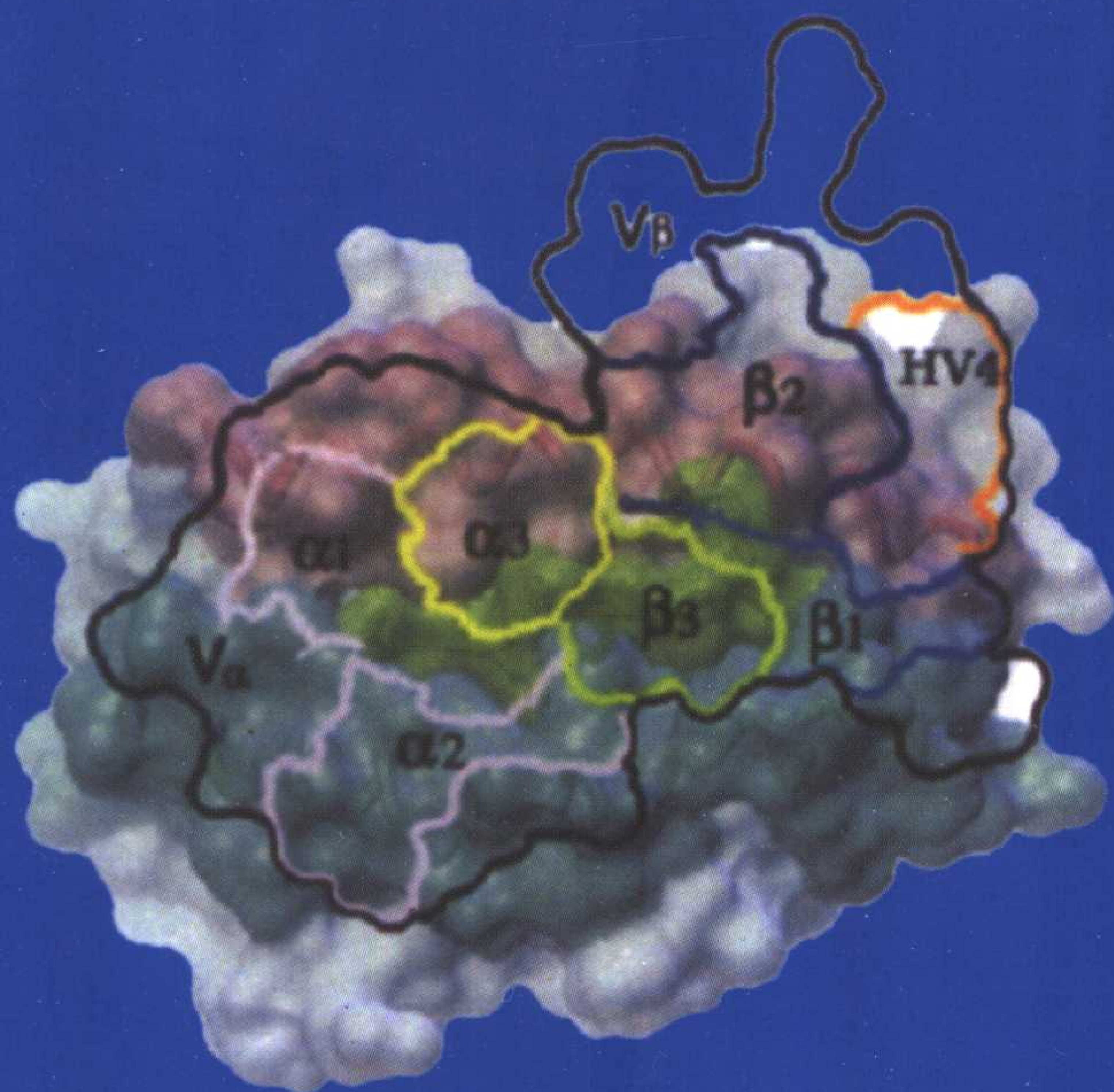
生命科学名著

〔美〕W.E.保罗 编著
吴玉章 等 译



基础免疫学

FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY
FOURTH EDITION

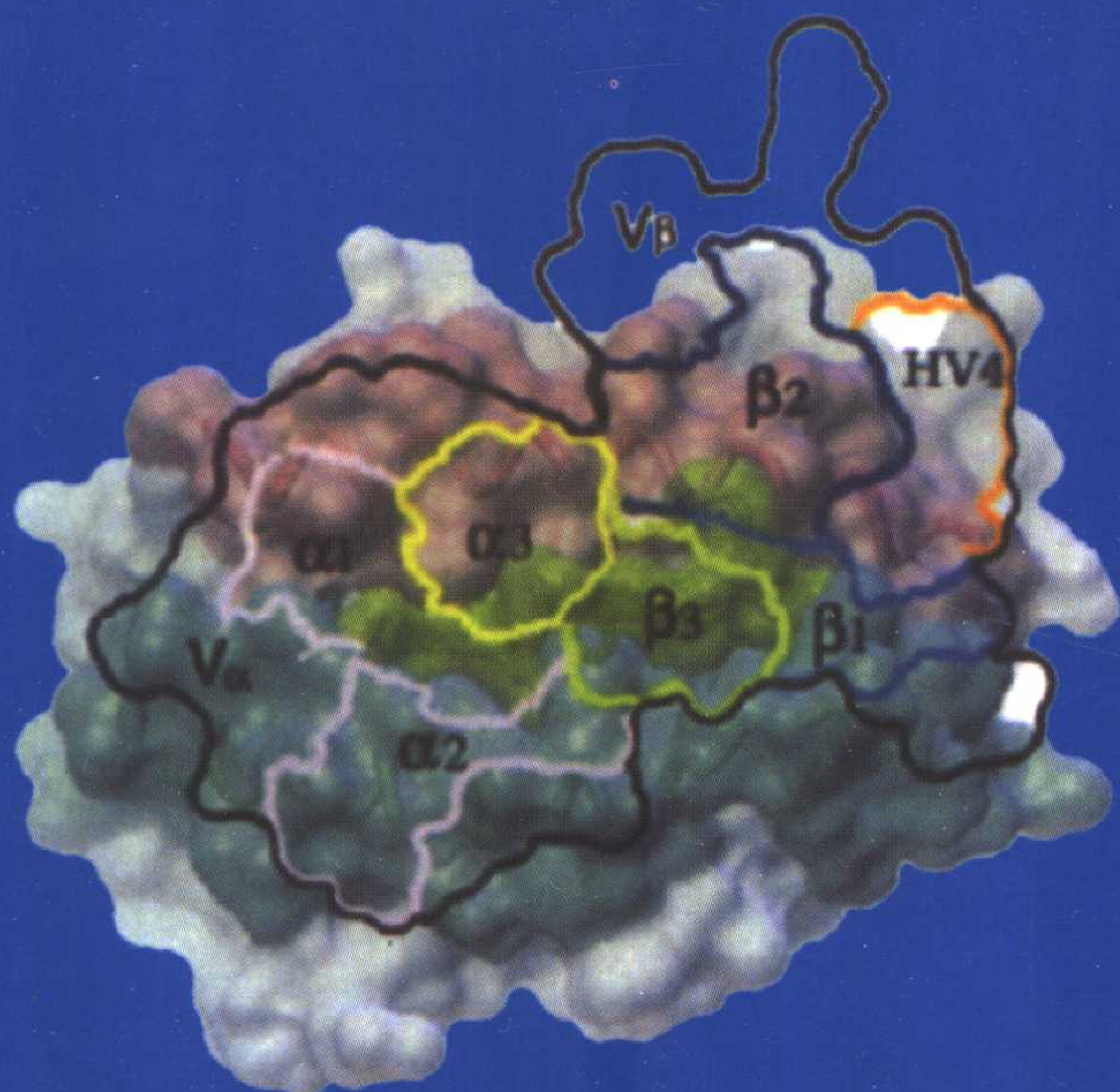
（上册）



科学出版社
www.sciencep.com

生命科学名著

〔美〕W.E.保罗 编著
吴玉章 等 译



基础免疫学

FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY
FOURTH EDITION

（下册）



科学出版社
www.sciencep.com

基 础 免 疫 学

（上　册）

Fundamental Immunology　Fourth Edition

〔美〕W. E. 保罗　编著

吴玉章 等　译

基　础　免　疫　学

（下　册）

Fundamental Immunology　Fourth Edition

〔美〕W. E. 保罗　编著
吴玉章 等　译

科　学　出　版　社
北　京

图字：01-2000-1930

内 容 简 介

本书是《基础免疫学》(Fundamental Immunology)第四版的中文翻译版。不仅介绍了免疫学的基础知识，也较为全面地反映了免疫学研究中的新进展，从不同水平阐述了免疫系统的主要组成和功能，以及免疫应答的规律和调节、免疫的效应机制。主要分为四大部分：现代免疫学的主要内容，以便免疫学知识背景有限的读者能有效阅读；免疫球蛋白和B淋巴细胞，包括免疫球蛋白的生物化学、相互作用、分子生物学、B细胞发育和活化的生物学；T淋巴细胞，将主要组织相容性复合体和抗原处理作为核心整合到T细胞识别过程中，还讨论了T细胞受体、发育、功能、活化，并特别强调了共刺激信号的作用；免疫系统的组成，免疫系统其他的重要细胞包括树突细胞、巨噬细胞、NK细胞，以及免疫系统进化。同时，本书还对免疫系统在疾病预防、致病作用及治疗中的基础免疫学机制进行了阐述。

本书可用作生物学和医学领域的本科生和研究生教材，并可用作免疫学相关专业的教学科研人员以及基础临床免疫学科研、检验、医护人员的参考书。

Published by arrangement with Lippincott Williams & Wikkins Inc., U.S.A.

本书提供了有关某些药物的详细而准确的提示、不良反应和服用剂量表，但这些情况是有可能会发生改变的。读者应仔细检查所述药物的包装以了解其制造商提供的信息数据。

图书在版编目(CIP)数据

基础免疫学(上、下册)/(美)保罗(Paul, W.E.)编著；吴玉章等译. —北京：科学出版社，2003.7

(生命科学名著)

书名原文：Fundamental Immunology. Fourth Edition.

ISBN 7-03-010280-0

Ⅰ.基… Ⅱ.①保…②吴… Ⅲ.免疫学-教材 Ⅳ.Q939.91

中国版本图书馆CIP数据核字(2002)第016457号

责任编辑：莫结胜 乐俊河/责任校对：钟 洋

责任印制：刘士平/封面设计：槐寿明

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100717

http://www.sciencep.com

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2003年7月第 一 版 开本：890×1240 1/16

2003年7月第一次印刷 印张：118 1/2 插页：4

印数：1—3 000 字数：3 570 000

定价：210.00元(上、下册)

(如有印装质量问题，我社负责调换〈环伟〉)

目　录

第三篇　T 淋巴细胞

第四篇　免疫系统的组成

第五篇　免疫应答的调节

下 册

第六篇　免疫的效应机制

第一篇　绪　　论

第1章　免疫系统导论

William E. Paul[①]

引言

免疫系统是机体非凡的防卫机制,在高等脊椎动物中最为完善。针对我们所生活世界上存在的极大数量的潜在的病原体,它能产生快速、高度特异性的反应,且通常是保护性的反应。实际上,严重免疫缺陷的悲剧性例子如明确的遗传性疾病和获得性免疫缺陷综合征(AIDS),展示了免疫应答在抗微生物感染中的核心作用。虽然有越来越多的理由认为免疫系统在肿瘤排斥中也发挥重要作用,但是大多数的免疫学家仍认为免疫系统形成的压力主要来自于微生物世界。 *1*

《基础免疫学》的主要目的是阐明:免疫系统的基本组成;多种临床疾病的免疫机制,包括感染性疾病的转归、肿瘤排斥、组织器官移植、自身免疫和其他免疫病理性疾病以及超敏反应;用疫苗接种来武装免疫从而

① W. E. Paul: Laboratory of Immunology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892.

提供对抗微生物病原的机制。

本章旨在为读者总体介绍我们对免疫系统的最新认识。这对于免疫学了解不多的读者尤为重要，为他们阅读后续章节作必要的准备。本章并不提供大量的参考文献，但每一个论题下的内容将会指明后续详细讨论该论题的章节。这些章节不但展开讨论，还将为读者提供全面的参考文献。

免疫应答的主要特征

初次应答

免疫应答由机体接触外界抗原物质，通常是感染性微生物所引发。感染个体迅速产生免疫原之抗原决定簇特异性抗体分子以及特异性调节性和效应性T细胞的扩增、分化。后者包括产生细胞因子的细胞和能溶破感染细胞的杀伤细胞。一般而言，初次免疫应答已足够控制和清除病原体。免疫系统最有效的功能就是发动从体内清除病原体的反应。

再次免疫应答和免疫记忆

初次免疫应答的结果之一就是被免疫个体成为免疫记忆状态。如果同一(或类似)病原体再次侵入，则产生再次免疫应答。通常抗体应答更快、更强，与抗原的亲和性更高、从体内清除病原体更有效。T细胞应答也存在类似的强化且通常更有效。其作用之一是病原体的初次感染可引发一种免疫状态以保护个体免于再次感染。多数情况下，这种保护基于高亲和力的抗体分子快速清除再次侵入的病原体。此即为疫苗接种的基础；疫苗接种的巨大威力在全球消灭天花和西半球完全控制脊髓灰质炎中得到展示(见第42章)。

免疫应答对众多抗原的高度特异性

免疫应答是高度特异的。病原体的初次免疫诱生的抗体和T细胞是病原体上的抗原决定簇特异性的，一般不能识别(或识别极差)不相关病原体上的抗原决定簇。事实上，免疫系统能区分的特异性抗原的数量巨大。

免疫系统对自身抗原耐受

免疫系统最重要和诱人的特点是能区分像病原体那样的外界抗原上的决定簇和宿主组织表达的决定簇。免疫系统忽视宿主抗原的能力是一个主动的过程，此过程被称之为免疫耐受，使可能识别自身抗原的T细胞的清除或失活。

对自身抗原的免疫应答导致自身免疫病

建立免疫耐受失败或非常规呈递自身抗原可引发针对宿主分子抗原决定簇的组织损害性免疫应答。这通常引起自身免疫性疾病。现在已经认识到一系列非常重要的疾病是自身免疫性疾病或具有自身免疫的重要特征，如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、胰岛素依赖性糖尿病、多发性硬化症、突眼性甲状腺肿和阶段性肠炎。通过调节自身免疫而治疗此类疾病是当代医学的重要课题之一。

艾滋病是免疫系统不能清除病毒而引起疾病的例子

针对感染因子的免疫应答并非总能清除病原体。在有些情况下，慢性感染使得免疫系统采用不同的策略以减少病原体或免疫应答引起的损伤。免疫应答不能清除病原最有名的感染性疾病的例子就是由人免疫缺陷病毒(HIV)引起的获得性免疫缺陷综合征(AIDS)。

免疫的主要特征

免疫的主要特征列举如下：

① 高度特异识别外界抗原并具备清除含该抗原之病原体的机制；
② 对数量巨大的不同抗原的特异性；
③ 免疫系统显示免疫记忆的能力；
④ 对自身抗原的耐受。

本章的以下部分将简述免疫系统的分子和细胞基础以及如何解释以上免疫应答的主要特征。

免疫系统的细胞及其特异性受体和产物

免疫系统由许多种不同类型的细胞组成，每种细胞均具有重要作用。由于淋巴细胞决定着免疫特异性，所以占据核心位置。其应答反应构成了免疫系统的效应臂。与淋巴细胞相互作用的细胞在抗原呈递和免疫效应的介导方面均起重要作用。这些细胞包括单核细胞/巨噬细胞、树突细胞和密切相关的朗格汉斯细胞以及自然杀伤细胞(NK)、肥大细胞、嗜碱性粒细胞及髓系细胞系的其他成员。此外，一系列特殊的上皮细胞和基质细胞为免疫应答的发生提供了解剖环境，并通过分泌重要的因子调节免疫系统细胞的生长和(或)基因活化。此类细胞在应答的诱发和效应阶段也发挥直接作用。

免疫系统的细胞可见于外周组织器官如脾、淋巴结、派尔集合淋巴结及扁桃腺。在这些组织中发生免疫应答。淋巴细胞还可见于胸腺、骨髓等中枢免疫器官，淋巴细胞在此进行发育并武装起来以介导成熟免疫系统大量的免疫应答。相当比例的淋巴细胞和巨噬细胞构成了血液和淋巴细胞的再循环库，以便将免疫细胞输送到所需部位并使得局部免疫全身化。

单一淋巴细胞群只对结构相关的有限的一组抗原应答。这种承约在免疫系统首次接触特定抗原之前已存在，表现为淋巴细胞膜表面存在抗原决定簇(表位)的特异性受体。每个淋巴细胞具有一群受体，所有受体均有特定的结合位点。淋巴细胞的一组或一个克隆与另一克隆受体的结合位点结构不同，因此其识别的免疫原性物质上的表位也不同。事实上，对任何非自身抗原均应答的能力是通过存在于不同淋巴细胞克隆的大量受体来实现的，其每一种受体对应一种表位。如此，淋巴细胞是一个高度异质性的细胞群。基于抗原特异性受体编码基因所产生异质性的推算，一个成年人的淋巴细胞受体的不同结合位点是数百万计。

3

淋巴细胞相互之间的不同不仅在于其受体特异性不同而且功能也不同。已认识到两种主要的淋巴细胞类别：B 淋巴细胞，抗体分泌细胞的前体细胞；T 淋巴细胞(胸腺来源)。T 淋巴细胞具有重要的调节功能，如辅助功能，有些情况下则抑制特异性免疫应答包括 B 细胞产生抗体和增强巨噬细胞的杀菌功能。另外一些淋巴细胞则参与直接效应如溶破病毒感染细胞或特定的肿瘤细胞。

B 淋巴细胞和抗体(第 3～7 章)

B 淋巴细胞的发育(第 6 章)

B 淋巴细胞来源于造血干细胞，后者经历了一系列目前只部分了解的复杂分化事件而发育成熟(图 1.1)。图示的是早期 B 细胞系发育成成熟 B 细胞的分子机制。这些事件发生在胎肝，在成人则主要发生在骨髓。与特定基质细胞及其产物包括细胞因子如 IL-7 的相互作用对此过程的正常调节至关重要。

B 细胞发育的主要事件发生在原 B 细胞和前 B 细胞。它们是编码 B 细胞表面受体基因组分排列组装的中心。B 细胞受体是表达在细胞表面的特殊的免疫球蛋白分子。免疫球蛋白分子是由重(H)链和轻(L)链组成的异源双体，每条链均含有抗原结合区(可变区，V 区)。一种免疫球蛋白的 V 区与另一种免疫球蛋白呈高度变异(图 1.2)。此外，重链和轻链均含有非变异区或恒定区。

编码免疫球蛋白重链和轻链可变区的基因组分在胚系 DNA 或非淋巴系细胞 DNA 上并不是连续的(图 1.3)。在原 B 和前 B 细胞，这些遗传组分易位构成可表达的 V 区基因。此过程包括在大量潜在可用的 V 区(V)、多样区(D)和铰链(J)组分中以组合的方式进行选择。这种组合性易位加上增加连接多样性的系列相

4

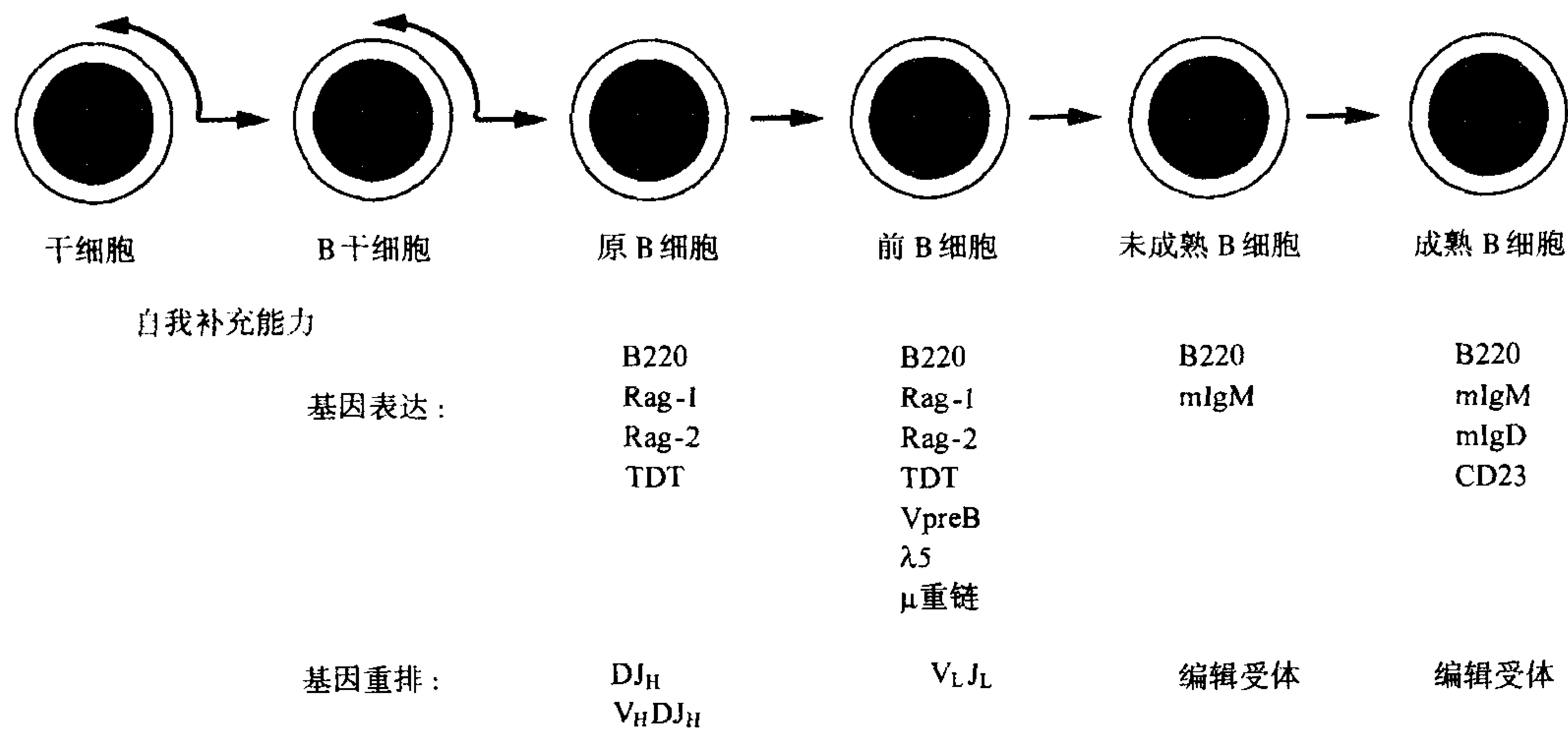


图1.1　B细胞的发育途径。B细胞由造血干细胞发育而来。这些细胞和B干细胞(即具有大部分形成B细胞系的分化能力的自我补充细胞)使该系具有更多的相同成员。干细胞和B干细胞均具有自我更新的能力。B细胞系第一个明确的成员是原B细胞。Ig基因重组过程开始于该细胞，主要限于重(H)链。它表达B细胞CD45(B220)(活化Rag-1和Rag-2基因的重组酶)和末端脱氧核苷转移酶(TDT)(负责添加N区的酶)。成功完成 V_HDJ_H 重排和 μ 重链表达表明重链基因重排的结束和轻链基因重排的开始。它标志着前B和原B细胞的分界。前B细胞继续表达CD45和Rag-1、Rag-2，但停止表达TDT。它们表达能与 μ 重链共同表达在细胞表面的编码替代轻链的基因(VpreB和λ5)。一旦轻链重排能提供能与可表达的 μ 重链配对的轻链，该细胞即被认为是有表面IgM的非成熟B细胞。随着δH(即膜IgD)和一组其他标志(CD23即是其中一个)，该细胞即被认为进入成熟状态。

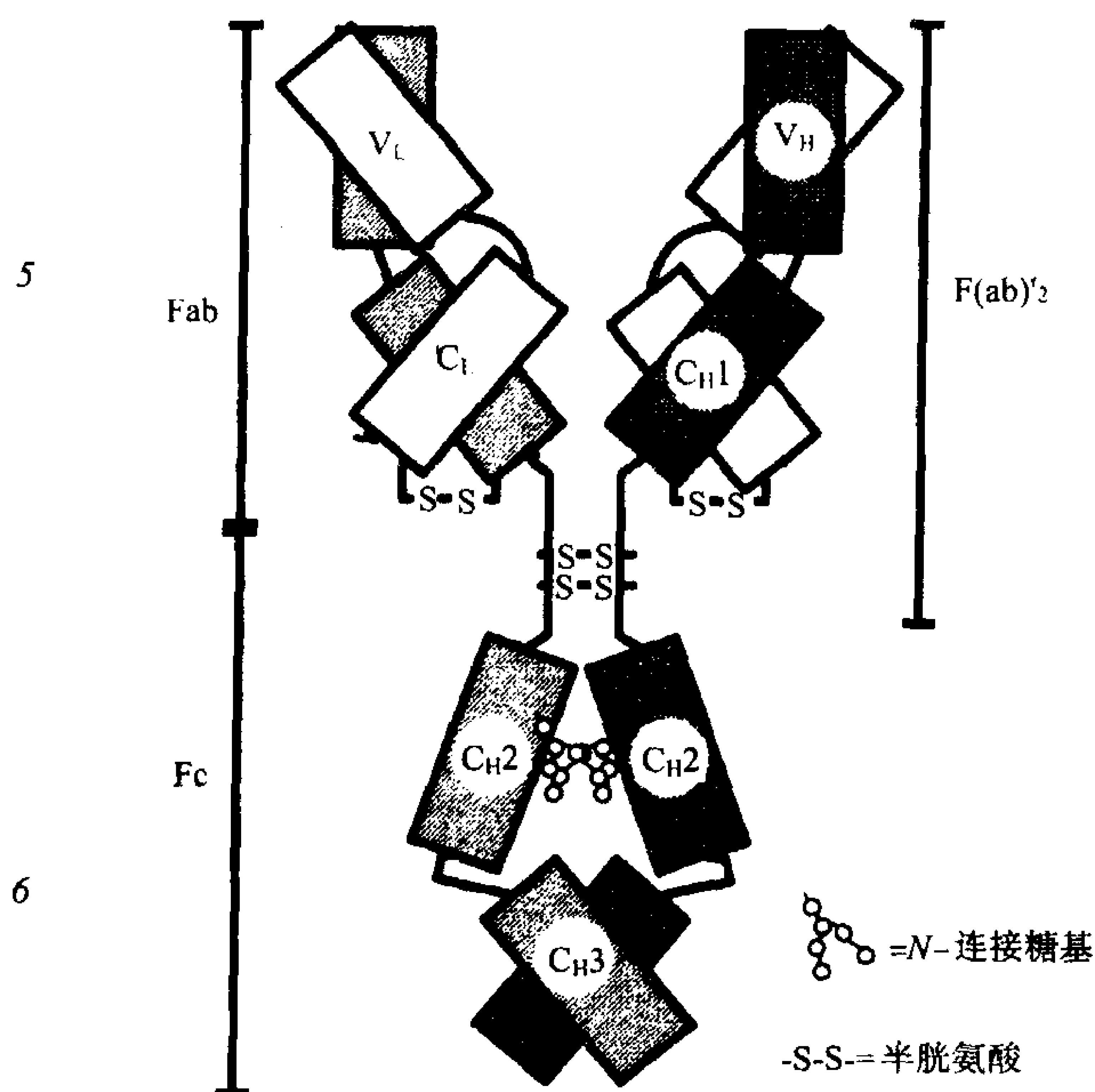


图1.2　Ig分子示意图。表明重链和轻链的V区和 C_H1、C_L 如何互相配对及重链的 C_H2、C_H3 区如何配对。(本图也见于第3章。)

关事件，可导致极大数目的不同重链和轻链的产生。重链和轻链以近似随机的方式配对可进一步形成的免疫球蛋白分子的多样性。

重链可变区起初与恒定(C)区称为 μ 的基因元件共同表达。这些基因共同编码免疫球蛋白 μ 类重链，后者用于IgM型免疫球蛋白。

成功完成免疫球蛋白基因重排过程和在细胞膜表面表达相应的IgM标志着前B到B细胞的转变(图1.1)。新分化的B细胞开始只表达IgM类免疫球蛋白。细胞完成其成熟过程则在其表面表达第二类免疫球蛋白(IgD)，后者含相同的可变区(VDJ)但不同的恒定区；第二类免疫球蛋白的重链称为δ，其相应的免疫球蛋白分子为IgD。

整个分化过程受检测系统的数个步骤调节以确认前一步是否成功完成。主要检测细胞表面是否表达了正确结构的免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子。例如，在Igμ链成功组装完成而轻链尚未组装前的阶段，μ 链与替代轻链共同表达在细胞膜表面。不能表达这种 μ/替代轻链复合体的细胞不能进入下一分化阶段或不能很有效的分化。通常认为这种细胞表面分子的表达提示有配体存在，与此配体的结合决定着细胞进入下一步分化过程。

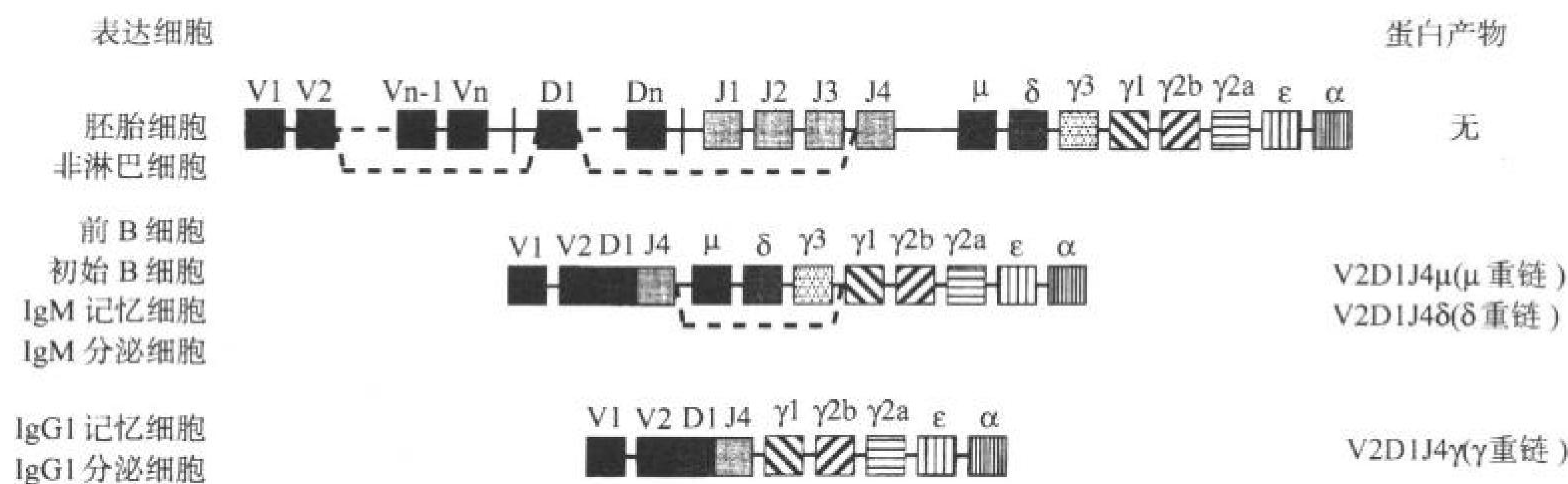


图1.3 小鼠Ig重链基因的结构和易位。Ig重链由4个不同的基因组分编码:Igh-V(V)、Igh-D(D)、Igh-J(J)和Igh-C(C)基因。V、D、J基因共同决定了重链可变区,Igh-C决定了C区。同一V区可与每一种C区相关联(如μ、δ、γ1、γ2、γ3、γ4、ε、α)。在胚系基因组中,V、D、J基因互相分离且其中每种基因均有多种形式。在淋巴细胞发育过程中,VDJ基因复合物是由V基因和D基因易位形成以便于连接到一个J基因旁同时切除干扰基因。VDJ复合物开始与μ和δC共表达不过其后发生易位,以便于使它靠近其他C基因(如γ1)并导致VDJγ1链的表达。

B淋巴细胞的活化(第7章)

成熟B细胞接触抗原后通过其表面的免疫球蛋白分子识别表位而被活化(图1.4)。该活化过程可是直接的:依靠抗原桥联膜免疫球蛋白分子(桥联依赖的B细胞活化);也可是间接的:通常最有效发生在被称之为关联性辅助过程中,与辅助性T细胞密切相互作用的背景下。

由于每个B细胞具有含可变区完全相同的膜免疫球蛋白分子,细胞表面受体的桥联要求抗原含有与受体结合部位互补结合的表位的拷贝数在一个以上。许多单一蛋白质抗原不含重复的抗原决定簇,因此,只有

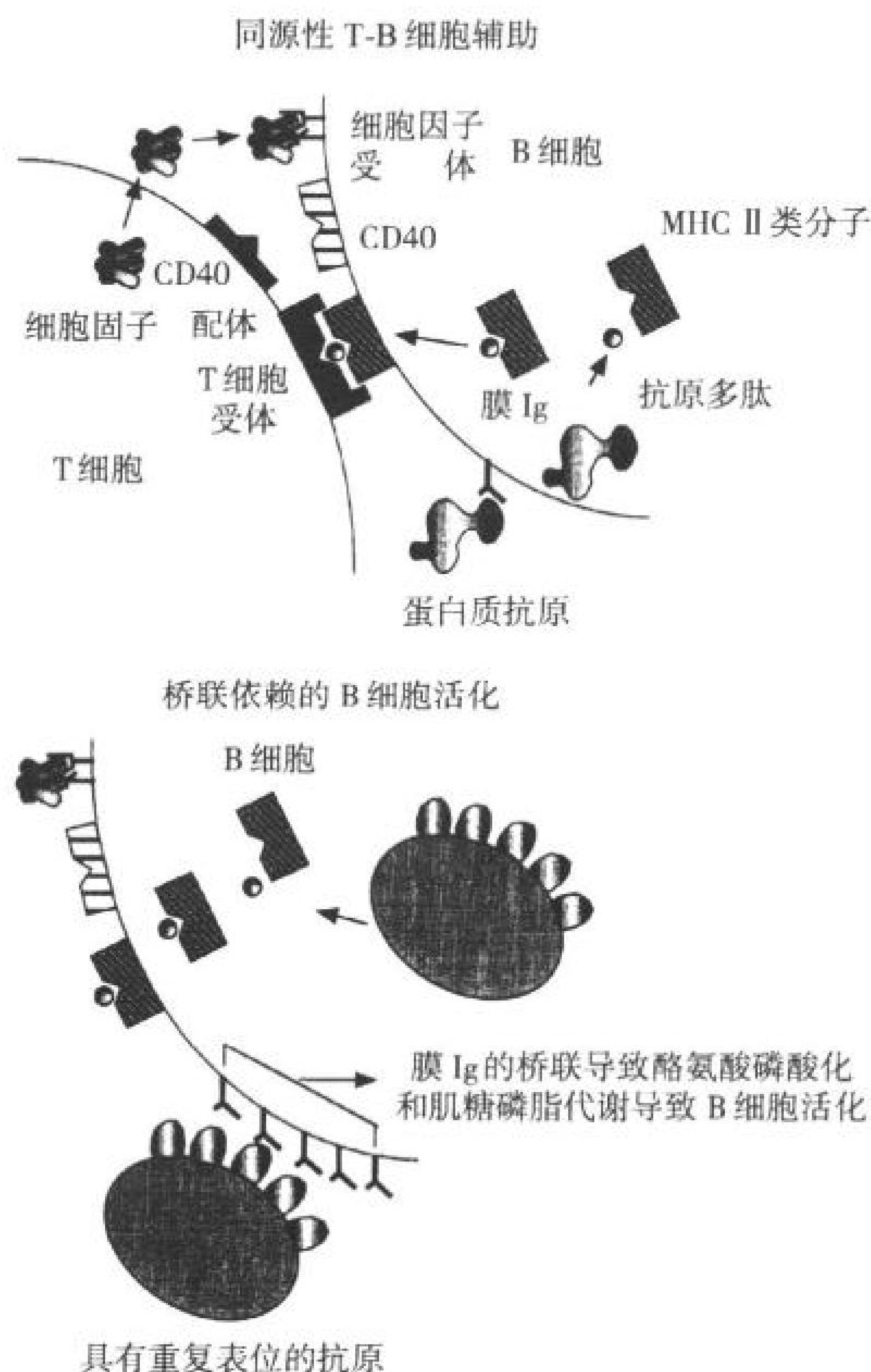


图1.4 B细胞活化的2种方式。A:同源性T/B细胞辅助。静息B细胞通过其膜表面与表位互补的Ig与含表位的抗原结合。由于该抗原不含一个以上拷贝的该表位而不能桥联B细胞受体,它将被内吞并进入后期内体和溶酶体被降解为多肽。一些多肽被装载到MHCⅡ类分子并被带到细胞膜,在细胞膜上被具有B细胞多肽MHC复合物特异受体的CD4$^+$T细胞所识别。这种相互作用反过来使得T细胞上的活化配体(CD40配体)与其B细胞上的受体(CD40)结合并转导B细胞活化。另外,T细胞分泌数种细胞因子通过与B细胞上相应受体结合而调节B细胞的生长和分化。B:桥联依赖性B细胞活化。当B细胞接触含多拷贝表位的抗原时,产生的桥联刺激了细胞内的生化信号。后者包括酪氨酸磷酸化和增强肌糖磷脂代谢。这些反应加上细胞因子的作用使B细胞活化、生长和分化。B细胞继续表达装载多肽的MHCⅡ类分子。后者可来自于抗原或其他来源,但似乎不在此活化过程中发挥直接作用。与此相似,CD40似也不在此活化过程中发挥直接作用。如文中所提到的,在许多情况下B细胞采用2种活化途径。

多糖和其他含重复表位的抗原才能满足这个要求。这些抗原包括医学上重要微生物如肺炎球菌、链球菌、脑膜炎球菌的胞壁多糖。与此相似,在单个免疫原颗粒表达多个相同表位者还包括许多种病毒,因在其表面有多个拷贝的外壳蛋白。桥联依赖性 B 细胞活化在对抗此类病原体中是主要的保护性应答。补体组分(见第 29 章)与抗原或抗原-抗体复合物的结合可增强桥联依赖性 B 细胞活化,这是由于补体受体与其他分子的共同作用增加了 B 细胞对一定量抗原的反应强度。

关联性辅助允许 B 细胞对不能桥联受体的抗原产生应答,与此同时,可提供共刺激信号,在 B 细胞受到弱的桥联事件刺激时防止细胞失活。关联性辅助依赖于抗原与 B 细胞表面膜免疫球蛋白分子结合,并在细胞的内体/溶酶体内降解为多肽。生成的某些多肽被装载入由一组特定的细胞膜蛋白——MHC Ⅱ类分子形成的结合槽中。最后形成的 MHC Ⅱ分子-多肽复合物表达在细胞表面。正如下面要讨论的那样,此类复合物是被称之为 $CD4^+$ T 细胞的一群 T 细胞抗原特异性受体的配体。具有 B 细胞表面表达的 MHⅡ-多肽复合物特异性受体的 $CD4^+$ T 细胞识别并相互作用于 B 细胞。通过 T 细胞表面分子[如 CD40 配体(CD40L)]和 T 细胞产生的细胞因子的相互作用而导致 B 细胞活化(图 1.4)。B 细胞抗原受体的作用是在抗原特异性 B 细胞表面产生 T 细胞配体;而 B 细胞活化主要源于 T 细胞的作用。但是,在很多生理情况下,受体桥联刺激和关联性辅助互相协同以提供更强的 B 细胞应答。

B 淋巴细胞的分化(第 6、7、24、25 章)

B 细胞活化使细胞分裂并分化为抗体分泌细胞或记忆细胞,因此有更多的细胞是抗原特异性的,而这些细胞具有新的特征。这种环境下的抗体产生属初次抗体应答。记忆细胞引起的抗体产生基于对个体的再次刺激。再次刺激之抗体应答(再次应答)的主要特点是反应更强、发生更快、抗体对抗原的亲和性更高、占优的免疫球蛋白不是初次应答占优的 IgM 而是表达 C_γ、C_α 或 C_ϵ 的免疫球蛋白。

细胞分裂和分化为抗体分泌细胞主要由 T 细胞表达的 CD40L 与 B 细胞相互作用及 T 细胞产生的细胞因子如 IL-4、IL-5、IL-6 或 IL-2 所控制。

活化的 B 细胞分化为记忆细胞发生在具有特定微环境结构的脾脏和淋巴结的生发中心。抗体亲和性增加的过程同样发生在生发中心。后一过程叫做亲和成熟,基于体细胞高突变和抗原介导的细胞选择,选择后的细胞受体对抗原的亲和力增强。

重链 V 区变为与编码 C 区的基因共表达而不再是 μ 和 δ 的过程叫免疫球蛋白类转换。它是通过基因易位机制将编码 V 区的基因元件和新表达的 C 基因间的原 C 区基因切除,这样转类的 C 基因占据了原 C_μ 的位置(图 1.3)。切除的基因常在大环型 DNA 中找到。

B1 或 $CD5^+$ B 淋巴细胞(第 6 章)

第二群 B 细胞在多个重要方面与优势(或传统)B 细胞不同。这些细胞首次发现是一些表达表面蛋白 CD5 的细胞,此蛋白在其他 B 细胞一般不表达而在所有的 T 细胞表达。成年小鼠 B1 B 细胞在腹腔的发现频率较高而在脾脏和淋巴结出现频率极低。胎儿期和围产期也存在相当数量 B1 B 细胞。

已有的证据提示 B1 B 细胞来源于胎肝中的另一组干细胞,后者未见于(或出现几率很低)成年骨髓。这提示 B1 B 细胞在成年未能再得到补充。与传统 B 细胞的分裂与记忆由抗原引导不同,B1 B 细胞是自我更新的。

传统 B 细胞和 B1 B 细胞的独特功能仍是致力研究的课题,而 B1 B 细胞具有较强的识别自身抗原的习性且可能负责产生正常小鼠血清中的大部分 IgM。

B 淋巴细胞的耐受(第 20 章)

免疫系统的一个核心问题是能对外界可能致病的抗原产生高效的免疫应答,对宿主自身组织相关抗原则无反应。现在认为对自身抗原的不应答涉及多种机制。其主要机制可能是清除了具有自身反应性的细胞

或使此类细胞失活。具有重复性表位能引起膜免疫球蛋白桥联的抗原刺激非成熟和初始 B 细胞可导致 B 细胞清除,特别在缺少 T 细胞辅助的情况下更易发生。这种潜在自身反应性细胞的清除通常称为克隆清除。然而,许多自身抗原并不接触发育中的 B 细胞或不能有效桥联 B 细胞受体以启动克隆清除过程。此类细胞即使是成熟后,也可因受体桥联缺少必要的共刺激信号而失活。这种失活的细胞仍可保留在体内但对抗原不能应答称为无反应性。当去掉无反应性的刺激信号则此类细胞重新获得反应性。

免疫球蛋白(第 3 ~ 5 章)

结构(第 3 章)

B 细胞的抗原特异性膜受体和其分泌产物均为免疫球蛋白分子。免疫球蛋白分子是一个含众多蛋白质成员的大家族,称为免疫球蛋白超家族。免疫球蛋白超家族的成员具有序列同源性、共同基因结构和相似的三维结构。后一结构称为免疫球蛋白折叠结构,通常由 7 个 β 折叠构成 2 个平行相对的层面(图 1.5)。许多参与免疫识别过程的细胞表面蛋白如 T 细胞受体(TCR)、CD3 复合物、B 细胞受体关联分子(Igα 和 Igβ)都属免疫球蛋白超家族成员。

免疫球蛋白自身形成由 2 条重链和 2 条轻链组成的结构域(图 1.2)。重链和轻链由系列结构域组成,每个结构域约含 110 个氨基酸。

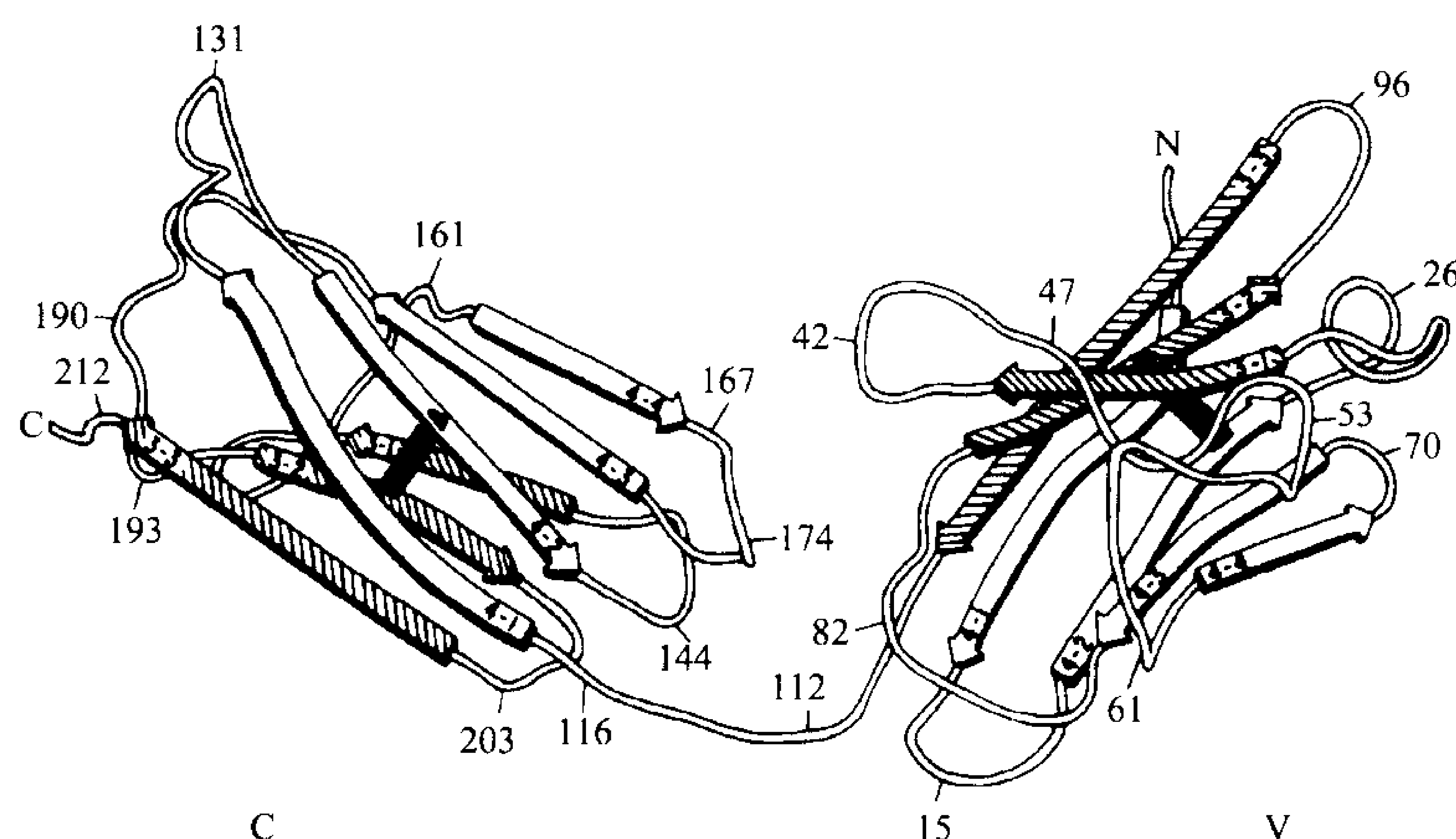


图 1.5 轻链 V 和 C 结构域示意。β 链参与每个结构域的反平行 β 折叠片层,用箭头表示。3 链片层用涂影线而 4 链片层用无色框。数字排序采用 Edmundson 法。链内二硫键用黑色线条表示。以 N 端第 1 个氨基酸为 1,选择性标示了一些氨基酸。(由 Edmundson AB, Ely KR, Abola EE, Schiffer M, Panagiotopoulous N 允许复制。Rotational allomerism and divergent evolution of domains in immunoglobulin light chain. Biochemistry 1975; 14: 3953 ~ 3961)

有 2 型轻链(κ 和 λ),每型均由 2 个结构域组成。每一型轻链 C 端结构域是相同的,被称之为恒定(C)区。如前所述,轻链间 N 端结构域不同形成抗体的结合位点。由于其变异性,被称之为可变(V)区。此区的变异性主要集中在 3 个部位,称为高变区或互补决定区(CDR)。CDR 所含氨基酸构成轻链的抗体结合位点。3 个 CDR 被 4 个低变区分割开,后者称为骨架区(FR)。

免疫球蛋白重链有 5 类[μ、δ、γ(有数个亚类)、α 和 ε]。组装好的免疫球蛋白分子含一个或数个由 2 条相同的轻链和重链组成的结构单元,并根据所含重链命名。这样就有 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE 抗体。每条重链由一个氨基端 V 区和 3 ~ 4 个 C 区组成。在许多情况下重链铰链区将第一 C 区和第二 C 区分开以赋予分子有更大的可变性,允许单个结构单元的 2 个抗体结合位点相互移动以促进单个抗体分子对含一个以上表位拷贝的抗原结合。这种对于单个抗原结构的双价结合增加了相互作用的获能。像轻链一样,重链 V 区含 3 个 CDR 形成抗体的结合位点,另有 4 个 FR。

每类重链的 C 区为相应的抗体赋予了特定的功能。每类抗体的不同功能如下。

8

① IgM 抗体是高效的补体系统激活因子(第 29 章)。

② IgA 能分泌到各种体液并主要负责黏膜免疫(第 27 章)。

③ IgE 结合嗜碱性粒细胞和肥大细胞上的特异性受体(FcεRI)。一旦与抗体桥联,IgE/FcεRI 复合物引发细胞

释放一系列过敏性炎症介质(第35章)。

④ IgD只作为抗原的膜受体。

⑤ IgG抗体,在人类和小鼠均有4个亚类,介导广泛的功能,其中包括通过胎盘和通过抗原-抗体复合物结合巨噬细胞和其他类型细胞上的Fc受体而发挥抗原的调理作用。

IgD、IgG和IgE是由2条轻链和2条重链组成的单个结构单元。IgM抗体则由5~6个这样的结构单元构成,但作为膜受体时仅有一个结构单元。IgA可有一个或多个结构单元。抗体有一个以上结构单元时通常需要另外的多肽片段即J链,它在多单元结构中发挥重要作用。

每种免疫球蛋白均可以以分泌抗体和膜分子的形式存在。特定细胞产生的同一类抗体和细胞表面受体具有除C端外的相同结构。膜免疫球蛋白含有一跨膜的疏水区和一短的胞质尾,此两种结构在分泌型中则不具备。

免疫球蛋白的遗传学(第5章)

在前面已暗示了免疫球蛋白重链的基因组成。成熟淋巴细胞的免疫球蛋白重链基因来源于胚系基因中相互分离的一组基因。V区有3种基因成分组成:V_H、D、J_H。共有100种以上的V_H基因,10种以上的D基因和较少数目的J_H基因(小鼠有4种)。一种重链V_HDJ_H基因是通过一个染色体上的一个D基因易位到该染色体上的一个V_H基因并通常切除干扰DNA而产生。紧接着发生二次易位,使一个V_H基因与排布好的基因并置从而产生V_HDJ_H(V区)基因(图1.3)。虽然可能V_H、D、J_H的选择和排布并非完全随机,但组合的过程允许产生很大数目的重链V区基因。另外的多样性是通过不精确的连接事件、删除核苷酸、添加D和J_H之间、V_H和D之间新的非模板核苷酸从而在这些区域形成N区等产生。这进一步增加了不同重链的多样性并使其从胚系中获取相对适度的遗传信息。

轻链的组装遵循大致相似的规则。但轻链仅以V_L和J_L基因组装。虽然也有连接的多样性,但轻链没有N区。另外的多样性由κ和λ两类轻链提供。

免疫球蛋白分子由重链多肽和轻链多肽配对组装而成。尽管这一过程几乎可以肯定非完全随机,但它允许产生大量的不同免疫球蛋白分子,其中大部具有单独的特异性。

重排事件导致免疫球蛋白分子重链和轻链的组装分别发生在B细胞发育的原B和前B细胞(图1.1)。此过程受重排事件中免疫球蛋白产物的调节。μ链的形成提示重链基因重排的结束和轻链基因重排的开始,在后者κ链一般先于λ链的重排。由此带来的重要后果之一是在一个给定的细胞只产生一种可表达的μ链,因为第一个表达的μ链消除了在可能的染色体产生可表达μ链的可能性。相似的机制确保只产生一条轻链基因,这导致等位基因排斥。这样在重链和轻链两种交替的等位基因中只有一种得到表达。与此密切相关的轻链同种异型排斥现象确保在单个细胞只产生κ链或λ链,而不能同时产生两种。等位基因排斥显而易见的后果是单一B细胞产生的抗体均具有相同的轻链和重链V区,是免疫应答克隆选择理论预示的核心内容。

类转换(第24章)

单个B细胞能持续表达同样的免疫球蛋白重链V区,但是随着其不断成熟能将重链C区转换成可用形式(图1.3)。这样表达IgM和IgD类受体的细胞可分化成为表达IgG、IgA或IgE受体并进一步成为分泌与细胞膜表面同类抗体的细胞。这一过程允许产生具有相同的抗原结合特异性而又介导不同生物功能的抗体。与抗体亲和成熟过程结合在一起,免疫球蛋白类转换为抗体以极高的效率防止微生物病原再感染和迅速清除该病原体。这两种互相关联的现象解释了再次免疫应答中产生的高效抗体。

转换区位于每一C区的上游(δC区除外)。已知类转换过程与含重复序列的特定转换区间的重组事件有关。如此,μC_H区基因上游的S区与一个下游亚型如$S_\gamma1$之上游S区重组产生嵌合$S_\mu/S_\gamma1$区并导致干扰

DNA 切除(图 1.6)。编码 α 链、ε 链、不同 γ 链(在人类为 γ1、γ2、γ3、γ4;在小鼠为 γ1、γ 2a、γ 2b、γ3)C 区的基因位于 C_{μ} 和 C_{δ} 基因的 3′端。

类转换过程的诱导基于一组特定的 B 细胞刺激物的作用。其中,研究最为广泛的是细菌脂多糖(LPS)和表达于活化 T 细胞表面的 CD40L。作为类转换结果的 C 区表达定位主要取决于细胞因子。这样 IL-4 决定了在人类和小鼠将转换为 εC 区和 γ4(人类)或 γ1(小鼠)C 区。在小鼠,γ 干扰素(IFN-γ)决定了转换到 γ2a 而转化生长因子-α 决定了转换到 α。提示生理因素决定了类转换过程的特异性。细胞因子通常是决定免疫球蛋白类转换到何种亚类的主要因素,这也在逻辑上提出了这样的疑问:是什么调节不同免疫方式产生的特定细胞因子的相对量?

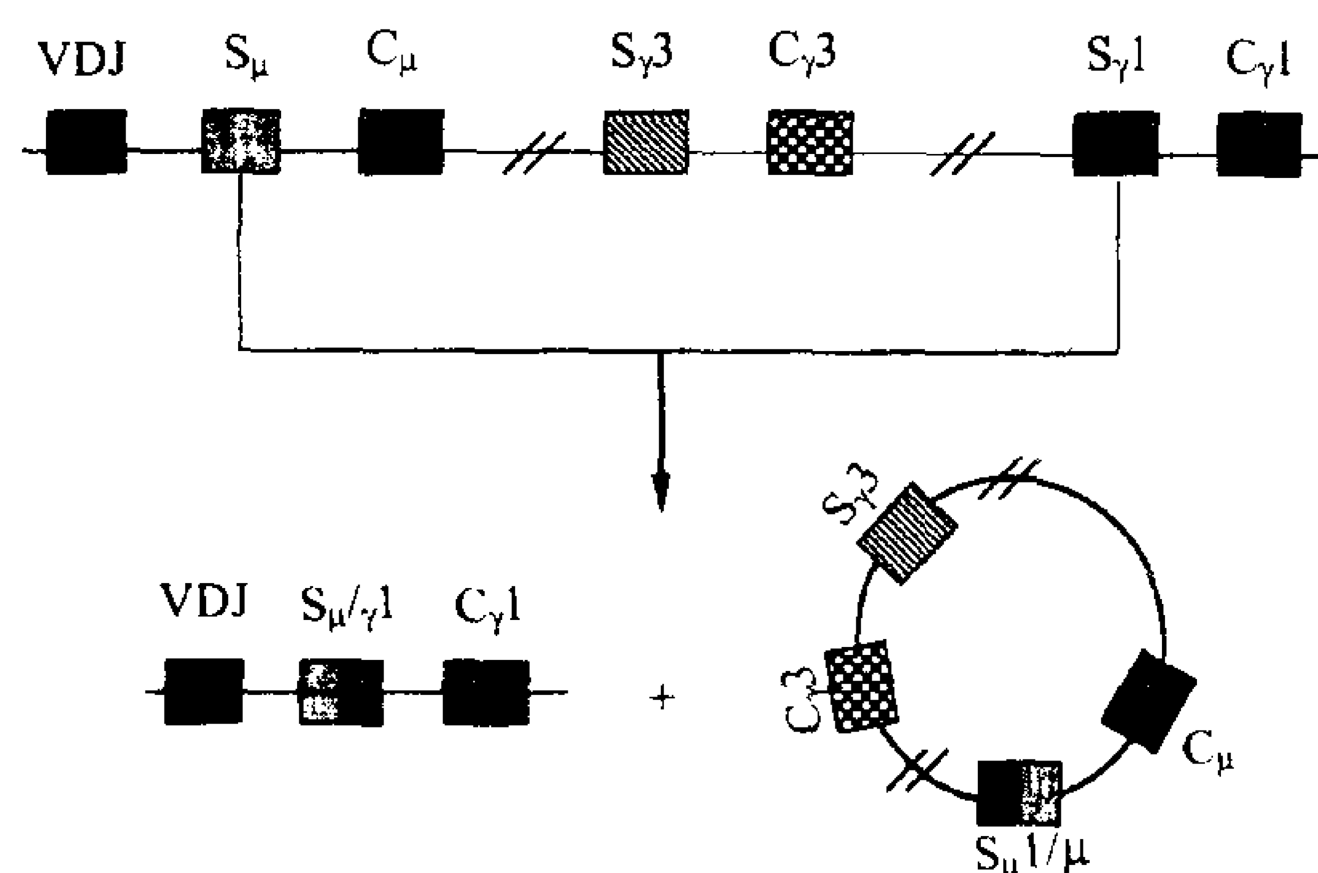


图 1.6 Ig 类转换。描绘的是活化的 B 细胞内 VDJ 基因可将 C 区从 μ 转换为其他如 γ1。在 S_{μ} 的一个酶切位点和 $S_{\gamma}1$ 的一个酶切位点之间的 DNA 形成了环型游离体,此为重组事件的发生部位。结果使得 $C_{\gamma}1$ 定位于紧挨嵌和区 $S_{\mu}/C_{\gamma}1$ 的下游,以使得上游 VDJ 基因转录可形成 VDJC_{γ}1mRNA 和 γ1 重链蛋白。

亲和力成熟与体细胞高突变(第 14、25 章)

多样性的形成过程具体体现在轻链和重链 V 区基因的构建和轻链和重链的配对产生了大量的不同抗体分子,而每个 B 细胞只表达一种。此原始库谱足够大以致外界抗原上的大多数表位均可与 B 细胞上的互补受体结合。所以,如果有足够的 T 细胞辅助,免疫系统能对巨量的外界物质产生抗体应答。然而,最早产生的抗体通常对抗原有相对较低的亲和性。最先产生的抗体通过 IgM 得到补偿。即使单个结合位点只有适度的亲和力,它作为五聚体可通过多价结合而达到高度亲和(见第 4 章)。在 T 细胞依赖的 B 细胞刺激过程中,特别在生发中心,体细胞高突变的过程被启动并导致大量突变事件发生且大部分限定在轻链和重链的 V 区基因及其紧邻内含子。

在体细胞高突变过程中,突变概率可达每代 1/1000(以 bp 计)。这预示着每个细胞每次分裂在重链或轻链 V 区几近发生一次突变。这使抗体多样性数目大增。虽然大部分突变不影响抗体与其配体的亲和性甚至降低亲和性,但某些则增加亲和性。这样,某些 B 细胞显现比原应答细胞群更强的抗原结合性。由于在生发中心有一个主动的凋亡过程,而 B 细胞可通过其膜受体与抗原结合得到拯救,具有高亲和性受体的 B 细胞比其他抗原特异性 B 细胞具有优势,因而成为应答细胞群的优势细胞。这样,再次免疫产生抗体的亲和性将高于初次应答。随着免疫后时间的增加,产生的抗体亲和性将增强。这一过程导致免疫后的个体出现高亲和力抗体,后者在防止微生物及携带抗原的其他病原体感染上,比初次产生的抗体更有效。与抗体型转换配合,亲和突变可提高抗体预防病原再次感染的效率,即使该个体先前曾接触过该病原体。

T 淋巴细胞(第 10~12 章)

T 淋巴细胞是第二类主要的淋巴细胞。它们来源于造血组织中的前体细胞,并在胸腺中分化(因而得名为 T 淋巴细胞),然后进入外周淋巴组织和淋巴细胞再循环库(见第 14 章)。根据其细胞表面表达的受体不同,T 细胞可分为两类。大多数 T 淋巴细胞表达由 α 链和 β 链组成的 TCR,小部分 T 淋巴细胞表达 γ 链和 δ 链组成的受体。在 α/βT 细胞中有 2 个亚系:表达共同受体分子 CD4 的 T 细胞($CD4^+$ T 细胞)和表达 CD8 的 T 细胞($CD8^+$ T 细胞)。这些细胞在如何识别抗原方面截然不同且介导不同类型的调节和效应功能。

$CD4^+$ T 细胞是免疫系统主要的调节细胞。它们的调节功能依赖于活化后表达的细胞表面分子如 CD40L 和活化后所分泌的各种细胞因子。被激活的 $CD4^+$ T 细胞倾向于分化成主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10 的(Th2)细胞和主要分泌 IL-2、IFN-γ 及淋巴毒素的(Th1)细胞。Th2 细胞在辅助 B 细胞发展成为抗体分泌细胞

方面非常有效，而 Th1 细胞是细胞免疫应答的有效诱导者，这包括增强单核细胞和巨噬细胞的杀菌活性和溶解细胞内微生物的效率。

T 细胞也介导重要的效应功能。部分取决于它们所分泌的细胞因子谱。这些强效分子对靶细胞有直接毒性并启动有力的炎症机制。另外，T 细胞，尤其是 $CD8^+$ T 细胞，能分化为细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T-lymphoayte，CTL)，它能识别和溶破表达抗原的靶细胞。

T 淋巴细胞抗原识别(第 8～10 章)

T 细胞与 B 细胞识别抗原的机制不同。B 细胞的受体——免疫球蛋白结合的是可溶性分子或颗粒表面的抗原表位。B 细胞受体识别表达在原型分子表面的表位。抗体和 B 细胞受体参与结合、对抗细胞外液的微生物。

相比之下，T 细胞总是识别其他细胞表面的抗原并通过与这些抗原呈递细胞(antigen-presenting coll，APC)相互作用和改变其行为而发挥功能。事实上 TCR 不能识别完整的、变性分子上的抗原决定簇。它识别的是由抗原水解形成的多肽结合于 MHC Ⅰ类分子或Ⅱ类分子结合槽中形成的复合物。$CD4^+$ T 细胞与 $CD8^+$ T 细胞的区别在于 $CD4^+$ T 细胞只识别多肽-MHCⅡ类分子复合物，$CD8^+$ T 细胞识别多肽-MHCⅠ类分子复合物。

TCR 的配体(即多肽-MHC 复合物)在 APC 内生成。一般而言，MHCⅡ类分子结合的多肽来源于 APC 通过内吞过程获取的蛋白质(图 1.7)。这些内吞的蛋白质在内体/溶酶体内被蛋白水解酶片段化，产生的多肽装载到 MHCⅡ类分子上。然后这些装载多肽的 MHCⅡ类分子被转运到细胞表面，供能识别细胞表面复合物的 $CD4^+$ T 细胞之 TCR 结合。因此，$CD4^+$ T 细胞专门识别细胞外来源的抗原。

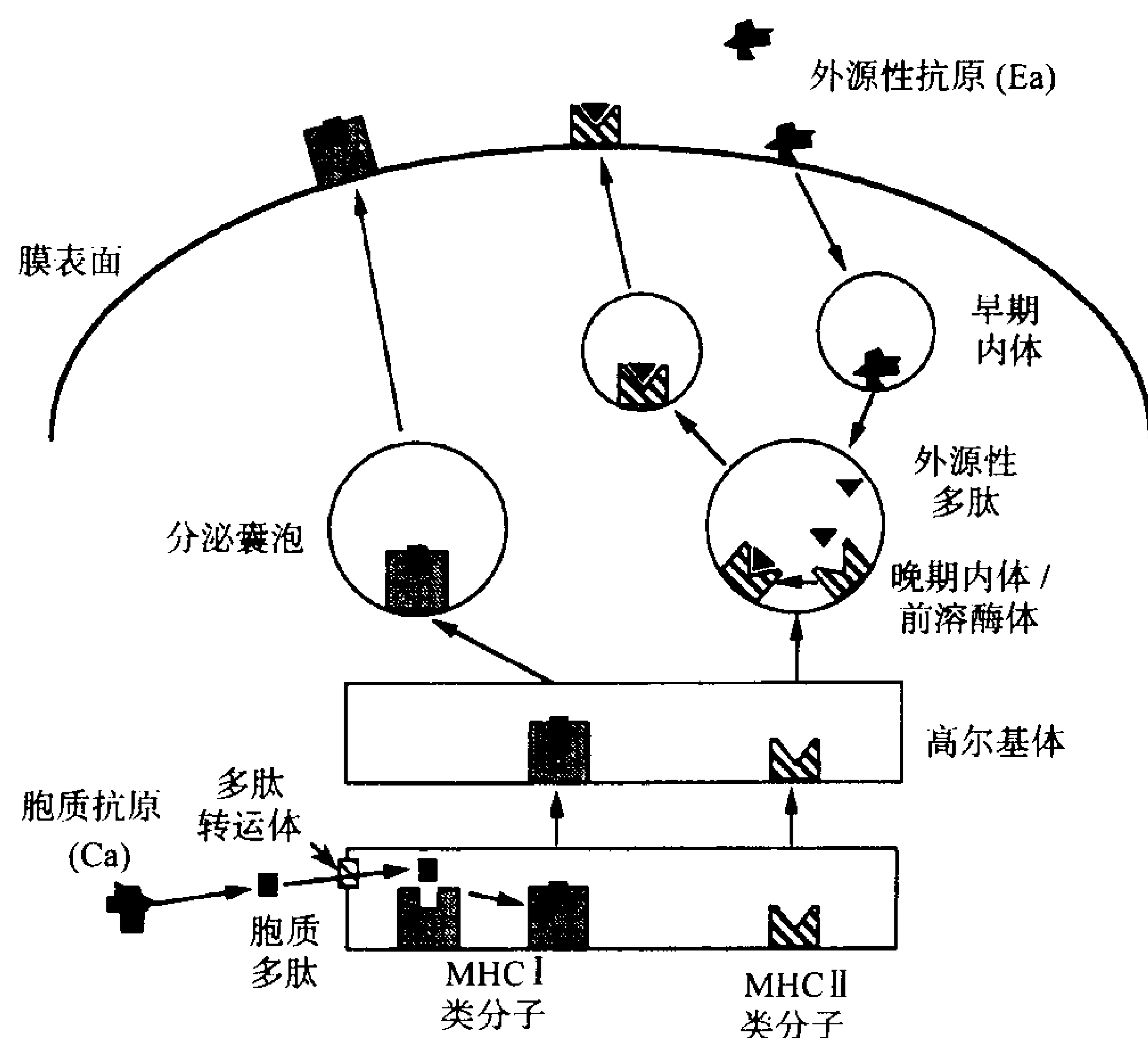


图 1.7　抗原呈递途径。外源性抗原(Ea)通过内体进入细胞内并从早期内体转入晚期内体或前溶酶体，在此发生片段化并将生成的多肽(外源多肽)转载到 MHCⅡ类分子。后者从粗面内质网(RER)经高尔基体进入含多肽的囊泡。然后，MHCⅡ类分子/外源多肽复合物被转运到膜表面，被表达 TCR 的 $CD4^+$ T 细胞识别。胞质抗原(Ca)在胞质内水解，然后经肽转运转运载体进入 RER。在 RER，内源多肽装载 MHCⅠ类分子，后者经高尔基体进入分泌囊泡，然后表达在细胞表面，可被 $CD8^+$ T 细胞识别。(经 Paul WE 允许引用。In：Gallin JI，Goldsten I，Snyderman R，eds. Inflammation. New York：Raven，1992：776)

MHCⅠ类分子装载的多肽主要来自于内源合成蛋白，如病毒蛋白。这些多肽来源于胞质蛋白经蛋白酶体水解后的产物并转运到粗面内质网。此类多肽长度多为 9 个氨基酸，可结合到 MHCⅠ类分子并转运到胞膜，并能为表达合适受体的 $CD8^+$ T 细胞所识别。这一特性赋予 T 细胞系统，尤其是 $CD8^+$ T 细胞，探测胞内表达的微生物蛋白或产生的更大量蛋白质之细胞的能力，即使这些蛋白质的原型并不表达在细胞表面也不分泌。这些蛋白质的例子有病毒抗原(不管是外壳、内部或细胞表面蛋白)、突变抗原(如活化的原癌基因产物)。

T 淋巴细胞受体(第 10、12 章)

TCR 是由二硫键连接的异源双体(图 1.8)。其组分链(α 和 β 或 γ 和 δ)属免疫球蛋白超家族成员。TCR 与一组总称为 CD3 复合体的跨膜蛋白相联系,后者在信号转导中扮演重要角色。CD3 复合体由 γ 链、δ 链和 ε 链组成并与由 2 条 ζ 链组成的同源双体或由 ζ 链和 η 链组成的异源双体相联系(注意:CD3 的 γ 链、δ 链与 TCR 的 γ 链、δ 链是不同的多肽,不幸的是采用了相似的命名)。CD3 的 γ、δ 和 ε 含属于免疫球蛋白超家族的细胞外结构域。CD3 的 γ、δ 和 ε 以及 ζ、η 的胞内结构域含一信号基序——免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)($D/E_{xxyxx}L_{xxxxxxx}Y_{xx}L/I$),该基序见于多种与免疫识别相关的受体链中。这一基序在信号转导过程中似乎发挥着非常重要的作用。

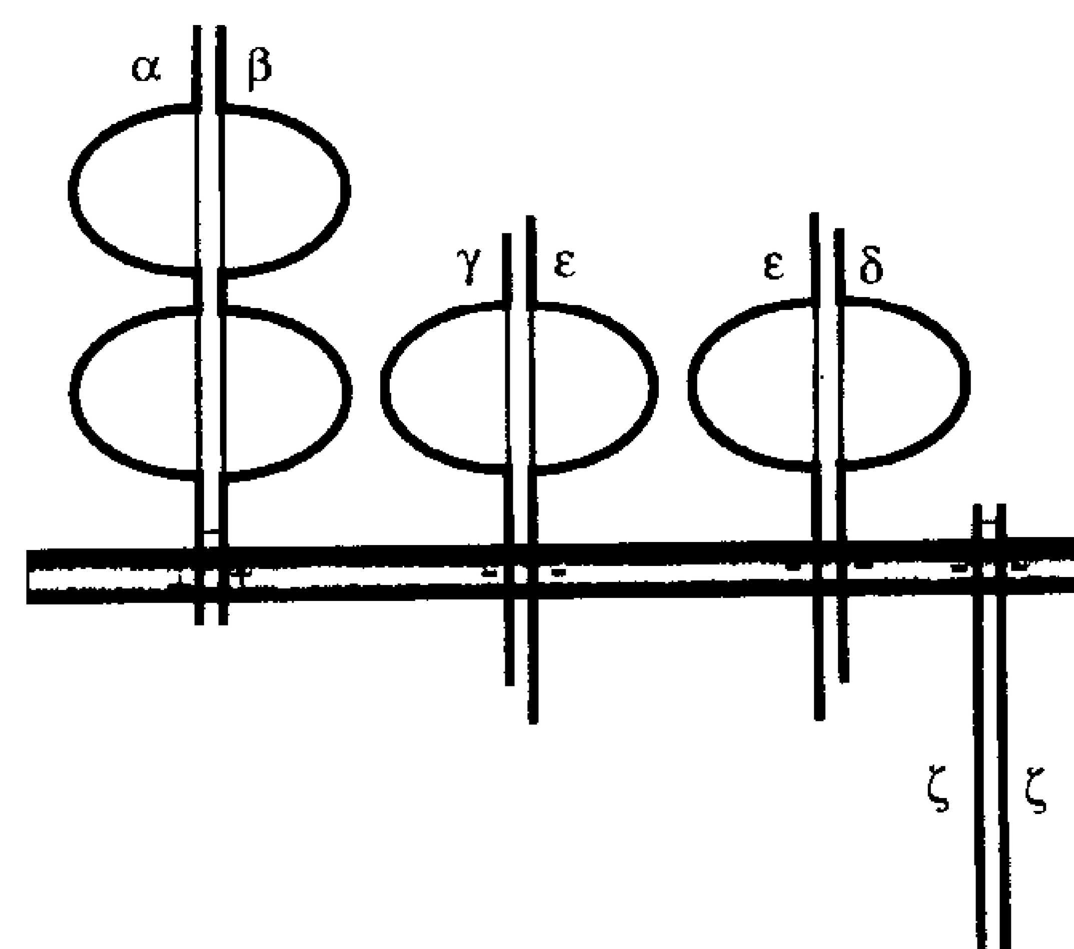


图 1.8 T 细胞抗原受体。图示的是抗原结合亚基由一个 α/β 异源双体、相关联的 CD3γ,δ 链及 ζ 链组成。标出了位于质膜内中的酸性(-)和碱性(+)残基。

TCR 链的构成很像免疫球蛋白链。N 端可变而 C 端恒定。而且,采用了相似的组合机制用于排列 TCR 链 V 区基因。因而 TCRβ 链 V 区基因由胚系中相互隔离的 3 个基因($V_β$、D 和 $J_β$)生成。虽然 $V_β$、D 和 $J_β$ 基因的相对数目与免疫球蛋白不同,但通过组合装配形成极大数目的不同基因之策略相同。联结多样性和 N 区进一步增加了基因及其产物的多样性。一个主要的不同是 TCRβ V 区基因少于免疫球蛋白重链,但有更多的多样性集中在 D/J 区,后者编码相当于免疫球蛋白的第三个 CDR。α 链遵从同样的原则,只是不用 D 基因。

TCR 的 γ 链、δ 链也以相似的方式装配,只是它们有更少的 V 区基因供选择。实际上,在特定环境,像皮肤和特定黏膜表面的 γ/δT 细胞间是非常相似的。这提示由这些基本不变的 γ 链和 δ 链组成的 TCR 可能特异性地警示病原入侵,通过这种机制引起 γ/δT 细胞的初步应答有助于更复杂的 α/βT 细胞应答。

T 淋巴细胞活化(第 12 章)

T 细胞的活化基于 TCR/CD3 复合体与其相应配体——结合于 MHC Ⅱ 类分子或 MHC Ⅰ 类分子结合槽中的多肽间的相互作用。通过含有前面提及的细胞质结构域信号基序之细胞表面的嵌合分子的桥联作用,这种分子的交联将因 TCR 结合而产生信号。然而,受体结合的一组动态分子事件是复杂的。在最早的步骤中似有酪氨酸激酶的活化导致一组底物的酪氨酸磷酸化,后者控制数个信号转导通路。现有的证据提示这一过程的早期事件有以下成员参与:Src 家族的酪氨酸激酶 $p56^{lck}$、相关联的 CD4 和 CD8 共受体的胞质结构域、与 CD3 相关联的 $p59^{fyn}$、结合 ζ 链之磷酸化 ITAM 的 Syk 家族的酪氨酸激酶 ZAP70、存在于所有 T 细胞表面上的蛋白酪氨酸磷酸化酶。

TCR 复合体相关联激酶的作用后果是生成酪氨酸磷酸化的一系列重要底物。其中包括一组适配蛋白将 TCR 连接到 ras 通路;磷脂酶 Cγ1,酪氨酸磷酸化可增加其酶解活性并参与肌糖磷脂代谢通路,导致细胞内游离钙浓度升高和蛋白激酶 C 活化;一系列其他重要酶类控制细胞生长和分化。

一般而言,正常 T 细胞和克隆的 T 细胞系仅通过 TCR 桥联刺激不能产生完全应答。实际上,TCR 结合通常不能产生 T 细胞来源的生长因子 IL-2,导致一种 T 细胞无反应性,对后续的强力刺激不反应或反应弱(见第 20 章)。完全的 T 细胞应答在需要 TCR 的结合之外还需要附件细胞提供的共刺激信号。T 细胞上的 CD28 与 APC 上的 CD80 和(或)CD86 结合可提供足够的共刺激活性。这一相互作用的抑制因子在离体和在体情况下均可明显抑制 T 细胞的活化,说明 CD80/86-CD28 的相互作用在 T 细胞活化中非常重要(见第 13 章)。

CD80/86-CD28 的相互作用可增加应答 T 细胞的细胞因子产生。对 IL-2 的产生而言,这种增加一方面是由于增强了 IL-2 基因的转录,另一方面是增强了信使 RNA(mRNA)的稳定性。以上 CD80/86-CD28 相互作用

的双重后果引起抗原刺激过的 T 细胞 IL-2 产生量增加。

CD80/86 有 T 细胞表面的第二受体——CTLA-4，它主要在 T 细胞活化的后期过程表达。大量证据表明 CTLA-4 与 CD80/86 的结合引发一系列生物化学信号以终止 T 细胞应答。

T 淋巴细胞发育（第 11、20 章）

T 细胞前体进入胸腺时并不表达 TCR、CD3 复合体、CD4 或 CD8 分子（图 1.9）。由于这些细胞既缺乏 CD4 又缺乏 CD8，所以通常被称为双阴性（DN）细胞。胸腺细胞从此 DN 细胞库发育成 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 细胞（双阳性细胞），并在其表面表达低水平的 TCR 和 CD3。依序，双阳性细胞进一步分化为较为成熟的胸腺细胞，这些细胞表达 CD4 或 CD8（单阳性细胞）和高水平 TCR/CD3 复合体。

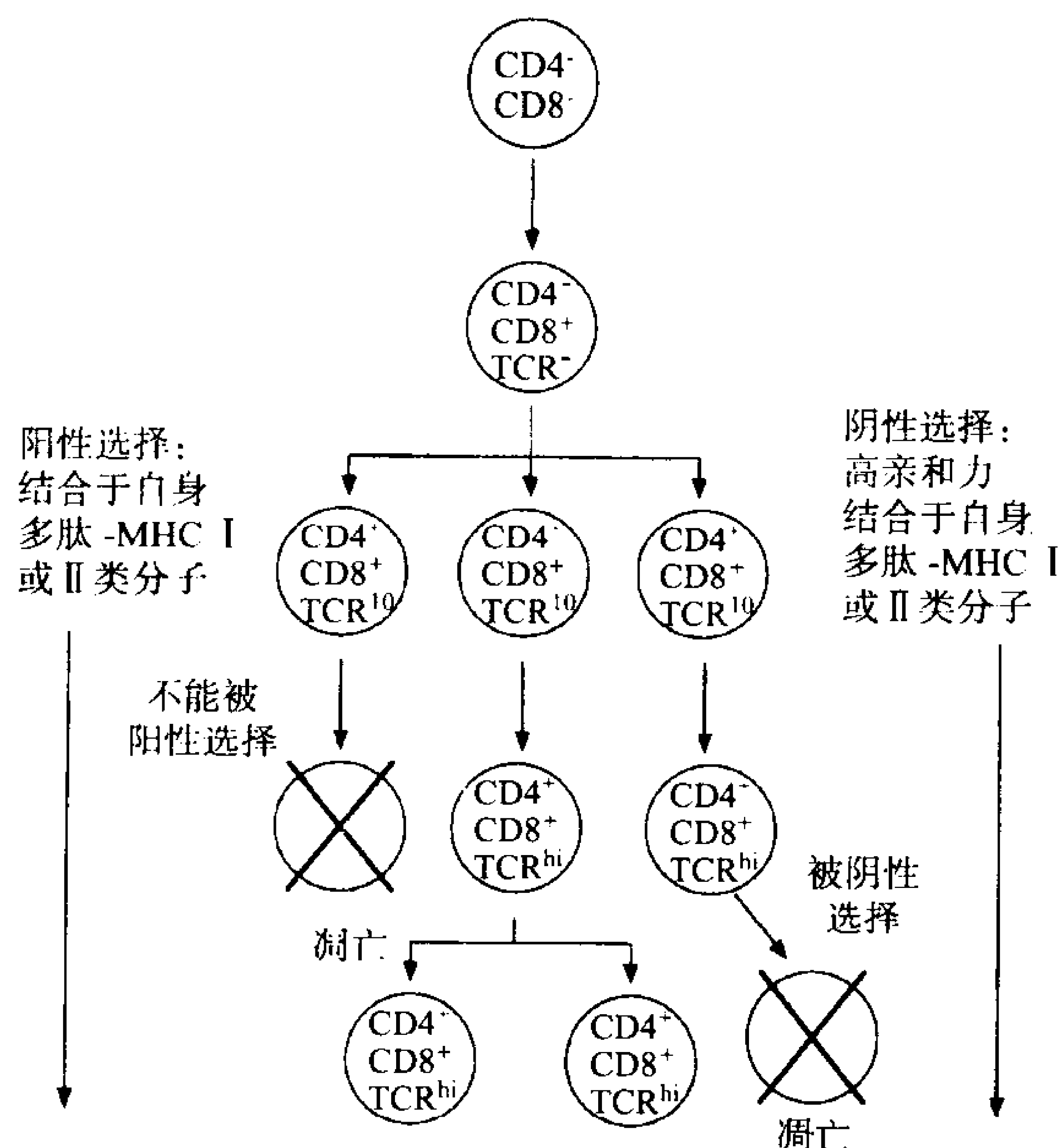


图 1.9 α/βT 细胞在胸腺的发育。双阴性 T 细胞（$CD4^-$ $CD8^-$）开始表达 CD4 和 CD8（$CD4^+$ $CD8^+$），然后表达 α/βTCR，一开始表达水平低。其后，TCR 表达水平上升，细胞分化为 CD4 或 CD8 细胞并进入外周。一旦 T 细胞表达 TCR，为了存活它们必须以高于某个特定阈值的亲和力识别多肽-MHC Ⅰ类分子或Ⅱ类分子复合物。如果它们做不到，则进入凋亡，这些细胞也就不能被阳性选择。阳性选择也与 $CD4^+$ $CD8^+$ 细胞分化为 CD4 或 CD8 细胞相关。通过识别多肽-MHC Ⅰ类分子的阳性选择导致 CD8 细胞的生成，而通过识别多肽-MHC Ⅱ类分子的阳性选择则导致 CD4 细胞的生成。在这一过程中，如果一个 T 细胞以高亲和力识别多肽-MHC 复合物，则它也通过凋亡被清除（它被阴性选择了）。阳性选择和阴性选择事件的精确时间尚未确定。

TCR 的表达基于复杂的基因重排过程以形成 TCR 的 α 和 β 链（或 γ 和 δ 链）。一旦表达 TCR，这些细胞即进入两个重要的选择过程。一个叫作“阴性选择”：删除其受体以高亲和力结合自身多肽-自身 MHC 复合体的细胞。这是 T 细胞发育成为对自身抗原不应答的主要机制。第二个过程叫作阳性选择：选择出其受体能识别自身 MHC 分子的细胞，是形成针对外源多肽相关自身 MHC 分子的 T 细胞库的基础。似乎未发生阳性选择的细胞通过在胸腺皮质发生凋亡而被清除。与此相似，高亲和力结合自身多肽-自身 MHC 复合体而导致的阴性选择 T 细胞也通过凋亡而被清除。此两种选择过程导致所形成的淋巴细胞群偏向于识别与自身 MHC 分子关联的外源多肽，而潜在的自身反应性细胞（能以高亲和力结合自身多肽-自身 MHC 复合体）被清除。

T 细胞发育过程中的一个重要事件是双阳性细胞分化为单阳性细胞。此过程可能归结到胸腺中的附件细胞对双阳性胸腺细胞的选择，且通过与 MHC Ⅰ类分子或 MHC Ⅱ类分子相互作用而发生。事实上，CD4 结合Ⅱ类分子的单形态位点，而 CD8 结合Ⅰ类分子的相当位点。TCR 和 CD4（或 TCR 和 CD8）结合附件细胞上 MHC Ⅱ类分子（或 MHC Ⅰ类分子）的能力导致双阳性胸腺细胞分化为 $CD4^+$（或 $CD8^+$）单阳性 T 细胞。

对表达由 γ/δ 链组成的 TCR 的胸腺细胞的分化了解较少。这些细胞不表达 CD4 或 CD8。但是，γ/δ 细胞在早期胚胎阶段相对较多，结合其有限的异质性，提示它们可能是一个相对原始的 T 细胞群体。

T 淋巴细胞的功能（第 11、14、21、26、31 章）

T 细胞介导广范围的免疫学功能，包括帮助 B 细胞发展为抗体产生细胞、增强单核细胞/巨噬细胞杀灭

病原体、抑制特定类型的免疫应答、直接杀伤靶细胞、动员炎症反应。总体而言，这些作用依赖于特异性细胞表面分子的表达和分泌细胞因子。

辅助性 T 细胞(第 11、26 章)

辅助性 T 细胞是刺激 B 细胞对蛋白质和其他 T 细胞依赖抗原产生抗体反应的细胞。T 细胞依赖抗原是指这样一类免疫原：单种表位只出现一次或有限次数使得其不能或不能有效桥联 B 细胞表面的免疫球蛋白分子。B 细胞通过其膜受体结合抗原，然后该复合物被内吞。在内体和溶酶体内抗原被蛋白酶水解为多肽片段，一种或多种多肽被装载到途经这些细胞器的 MHCⅡ类分子上。形成的 MHCⅡ类分子多肽的复合物被转运到细胞膜上。具有特异性多肽-MHCⅡ类分子复合物受体的 T 细胞在 B 细胞表面识别该复合物。

B 细胞的活化不仅依赖于与 T 细胞 TCR 的结合，还依赖于 T 细胞表面 CD40L 与 B 细胞表面 CD40 的相互作用。T 细胞并非组成型表达 CD40L；这种表达是它与表达被 TCR 识别的抗原和 CD80/86 的 APC 之间相互作用的结果。CD80/86 一般表达在活化的 B 细胞而非静息性 B 细胞，使活化的 B 细胞与 T 细胞相互作用引发有效的抗体产生。但是，在很多情况下，T 细胞表面 CD40L 的最初诱导依赖于识别组成型表达 CD80/86 的 APC(如树突细胞)的表面抗原。这种被活化的 T 辅助细胞能有效地与辅助性 B 细胞相互作用。即使 B 细胞膜免疫球蛋白桥联无效，与 CD40L/CD40 相互作用的叠加也可提供强力的 B 细胞活化信号。

在 B 细胞应答过程的后续事件，包括增殖、抗体分泌及类转换，或是依赖于 T 细胞来源的细胞因子或是被其促进。B 细胞的增殖和抗体分泌由于 IL-4、IL-5 及 IL-2 的作用而增强。在免疫球蛋白类转换中，一方面类转换能力由 CD40L/CD40 相互作用引发；另一方面转换靶向到特定的 C 区多是由细胞因子决定的。最好的研究例子是 IL-4 决定了在小鼠转换为 IgG1 和 IgE 而在人类则转换为 IgG4 和 IgE。实际上 IL-4 在 IgE 产生中的核心作用通过如下事实得到证明：采用同源重组介导的基因敲除方法使小鼠缺少 IL-4 基因或 IL-4 受体 α 链基因，该种小鼠表现出明显的 IgE 产生缺陷。

虽然具有 Th2 细胞表型(如分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10)的 $CD4^+$ T 细胞是有效的辅助细胞，Th1 细胞也有作为辅助细胞的能力。因为 Th1 细胞产生 IFN-γ，在小鼠可作为 IgG2a 的类转换因子，Th1 介导的辅助主要产生 IgG2a 抗体。

细胞免疫的诱导(第 15、21、22、16 章)

T 细胞也可提高单核细胞和巨噬细胞摧毁细胞内病原体的能力。特别是 IFN-γ 可通过多种机制包括生成一氧化氮和诱导肿瘤坏死因子(tunor necrosis factor, TNF)产生使得单核吞噬细胞摧毁细胞内的细菌和寄生虫。Th1 类细胞由于可产生 IFN-γ，因而在促进杀伤病原体作用方面特别有效。相比之下，Th2 细胞分泌的 2 种主要细胞因子 IL-4 和 IL-10 则阻断这些活性。因此，在诱导细胞免疫方面 Th2 细胞与 Th1 细胞通常起相反的作用。在一些特定巨噬细胞内的微生物感染中，Th2 占优的应答可能与感染控制失败有关。

13

抑制性 T 细胞

T 细胞既能减弱又能辅助免疫应答的能力长期以来一直是个有趣的问题。介导这种作用的细胞称为抑制性 T 细胞。毫无疑问，T 细胞强有力的调节功能会抑制某些类型的应答。但是，我们以前认为多数现象是由特异的抑制细胞控制的，反映了存在具有不同的细胞因子分泌表型的 T 细胞群且作用互相拮抗。正如已经讨论过的那样，确实存在 Th2 和 $Th1CD4^+$ T 细胞。实际上，IFN-γ 阻断 IL-4 的许多作用包括诱导类转换和分泌抗体。IL-4 和 IL-10 也作为 IFN-γ 产生和功能的抑制因子。因此，免疫应答中一组 T 细胞的作用就可使其偏离到特定方向。如果 B 细胞或 T 细胞的功能被测量并由于这种偏离而减弱，就可推论应答被抑制了，而实际上它只是提早改变了方向。

在另外一些情况下，T 细胞能产生细胞因子 TGF-β，它具有广泛的抗炎和免疫抑制作用，作用也类似于特异性抑制性 T 细胞。

细胞毒性 T 细胞(第 31 章)

T 细胞最为惊人的作用之一是溶破表达特异性抗原的细胞。大多数具有这种细胞毒性的细胞是 $CD8^+$ T 细胞,它识别靶细胞的内源性多肽,后者结合于 MHC Ⅰ类分子并表达在靶细胞的表面。但 $CD4^+$ T 细胞也能表现细胞毒性,其识别的抗原为与 MHC Ⅱ类分子关联的多肽;通常这些多肽来源于外源性抗原。

溶破的分子机理最近被阐明。现在认为有两种主要的机制。一种是 CTL 产生穿孔素,它可插入靶细胞的细胞膜内促进细胞溶破。穿孔素介导的溶破由活化的 CTL 产生的系列酶而强化,这些酶称为颗粒酶。许多活化的 CTL 在其细胞膜表面表达大量的 FAS 配体。CTL 表面 FAS 配体与靶细胞表面 FAS 的相互作用启动靶细胞的凋亡,从而导致这些细胞死亡。

CTL 介导的溶破似乎是摧毁病毒感染细胞的主要机制。如果在病毒的隐蔽期 CTL 被激活,CTL 可能能清除病毒、治愈宿主并只损伤有限的细胞。另一方面,病毒广泛扩散后的强 CTL 活性可导致相当广泛的组织损害,因为大量的感染细胞被 CTL 杀灭。因此,在许多感染中,是 CTL 引起的组织损伤导致了疾病而并非病毒本身。乙型肝炎就是一个例子,大部肝脏损害反映了 HBV 特异性 CTL 对感染肝细胞的攻击。

通常可观察到病毒感染或人为免疫诱导的 CTL 必须通过识别靶细胞上的抗原才能在体外被再活化。如果感染、免疫、检测的时间间隔较长就特别会出现这种情况。这就提出了 CTL 免疫在对抗再次感染的重要性的问题和保护性疫苗启动长期免疫中 CTL 如何重要的问题。

细胞因子(第 21、22、26 章)

免疫系统许多细胞的功能是通过其产生的叫作细胞因子的一组小蛋白质介导的。这些蛋白质现在可将其分为几个家族。它们包括:Ⅰ型细胞因子,它包括许多白细胞介素(即 IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、和 IL-15)和数种造血生长因子;Ⅱ型细胞因子,包含干扰素和 IL-10;TNF 相关分子,包含 TNF 和淋巴毒素;Ig 超家族成员,包含 IL-1;趋化因子——一个正在成长的分子家族,在免疫和炎症中具有重要功能。

许多细胞因子是 T 细胞的产物,它们的产生反映了 T 细胞正在发挥其不同功能。大多数细胞因子不是 T 细胞组成型的表达产物,而通常是 T 细胞活化的产物。T 细胞活化则一般由 APC 向 T 细胞呈递抗原会同共刺激分子的伴奏(如 CD80/86 与 CD28 的相互作用)而引发。虽然细胞因子产生的量很低,却很有效,结合其受体的平衡常数大约为 10^{10} L/mol。在某些情况下,细胞因子定向分泌到 T 细胞和 APC 之间有限的空间中以便以旁分泌的方式起作用,并限制了远距离分泌这些细胞因子的细胞之作用。在Ⅰ型细胞因子尤其是如此。但另外的细胞因子通过细胞外液和血液扩散到远离其产生细胞的靶细胞发挥作用。这些细胞因子多具有促炎症作用,如 IL-1、IL-6 和 TNF。

主要组织相容性复合体和抗原呈递(第 8、9 章)

本章在讨论 T 细胞识别结合于 MHC Ⅰ类分子和Ⅱ类分子槽中的抗原肽时已介绍过 MHC。的确,MHC Ⅰ类分子和Ⅱ类分子是 T 细胞识别和应答的基本条件。然而,第一次发现它们并不是因为这个原因,而是因为 MHC Ⅰ类分子和Ⅱ类分子在移植免疫中的决定性作用(见第 36 章)。由于其高度的多态性和能结合广泛多肽,MHC 蛋白是同种异体移植导致排斥的免疫应答的主要靶分子。

在了解了不同品系小鼠间移植排斥的遗传基础上,认识到虽然多个基因参与了排斥过程,但有一个区域起决定作用。仅在这一区域的不同即可引起迅速的移植物排斥,而其他区域的不同通常引起对外来组织的慢性排斥反应。鉴于此,负责移植物快排斥的遗传区域命名为主要组织相容性复合体。

人类 MHC 位于 6 号染色体,小鼠则在 17 号染色体。在所有研究透彻的较高等脊椎动物中,均存在类似

14

的 MHC。确定 MHC 的特征是靠其编码的移植抗原。有 MHC Ⅰ类分子和Ⅱ类分子。但是,MHC 也包括其他基因,特别是某些补体成分的基因,通常叫作 MHCⅢ类分子。另外,TNF-α 和淋巴毒素(也称为 TNF-β)的基因也在 MHC。

MHC Ⅰ类分子(第 8 章)

MHC Ⅰ类分子是表达于大多数细胞表面的膜糖蛋白。它由一条约 45 000 Da 的 α 链非共价结合于12 000 Da 的 β_2 微球蛋白组成(图 1.10)。α 链由 MHC 编码,而 MHC 不编码 β_2 微球蛋白。α 链和 β_2 微球蛋白均是 Ig 超家族成员。α 链是高度多态性的,其多态性主要见于构成抗原肽结合部位的区域,也是与 TCR 接触的部位。

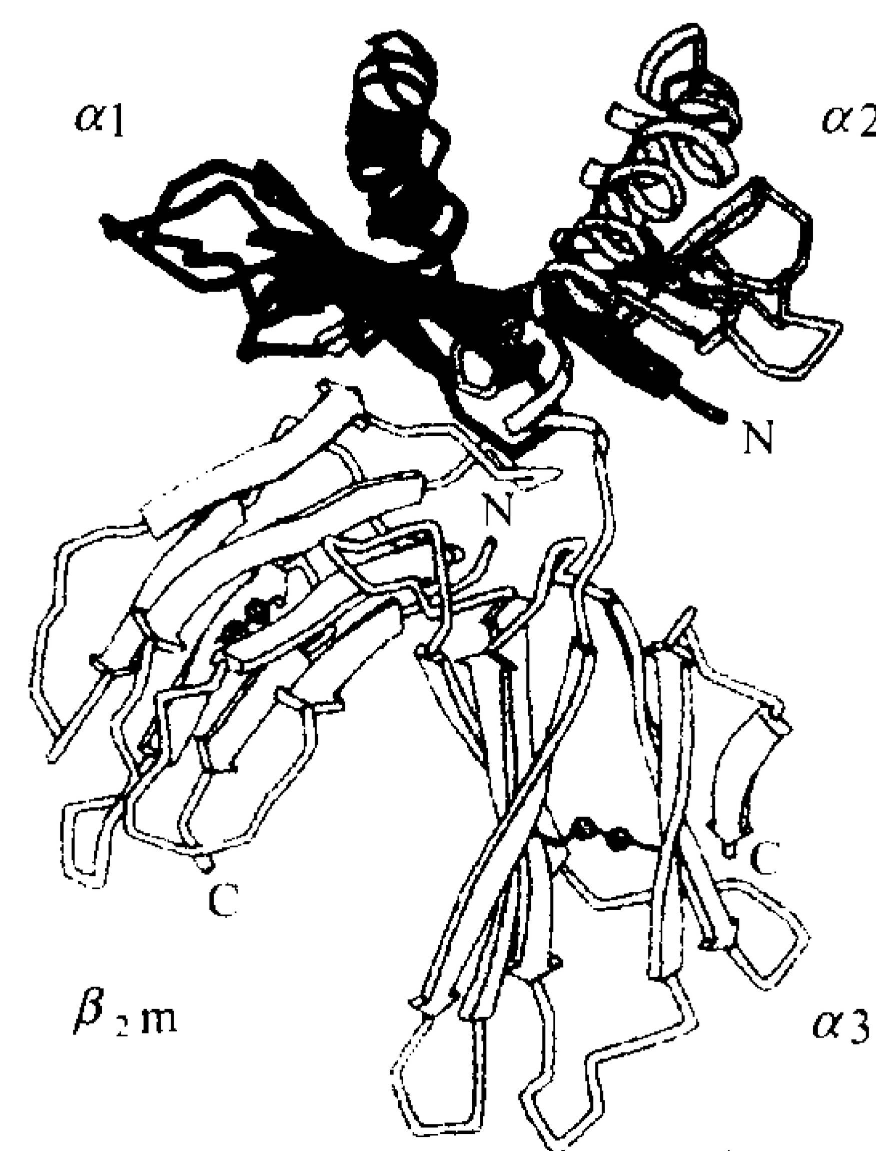


图 1.10 MHC Ⅰ类分子 HLA-A2 的模型。示意了 MHC Ⅰ类分子 HLA-A2 的结构。多态性 α1 和 α2 结构域位于顶部;它们形成一结合槽,适合于结合抗原多肽以形成被 $CD8^+$ T 细胞识别的多肽-MHC Ⅰ类分子复合物。(经 Bjorkman PJ 等允许引用。Nature, 1987;329:506 ~ 512)

Ⅰ类分子的 α 链由长度相当的 3 个胞外区或结构域组成,命名为 α1、α2、α3。另外,α 链有 1 个跨膜结构域和 1 个短细胞质 C 端尾。数种Ⅰ类分子的晶体结构解析表明 α1 和 α2 结构域形成抗原肽结合位点。这一部位特点是由 β 片层形成基底并有 α 螺旋墙。正如前面提及的那样,Ⅰ类分子的多态性主要在此区域。

人类编码经典Ⅰ类分子的 3 个位点被确认,分别被称为 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C,都表现出高度多态性。小鼠中有类似情况。另外,有一系列主要在小鼠中发现的基因,编码Ⅰ类分子类似物(Ⅰb 类分子)。新近证明其中某些分子对甲基化多肽有抗原呈递活性,提示它们可能专门呈递原核抗原。另外,Ⅰb 类分子 CD1 被证明能呈递分枝杆菌的脂质抗原,是此类抗原引起 T 细胞活化的机制。在小鼠中,CD1 被一类新的 T 细胞(NK T 细胞)识别,并立即产生大量细胞因子。

MHC Ⅱ类分子(第 8 章)

MHC Ⅱ类分子是异源双体膜糖蛋白。它由 α 和 β 两条链组成,两链均属 Ig 超家族成员且均由 MHC 编码。每条链均由 2 个胞外结构域(分别是 α1 和 α2;β1 和 β2)、1 个疏水结构域和 1 个短胞质片段组成。MHC Ⅱ类分子的整体构象与 MHC Ⅰ类分子很相似。然而,MHC Ⅱ类分子三维结构的解析提示:某些不同的结构特征可解释两类 MHC 分子所结合多肽的长度不同:Ⅰ类分子一般结合平均长度为 9 个氨基酸的多肽,Ⅱ类分子却能结合更大的多肽。MHC Ⅱ类分子的多肽结合位点由 α1 和 β1 结构域构成;正是在这些结构域中发现有大部分多态性残基。

小鼠 MHC Ⅱ类分子由 MHC Ⅰ区内的基因编码。有两组 MHC Ⅱ类分子,分别命名为Ⅰ-A 和Ⅰ-E。Ⅰ-A 分子的 α 和 β 链(Aα 和 Aβ)互相配对,正如Ⅰ-E 分子的 α 和 β 链(Eα 和 Eβ)互相配对一样。虽然在离体实验发现有例外,但一般而言,不会发生Ⅰ-A 和Ⅰ-E 链间交叉配对。在杂合小鼠中,α 和 β 链由不同的染色体编码(即 $A\alpha^b$ 和 $A\beta^k$)可发生交叉配对,所以杂合小鼠可表达亲本型和杂交型 MHC Ⅱ类分子。但是,交叉配对的程度是等位基因特异性的,因而并非所有的杂交配对都等效形成。

人类主要有 3 组 MHC Ⅱ类分子,分别由 HLA 复合体内的 DR、DQ 和 DP 编码。配对发生在特定区域编码的 β 链和同一区域编码的 α 链间。

MHC Ⅱ类分子的组织分布比 MHC Ⅰ类分子限制性强。MHC Ⅱ类分子在 B 细胞、巨噬细胞、皮肤朗格汉斯细胞、树突细胞、胸腺上皮细胞及人类活化的 T 细胞上有表达。MHC Ⅱ类分子的表达水平在许多种细胞中受干扰素调节而在 B 细胞中则受 IL-4 调节。实际上,干扰素可引起多种在正常情况下不表达 MHC Ⅱ类分子的细胞表达 MHC Ⅱ类分子。干扰素也可明显上调 MHC Ⅰ类分子的表达。因此,免疫介导的炎症反应可引起

MHCⅡ类分子的异常表达并增强 MHCⅠ类分子的表达。这种干预使许多细胞对 $CD4^+$ T 细胞正常行使 APC 功能并增强这些细胞对 $CD8^+$ T 细胞的敏感性。这可能会对免疫病理应答和自身免疫产生严重后果。

抗原呈递(第 9 章)

正如已经讨论过的,MHCⅡ类分子和Ⅰ类分子的功能是结合和呈递抗原多肽给 T 细胞,后者能识别所形成的多肽-MHC 复合物。有两种主要的抗原呈递过程,专门对付 T 细胞系统所面对的不同类别的抗原(图 1.7)。

胞外细菌、尚未整合到细胞内的病毒及胞外蛋白通过内吞或吞噬进入 APC。抗原在内体或溶酶体内片段化,当 MHCⅡ类分子在囊泡内旅行时发现抗原来源的多肽并与之结合。装载多肽到 MHCⅡ类分子内对分子结构的稳定是重要的。发生装载的细胞器内的酸性 pH 环境似乎可促进这一过程。但是,一旦装载多肽的 MHCⅡ类分子进入中性 pH 环境如在细胞膜表面,多肽-MHC 复合物是非常稳定的。多肽从这种 MHCⅡ类分子上解离下来很慢,其半衰期以小时计。多肽-Ⅱ类分子复合物被 CD4 类 T 细胞以互补受体识别。如前所述,$CD4^+$ T 细胞专门识别多肽-Ⅱ类分子复合物是由于 CD4 分子对Ⅱ类分子上决定簇具有亲和性。显然,这种形式的抗原处理仅适用于表达 MHCⅡ类分子的细胞。实际上,$CD4^+$ T 细胞的 APC 主要包括正常情况下表达 MHCⅡ类分子的细胞,像 B 细胞、巨噬细胞、树突细胞。

T 细胞也识别产生于该细胞又被其呈递的蛋白质。通过这种机制识别的主要病原体是病毒和其他专性的细胞内(非内体/溶酶体)的感染细胞的微生物。另外,肿瘤的独特蛋白如突变的原癌基因也能为 T 细胞识别。内源性蛋白质在胞质内被蛋白酶体的蛋白酶片段化。形成的多肽通过专门的转运系统转运到粗面内质网。而后这些多肽可装载到 MHCⅠ类分子内。与 MHCⅡ类分子装载多肽受装载环境中的酸性 pH 促进不同,MHCⅠ类分子装载多肽受Ⅰ类分子 α 链和 β_2 微球蛋白相互作用控制。在缺少 β_2 微球蛋白的情况下多肽与 MHCⅠ类分子的结合通常很弱,β_2 微球蛋白的结合可显著稳定该复合物(还应指出的是多肽出现在 α 链的结合槽中可明显促进 β_2 微球蛋白与 α 链的结合),装载多肽的 MHCⅠ类分子被带到细胞膜表面。与装载多肽的 MHCⅡ类分子被 $CD4^+$ T 细胞识别不同,装载多肽的 MHCⅠ类分子被 $CD8^+$ T 细胞识别。这种抗原处理和呈递形式可由所有的细胞执行,因为除少数例外,MHCⅠ类分子是广泛表达的。

虽然 MHCⅠ类分子结合和呈递内源性多肽及 MHCⅡ类分子结合和呈递外源性多肽一般都是正确的,但也有例外且许多都具有重要的生理意义。

T 细胞识别多肽-MHC 复合物导致 MHC 限制性识别(第 9、10、20、36 章)

在认识抗原多肽和 MHC 分子被识别的生物化学本质之前,就已经观察到 T 细胞应答表现出 MHC 限制性抗原识别。如果动物用某一抗原致敏,只有与被致敏动物相同 MHC 的 APC 存在的情况下,其 T 细胞才能识别和应答该抗原。当用同种异型的 APC 呈递时,抗原不能被识别。现在可用 TCR 只识别结合于 MHC 分子的多肽解释。MHC 分子表现出高度的多态性,且主要集中在 MHCⅠ类分子和 MHCⅡ类分子的多肽结合区和 TCR 结合区。不同个体(或不同系小鼠)MHC 分子结构的差异深刻的影响识别过程。对此有两种显见的解释:第一,不同 MHC 分子结合槽结构可决定所结合多肽的不同范围,即使是结合同样多肽也可改变呈递给 TCR 的表面构象;第二,α 螺旋墙的多态性部位暴露给 TCR,因结构不同它可促进或减弱整个复合物的结合。因此,用给定的抗原致敏与被致敏个体同系的 APC 来免疫动物个体,将诱发给定多肽(来源于给定抗原)特异性的 T 细胞应答,该多肽具有特定的构象并与 MHC 分子暴露的多态性残基相适配。当同一抗原用于不同 MHC 型的 APC 时不可能形成同样的多肽-MHC 表面,因此,致敏的 T 细胞不可能结合并对该刺激作出应答。

如前讨论,这一过程也发生在胸腺内 T 细胞库的形成过程。T 细胞在胸腺内发育经历一个阳性选择过程,在此过程中那些能识别胸腺内 MHC 分子的 T 细胞被选择(剩下的细胞进入程序化死亡)。这导致胸腺来源的 T 细胞群偏向性,以便专门应答结合于自身 MHC 分子上的多肽。胸腺内的阳性选择的一个未解之谜是

用其受体结合大量与自身 MHC 相联系的外界抗原肽的大批 T 淋巴细胞是如何通过仅表达自身分子的 MHC 所选择的。据信可能存在高度的交叉反应性,以使得选择结合某种Ⅰ类分子(或Ⅱ类分子)和自身抗原肽 A 的 T 细胞也能结合与同一 MHC 分子结合了的一组其他多肽。

我们对 T 细胞识别的现代认识也有助于解释免疫应答(immune response, Ir)基因控制免疫应答的现象。在很多情况下,识别简单抗原的能力仅见于一个物种中的某些成员。在大多数这样的例子里,决定产生这些应答能力的基因被追溯到 MHC。现在我们宁愿用基于不同 MHCⅡ类分子(或 MHCⅠ类分子)结合不同组多肽来解释 Ir 基因对免疫应答的控制。这样,对于简单分子而言,其被处理生成的多肽只能结合该物种多态性 MHC 分子的某个成员。只有含有这些 MHC 等位基因形式的个体才对这些抗原反应。也可能不应答小鼠的 MHC 结合了多肽但其 T 细胞库中没有 TCR 可识别这种特殊的多肽-MHC 复合体。我们可以看到,不管哪种情况,某些个体之所以不应答,是因为不能形成能为 T 细胞系统识别的多肽-MHC 复合物。

该机理也可解释 MHC 类型与针对不同疾病的易感性的联系。许多疾病在某种 MHC 型有更高的发病率。这些疾病包括反应性关节炎、麸质敏感性肠病、胰岛素依赖性糖尿病和类风湿性关节炎(见第 34 章)。一种解释是 MHC 型可改变针对引起或加重疾病的病原体抗原的反应性。实际上,似乎很多这类疾病可归因于过强的或不适当的免疫应答。

免疫的效应机制

免疫系统的最终目标是策动应答以保护个体对抗病原微生物感染,如不能清除这种感染则控制病原体的扩散和毒力。另外,免疫系统扮演控制某些恶性肿瘤发生和扩散的重要角色。摧毁致病因子(如细菌、病毒、寄生虫、肿瘤细胞)是免疫系统效应机制的综合结果。前面已经暗示过数种机制。其中 CTL 的细胞毒作用可破坏病毒居住的细胞和某些情况下表达肿瘤抗原的细胞。在有些情况下,抗体可通过中和抗原决定簇而形成直接保护,而其抗原决定簇应是对病原体建立或扩散感染必需的。但是,在大多数情况下,免疫系统动员强力的非特异性机制介导其效应功能。

免疫应答的效应细胞(除 T、B 淋巴细胞外)(第 15、17、29、30、31、32 章)

在免疫系统介导重要功能的细胞有单核细胞/巨噬细胞系统、NK 细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞。详细讨论这些细胞会超出本章的范围。但简要提一下它们的功能有助于了解它们在免疫应答中的重要作用。

单核细胞和巨噬细胞(第 15 章)

单核/巨噬细胞系统的细胞在免疫中担任一种核心角色。正如前面讨论过的,它们是重要的 APC。这在巨噬细胞内建立感染的细菌和其他病原因子抗原的呈递更是如此。细胞免疫的主要目标之一就是帮助巨噬细胞清除已建立这种细胞内感染的病原体。一般而言,未活化的巨噬细胞不能有效摧毁细胞内病原体。但是,T 细胞产生的 IFN-γ 和其他介质可增强巨噬细胞清除细胞内感染病原体的能力。存在数种机制,包括产生活性氧、一氧化氮、诱导产生系列蛋白溶解酶、诱导细胞因子产生。

自然杀伤细胞(第 17 章)

自然杀伤细胞在免疫系统中扮演重要角色。实际上,由于 SCID 突变而缺乏成熟 T 和 B 细胞的小鼠,其 NK 系统似乎很活跃,并为这些动物提供保护性免疫的手段。NK 细胞似乎与 T 细胞密切相关。它们缺乏 TCR(或 Ig)但表达两类受体。它们具有一组阳性受体以允许它们识别病毒感染细胞或肿瘤细胞的相关特征。它们也表达 MHC 分子的受体以停止它们的溶破活性。因此,肿瘤细胞或病毒感染细胞试图通过下调或停止 MHC 分子的表达而逃避细胞毒性 T 细胞的监视,则会变为 NK 细胞有效杀伤的靶子。因为后者的细胞

毒活性不再通过识别 MHC Ⅰ 特定的等位基因而停止。

此外,NK 细胞表达 IgG 的 Fc 段受体(FcγRⅢ)。抗体包被的细胞能被 NK 细胞识别从而溶破这种细胞。这一过程被称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(antibody dependent cell mediated cytotoxiaty, ADCC)。

NK 细胞可有效产生 IFN-γ。不同的刺激,包括识别病毒感染细胞和肿瘤细胞、FcγRⅢ的桥联、巨噬细胞来源的 IL-12 和 TNF 的刺激,均引起 NK 细胞大量产生 IFN-γ。

肥大细胞和嗜碱性粒细胞(第 35 章)

肥大细胞和嗜碱性粒细胞在引发过敏性炎症反应中发挥重要作用。它们表达 IgE 的 Fc 段细胞表面受体(FcγR)。这使得它们可将抗体结合在其表面,一旦能与抗体反应的抗原进入,产生的 FcγR Ⅰ 和(或)FcγR 桥联可引起系列重要介质如组织胺、复合胺和各种酶类立即释放,后者在超敏和过敏性反应中发挥重要作用。另外,这种刺激也可引起细胞产生一组细胞因子,包括 IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、GM-CSF 和 TNF,这在过敏性炎症反应后期有重要作用。

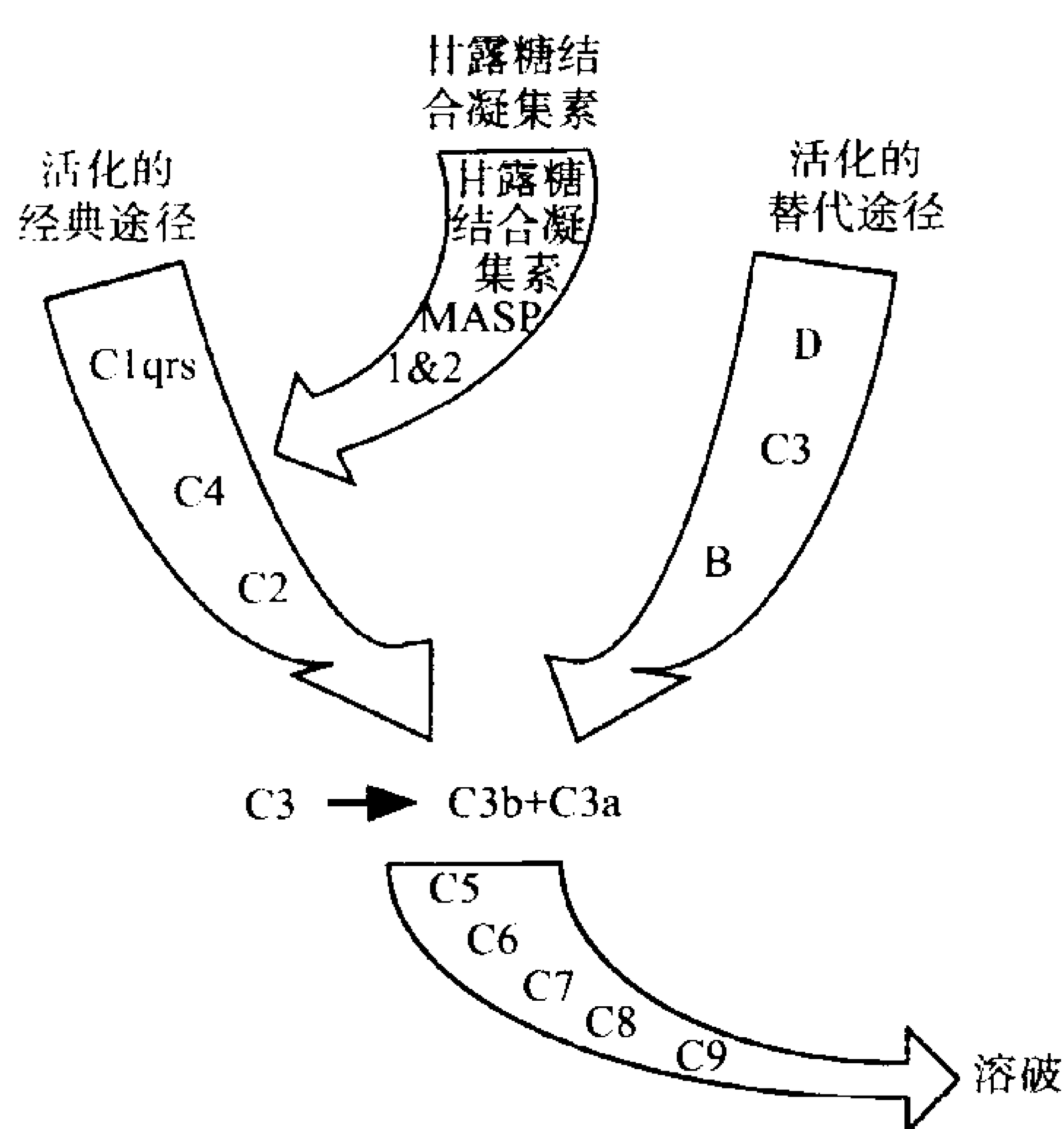


图 1.11 补体系统。补体激活的经典途径,通常由通过与抗原-抗体复合物结合而发生的 C1 聚合开始,导致 C3 转化酶的形成。后者将 C3 裂解为 C3a 和 C3b 两个片段。补体激活的经典途径也可由甘露糖结合凝集素(MBLectin)结合病原体包囊的糖类而发生聚合而启动。甘露糖结合凝集素途径成分的作用相当于 C1qrs。补体活化的替代途径为不需抗原抗体结合的补体活化提供了有力的手段。它导致另一种 C3 转化酶形成。裂解 C3 所形成的片段具有重要的生物学活性。另外,C3b,与经典途径中的其他成分(C4b,C2a)或替代途径中的其他成分(Bb,备解素)一起形成 C5 转化酶,后者水解作为终末蛋白家族起始成分的 C5。C5 的裂解导致攻膜复合物的形成,引发细胞渗透性裂解。

粒细胞(第 32 章)

粒细胞在多种炎症情况具有重要作用。不用过多讨论,提及这一点就足够了:没有它们要清除胞外细菌感染是极其困难的,免疫应答在这些至关重要细胞的生长、分化、迁移的交响乐中扮演重要角色。

补体系统(第 29 章)

补体系统是由蛋白酶、调节的炎症的蛋白质和多肽、细胞表面受体、溶破蛋白组成的复杂系统。此系统可认为由三组蛋白质组成。当其中两组参与时,可导致第三补体成分(C3)活化(图 1.11)。C3 活化释放的蛋白质对细菌和其他颗粒有调理作用(准备吞噬)并参与激活第三组蛋白质,第三组蛋白质插入到生物膜内通过渗透压溶破细胞导致细胞死亡。另外,某些补体成分生成的片段(如 C3a 和 C5a)具有很强的炎症活性。

补体活化的经典途径

对 C3 而言有两种活化系统称为经典途径和旁路途径。经典途径起始于抗原与 IgM 或 IgG 形成复合物。这导致结合第一个补体成分 C1,产生 C1 酯酶,后者裂解后两个补体成分 C4 和 C2。

C4 是由 α、β、γ 链组成的三聚体分子。C1 酯酶裂解其 α 链,释放 C4b,后者结合到其最近的抗原/抗体/C1 酯酶复合物表面。单一的 C1 酯酶可导致众多 C4b 分子的沉积。

C2 是单肽链,可结合 C4b,其后被 C1 酯酶裂解,释放 C2b。剩余部分(C2a)与 C4b 形成复合物(C4b2a),此为丝氨酸蛋白酶,其底物为 C3。C3 被 C4b2a(也称为传统途径 C3 转化酶)裂解释放 C3a 和 C3b。这一系统的放大特性暗示单个抗原-抗体复合物及相关的 C1 酯酶有能力产生大量 C3 转化酶(C4b2a)并水解大量的 C3 分子。

传统途径中的组分能被一种不同的、非抗体依赖机制活化。甘露糖结合凝集素(MBLectin)因结合(并被桥联)重复性糖基如 *N*-乙酰葡萄糖胺或甘露糖而活化。甘露糖结合凝集素的活化使 MBL 相关的丝氨酸蛋

白酶 MASP-1 和 MASP-2 得到补充，后者与 C1 的两条组成链（C1r 和 C1s）同源。这导致 C4 和 C2 的活化并形成经典途径中的 C3 转化酶。由于数种致病性微生物的包囊发现有甘露糖结合凝集素，所以这种抗体非依赖性途径可使得补体系统被外界微生物激活。

补体活化的旁路途径

旁路途径虽然发现较晚，但可能是补体活化的进化中更古老的系统。实际上，可认为它为个体提供了非特异性免疫系统的原始形式。旁路途径能被各种不同的因子激活如不溶性酵母细胞壁提取物和细菌脂多糖。抗原抗体复合物也可激活旁路途径。旁路途径的 C3 转化酶是由 C3b（C3 自身的裂解产物）结合 B 因子的 b 片段形成的复合物。C3bBb 是由疏水酶 D 因子水解 B 因子形成，这种水解只发生在 B 因子结合 C3b 后。

旁路途径除了具有非特异性活化补体系统的重要性以外，它还有放大经典途径的作用。因为经典系统的 C3 转化酶（C4b2a）提供了一个 C3b 来源，在 D 因子存在的情况下这将极大地增加旁路途径转化酶（C3bBb）的形成。

补体系统的终末成分

C3 转化酶作用于 C3 而生成的 C3b 内含有一硫酯键，可被裂解形成游离的硫氢基。后者可与不同的表面结构以共价键结合。C3b 为不同类型细胞包括巨噬细胞和 B 细胞的表面受体所识别。C3b 结合于抗体包被的微生物通常是巨噬细胞吞噬细菌作用的一个基本步骤。 *18*

C3b 还作用于补体系统终末成分（C5 到 C9）形成攻膜复合物——是引起细胞溶破的重要成分。这一过程首先裂解 C5，它是 200 000 Da 的双链分子。催化这一反应的 C5 转化酶是 C4b2a3b（经典途径的 C5 转化酶）或称为备解素的蛋白质与 C3bBb 形成的复合体（旁路途径 C5 转化酶）。C5 的裂解产物 C5b 与 C6 形成复合物，然后与 C7、C8、C9 形成复合物。这种 C5b/C9 复合物插入膜作为膜蛋白的一部分引起补体介导的细胞膜损伤。这种损伤外观像油炸面卷，C9 分子形成油炸面卷的环。

除了补体系统的调理作用和细胞溶破作用之外，补体活化过程中形成的补体成分的数种片段则是强力的炎症介质。C3a 是在 C3 转化酶作用下释放的 9 000 Da 的片段，结合到肥大细胞和嗜碱性粒细胞上的受体导致组织胺和其他过敏介质的释放。与 C5a 一样，C3a 也得名过敏毒素，而 C5a 是由 C5 转化酶作用下释放的 11 000 Da 的片段。C5a 还是中性粒细胞和单核细胞的化学趋化剂。

最后，一项重要的提示是补体活化的瀑布反应过程是受高度调节的。数种调节蛋白（如 C1 酯酶抑制因子、促衰减因子、膜辅因子蛋白）具有预防失控补体活化的功能。这些调节蛋白的异常通常与临床疾病相关，如遗传性血管水肿和阵发性夜间血红蛋白尿。

结论

这章绪论旨在让读者欣赏免疫系统的组成全貌和其主要细胞和分子的特点。很明显，免疫系统非常复杂，它具有广泛的效应功能，其活动是强有力的、但目前只部分了解的调节过程。作为高等生物最具威力和多能的防卫系统，免疫系统是发展众多疾病之有效预防和治疗手段的关键。实际上，本书的最后部分明确涉及了疾病的免疫机制。这里的介绍材料旨在为初级读者理解那些免疫机理有主要作用的广泛临床疾病的免疫学机制提供帮助。

（吴玉章 译　邹丽云 校）

第2章 免疫学史

Arthur M. Silverstein[①]

关于获得性免疫的早期理论

19 人类社会形成之初,人们就认识到了流行性疾病的危害。公元前 2000 年左右的巴比伦《吉尔迦美什史诗》就记载了疾病和瘟疫带来的灾难。埃及早期王朝的编年史也记载了一些重大的流行病。在早期大多数社会里,甚至在今天的一些原始部落里,人和自然都被认为是受神灵和恶魔的魔力摆布的。自然而然地,疾病被认为是违反部落忌讳或者是做了违抗神灵的邪恶事情后受到的惩罚。巴比伦人和埃及人都有各自掌握疾病的神。在整个旧约全书中,神总是用瘟疫之类的疾病来惩罚那些犯过失的人们。上帝不仅降瘟疫给他的子民作为惩罚,如大卫犯下清点百姓的罪孽时(《撒母耳记下篇》24),同时也惩罚他们的敌人,包括埃及人(《出埃及记》9:9)、腓力士人(《撒母耳记上篇》5:6),以及亚述王(《以赛亚书》37:36)。在古希腊,人们甚至推测太阳神(Phoebus Apollo)因受到俄狄浦斯的侮辱而散播了底比斯瘟疫。人们还认为阿波罗在特洛伊前向希腊军队播撒了瘟疫(因为他们的统帅阿伽门农诱拐了阿波罗祭司的女儿。)

尽管人们还不清楚各种各样的流行病的性质以及它们之间的关系,但已经观察到了在疾病中幸免于难的人当再次爆发相同疾病时不会再得此病。历史学家 Thucydides 在描述公元前 430 年的一次瘟疫时写到:"(疾病再流行时)从疾病中康复过来的病人和濒临死亡的人得到了幸免。那些根据经验,知道它从来不攻击(至少从不致命性攻击)同一个人两次的人就不再害怕它。"尽管那次瘟疫可能不是鼠疫巴斯德菌引起的,但几千年之后引起东罗马帝国瘟疫的很可能是腹股沟淋巴结鼠疫。对这次瘟疫,历史学家 Procopius 写道:"后

① A. M. Silverstein: Institute of the History of Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21205.

来,(瘟疫)回来了,那些在这块地方居住的人,上次被它痛苦地折磨着,这次却没被伤害。"很快,这种对再次感染具有的抵抗力被称为"免疫",来自拉丁文"*Immunitas*",在古罗马时代的本意是指免除个人劳役或对国家的义务。

认为疾病来自复仇女神的观点本身包含着一种含蓄的免疫理论:如果疾病是对所犯罪恶的惩罚,人们自然认为那些在疾病流行期间幸免于难的人(天然免疫)是他平时过着虔诚生活的必然结果。但在基督传播的早期发生了重大变化,不仅上帝用疾病来惩罚犯罪的人,而且他还用疾病来清除人类的罪恶。如果疾病被看作是一种赎罪和净化,那么从一次致命的瘟疫中活过来不仅表明罪恶被减轻,而且一旦清除了所犯罪恶就不会在瘟疫回来时受到进一步的惩罚(获得性免疫)。在当时充满宗教热情的时代,这样的免疫理论深入人心,无须明释。

直到上个千年[①],明确的获得性免疫理论才被提出来,大部分理论富有想像力,每一种都明确地包含了当时盛行的致病源的观点。由于天花是最早在临床上鉴别出的疾病之一,而且因为它所引起的终身免疫现象很容易被注意到,所以毫不奇怪大部分关于免疫的早期理论都是用天花来描述的。

驱逐学说

最早清晰描述天花临床表现的是伊斯兰内科医生 Rhazes。Rhazes 不仅是第一位鉴别天花与麻疹以及其他疹类疾病的人,而且还明确提出感染天花康复后能产生持久的免疫力。为了解释这个现象,他提出了有史以来的第一个关于获得性免疫的详细理论。和同时代的其他人一样,Rhazes 继承了希波克拉底的传统,后者认为疾病是体内四种体液(血液、黏液、黄胆汁、黑胆汁)产生了数量上的不平衡,或者是由于它们的温度或者是由于其成分发生了改变,甚至是因为它们发酵了而造成的。人们认为天花影响了血液,Rhazes 进一步认为天花是由于血液发酵引起的,它有助于年轻人体内多余的水分蒸发。他提出发病过程中皮肤上形成脓疱,破了后流出液体,就是机体释放血液中多余水分的机制。他把人的发育成熟过程和用果子发酵酿酒的过程作了比较,认为天花病本身有利于正常的发育过程。他写道:"由此我认为,每个人从他一生下来直到老去,一直都有变得干燥的趋势。因此小孩的血比年轻人的要潮湿,比老年人的更潮湿。当血液腐败发酵时就产生了天花,多余的潮气被释放出来,血液从婴儿的血(好比葡萄汁)转变为年轻人的血(好比酿好的酒),最后变为老人的血(好比失去了酒劲的酒,开始变得又酸又无味)。天花可比作葡萄汁发酵时的嘶嘶的噪音。这就是为什么小孩,尤其是男孩,很少有能不患这种病的原因。因为想阻止血液从第一阶段转变到下一阶段是不可能的,就像不可能阻止葡萄汁的发酵一样。"

这个奇特的理论似乎可以很好地解释关于天花的所有已知问题:①几乎每个人都会被感染,尤其是年轻人(既然年轻时血液最潮湿);②成年人很少会感染天花,老人几乎不感染(因为那时正常的老化过程已经充分干燥了血液,不能再满足感染的要求);③感染过后可导致持久的免疫力,以后就不会再得此病(既然第一次感染已经耗尽所有多余的湿气,感染天花所需的先决条件已不复存在)。有趣的是,Rhazes 认为天花是一种良性的不危险的童年疾病,甚至是一种有益的现象,似乎在从婴儿到成人的发育过程中起辅助作用。

11 世纪时,Avicenna 提出了另一个解释获得性免疫的有趣理论。大约 500 年后的 1546 年,意大利的内科医生 Girolamo Fracastoro 在《关于传染》一书中扩展了这个理论。Fracastoro 认为所有的病都是由细小的种子和芽孢引起的,这些种子可以从一个人传播到另一个人。每个种子都有针对特定植物和动物、器官或体液的不同特异性亲合力。他认为天花的种子只对月经血有亲和性,所有的哺乳动物的幼儿在子宫时就感染了这种"秽物"。当一个人(年轻)感染后,经血"秽物"就会发酵,升到皮肤表面形成脓疱,破了后就被排出来。他写道:"这种起疱过程是血液纯化的一种方式,儿童接触母亲子宫经血后的感染物,通过这种发疹方式和瘤化作用被局限化,于是通过大自然提供的这种(解决危机的)方法,血液得到了纯化。这就是为什么几乎我们每个人都会得这种病的原因……这种病自身很少是致病性的,而是一种净化……这种病很少复发也是因为感

20

① 原书出版于 1999 年,此处"上个千年"应当是指公元 1000 年以前的时期。——编辑注

染源在第一次发病时已经被驱除出去。”于是，Fracastoro的理论似乎也可以解释当时关于天花的所知道的所有的现象。在这个理论里获得性免疫来自于我们第一次发病时对生来就有的经血感染物产生的排除作用，排除了这种感染物后就不会再得病了。但是，Fracastoro认为他的理论同时包含了对类似麻疹等其他疹类疾病的获得性免疫，这点受到了Heironymus Mercurialis的批评，后者可能是第一个提到了免疫特异性的人，Mercurialis指出Fracastoro的理论不可能正确，除了一些其他原因外，还因为麻疹和天花是不可能都依赖于同一种月经血感染物。（既然感染了一种就会清除这种污染物，因而同时也会对其他疾病产生免疫力，Mercurialis认为这种“交叉免疫”现象与事实不符合。）

这里还要谈到其他几种由经血驱除理论变化而来的理论，每种都提出类似于天花的致病机制以及类似的获得性免疫的基础，不同的只是，羊膜液或肚脐血取代经血成了罪魁祸首。在所有的理论中，疾病总被认为与秽物的腐化作用有关。它的排除依赖于脓疱，而终身免疫力的获得也是由于缺少新一轮感染所必需的秽物。

清除学说

21 种痘法（接种从天花病人身上获得的活病毒）作为一种预防措施在18世纪早期引进，此后人们对获得性免疫的性质和机制产生了新的兴趣。用合适的天花病人脓疱上的硬皮进行接种的技术在许多亚洲和非洲的民间医学（folk medicine）中得到了大范围的实施。这种技术可能起源于中国。中国人建议将感染后的东西用银制的管子吹入病人的鼻子。男人的吹入左鼻孔，女性的吹入右鼻孔。此外，更常用的做法是将皮肤切开个口子插入感染后的硬皮，或者用感染后的脓液浸过的银丝穿入皮肤。

尽管接种技术受到了僧侣和医生的指责，它还是得到了一定程度的肯定，尤其是在英国，1772年威尔士王子和公主做出榜样允许给他们的小孩接种。在天花流行期间，感染者的死亡率常常达到15%～20%，破相的比率更高，而接种很好地防止了感染，大部分人不会有面部伤痕，死亡率最多也只有2%～3%，于是接种变得尤其流行。著名的Voltaire在到英国的旅行期间观察到了这种现象。他在*Lettres Philosophiques*一文中热情地赞扬了种痘的作用，把这归功于Mary Wortley Montagu夫人将种痘技术介绍入英国。Voltaire推测种痘技术最初源于古人保护他们女儿的容貌需要，因为总不能将她们用袋子装着卖入奥斯曼帝国的闺房。

于是，当种痘技术在上层社会的哲学笔记中普及后，特别是当皇室成员参与接种给予了权威证明后，百姓们开始试着接受这种新方法，一些人也试着推测它的意义是什么。大约在1721年波士顿的一次天花流行中，新英格兰牧师Cotton Mather劝说他的朋友Zabdiel Boylston医生采取接种的措施，结果获得了成功。Mather后来提出了一种获得性免疫的理论，他用华美的文笔写道：

“然而，天花瘴毒通过接种的方式被允许进入（体内），它的侵入路径是由城堡的外围工人安排的，离城堡中心很有一段距离。敌人（天花），进来得到了一些战利品，令他如此满意，将病人体内的懦者尽情掠夺，尽管他以后还须利用他们……在下次他侵袭血液时，尽管血中的体液还有投降者，他们仍然迫使他从进来的地方出去，并且确信再也不会被它打扰。”

Mather因此认为在自然感染或接种后，某种未知底物被排除了，这种物质的缺乏抑制了这种疾病的再次产生。

就是在这种情况下，天花接种进行了四分之三个世纪，直到Edward Jenner在1798年公布了他具有划时代意义的报告。其内容主要是关于一种从牛痘脓腔中得到的安全并且更有效的抵抗天花的疫苗。Jenner的疫苗横扫整个世界的速度给世人留下深刻的印象。几年后，当Jenner为一个英国犯人向法国敌人求情时，拿破仑将军说他不能拒绝这个给人类带来如此巨大贡献的人的任何要求。可惜的是，Jenner似乎永远也没有试着去弄明白为什么他的疫苗会引起免疫力，也许是受到他的老师——声望显赫的John Hunter的早期教诲（的影响）：“为什么要思考呢？为什么不去做实验呢？”

在17世纪和18世纪时，出现了一些关于疾病病因及疾病免疫力奇妙的理论。一个是“天然种子”学说：人和动物一生下来就有相应于各种疾病的种子（卵子），每个卵子在接触到合适的感染物后就会受精，产生相

应的疾病。正如 Thomas Fuller 优美地概括道:"因为这些卵子是各自不同的,那么传染病永远不能引起天花,天花也不能引起麻疹。这些卵子本是静止的,不增殖的,除非它们受孕了。这就是为什么这些病往往在感染后才发生,感染就是雄性的物质,是活化因子。某一种发热病在每个人身上只有一个卵子,通常只能受孕一次,当它们受孕后,表达出病态的胚胎后,它们就死亡了。由于这,所以没有人能两次以上感染同一种疾病。"由此看来,Fuller 不仅意识到了特异的病因论,而且似乎可以合理地解释特异而又持久的获得性免疫。

在整个 18 世纪,认为免疫力是以某种疾病发生过程中所必需的物质被清除为基础的观点经常被提到。有人发现 M. Maty 在一篇文献中写到:后来,我在自己身上做这个接种实验,发现它并不影响血液,正如 15 年前已经充分澄清的那样。当时一个评论家 Angelo Gatti 把天花对机体的易感性比作一个火花就能引起火灾,但随后即使被火焰包围都不能再燃烧,因此对下一次的感染产生免疫。

19 世纪 70 年代,人们越来越接受疾病的细菌学说。由于 Pasteur、Robert Koch 等人的努力,人们得以鉴定了许多疾病的致病源,解释了它们致病的方式。病因学的新概念,特别是 Pasteur 在 1880 年利用减毒病株证明通过诱导可以产生针对霍乱的获得性免疫后,推翻了所有的以前关于免疫力的观点。受这些免疫现象的启发,而且由于对细菌在培养过程中的动力学变化的了解,永远值得怀念的 Pasteur 提出了他自己的简单而有力的获得性免疫学说。Pasteur 观察到体外细胞在初始的对数生长期之后迅速停止生长,认为这是由于某种必需的微量物质被耗尽的结果,不同的细菌需要不同的微量物质。那时人们所知道的疫苗都含有少量活的感染物组织,Pasteur 提出宿主经过天然感染或通过接种后能迅速消除感染物生长所必需的营养物,已经消除这些必需物的宿主不可能再次被相同的物质感染。只要这些必需物质不再生,免疫力就会在机体内存在。但随后 Theobald Smith 证明了死组织也能作为疫苗。Emil Von Behring 和 Shibasaburo Kitasato 甚至证明了白喉和结核菌的培养基的上清液也能引起免疫力,很快就证明了 Pasteur 理论的不足。

早期免疫学的起源和研究工作

预防免疫

当 Pasteur 致力于疾病的细菌学说研究的时候,免疫学作为一门学科在 Pasteur 的实验室里诞生了。Pasteur 早期研究与蚕病以及制酒工业有关的试剂,这些早期工作使他确信每一种疾病都是某种特定的细菌感染增殖的结果。此外,他坚信不仅疾病不可能自发产生而且这些病原体的致病性也是特异和恒定的,不能转变成引起其他疾病的病原体。随后,在 Emile Roux 的合作下,Pasteur 发现同一种细菌的不同菌株的致病力也是不同的,即某些菌株可能比其他菌株引起的病要轻。Pasteur 和 Roux 设计各种毒性细菌的减毒培养技术,最为人所知的是鸡霍乱致病菌的减毒株。由于科学史上的一次幸运的偶然事件,他们发现感染减毒霍乱疫苗的小鸡恢复后,就不会再被毒力更强的菌株所感染。

这篇报告发表于 1880 年,是自 Edward Jenner 利用牛痘预防天花后第一个具有划时代意义的贡献。它开辟了一个全新的预防免疫学研究领域。Pasteur 在后续工作中研究了炭疽、疟疾等其他疾病,利用这些可能存在的疫苗为其理论寻找详细的论据。在随后的 25 年里,随着针对不同疾病的特异性致病体被越来越频繁地报道,全球的科学家都致力于利用 Pasteur 的方法来制备各种合适的预防疫苗。

细胞免疫

19 世纪免疫学研究工作取得的第二个重大进展是在 1864 年。这一年,Ilya Metchnikoff 提出了细胞免疫理论。以达尔文的进化论为基础,Metchnikoff 提出低等动物形态所具有的原始的细胞间消化功能在多细胞动物门和高等形态动物上仍然存在,表现为游动的吞噬细胞可以吞噬消化外来物质。Metchnikoff 推测吞噬细胞是天然免疫(抵抗感染的第一条防线)中的主要部分,并且对获得性免疫(通过预防接种或初次感染诱导的高级保护)也至关重要。

Metchnikoff 的理论对生物学和医学带来几点深远影响。首先,他提出了物种间的竞争可能与经典达尔文学说所说的物种内的竞争对物种的进化一样重要的观点。在这里,生存斗争在被感染的宿主和侵犯的感染源之间展开,而吞噬细胞作为前者的拥护者出现。吞噬细胞理论的另一个值得注意的贡献在于普通病理学。大部分人认为炎症是疾病引起的一种损伤作用,但 Metchnikoff 认为炎症是用来保护机体组织的一种进化免疫理论机制。尽管最终 Metchnikoff 关于炎症的保护作用的理论胜利了,但他的细胞免疫理论激起认为体液因子更为重要的人的极大反对。这两个阵营之间的争论在随后的二三十年间极其激烈,下面将要谈到这点。

血清治疗学

1888 年人们又取得了一次显著进展。Emile Roux 和 Alexandre Yersin 证实可以从白喉菌培养物的上清液中分离到一种毒素,这种毒素在实验动物身上能引起典型的白喉病的所有症状。这证明了至少在某些情况下不是细菌组织而是它释放的外毒素引起了疾病。随后不久,在 1890 年,Von Behring 和他的同事 Kitasato 一起针对这个现象发表了一篇文章,认为用白喉结核毒素免疫后的动物能产生一些可以中和或消除毒素的物质,可以预防疾病。很快,人们利用由实验动物制得的抗毒素血清在受感染儿童身上进行验证,表明这种血清有迅速显著的疗效,尤其是在发病的早期。这种抵抗毒素的物质被称为抗毒素,但不久一个含义更笼统的词"抗体"被用来描述这一类新物质,能引起抗体产生的物质称为抗原。

Behring 抗毒素治疗的理论在医学界引起震动,并且其普适性得到了 Paul Ehrlich 的支持。后者发现利用蓖麻毒素蛋白和相思豆毒素等植物毒素免疫动物后可以中和抗毒素,在与各种传染病的战斗中为人类增加了一种重要的武器,提供了巨大的治疗希望。这门被称为血清治疗学的学科引起了实验室和临床试验的数量巨增。在众望所归中,Behring 因这一伟大发现而获 1901 年的首届诺贝尔奖。

细胞毒性抗体和自身免疫

早期免疫学家们取得的第四个意义重大的领域是 Jules Bordet 在 1899 年证明了红细胞特异性抗体与非特异性的血清因子补体结合后能引起溶血。这明确地解释了关于保护性免疫的另一个重要机制:细菌致病物的直接清除有赖于二种免疫活性因子的共同作用。随后,人们注意到 Bordet 观察到的现象的更深远的意义,首次认识到免疫后的宿主本身的细胞和组织有可能因越轨的免疫系统产生针对自身成份的免疫应答而处于危险之中。马上,各个实验室的科学家用几乎所有的体内器官或组织的悬浮液来免疫实验动物,试图找到一二种引起局部疾病的自身毒性抗体。随后,杂志上就充满了这些实验的报道,事实上 1900 年这一期《巴斯德研究所年鉴》(Annales de l'Institu Pasteur)大部分都在谈这个问题。很快人们就发现异体抗体和同种抗体常常能形成,并且对目的组织和细胞有细胞毒性,而自身抗体,除少数特例外,则很少形成。这使 Ehrlich 得以形成他著名的自身禁忌中毒学说。这个学说认为,由于某些未知原因,机体不能产生针对自己结构的被动免疫应答。此外,在随后的几年里,人们严肃地考虑了这种可能性,即细胞毒性抗体可能在一些疾病中扮演着重要角色,既可以作为单纯的自身免疫现象,也可以在梅毒或交感性眼炎这类疾病的损伤中起辅助作用。事实上,Donath 和 Landsteiner 在 1904 年首次报道了一种真正的自身免疫疾病——阵发性血红蛋白尿。

血清学和免疫诊断学

1896 年发现的细菌凝集现象很快就为细菌学家提供了一种强大的工具,不仅可以用合适的抗血清来鉴定分离细菌,而且可以通过检测病人血清凝集特定细菌的能力来判断以前是否接触过相同细菌以及机体产生的针对该菌的免疫力大小程度。沉淀反应的发现进一步扩展了这一个方法。既可以分析与细菌产物有关的抗原或抗体,也可以分析非细菌的因素。G. H. F. Nuttall 则更灵活地运用这门技术,他利用针对动物或植物而制出的抗血清反应和交叉反应来进行分类研究,甚至把它用在法医学上。

Bordet 证明了免疫性溶血可能是由抗红细胞抗体和补体介导的,并且参与这个反应的成分都可以被精

23

确的滴定，这就开辟了一种新的诊断疾病的方法。从此对那些既不凝集又不沉淀的病人血清也可通过抗体结合补体来检测。由此不仅能判断有无病源接触史，而且可以在血清学上对疾病进程进行监测。August Von Wassermann 和他的同事有效地利用这种方法研究出一种用于血清诊断的补体结合实验。不久，人们将补体结合反应进行了改进，形成了许多针对抗体抗原的定性和定量分析的技术。

变态反应和免疫病理学

1902 年生理学家 Paul Portier 和 Charles Richet 揭示了免疫史上又一项重要发现。在那以前，免疫应答被认为是一种有利的机制，其惟一的功能就是保护组织不受外来物的侵犯，寻找细胞毒性抗体的工作，对这种观点影响甚微。只是在几年前才发现到一种可以被非细菌抗原或毒素物质刺激的免疫应答。随后，Portier 和 Richet 证明了即使给预先致敏的机体注射无刺激性的物质时，也能引起严重的系统性休克样症状甚至死亡，他们称这种现象为过敏性，以与期望免疫机体后产生的通常的预防性效果相区别。此后不久，Maurice Arthus 证明了无刺激性抗原能与试验动物皮肤内特异性抗体形成局部坏死性损伤，称为 Arthus 现象。1906 年，Clemens von Pirquet 和 Bela Schick 证明这种称作血清病的疾病是由于宿主被注入大量外源性抗原后产生的抗体应答引起的。那种认为这仅仅是实验室里的人为现象的观点是站不住脚的，很快就有人证明了两种使人类倍受折磨的病——干草热和哮喘就属于这一类特异性的抗体介导的疾病。

思考一下早期免疫学对待众多变态反应和过敏反应的“示威活动”的矛盾心情是很有意思的。这个系统是为了提供预防功能而进化而来的，但为何有时有“出轨行为”引起各种致病情况？免疫学上的这种目的论是如此的根深蒂固以至于大约半个世纪来变态反应的机制被认为是与免疫机制完全分开的。只是随着对免疫性物质在如麻风、结核之类的疾病中的致病作用的逐渐了解，以及建立了像肾毒性血清肾炎、实验性变应性脑脊髓炎和淋巴细胞性脉络丛脑膜炎之类疾病的实验模型后，免疫病理学才融入背景更宽的免疫现象中。

免疫血液学

在 19 世纪 90 年代，证实红细胞的抗体能引起红细胞的凝集和溶血的早期工作主要集中在将这些细胞作为抗原的情况下，人们在同体和异体之间进行了许多用红细胞免疫动物的实验，很快就发现动物血清都存在天然的同种抗体，这种抗体能凝聚同一种属里其他个体的红细胞。在 1901 年开始的一系列实验中，Karl Landsteiner 证明了根据人体内血清中所含针对不同红细胞的抗体的不同可以将人分为几类血型，他因为这些实验获得了诺贝尔奖。这种分类非常清晰，是 ABO 血型系统的基础，后来证明在遗传学上是由三种等位基因决定的，由于它使得人们可以进行常规的血型分型和现代的输血技术，这种基因决定抗原多样性的理论重要性很快被它的临床意义所掩盖。最后在 1920 年 Landsteiner 和 Philip Levine 继这个发现之后又发现了 M、N 和 P 血型，并且在 1940 年又和 Alexander Wiener 一起发现了 Rh 因子：这种物质在输血以及新生儿溶血的发病机理上有重要意义。从此以后又有许多种次要红细胞抗原得到了鉴定，免疫血液学对理论免疫学、法医学以及关于人种关系和大规模迁移的人类学研究贡献巨大。

Ehrlich 的侧链学说

抗体这个词起初是笼统的，用于指那些存在于血清中能中和毒素和细菌的物质。血清学手段可以被动地转移免疫力的现象得到证明后，抗体是免疫宿主体内形成的一种独立的物质就变得显而易见了，抗体形成机制也就成了值得思考和研究的有价值的话题。最先提出的可被接受的理论是：抗原自身携带抗体特异性的信息，通过与相应抗体分子发生特异性反应而将信息的手段传入抗体分子中去。这种理论在大量早期的研究中并没有流行多久。当时已经证实实际抗体形成的数量比注入抗原认为能产生的数量多出许多。抗体形成一旦启动便会持续产生，并不需要更进一步加入抗原。到了 1897 年，Paul Ehrlich 提出了抗体形成的更进一步的理论，将其运用于具有划时代意义的白喉毒素与抗毒素检测的有关研究中，并由他和他的学生更精细地发展了它。

24

Ehrlich相信抗体是一种大分子，它对抗原甚至补体的抗原特异性依赖于一定立体结构，这种与抗原类似结构的互补性决定相互间特异反应。他认为抗体是体内自然而然产生的，行使细胞膜表面特异性受体的功能，以完成与猜想中的消化过程中食物受体相类似的正常生理功能（或与他后来在关于化学治疗学理论中所认为的药物受体的作用相类似）。Ehrlich推断这些抗体受体可能是合适的抗原分子特异性选择的结果，由于它们从细胞表面脱落而刺激细胞代偿性过度产生，从而出现在血液中成为循环抗体。Ehrlich富有想像力的理论统治了许多年，尤其是在德国，影响了许多医学领域中观念的改变。当时，很少有人认为抗体与抗原的免疫学性质的轮廓暗示着潜在性的问题。因为，19世纪70年代中期人们了解的惟一抗体被认为是只针对人类和动物病原菌的抗毒素。但20年过去了，人们开始怀疑Ehrlich理论的正确性。最早的冲击来自于有关研究的结果，显示了抗体能针对范围广泛的物质产生，甚至是健康动物和植物自发产生的物质，包括许多宿主在正常情况下永远不会接触到的物质。接着，在20世纪的第二个10年里，F. Obermeyer与E. P. Pick的实验观察及Karl Landsteiner的进一步研究发现抗体能针对几乎所有的，能作为半抗原与载体蛋白质相结合的人工化学物质而产生。于是，关于个体能自发针对如此多的外来物质甚至人工合成的结构产生特异性抗体似乎是不可理解的了。

细胞免疫与体液免疫的争论

科学史学家发现许多标志着某一领域取得最重要进展的时期往往是两个对立学派互相争论的时期，因为这可激励争论中的每一方设计实验方法以提高自己的地位并驳倒对方。这种现象出现在免疫学发展的早期，包括关于抗原-抗体相互作用的性质以及补体作用的模式的争论。这种争论为免疫学的飞速发展提供了巨大的动力。但可能没有哪一种争论比细胞免疫和体液免疫理论之争持续的时间更久，对免疫学未来发展的影响更重要。然而，这场免疫学争论不是一个独立的事件，而是19世纪正常与异常生理过程的医学基础理论经历的巨大观念性改革中的一部分。2000多年来，医学一直都处于希腊体液学家人体基本体液失衡而致病的观点统治之下。只是在19世纪，构成组织的细胞的重要性才得以理解。而当免疫学家在这场大争论中调整并选择自己的立场时，Virchow的细胞病理学理论（他认为疾病的发病基础是由于细胞功能异常）刚刚过去30年。

动物学家Ilya Metchnikoff最早明确提出白细胞吞噬作用可能在机体抵抗感染性疾病的过程中扮演着重要的角色。Metchnikoff的理论建立在观察海洋无脊椎动物具有巨噬细胞消化和破坏外来物质或细菌或至少有通过形成巨细胞和颗粒反应将它们包裹起来的能力。Metchnikoff认为脊椎动物的巨噬细胞执行类似的功能，并且这种功能是自身免疫及获得性免疫中最重要的因素。这项成果给Pasteur留下深刻的印象。于是他邀请Metchnikoff加入巴黎的Pasteur研究所工作。在那儿，为证明并发展免疫学细胞免疫（巨噬细胞）理论，Metchnikoff和他的众多优秀学生又花了十多年的时间做了大量难以想像的、硕果累累的工作。

Metchnikoff的细胞免疫理论立即激起了反对。刚开始，这项理论领先了一段时间。它提出时正是许多病理学家认为炎症反应及反应中的大量巨噬细胞在机体内是破坏性的作用而不是保护性应答。当时甚至有一种观点认为尽管吞噬细胞确实可以吞噬消化感染性微生物，但其结果却不是破坏病原体而是在体内转移病原体进而导致疾病的播散。接着，1888年Nuttall观察到正常动物的血清含有对一些微生物有天然毒性作用的物质，这种抗菌的物质在免疫后的机体中明显增强。后来Koch的学生Pfeiffer描绘了以他的名字命名的一种现象，即循环抗体（即便是被动转移至正常机体的抗体）能引起经腹腔注入免疫豚鼠的霍乱弧菌的溶解，在溶菌作用中有两种不同的体液物质相互配合：①热稳定血清抗体；②对温度敏感的因子，称之为补体，或者防御素（希腊语aleksein，防御）。

但对细胞免疫学理论打击最大的或许当属Behring与Kitasato在1890年对白喉和破伤风免疫的描述，他们证实了这种免疫作用是由循环抗体而不是巨噬细胞介导的。随着时间的推移，人们很快又发现了许多针对新发现病原微生物的循环抗体，并且Paul Ehrlich在白喉抗毒素系统中不仅说明了如何测量这些抗体而且发表了描绘抗体分子是什么样子、如何发挥作用的图片，这些图片使人易于理解。最后，当Metchnikoff自己

的学生 Border 描述体液中抗体和补体可以引起红细胞溶解的现象时，许多研究人员都被吸引到赞同 Koch 的看法，即体液免疫理论家的假说更符合事实。

Metchnikoff 和他的学生们在反对吞噬细胞理论的强大攻势面前并没有保持沉默。论文一篇一篇地发表出来，作者们描述宿主对一定微生物感染的抵抗力常常与血液中杀菌的力量没有关系。而且，物种的抵抗力常直接与吞噬细胞消化病原体的能力相关，如炭疽病就是一个例子。另外，他们设计出十分精巧的实验来证实，被滤纸制成的小袋密封的微生物由于不能与巨噬细胞接触，即便浸浴在含有抗体的组织液中仍能保持毒力。Metchnikoff 同时揭露出，制备富含活化巨噬细胞的腹膜浸出液能保护接受各种病原微生物致死剂量腹腔注射的宿主免于死亡，这为现代非特异性免疫治疗开创了先河。但在 19 世纪 90 年代，当时的潮流显然是反对巨噬细胞理论的。Metchnikoff 最后一次重新树立吞噬细胞理论的重要地位的尝试是在 1901 年出版了一本著作《感染病免疫》，但它出现得太迟了，人们由衷地钦佩书中的广博知识，但那些不相信细胞免疫学的人们仍未能转变他们的观点。

如果我们分析一下 20 世纪前 10 年的免疫学文献就会发现，大部分研究人员十分明显地赞同体液免疫理论而反对细胞免疫理论。除 Metchnikoff 和他当时的追随者以外，大部分人都因为这方面工作易于进行测量和展开而选择研究抗体，很少有人致力于更难掌握的细胞方面。即使如此，为了调解关于细胞免疫与体液免疫的争论，也曾出现过两次尝试。一次在 1908 年，瑞典科学院将诺贝尔医学奖联合授予 Metchnikoff(作为细胞免疫学理论的权威)以及 Ehrlich(当时是体液免疫理论的领袖人物)两人。另一次是在更早的时候，英国的 Almroth Whight 和 S.R.Douglas 企图通过更进一步研究调理过程(调理取自希腊语，使可口，使满意之意)的成果，合理的解释两个学派理论之间的分歧。他们宣称体液因素与细胞因素是同等重要而且是互相独立的。体液中的抗体特异性地与微生物发生作用而使之更易于被吞噬细胞吞噬消化。

Whight 的观点在英国十分流行，以致他的朋友萧伯纳将此作为他的戏剧《医生的困惑》的主题。在序言中，萧伯纳概括了 Whight 的研究，从某种方面来说是对医生这种职业的尖刻的指责，他写道：Almroth Whight 先生追随 Metchnikoff 的最有暗示性的生物学浪漫之一，发现白血球或称巨噬细胞为我们攻击和吞噬致病菌，为此需要我们用 Almroth Whight 先生称之为调理素的物质作为调味汁涂抹在细菌上面使之更适合吞噬细胞的胃口。

但在一定程度上由于这项技术极难实现，其结果也很难复制，Whight 关于调理作用的观点及其用于治疗学上的意义很快便受到了冷落。他尝试复兴细胞免疫学理论的持续影响微乎其微。

发生在这个世纪之交的体液免疫理论战胜细胞免疫理论的现象为免疫学这门年轻的学科的下一步发展带来长久的影响。通常情况下，科学领域内最富有想象力和高产的研究者往往倾向于选择他们(或他们老师)认为这一领域最重要的问题来研究。而在 20 世纪的前 10 年，对大多数研究者来说抗体就是理解免疫学的中心所在。在这个体液免疫学说盛行的年代，许多在细胞免疫学中可以解决的问题就这样被认为“毫无意义”而忽略了。

移植学与免疫遗传学

移植学的研究在免疫学史上有着奇特的地位。到 20 世纪初，它在其自身发展过程中产生了一些对免疫学有巨大潜在意义的思想。然而，当时研究它的人主要是与免疫学联系很少的外科医生、肿瘤学家、生物学家、遗传学家，而不是免疫学家。因此他们研究结果的重要意义在五十多年时间被免疫学的主流忽视。中世纪以来，外科医生梦想能对缺失的或不正常的组织和器官进行替换。Saints Cosmas 和 Damian 进行的腿移植的奇迹常常为文艺复兴时期的画家津津乐道。但是很多世纪后，除了移植角膜的少数几个例子以外，所有的努力都失败了。19 世纪末，人们发现肿瘤可以传给动物，但这些移植物通常都会被排斥，这是因为受体处于免疫状态。于是肿瘤生物学家由此看到了解决癌症的方法，如果能揭示排斥肿瘤移植物的机理，或许可以诱导人们来排斥自身的肿瘤。随后在世纪之交的转折时期，人们做了很多工作来研究排斥肿瘤移植物的机理。为了明确是宿主而不是肿瘤的某些特性导致了排斥，这类研究通常采用皮肤之类的正常组织作为对照。不

到十年后，移植物排斥的一般规律被揭示出来。Georg Schone 在他引人瞩目的《Heteroplastic and Homoplastic Transplantation》一书中进行了总结：①异种之间的移植无一例外地要失败；②同一种系内不相关的个体之间的移植常常要失败；③自体移植总是能成功；④同种异体的受体内存在着一种对首次移植物的延迟排斥反应；⑤对来自同一供体的再次移植物的排斥速度加快，和用其他移植组织预先免疫的受体所发生的一样；⑥受体与供体间的血缘关系愈近，移植愈可能成功；⑦这些规律同时适用正常组织和肿瘤组织。毫无疑问，Schone 认为排斥是宿主免疫系统所作出的主动反应。事实上，是他提出了"移植免疫"一词。

这些早期发现在 1916 年 E.E.Tyzzer 发表在 Tumor Immunity 上的一篇综述中得到了肯定和扩展，他指出近交系小鼠的研究表明，供者和受者的基因型不相容，也就是不是来自同一个的"孟德尔因子"。此外，形态学数据也表明炎症物质主要是由淋巴细胞组成，是可以增殖的而不仅仅是渗出性的。James Murphy 起初和 Peyton Rous 一起工作，1926 年他发表了一篇专著《淋巴细胞在组织移植、恶性疾病以及结核感染中的抵抗作用》，阐明胚胎中并不发生免疫排斥，而肿瘤可以在一些像脑一样的禁忌区域中生长，在那些区域中同时移植淋巴组织也可能引起排斥，X 射线照射能抑制这种排斥过程。

26

由于对免疫问题有着类似的兴趣，Clarence C.Little 在缅因州的 Bar Harbor 建立了 Jackson 实验室，全心投入到了肿瘤移植的遗传学研究中去。在 19 世纪 30～40 年代，George Snell"创造"了同基因异系小鼠，帮助定义了主要组织相容性复合体(MHC)，他的工作起初是以 Peter Gorer 提出的一个事实为基础，这个事实是老鼠的移植排斥是和一种针对由 Peter Gorer 命名为抗原 II 的红细胞抗原的抗体同时出现的。但随着人们对组织移植排斥的免疫性质了解得越多，似乎对解决人肿瘤问题提供的作用却越小。有趣的是，外科医生、肿瘤生物学家和遗传学家在免疫方面的大部分工作都被当时免疫学家所忽视。在那个免疫方面的工作受化学主导的时代里，研究人员对自身免疫和移植这类有更多生物学色彩的工作不感兴趣，他们主要从事抗原抗体化学性质、血清学反应的特异性以及定量免疫化学方面的工作。

在从事移植工作的三类人中，由于器官和组织的移植是显然不可能在人类身上实施的，所以外科医生首先离开了这个领域。类似的，肿瘤生物学家发现从动物实验中得到的知识没办法用在人类身上，于是他们也转向肿瘤的其他方面。遗传学家的兴趣变化较为微妙。起初，他们认为近交系小鼠是一种研究人肿瘤易感性以及最终治疗手段的完美工具。但如果说在早期进行鼠 MHC 定位工作还是为了了解移植物的免疫应答的话，很快它就失去了肿瘤学甚至免疫学的动机，而纯粹是为了研究遗传学。于是，他们开始致力于了解 MHC 的多态性和大小情况，以及分离规律。直到后来，他们使组织分型和组织相容性成为可行后，才重新开始关心移植生物学领域。

移植免疫(从 1912 年到 20 世纪 50 年代)

早期免疫学研究计划的结局

我们知道在 19 世纪 80 年代至 20 世纪前 10 年中，免疫学这个年轻而富有作为的学科吸引了几大主要领域中众多研究者的兴趣。一战初期，大多数在这一领域开展研究工作的人还没有自称为"免疫学家"，但这门学科的制度化正在认真的着手准备着。法兰克福成立了 Paul Ehrlich 的专门研究所，世界上许多先进的研究机构也纷纷成立了研究相关项目的机构和系院。在世界性的医学集会和卫生集会上经常可以看到为免疫学研究而形成的一个或几个项目小组，并且还存在一种"看不见的学院"，帮助免疫研究人员之间非正式地交流。《巴斯德研究所年报》中有相当篇幅用于刊登免疫学报告。在 1908 年和 1916 年先后成立了 *Zeitschrift fur Immunitatsforschung* 和《美国免疫学杂志》两份期刊来登载免疫方面的文章。到此，免疫学被正式承认了。至少在美国，免疫学这一学科分支的科学家和研究人员的共同兴趣进一步得到认同，于是 1913 年成立了美国免疫家学会。

再来看看在早期免疫学研究计划中各个组成部分取得的进展情况。预防免疫在鸡霍乱、炭疽、狂犬病、

瘟疫和其他几种主要疾病方面取得了巨大的胜利。但是人们进一步发现许多病原微生物不能制成高效的疫苗，这些不但包括结核、麻风杆菌、霍乱弧菌、梅毒螺旋体，而且还包括一些重要的革兰氏阳性致病菌及一些不知名的新近描述的与侵害动物和人体有关的病毒、寄生虫性疾病。因此，20 世纪前 10 年由 Pasteur 理论指导的免疫学所做出的早期承诺并不能完全实现，要想获得新的成绩便变得更加渺茫，需要克服巨大的困难才能取得一点成功。于是这方面的工作迅速从经典免疫学家手中转移到对微生物有机体比对免疫学机制更感兴趣的细菌学家、病毒学家及寄生虫学家手中。

我们知道，细胞免疫方面的研究与 Metchnikoff 的巨噬细胞理论在 20 世纪初遭到了拥护体液免疫理论的免疫学者的否定。研究细胞比研究体液中的抗体难度更大。在细胞研究领域中没有象抗体研究所采用的技术的帮助，如凝集现象、抗原抗体沉淀反应、免疫溶血、动物之间被动的抗体转移。事实上，细胞仍被认为是神秘之物，而 Ehrlich 描绘的抗体及其特异性结合位点的图片使人易于理解并确信抗体是一个具有真实结构和特性的实体。

用于防治疾病的血清学治疗技术的发展结局也与预防免疫类似。在这一时期，除意义深远地证明了马抗白喉与抗破伤风毒素的功效外，再没有别的重要的成就。很长时间里，世界各地的实验室都在持续生产这两种抗血清（Pasteur 研究所通过免疫饲养的马群来获得），但除了这两种抗毒素以外，其他外毒素引起的重要疾病罕有能用此种方法治疗的，因而人们对这一方法的兴趣逐渐减退了。很长一段时间后，抗体的被动转移方法才能得以运用。血液病学家利用 γ 球蛋白预防新生儿溶血病，儿科学家使用恢复期抗血清治疗脊髓灰质炎。

这一时期，人们对细胞毒性抗体和自体免疫方面的兴趣是极短暂的。尽管人们企图将抗组织和抗器官抗体与病原学相联系，但除了抗红细胞抗体引起溶血性贫血外，免疫学家没有提出任何令人信服的证据，他们甚至忘掉了 Donatd 与 Landsteiner 对阵发性冷血红蛋白尿的发病过程的揭示——这一揭开自体免疫性疾病冰山一角的可能突破口。所以直到 1912 年，各实验室对细胞学现象的关注还只停留在探究一些基本上毫不相干的临床特定方面的相关问题，如眼科对交感性眼炎及晶状体自身疾病的研究。

27

血清诊断学领域的发展为社会科学家研究学科分化的问题提供了一个典型案例。这些技术的形成不仅需要对病原发生学，也需要对病原方面的理解，只有那些对感染性疾病的免疫机制感兴趣的研究组织能够建立和发展。梅毒的血清学诊断成为实验室的主要项目，如何完善这项技术并将其推广到其他疾病的诊断工作中去成为这段时期讨论的话题。但很快，这项技术得到普及并常规运用。那些关注于基本机制方面的免疫学家便将目光转移到其他领域，而这方面的工作改由传统的细菌学家进行。事实上，投身于血清学工作的细菌学家则改称为血清学家，他们主要从事实验室诊断而不是基础免疫学工作。

自从发现过敏现象以来，免疫学实验家就一直密切关注着过敏及其相关疾病。他们对过敏反应中抗体的性质及其在疾病发生中的基本作用机制感兴趣。但经过短暂而且基本上不成功的努力后，他们不能解释为何在进化过程中保护机体的系统现在却引起疾病这一矛盾现象，于是很快放弃了这方面的研究。总体而言，这方面的研究转交给临床上关注干草热和支气管哮喘的医生。在临床上过敏作为医学专科的一个分支，主要在过敏学实验家的努力下弄清发病机制以及建立起皮试和治疗人体过敏疾病的手段，才使过敏方面的研究取得了更进一步的成绩。除此以外，过敏及其相关疾病也引起生理学家如 Henry Dale 极大的关注，他对这些疾病发病的生理学机制充满兴趣。另外，过敏现象也引起了大批实验病理学家的注意，他们主要对这些相关性疾病及其相关损害的比较研究感兴趣。

免疫化学主导地位的上升

就基础科学家而言，免疫学研究计划中他们感兴趣的所有领域都衰退了，少数几个领域给了其他学科。而现在我们将看到它的常规领域如何逐渐转到新的主流中来。后来人们普遍的关注抗原和抗体的化学性的原因可以追溯到 Paul Ehrlich 丰富的想像。Ehrlich 关于抗体形成的侧链化学理论将抗原抗体和补体描绘为真实的化学分子，它们的结合位点是立体结构上互补的结构，这决定了其互相作用时的特异性。然而那个时

候对蛋白质分子精确的组成和结构知之甚少，因此还没有合适的技术方法能将 Ehrlich 的理论转化成实验室里的实验模型。

大多数教科书将免疫化学的开拓者这一盛誉授予著名的物理化学家 Svante Arrhenius。因为，他在 1904 年发表的一篇文章的题目中将免疫与化学连接在一起作为一个词“免疫化学”而提出来。Arrhenius 与其他许多物理学家一样被许多生物学上神奇而又含混的问题所吸引，他认为通过引入严密的物理和化学定理能够从一定程度上扭转这种混乱的局面。从他的丹麦同事 Madsen 那儿，Arrhenius 对白喉抗毒素与白喉毒素的滴定问题产生了兴趣，他认为这种反应，如同他早年的研究强项——弱酸与弱碱相互反应一样，是可逆的。但称 Arrhenius 为“免疫化学之父”也是不太正确的。因为，他的贡献仅在于纯理论方面，当时并不能进行充分的试验，而且对后来的事情也无立竿见影的影响。

真正的转折点也许是在 1906 年，Obermeyer 和 Pick 证实了蛋白质抗原能通过化学修饰改变其免疫特异性。例如，经硝酸处理过的蛋白质免疫动物后产生抗体的特异性不再与原来的蛋白质所对应，而是与加入的硝基基团对应。1912 年，在一篇关于这一领域的百科全书式的综述里，Pick 提出某些不同的合成组分(称半抗原)能结合到蛋白质载体上起抗原决定簇的功能。这是一种新的强有力的工具，使得在有机化学实验室产生的小分子能用于研究免疫特异性的本质及抗体连接位点的特性。其中博学的 Karl Landsteiner 恐怕是使用这种工具最专致且取得较好效果的科学家。1917 年他发表了两篇文章来说明这种手段十分强大，这些论文有助于解释他在后续 37 年的研究工作以及免疫化学领域的主要成就。这个时候，人们对抗原抗体的生物学功能及抗体形成的生物学基础理论的兴趣已经不及对抗原抗体化学性质感兴趣了。

另一种研究抗原与抗体化学性质的方法是由有机化学家 Michael Heidelberger 在 20 世纪 20 年代建立的。通过早期在细菌实验室的工作，Heidelberger 能够证明肺炎球菌的外壳脂多糖也能引起特异的抗体应答，这与经典的认为机体只能产生针对抗原的抗体的观点相反。这促使 Heidelberger 研究不同肺炎球菌菌株之间脂多糖类抗原的化学差别，经过在这方面多年坚持不懈的努力，他发展了一套令人印象深刻的定量方法，帮助免疫学成为一门更精确的科学。

Mindset 之后的理论：指令学说

从上面我们已经了解了免疫学早期生物医学时期，Ilya Metchnikoff 依据严格的达尔文进化论，在动物学中提出了第一个关于免疫的理论。第一个抗体生成的学说是 Paul Ehrlich 提出的，在医学中产生，也以达尔文进化论为基础。但一战以后受化学思想引导的研究人员对免疫学的生物学机理不感兴趣，而对抗体以及抗体的形成很感兴趣。于是关于抗体形成的新理论毫不犹豫地一个接一个被提出来。这些新的理论不再注意抗体的功能，而着重于它们的化学结构，尤其是为什么脊椎动物可产生大量的能与多样性不断增加的潜在抗原反应的特异性分子。而这正是 Ehrlich 的侧链学说所不能解释的问题：进化不可能自发产生如此多的抗体，大部份无刺激物质甚至人工抗原的抗体缺乏明显的选择压力。

28

因此毫不奇怪，新的抗体形成的化学理论本质上是拉马克化的，与生物学家相反，化学家的分子都不具有进化性。首先提出的新理论是 1930 年生物化学家 Felix Haurowitz 的理论。在这个理论里，他指出抗原自身包括了形成抗体的所有必须信息，并且通过合成特异氨基酸序列的模板，为新生的蛋白质界定了完整的结构。这就是最初所说的抗体形成的指令学说，这个学说不仅解释了不同抗体的巨大多样性还解释了抗体分子如何能具有这样精确的特异性。这个学说在 1940 年被物理化学家 Linus Pauling 进一步改进，后者认为抗原作为一种模板，新合成的氨基酸链则缠绕它形成蛋白质分子。

但不能让生物学家们满意的是，这些着眼于化学的理论并没有解释为什么在抗原明显不存在时抗体仍能持续。他们也没有试图解释为什么第二次接触同一抗原会引起快速的加强了的反应。此外，这些理论也无法解释较新的实验结果。这些新结果表明，重复免疫可能会引起抗体质的改变，在某些情况中有很强的特异性，而在另一些情况下有潜在的较广泛的血清交叉反应性。病毒学家 Macfarlane Burnet 对直接模板学说在生物学方面的不足加以补充，于 1941 年提出了指令学说的修改。随着对酶在合成及消化方面的重要性的认

识越来越多,Burnet 认为抗原的功能是刺激蛋白合成中所必需的酶进行适应性改变,进而产生相应的特异性的分子。这个酶适应学说不仅能解释抗原发出的初始指令的多样性,而且由于这些改进过的酶可以在大量的子代细胞中复制,每一种子代细胞均可形成抗体,因此可以解释抗体形成的维持和抗体应答的增强现象。后一点尤其值得重视,因为 Burnet 或许是强调细胞连续功能和抗体形成过程中细胞复制的重要作用的第一人。

随着人们越来越了解到核酸可能有基因的作用,Burnet 和 Frank Fenner 于 1949 年提出了这个学说的修正版。仍然是出于一些基本生物学考虑,他们提出,抗原可能将其特异性决定簇信息直接表达在(? RNA)基因组上,机体针对这种间接模板形成特异性抗体,这种新的基因拷贝不仅可以存在于细胞中,还可以在细胞分裂过程中复制,由亲代细胞传给子代细胞,由此来解释抗体形成的持续现象和强化应答现象。有趣的是,当时化学的观点在整个免疫学界中是如此的根深蒂固,以致即使是 Burnet 这样的生物学家在他的前二个理论中也不得不采取拉马克式的指令方式。

免疫化学研究工作的范围和影响

人工载体在抗体特异性中的研究应用,带来了对抗原大小,结构,抗体结合位点的分类,定义了抗原抗体反应的热力学参数。测定这些反应的定量技术的建立,以及确定抗体是一种 γ 球蛋白使上述研究变得容易,为化学纯化方法的产生铺平了道路。

20 世纪 20 年代到 60 年代初的五本重要书籍很好地概括了当时免疫学的研究范围。这五本书是 1924 年 Well 的《免疫的化学性》,1934 年 Marrack 的《抗体和抗原的化学性》,1937 年 Landsteiner 的《血清学反应的特异性》,1943 年 Boyd 的《免疫学基础》以及 1949 年 Kabat 和 Mayer 的《定量免疫化学》。这些书是年青一代免疫学家学习的参考书,但没有一本书谈及到了这个领域中生物学或医学方面的东西。如果某位 Max Theiler 在 20 世纪 30 年代发明了黄热病的新疫苗,只有病毒学家和学习传染病的学生会感兴趣。如果在 20 世纪 20 ~ 30 年代 Hans Zinsser 或 Arnold Rich 研究细菌的变态反应,或者 Louis Dienes 或者是一位 Simon 和 Rackemann 建立了单纯蛋白质引起的迟发超敏反应模型,只有细菌学家和实验病理学家感兴趣。最后,如果 Thomas Rivers 早在 1933 年建立变态反应的模型,当时没有人会感兴趣。这些以及其他类似的对有生物医学价值的领域作个"短途旅行"的研究都被当时的免疫学主流所忽视,通常只能发表在一些外围刊物上,对占统治地位的主流影响甚微,只有后来一代更熟悉生物学问题的免疫学家才把这些当作免疫学发展中的里程碑。

但这并不是说上面谈到的在免疫化学时期经典研究方面的所有工作都停止了。正如有人指出:"已经很好地形成的研究领域的完全消失需要很长时间,(这期间)总有一些事可以做。"因此,如上所说,临床变态反应学家顺着新的研究方向重新定义这个领域,使过敏现象的研究获得新生,在制备更好的类毒素和更好的免疫模型方面也不断取得进步。血清学家一直在改进和扩展血清诊断方法的应用。而且,治疗人和动物疾病的疫苗一个又一个地被发明出来。

免疫生物学的革命

20 世纪 20 年代至 50 年代间免疫化学统治时期,正统科研工作产生了很有意思的结果。人们进一步描述了抗体和抗原的化学性质及两者之间精确的特异性反应。然而,处于免疫学研究工作边缘的生物学家观察到的现象却不能在原有的抗体形成的指令理论中找到答案。他们提出:抗体为什么在没有明显抗原作用的条件下能持久产生?为什么第二次接触抗原刺激时能产生比第一次接受抗原刺激时强烈得多的增强免疫应答?为什么重复接受抗原刺激能改变抗原的特性,在多数情况下能增强与抗原决定簇的亲和力而增强抗体特异性?最后,为什么抗病毒疾病的免疫力形成似乎与循环中抗病毒抗体的存在无关?以上种种加上其他建立在生物学基础上的质疑对免疫化学的理论模式,尤其是对 Macfarlane Burnet 于 1941 和 1949 年编著的《抗体的产生》书中的观点提出了严峻的挑战。Burnet 也多次抱怨说免疫化学理论尽管相当完善,但对免疫

29

应答的许多生物学功能方面的问题却无法解释。

到了50年代,免疫学似乎处于面临大规模对抗的时期,正如Thomas Kuhn在他的《论科学发展的结构》中所描述的,一方面是已不能令人满意地解释这一领域的所有现象的免疫化学传统理论所采用的研究方法越来越没有价值,结果日益乏味,其具备的实用价值越来越小;而另一方面是日益成长壮大起来的生物医学领域,从事这一领域的科学家们正在努力对免疫化学理论不能很好地解释许多新的重要的问题做出解释,他们对经典的免疫化学理论提出了有力的挑战。

20世纪40年代,Peter Medawar"重新"发现了移植的规律,证明组织移植的排斥反应是一个纯粹的免疫学现象,但与体液中的抗体无关。在1945年,Ray Owen描述了异卵共生的二只小牛不能产生针对对方抗原的应答。解释这个现象的关键在于研究脊椎动物幼儿免疫应答的个体发育。于是Burnet和Fenner推测存在一种以细胞为主的免疫学耐受。Peter Medawar(当时还是个动物学家)和他的同事通过实验证实了这个假说。于是Burnet和Peter Medawar获得了1960年的诺贝尔奖,然而当时的经典理论不能解释在20世纪50年代早期关于免疫缺乏性疾病中描述的另一种现象。要解释这种现象必须深入到免疫应答的生物学基础中去。最后,经过40多年或更长时间,自身溶血性疾病、实验中或体内的自身免疫性甲状腺炎、以及过敏性脑脊髓炎的新证据重新唤醒了人们对自身免疫性疾病的兴趣。这些新现象为质疑旧的观念提供了充分扎实的基础。要想回答这些问题,必须发展新的方法。很快这些方法就产生了,免疫荧光染色技术使人们得以进行组织定位,而溶血斑分析技术可以对抗体形成细胞进行定量计数,被动细胞转移,尤其是细胞培养技术使人们第一次得以分析细胞之间的反应和免疫细胞的动态变化。于是一场真的革命产生了,只等着一位历史性的人物来执掌反对旧的领域和旧的不合时宜的观点的大旗,这个名垂青史的人物就是Macfarlane Burnet。

抗体形成的选择性学说

1949年Burnet和Fenner的间接模板学说提出了一个所有的抗体形成理论必须面对的重要的生物学事实,即最近被称为获得性免疫耐受的现象。从此,圆满的解释抗体形成什么时候产生耐受就和抗体怎样受到刺激而产生同等重要了。

第一个纯粹生物学意义上的抗体形成选择学说是1955年由Niels Jerne归纳出来的,他称之为天然选择学说。Jerne提出,如同在他之前的Paul Ehrich所认识到的,宿主确实可以合成微量的整个抗体库中的每一种特异性抗体,这些抗体自发地出现在血中,称之为天然抗体。其功能是选择性地和合适的抗原相作用,把这些抗原转移到体内某些细胞里。在这些细胞里,抗体可以发生信号复制出和自己相同的分子来,也就是天然抗体可以导致大量特异性抗体的产生。抗体增强的再次应答因此可以通过初次免疫后体内产生大量的抗原运载体(天然抗体),有助于抗原对高亲和力的抗体的选择性作用来解释,这同时也解释了多次重复免疫后,抗体性质改变的原因。免疫耐受现象也首次轻而易举地被解释了,推测这是由于与所有自身抗体反应的天然抗体,在最初就被机体组织所忽略,因此就不能介导自身抗体的形成。

尽管Jerne的天然选择学说没有争取到多少指令学说的支持者,但它的历史重要意义在于它激励了站在生物学角度这一边的理论学家。这种激励并没有"休眠"多久,因为几年后Burnet就提出了一种抗体形成的克隆选择学说,这个学说的核心在于一个推测:抗体是细胞表面天然表达出来的受体,能与抗原选择性的作用。抗原与细胞表面受体之间的作用产生了克隆增殖,其表型受到给定抗原特异性限制的细胞信号的影响,一些子代细胞形成了抗体生成细胞,另一些细胞作为免疫记忆细胞参与后来的免疫应答。最后,这一理论提出免疫耐受是一种克隆忽略过程引起的。这个过程由特异性的自身抗原或在早期克隆前体胚胎发育过程中的关键时候引入的物质介导。Burnet的理论得到了David Talmage和Joshua Lederberg的重要支持和帮助。Talmage独自一人回答了抗体特异性(晚期克隆型)可以区别数量大得多的抗原决定簇。Lederberg从另一方面思考了克隆选择学说的遗传学意义,提出抗体的多样性或许在于拥有免疫球蛋白基因的体细胞的突变率很高而形成。

在短短几年里,克隆选择学说得到了广泛的认可,部分得益于研究细胞的新方法的应用,也得益于遗传

学新的发展。一旦 DNA 决定抗体结构的观念为人们所接受，免疫球蛋白的氨基酸序列得以阐明，克隆选择学说的自身多样性的矛盾就引起了长时间的争论：一部分人坚持整个特异性都编码在基因中；另一部分人认为抗体的多样性在于体细胞突变或高度有限数量的基因重排。这个问题的解决是 20 世纪分子生物学的一大胜利。它涉及到一定数目的小基因片段的多种重排，再加上突变的辅助，形成大量多样性的抗体轻链和重链。

30

免疫学的融合统一

我们可以将免疫学理论 110 年的历史分为三个明确的时代：最初，从 1880 年到第一次世界大战，以新的细菌学和感染病为中心，带有明显的医学考虑。早期免疫学研究工作中的几个部分没能维持住起初的动机，未能实现最初的目标便开始衰退了。一部分包括制备新的疫苗、血清治疗学方法、对细胞免疫的研究，以及对可能由细胞毒性抗体介导的疾病的研究。另二个部分走了一条不同的道路，对过敏反应及相关疾病的研究基本上交给了临床过敏学家；而发展和改进血清诊断学技术的任务则给了新的血清学。

我们可以将一战到 20 世纪 50 年代末 60 年代初称为第二个时期。随着对旧工作的兴趣逐渐失去，新的兴趣在免疫学中形成了。这个领域主要由从化学性质的角度来研究抗原和抗体的人组成的，他们进行的研究工作和理论基础都反映了这个主导理想。一门学科不会自发地改变它的方法和准则，而是由那些探索肥沃的未知领域的人推动到新的位置。虽然早期免疫学工作广泛地与许多生物学、医学上的领域相互影响着，但在免疫化学时代却是相对倒退，很少与其他生物学学科相联系。

随后，在免疫学上发生了巨大的转折，或许可以称为一场科学革命。既然旧的理论和旧的方法不能满意地解释新的现象，生物学家们从化学家手里夺回了这门学科的主导权。以新的生物医学取代了化学方法和基于化学思想的理论。后来以克隆学说为指导，提出了一系列明显不同的涉及到生物学基础和生物医学意义的免疫应答的问题。

最后，这二个阵营合并了。化学家们（他们从最后的分子产物——抗体向前研究接近这个系统）和生物学家们（他们从最初的细胞学作用向后研究）发现他们的不同问题和技术方法，其实是朝着同一个系统的二个方面。他们在 T 细胞、B 细胞受体和淋巴因子的化学和分子生物学上找到了共同点，他们一起澄清了抗体形成和结构的主要问题、细胞之间相互作用的动态性和化学机制，以及免疫应答的调节机制。

免疫学再次接触到了其他众多学科，它为经典的进化论提供了优美的、机制非常复杂的模型，可以用来预测新的致病原的出现，而不仅仅是在致病原出现后才缓慢的调整应答。事实上，进化的这个特点不只发生了一次而是二次，一次是为了免疫球蛋白的 B 细胞的受体，另一次是与之有某些不同点的 T 细胞受体，它给遗传学家提供了一个免疫球蛋白基因超家族的独特例子。这个家族的成员执行着广泛的相互联系的活动，甚至超出了免疫应答的范围。它的免疫多样性的形成机制表明了一个基因产物可以由许多不同 DNA 片段的各种碎片组装起来。在对淋巴因子和细胞因子的研究中，现代免疫学为生理学家们提供了各种细胞间是如何通讯，互相影响的例子。最后，新免疫学已经帮助许多医学专家分清重要疾病的病因，并且指出了寻找预防措施或与之作斗争的治疗方法的方向，这将在下面章节中谈到。

免疫学界的诺贝尔奖获得者

1901 年，von Behring

von Behring (1854 ~ 1917)是第一届诺贝尔医学奖得主。他曾师从于柏林 Koch 研究所的 Robert Koch。在 1883 年 Loffler 分离出白喉杆菌及 Roux 和 Yersin 于 1888 年鉴定白喉杆菌外毒素后，von Behring 与他的同事 Kitasato 以及 Wernicke 一起，在 1890 年至 1892 年间指出白喉和破伤风是经血循环中的抗毒素形成免疫力的，并指出主动给病人注射抗毒素血清可能具有治疗作用，从而在一些疾病中开创了血清免疫疗法的途径。在

给他的颁奖词写道“因为他在血清治疗方法上的工作，尤其是用于抵抗白喉的工作，他开创了医学新领域，从而给予了医生战胜疾病和死亡作战的一种武器。

1905 年，Koch

Koch(1843～1910)“因他在结核方面的研究与发现”而被授予诺贝尔奖。当他还在德国一个小城镇当医生的时候，就因其在炭疽杆菌的生活史及炭疽病因学上的研究而震动医疗界。他在柏林先是得到一个实验室，继而是一个研究所。在一些杰出学生的帮助下，他建立了严格的细菌分离和培养技术，并在病因学证据方面提出了著名的 Koch 假说，这些努力都使细菌学成为一门真正的科学。Koch 一生从事于几种不同疾病的研究。其中对结核杆菌和结核抗菌素的鉴定及对结核病的不懈研究使他获得诺贝尔奖的殊荣。结核菌素反应的诊断性实验及已致敏动物对过量皮下注射结核杆菌的皮肤反应，又称 Koch 现象，为以后阐明细胞免疫机制发挥了重要作用。

1908 年，Metchnikoff 和 Ehrlich

31

这一年，Elie Metchnikoff(1845～1916)与 Paul Ehrlich(1845～1915)“因为他们在免疫力上的”贡献共同分享了诺贝尔奖。Metchnikoff 出生于俄罗斯乌克兰，重点在动物学方面学习了比较胚胎学。1884 年在意大利一家海洋生物实验室工作期间，他对海盘车幼虫巨噬细胞的观察奠定了他的免疫细胞(巨噬细胞)理论的基础。Metchnikoff 因政治原因离开俄国后，巴斯德在巴黎自己新成立的一个研究所里为他提供了研究工作。从此，Metchnikoff 投入他的全部精力进行了卓有成效的研究，为他的巨噬细胞理论寻到了支持点，也反驳了许多倾向于免疫学是基于体液机制(如抗体，补体等)的学者对他的攻击。

Paul Ehrlich 出生于德国，学习过医学，早年对细胞中的细胞染色反应产生兴趣并设计了一些对结核杆菌和血液系统白细胞非常有效的染色方法。1891 年在感染病研究所担任 Koch 的助手，从此开始了他的免疫学研究。在 1897 年，沿着他在植物毒素蓖麻毒蛋白和相思豆毒素可以引起抗体应答的研究工作，Paul Ehrlich 做出了他早期在免疫学上的最瞩目的贡献——发表了首篇描述标准化制备白喉和抗毒素的实际方法的论文。这篇论文同时包含他著名的抗体侧链形成学说的要点，这个学说有力的影响了免疫学几十年。他和 Julius Morgenroth 一起发表了一系列关于免疫性溶血机制的重要文章。进入 20 世纪不久，Ehrlich 将他在免疫学大部分的研究活动转向感兴趣的免疫化学药物治疗方面，在治疗锥虫病及梅毒方面取得了重要发明并协助建立了科学的药物学。

1913 年，Richet

Charles Richet(1850～1935)，“因为过敏反应方面的成就”而获 1913 年度诺贝尔奖。Richet 出生于巴黎，学过医学尤其对生理学感兴趣。正因为这种兴趣，他在乘摩洛哥王子号游艇巡游期间，对海洋无脊椎动物毒素的生理学作用进行了研究。他与同事 Paul Portier 一起发现过敏现象并不取决于注入毒素的性质而仅仅依赖于已致敏动物体内抗原的功能。由此出发，他指出“保护性”的免疫机制有可能导致疾病发生，从而在当时为医学提供了一种新奇的前景。随后在人们证明了实验中的过敏现象与他们熟悉的过敏性疾病之间有某种关系后，Richet 的观察在免疫学上的临床意义就和其理论意义同样重要。

1919 年，Bordet

Jules Bordet(1870～1961)，“因为他在免疫学上的研究成就”获得 1919 年度诺贝尔奖。他是一位比利时医生，24 岁时在巴黎的巴斯德研究所师从于 Metchnikoff。他对阐明补体介导的溶菌作用作出了早期重要的贡献，并于 1899 年发现了特异性溶血现象。此后不久，在与他的助手，也是他的妻弟的合作下，Bordet 描述了补体固定现象及其对辅助诊断的可能性。这种方法迅速发展为诊断感染性疾病的有力工具，尤其因被 August von Wasserman 和他的同事用于诊断梅毒的许多补体结合实验中而闻名。Bordet 在免疫学的其他方面也

做出了许多重要的贡献。他和 Ehrlich 关于抗原-抗体-补体相互作用的本质的争论也使他享誉免疫学界。

1930 年, Landsteiner

1930 年, Karl Landsteiner(1868 ~ 1943)"因他在人血型方面的发现"而获此殊荣。Karl Landsteiner 是一位维也纳医生,在从事免疫学工作以前一直对有机化学结构方面有着强烈的兴趣。他似乎从来都是一开始就选择工作中的重点领域或在重点课题中投入更多的注意力。1901 年, Landsteiner 在早期对抗红细胞抗体的研究中描述了人类一整套同种凝集素,包括现在所称的 ABO 血型。

1926 年,他与 Philip Levine 共同发现了 MNP 系统,并在 1940 年与 Albert Wiener 一起发现了红细胞 Rh 血型系统。他最早提出脊髓灰质炎及梅毒可在除人类以外的灵长类动物身上发生。一战期间,他对化学修饰的半抗原产生的抗体应答产生兴趣,并在以后的 25 年里基本上在纽约研究所从事该研究,对理解抗原-抗体相互反应的化学基础做出了巨大的贡献。这些理论在他的著作《特异性血清学发应》中得到了阐述。据说在人们称赞他所发现的人血型抗原的重要性时, Landsteiner 认为 1930 年诺贝尔奖更应该授予他在抗体与半抗原相互反应方面的工作。

1951 年, Theiler

Max Theiler(1899 ~ 1972),"因他在研究黄热病疫苗方面的成就获奖"。他是一位南非人,曾在英国学医并于 1922 年迁入美国。先后在哈佛大学的热带地区医学院和纽约的 Rockefeller 研究所工作。他提出,黄热病是由一种滤过性病毒引起。他所进行的大鼠保护性实验(用混有病毒的抗体血清来保护大鼠免遭致死剂量的脑内接种而死亡的实验)为研究黄热病的流行病学及其他研究提供了非常重要的工具。30 年代后期,他通过一系列大鼠和鸡胚载体实验得到了黄热病毒的减毒株。通过这种方法,这种病毒株保持了它们的免疫原性,但去掉了病原性,从而为生产普遍有效的黄热病疫苗奠定了基础。

1957 年, Bovet

Daniel Bovet(1907 ~)是一位瑞士生理学家和药理学家。1957 年"因在过敏疾病中抗组胺治疗的研究"而获奖。Schultz-Dale 现象(即一小块已致敏的子宫组织在抗原的刺激下能产生收缩)的发现,为建立研究过敏反应的体外模型及解释其中的生理学机制提供了便利。研究结果表明在过敏反应中,机体释放了一系列活性物质,其中最重要的物质是组织胺。在巴黎巴斯德研究所 Emile Roux 的指导下, Bovet 可能接触过免疫学和过敏方面的知识,并且在自主神经系统对各种化学物质的反应方面发表过很多论文。正是这些经历和认识使他从事研究有关抗组织胺效果的试剂,并由此发明了治疗支气管哮喘和干草热十分有用的药物。退一步说,即使他并没有因抗组胺研究方面的工作出名,那么他在南美洲探险发现的箭毒和关于箭毒作用的机制以及发明的一些类似于箭毒的松弛剂、镇静剂及麻醉剂方面的杰出贡献也足以保证他在医学发展史上的杰出地位。

32

1960 年, Burnet 和 Medawar

F. Macfarlane Burnet(1899 ~ 1985)和 Peter B. Medawar (1915 ~ 1987)两人因"获得性免疫耐受的发现"获得了 1960 年度诺贝尔奖。第二次世界大战期间许多学科的基础性研究向前发展,其中提高烧伤和创伤病人的皮肤和其他移植物移植存活能力及解释移植排斥机理方面的研究尤为突出。Medawar 在牛津大学学习过病理学和动物学,对组织修复及由此产生的组织移植方面的问题尤感兴趣。他的早期理论工作建立在机体对异体皮肤移植的排斥符合免疫特异性规律的基础上,这实际上与机体抵抗细菌和病毒感染的应答机制相同。接下来,他和他的一些优秀的学生(最著名的有 Rupert Billingham 和 Leslie Brent)开展研究,牢固地建立了移植免疫生物学这一分支学科并由此开辟了临床器官移植领域的许多新课题。1945 年至 1947 年间 Ray Owen

报告了一例奇怪的异卵双生小牛的现象,这对孪生小牛在子宫内共用一套血液循环系统,从而在血细胞中形成了血型嵌合体,对各自的抗原也不能发生免疫应答。一位多产的研究人员同时也是一位广治博学的理论家——澳大利亚的医生兼病毒学家 Macfarlane Burnet 注意到这一现象时正与他的同事 Frank Fenner 一起修改他 1941 年出版的一本很有启迪意义的著作《抗体的产生》。在 1949 年出版的新版中他不仅提出了一种新的关于抗体形成的间接模式理论,而且对 Owen 的发现提供了理论上的解释。Burnet 和 Fenner 认为免疫应答发生于胚胎较晚期的动物体内,此时体内存在一种能"自我标记"的抗原类型。宿主对这类抗原耐受而不产生免疫应答,其他不能分类为自我成分的则为"异己成分"而在以后刺激产生主动的免疫应答。这种假设认为,在关键时期任何进入机体的抗原都将被视为自身成分而产生耐受,以后不能激活免疫系统。这些概念被 Burnet 进一步发展到他的抗体形成的克隆选择理论中去。Medawar 和他的同事用 Burnet 和 Fenner 的免疫耐受假说开展实验,并于 1953 年利用近交系小鼠给予了广泛的证实。Medawar 将这种现象称作"获得性免疫耐受"。

1972 年,Porter 和 Edelman

来自牛津大学的 Rodney R. Porter(1917~1985)和来自 Rockefeller 大学的 Gerald M. Edelman(1929~),"因对抗体的化学结构进行的研究"而获得本年度诺贝尔奖。A. Tiselius 及 E. A. Kabat 证实了抗体是一种高分子质量 γ-球蛋白,使人们清楚的认识到想从化学的角度来定义抗体的基本免疫学特异性及继发产生的生物学功能的基础是极其困难的。Porter 采用酶解的方法断开抗体分子来得到更小的活性片段,并于 1958 年使用木瓜蛋白酶使完整的抗体分子分解为两段相同的 Fab 段和一条 Fc 段,Fab 段含有抗体结合的位点,Fc 段则与抗体继发产生的生物学功能有关。Edelman 随后也证明了同源性骨髓瘤球蛋白能被还原断裂为多肽链成分,包括轻链(L)与重链(H),而两种不同豚鼠产生的抗体轻链电泳速率等参数均不同。他进一步指出多发性骨髓瘤 B-J 蛋白与抗体的轻链类似。Porter 和他的同事接着证明了免疫球蛋白分子是由两条轻链与两条重链组成,从而提出了现在普遍接受的 IgG 模型。免疫球蛋白组成链和片段的分离纯化使免疫球蛋白的基本氨基酸序列测序得以可行,Porter、Edelman 和其他许多研究者的实验室都在积极的从事这项工作。通过这项工作人们对抗体分子轻链和重链上既有可变区又存在恒定区开始有所理解,并可以比较抗体特异性不同的、同种异型的、甚至异种动物间的抗体分子的基本氨基酸序列。最后,1969 年,Edelman 和他的合作者们成功地提出了一个完整免疫球蛋白分子的一级结构,不仅为抗体分子活性区的定位,也为定位抗体分子中负责继发生物学活性功能的区域提供了很大帮助。

1977 年,Yalow

1977 年 Rosalyn Yalow(1921~)"因对肽类激素的放射免疫测定方法的研究工作"而获此奖(同时分享该奖项的还有 Roger Guillemin 和 Andrew Schally,他们发现了大脑产生的肽类激素)。

20 世纪 50 年代起,Yalow 和她的长期合作者 Solomon Berson 调查了糖尿病人胰岛素耐受的原因,她们发现,使用胰岛素的糖尿病人体内可形成特异性抗胰岛素抗体。最初他们试图发表这个重要发现,但因人们普遍认为象胰岛素这样的小分子不可能产生免疫原性而被拒之门外,Berson(1972 年去世)和 Yalow 一起证明了通过在胰岛素抗体和放射性同位素标记的胰岛素之间形成的免疫复合体中加入越来越多的未标记的胰岛素可以测定被置换出来的标记的胰岛素的含量。这一发现为最早的放射性免疫法测定激素奠定了基础,可以估计到纳克(ng)和皮克(pg)水平,从此这种检测系统被应用于对其他激素及生物活性物质的检测,成为许多基础及理论研究的很有价值的工具,正是利用这一技术 Guillemin 和 Schally 才分离出下丘脑激素并得以研究它们各自的特点。

33

1980 年,Benacerraf、Dausset 和 Snell

Baruj Benacerraf(1920~),Jean Dausset(1916~),George Snell(1903~)三人"因研究调节免疫反应的细胞表

面结构的遗传决定性”而获诺贝尔奖。当时,已有人证明了小鼠抗肿瘤的能力是由遗传决定的,这促使身为遗传学家的 Snell 决定寻找一些方法来研究产生这一现象的基因。20 世纪 40 年代中期,Snell 想出了采用同系小鼠的主意,同系小鼠是一种遗传学上除一个基因座或遗传区域外遗传学特性均相同的动物。他与 Peter Gorer 合作鉴定出了在同种移植排斥中起重要作用的基因座,记为 H-2(H-histocompatibility 组织相容性),继而证实它是一组由许多紧密连续的基因组成的复合体,每个基因座上都有许多不同的等位基因存在,这项探索性工作为更好地理解这一段复合的 DNA 片段(现在被称为 MHC,主要组织相容性复合体)的功能及组成做出了重要贡献。20 世纪 50 年代,法国的 Jean Dausset 发现了输血者体内存在着抗白血胞的同种型抗体,对揭示鼠 H-2 复合体与人白细胞抗原(HLA)系统的相似性提供了帮助,并提供了一种确定个体 HLA 抗原的有力工具。1965 年,Dausset 和他的同事描述了一个包含约 10 种由组织相容性抗原复合体编码的人抗原系统,包括“亚基因座”,每个“亚基因座”代表着有限量的抗原性等位基因。这种方法最终开辟了鉴定主要和次要组织相容性抗原并对其进行基因定位的研究领域。但 HLA 和 H-2 复合体上基因的重要性却被局限在类似组织移植和输血等非生理条件下的操作中,直到 Benacerraf,McDevitt 等人揭示出这些定位于 MHC 复合体上的基因也可以控制机体对各种抗原刺激的积极免疫应答过程。Benacerraf 利用简单的抗原如合成的多肽分子进行研究发现动物针对某一特定抗原的免疫应答能力受一种特殊基因 Ir(免疫应答)控制,后来被证明存在于 MHC 分子的 I 区内。此后,Benacerraf 以及其他人的实验室都发现 I 区基因在控制调节免疫应答的免疫细胞之间的信号传递方面起重要作用,而某些 MHC 基因在一些先天性疾病中扮演重要角色。

1984 年,Milstein、Kohler 和 Jerne

Cesar Milstein(1927 ~)与 Georges F. Kohler(1946 ~ 1995),“因建立单克隆抗体制备技术方面的成就”,和 Niels K. Jerne (1912 ~ 1994),“因对免疫系统概念的理论贡献”,一同分享了 1984 年诺贝尔奖。在 1955 年 Henry kunkel 及其合作者就发现骨髓瘤可产生单克隆的抗体。1962 年,Michael potter 提出浆细胞瘤能在小鼠中诱导发生,并且能使这种瘤在培养中无限生长。1974 年,Köhler 在剑桥大学 Milstein 的实验室内做博士后学位课题,他们一起从事将浆细胞与骨髓瘤细胞结合的工作,以研究抗体多样性的遗传学基础,他们希望在形成的杂交细胞中肿瘤细胞能赋予存活率较短的浆细胞以较强的生存能力。完成这一目的的关键在于利用缺乏次嘌呤磷酸核糖转移酶的突变骨髓瘤细胞系来建立一种能选择出融合的杂交瘤细胞的技术,缺乏这种酶的细胞在含中等浓度的次嘌呤、氨基嘌呤及胸腺嘧啶(H.A.T)介质中会死亡,而杂交细胞能够生存而被选择出来——因为杂交瘤细胞中的正常浆细胞含有这种必需的酶成分,分离这种杂交瘤克隆就可得到大量针对某一抗原决定簇的单克隆抗体,这种纯净的试剂的获得为当今分子生物学的革命提供了一种最有力的工具,并为许多基础和临床医学的研究开辟了新道路。

Niels Jerne 对免疫学的贡献不胜枚举,他对这一领域的影响无论怎样评价都不过分。学生时代起,Jerne 就观察到了再次增强了的免疫应答的抗体效价及抗体质量发生改变的重要现象。在 1963 年,Jerne 与 Albert Nordin 描述了利用溶血试验对抗体生成细胞进行记数的方法,这种技术在研究抗体反应发生时所产生的一系列细胞事件中得到了广泛的应用。正是 Jerne 在理论上的贡献使免疫学和免疫学家在生物医学上取得了像今天一样的重要位置。1955 年,Jerne 是第一个对当时流行的抗体形成指令理论提出挑战的现代科学家,并建立了选择学说:即抗原通过对一个预先存在的有抗体形成能力的库行使选择功能来形成特异性抗体。虽然 Jerne 假说有个别地方需要修正,但它的创立对 Macfarlane Burnet 克隆选择学说的形成起了重要的促进作用。1971 年,Jerne 提出了另一概念性的飞跃来解释 T 细胞库特异性谱系的形成,他推测刺激胸腺内淋巴细胞分化和高度变异的主要动力是个体 MHC 抗原分子,这再一次对实验和理论方面的进步起了重要的作用。第三个,也许是他所有理论中最具深刻意义的一个,是于 1974 年提出的独特型网络的理论。Jacques Oudin、Henry Kunkel 以及 Philip Gell 等人以前就已经表明抗体连接位点具有独特的抗原决定簇(独特型),Jerne 假说的要点是:独特型与抗独特型形成的一个级联网络的平衡可能是控制抗体免疫应答的一个重要调节机制,这一理论得到了较好的证实,对研究免疫系统的生理学方面及自身免疫病等病理状态时的调节方面具有

深刻的意义。

1987 年，Tonegawa

34 Susumu Tonegawa(1939 ~)，因在免疫球蛋白基因的分子生物学方面的研究，揭示了抗体特异性如何产生而获奖。长期以来，人们很难相信编码数目如此众多的抗体的所有基因都存在于胚系中，因而大部分研究人员倾向于认同有限的胚系基因发生体细胞变异的体细胞突变学说。1965 年，Dreyer 和 Bennett 提出假说认为：如果大量的可变 V 区基因能与单个 C 区基因，组成特定的同种型（两条基因一条肽链理论）则只需数目较少的 DNA。这一猜测在 1976 年被 Tonegawa 与 Hozumi 证实，他们揭示出 C 区和 V 区基因在胚系 DNA 中是分离的。Tonegawa、Gilbert 和 Maxam 又证实，分化细胞中这两个基因的重排还和它们被不编码的 DNA（内含子）分开有关。Tonegawa、Philip Leder 和他们的同事进一步发现 V 区重链氨基酸数目比轻链 DNA V 区能编码的要多，提示在形成完整的 V 区时可能需要另一些 DNA 片段。Tonegawa 和他的同事们很快找到了失掉的 DNA 片段，即 J 链（J 代表连接之意）。于是一条 C 区片段加上一条或几条 J 片段再加上许多 V 区基因片段中的一条就能足以产生范围广阔的不同的重链分子。在研究抗体重链基因的重排时，Tonegawa 与 Leroy Hood 同时发现三段分离的 DNA 片段必须连结在一起，才能完成编码轻链与重链的序列，除 V 区，J 片段外，还与另一组 DNA 片段有关，命名为 D（D 表示多样性）。除了在 V、D、J 片段中选择组合外，重链还可通过三联密码的中间部分发生缺失所产生的移码转换来增加多样性。Hood 和其他人共同证明了这些基因片段也能发生突变，最终完善了容量如此大的特异性抗体库是如何产生的理论。Tonegawa 的工作，包括其他人的工作对许多其他领域也有着重要的意义，包括在 T 细胞受体的形成及结构和可能导致淋巴瘤和白血病的 DNA 重排等方面。

1996 年，Doherty 和 Zinkernagel

Peter Doherty(1940 ~)与 Rolf Zinkernagel (1944 ~) 因揭示细胞毒性 T 细胞在识别被感染细胞的病毒抗原时有 MHC 限制性而获 1996 年诺贝尔奖。20 世纪 50 年代是免疫学取得巨大发展的时期。一方面，Burnet 的免疫耐受理论强调“免疫自我”——这个词后来不仅仅限于其比喻意。另一方面，已为人们熟知的抗体的功能与免疫细胞在迟发型超敏反应中以及在消灭那些含同种异体移植抗原的细胞中所起作用不同导致了 B 细胞和 T 细胞在细胞系上和功能上的分开。

实际上，Mitchison 在 1954 年就提出假说，认为与识别外来移植抗原相似，细胞对皮肤致敏性抗原的识别只当这种抗原存在于吞噬细胞膜表面时才能发生。正是 Lewis Thomas 推测这种细胞机制可被用在控制肿瘤形成的理论中（免疫监视理论），促使 Sherwood Lawrence 发展了他的抗胞内寄生虫的理论。通过一个想象力丰富的概念飞跃，他提出免疫识别可能只和与自身抗原结合了的寄生虫（病毒）抗原有关，即称之为“自身 + X 假说”。后来到了 20 世纪 70 年代早期，高瞻远瞩的外科医生 Zinkernagel 结束了他在堪培拉的漫游生活。由于缺少足够的地方，他和同样具有开阔视野的动物学家 Doherty 共用一个实验室。当时他们共同合作的课题是一个很流行的题目，即病毒免疫的细胞毒性细胞在小鼠淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒致病中发挥损伤作用的机制。当时刚刚报道了抗原的免疫应答的许多方面是由 Ir 基因（Ir 基因是 MHC 的一部分）控制的，尤其是淋巴细胞性脉络丛脑膜病毒的易感性可能与感染小鼠的某个特定 MHC 分子有关。Doherty 与 Zinkernagel 为他们的试验建立了一种体外检测病毒免疫后的活性细胞杀伤被病毒感染的细胞的能力的系统。当两种细胞来自同一品系小鼠时，受感染细胞显著死亡。然而，如果针对病毒的特异性细胞毒性细胞与受感染的靶细胞来自不同 MHC 型别的小鼠，靶细胞通常不能被免疫细胞所破坏。研究者们从而能做出结论，效应细胞必须识别受病毒感染细胞的两个信号，一个来自病毒，另一个则源于正常表达在细胞表面的 MHC 分子。在过去的 20 多年间已有大量的证据证实了 Doherty-Zinkernagel 的观察结果。并发现 T 细胞受体的结构能使它与病毒产物的多肽片段紧密结合，这种多肽片段存在于 MHC 分子表面的特异性狭槽中，由此可见 T 细胞的识别是一种真正的“自我识别”。

（许雪青　白　云 译）

参 考 文 献

Arrhenius S. *Immunochemistry.* New York: Macmillan, 1970.

Bordet J. *Studies on immunity.* Gay, F, translator. New York: John Wiley and Sons, 1909.

Bordet J. *Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses.* Paris: Masson, 1920.

Burnet FM. *The Production of Antibodies.* 1st ed. Melbourne: Macmillan: 1941.

Burnet FM. *The clonal selection theory of acquired immunity.* Cambridge: The University Press, 1959.

Burnet FM, Fenner F. *The production of antibodies.* 2nd ed. Melbourne: Macmillan, 1949.

Ehrlich P. The Croonian lecture: on immunity. *Proc Soc Lond Biol* 1900;66:424.

Ehrlich P. *Collected studies in immunity.* New York: John Wiley and Sons, 1905.

Ehrlich P. *Collected papers of Paul Ehrlich.* vol 2. New York: Pergamon Press, 1957.

Landsteiner K. *The specificity of serological reactions.* Boston: Harvard University Press, 1945.

Marrack JR. *The chemistry of antigens and antibodies.* London: H. M. Stationery Office, 1934.

Metchnikoff E. *Lectures on the comparative pathology of inflammation.* London: Kegan, Paul, Trench, Trübner, 1893.

Metchnikoff E. *Immunity in the infectious diseases.* New York: Macmillan, 1905.

Murphy JB. *The lymphocyte in relation to tissue grafting, malignant disease, and tuberculous infection.* New York: Rockefeller Inst. Monograph #21, 1926.

Nuttall GHF. *Blood immunity and blood relationships.* Cambridge: The University Press, 1904.

von Pirquet C, Schick B. *Serum sickness.* Baltimore: Williams & Wilkins 1951.

Secondary Sources

Bibel DJ. *Milestones in immunology.* New York: Springer-Verlag, 1988.

Brent L. *A history of transplantation immunology.* San Diego: Academic Press, 1997.

Bulloch W. *The history of bacteriology.* London: Oxford University Press, 1938.

Castiglioni A. *A history of medicine.* New York: Knopf, 1947.

Foster WD. *A history of medical bacteriology and immunology.* London: Heinemann, 1970.

Marks GM, Beatty WK. *Epidemics.* New York: Scribner, 1976.

Marquardt M. *Paul Ehrlich.* New York: Schuman, 1957.

Mazumdar PMH. Immunity in 1890. *J Hist Med Allied Sci* 1972;27:312.

Mazumdar PMH. The antigen-antibody reaction and the physics and chemistry of life. *Bull Hist Med* 1974;48:1.

Mazumdar PMH. *Species and specificity.* Cambridge: The University Press, 1995.

Metchnikoff O. *Life of Elie Metchnikoff.* Boston: Houghton Mifflin, 1921.

Miller G. *The adoption of inoculation for smallpox in England and France.* Philadelphia University of Pennsylvania Press, 1957.

Moulin A-M. *Le dernier langage de la médicine: histoire de l'immunologie de Pasteur au SIDA.* Paris: Presse Universitaire, 1991.

Parascandola J, Jasensky R. Origins of the receptor theory of drug action. *Bull Hist Med* 1974;48:199.

Parrish HJ. *A history of immunization.* Edinburgh: Livingstone, 1965.

Rubin LP. Styles in scientific explanation: Paul Ehrlich and Svante Arrhenius on immunochemistry. *J Hist Med* 1980;35:397.

Silverstein AM. *A history of immunology.* New York: Academic Press, 1989.

Silverstein AM. The dynamics of conceptual change in twentieth century immunology. *Cell Immunol* 1991;132:515.

Speiser P, Smekal FG. *Karl Landsteiner.* Vienna: Brüder Hollinek, 1975.

Tauber AI, Chernyak L. *Metchnikoff and the origins of immunology.* New York: Oxford University Press, 1991.

Topley WWC, Wilson GS. *The principles of bacteriology and immunity,* 2d ed. Baltimore: Wood, 1936.

Vallery-Radot R. *Life of Pasteur.* London: Constable, 1906.

Woodruff MFA. *The transplantation of tissues and organs.* Springfield, IL: Charles C. Thomas Publisher, 1960.

Zinsser H. *Infection and resistance.* New York: Macmillan, 1914.

第二篇 免疫球蛋白和B淋巴细胞

第3章 免疫球蛋白的结构和功能

J. Kimble. Frazer and J. Donald Capra[①]

概述

37 免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)在人类免疫应答中起关键作用。作为B淋巴细胞的细胞表面受体，Ig在多种细胞活动过程中均扮演重要角色。这些活动过程包括细胞的活化、分化甚至程序性细胞死亡。Ig被分泌到血浆或其他体液中之后，能够与其中的相应抗原相结合。由此导致两种结果：Ig或者直接将外来抗原中和，或者作为启动和募集效应系统所必需的初始引发者——例如启动补体或单核吞噬细胞介导的抗体依赖的细胞溶解。Ig的这些功能与其所具有的独特结构是分不开的，在Ig体系演化过程中形成的这种独特结构——免疫球蛋白结构域——具有重复性、多样性以及精密性。这就是Ig功能的结构基础。

撇开作用的多样性不谈，Ig分子在结构与功能上具有一个共性：它们都具有与其他分子相作用的超凡能力。一方面Ig能够与一组恒定的特异性物质(如Fc受体、信号传导分子、补体的级联成分)结合。另一方面，所有的Ig具有识别一类特定抗原决定簇的基本序列。也许更让人惊讶的是Ig常能同步实现其结合功能和发挥特异的生物效应。总之，免疫球蛋白分子在体系演化过程中即有生物连续性的体现又有生物多样化的体现。

① J. K. Frazer: Graduate Program in Molecular Microbilolgy and Medical Scientist Training Program, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, TX 75235-9140.

J. D. Capra: President and Scientific Director, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, OK 73104.

在体系演化过程中，Ig 结构究竟是怎样才具有各种功能的？这个疑问已经成为科研热点之一，并取得了一些进展。这些纷繁复杂的工作都是围绕免疫学、遗传学、蛋白质化学以及生物学原理而展开的。VDJ 重组和体细胞突变的发现，对解开抗体是怎样特异性识别不同抗原这个谜提供了一个突破口。通过对 N 端高度变异区和 C 端恒定区的观察，研究不仅证实了"两个基因，一条多肽"的假说[1]，而且还提出了型别转换的构想。因此，可以说对 Ig 多样性的研究是极具前途的。另外，尽管自从多样性第一次被认为是 Ig 的突出特征以来，在 Ig 的研究中多样性一直被视为最值得注意的地方。但另一方面，从 Ig 基本共性所得到的几点认识，却促进了对蛋白质结构与功能关系的研究。

38

免疫球蛋白是古老的免疫球蛋白超家族中最先被研究的分子[2, 3, 4]，作为一个分散的基因家族，其成员打破了分类学的局限，参与了细胞间的相互作用，相互识别。免疫系统许多重要分子，如 TCR、MHC Ⅰ 类分子和 Ⅱ 类分子都在此列。超家族的成员一般都含有一个或几个免疫球蛋白样结构域，对含有这些结构域的蛋白质三维结构分析表明，组成免疫球蛋白同源结构域的保守氨基酸序列折叠为致密球形的结构亚单位，这些亚单位可以结合复合大分子，不同的免疫球蛋白分子结构彼此相近，并与其他一些重要的蛋白质多肽相似[5, 6]。

由于在免疫球蛋白功能研究方面的努力，目前在核苷酸和氨基酸水平的序列信息在文献和公共数据库中可以得到。的确，对于免疫球蛋白的序列分析已经超过其他任何一种基因或蛋白质，对它结构方面研究的深入达到了前所未有的程度，大量的研究工作已得出 Ig 结构和功能关系的很多结论，本章的目的不是详尽分类叙述以免疫球蛋白序列为主题的所有方面的工作，而是讲述 Ig 结构的基本特征，和当前认识程度上它与 Ig 功能的关系。而且，Ig 分子有进化意义方面的价值，它们在整个脊椎动物体内以一种形式或其他形式存在。许多此类分子已经明确，但还有更多的尚未明确。由于序列的多样性，完全详尽地描述 Ig 结构和所有细节是不可能的。正因为如此，以人和猪的 Ig 例子为模型，以科学的视角和实验得出这类分子的一般结论，讨论从介绍 Ig 基本结构特征和抗体分子的主要结构，及介绍从 Ig 序列中衍生出来的 Ig 一、二、三、四级结构开始。这些问题明确了，Ig 的功能也就知道了——在联系抗体的结构和功能的基础上，认识这些是可能的。下一章将主要讨论 IgSF 的进化和详细介绍本章中 IgSF 成员关于免疫应答不明确的地方。

免疫球蛋白的结构、命名和历史

结构概述

图 3.1 所示的是一个抗体分子模式图，典型的免疫球蛋白单体由四条多肽链通过疏水作用而结合在一起，并由二硫键连接。由于等位排斥，B 淋巴细胞常表达一种重链和一种轻链多肽链，因此，完整的 Ig 蛋白是由两个约 55kDa 的相同重链和两个约 25kDa 的相同轻链构成。轻链和重链之间由一个或几个二硫键结合，同时也存在非共价作用，这样"半个抗体"包含单一抗原结合位点。完全的含四个多肽链的单体通过两重

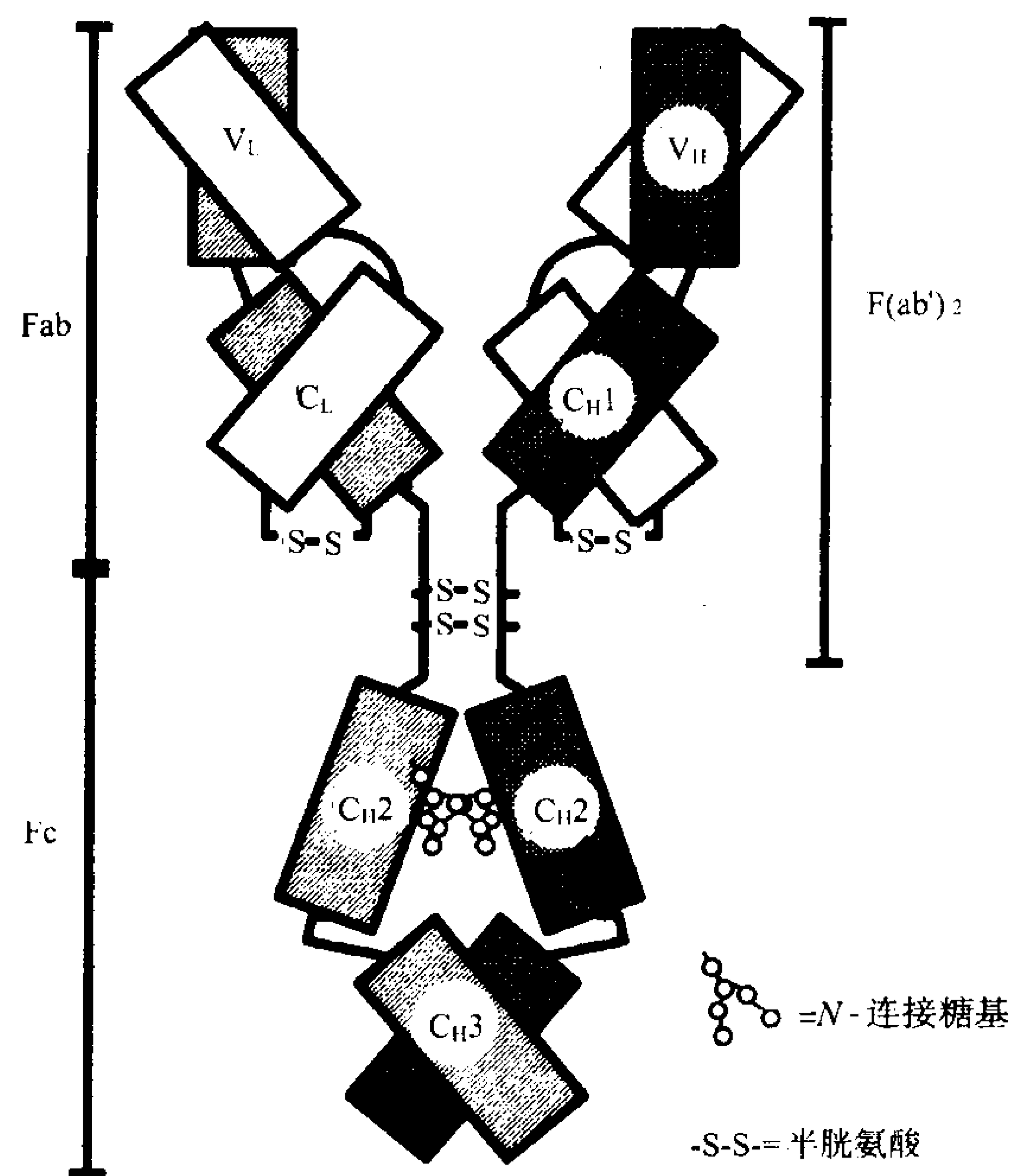


图 3.1　免疫球蛋白单体结构模型示意图。方框代表重链（阴影）和轻链（无阴影）的免疫球蛋白结构域。每个方框根据标准命名法命名（详见正文）。链间二硫键用黑色条带标示。如图所示，重链和轻链之间以及重链之间都有类似条带。某些免疫球蛋白分子多个部位含有糖基，而 C_H2 区的 *N*-连接糖基是保守的，所有分子均有。注意，除 C_H2 区外，是所有的结构域（V_H/V_L，C_H1/C_L，C_H3/C_H3）均与二聚体的形成有关。图中在两侧用条带显示了 Fab，Fc 以及 $F(ab)'_2$ 的酶解片段。

39

链之间类似疏水作用形成,同时它也利用一个或几个二硫键连接稳定其复合体。这样一个完整的 Ig 分子可以被认为是一个杂二聚体的二聚体,尽管其半个分子不能自然形成。

每一条单独的多肽链是由含有 110 个左右氨基酸的 2~5 个结构域组成[7],并且可以独立折叠,这些结构域形成紧密并且耐受蛋白酶的结构从而成为免疫球蛋白结构的基本单位。前述免疫球蛋白(Ig)单位得以形成的作用力同样存在于两条不同多肽链的结构域间,因此,抗体的功能单位实际是二聚结构域。每一个结构域是由一个单独的外显子编码的,Ig 结构域基因也就成为抗体基因的重要成分,由此不难看出,用标准免疫球蛋白的结构域作为实验研究对象是一种进步,结果自然是不同的结构域在结构和功能上有不同的表现。而且,不只一个"Ig 同源结构域"的存在证明了在 Ig 基因超家族中 Ig 具有许多不同特征。Ig 同源结构域的复制和适应性改变不仅仅存在于标准的"Ig 基因"中,同时存在于 IgSF 的更大范围内,它早就注定了抗体(antibody, Ab)的出现。另一方面,典型的 Ig 结构域确是一个强有力的进化工具,下面本章将详细介绍。

"Ig 折叠"结构基序的提出是 Ig 结构域存在的明证,这种结构的显著特征是一个特殊的"β 桶"状,由在折叠结构域中形成反向平行 β 片层的七条多肽折叠股构成[8],图 3.2 所示的是由 X 射线对一条 Ig 轻链结构放射分析的结果,每一个 Ig 结构域由两个 β 片层构成,其一个含四条 β 折叠股,另一个含三条折叠股(图 3.2 箭头所示),有可变长度的肽环在股间进行连接,使 β 片层得以形成。这两个 β 片层就像三明治的夹心,有一个疏水的内部,结构域间二硫键以共价方式连接两个片层加强了结构的稳定性,所有的 Ig 和几乎所有拥有类似于 Ig 结构域的蛋白质都有由半胱氨酸构成二硫键,折叠股 3-1 中有一个色氨酸和一个芳香族氨基酸残基(位于第二个半胱氨酸前),这两个残基保守存在并在三维结构上保护二硫键。其他保守的位点包括稳定"三明治"内部的疏水残基和提供序列间连接柔韧性的脯氨酸环状残基[9~12]。

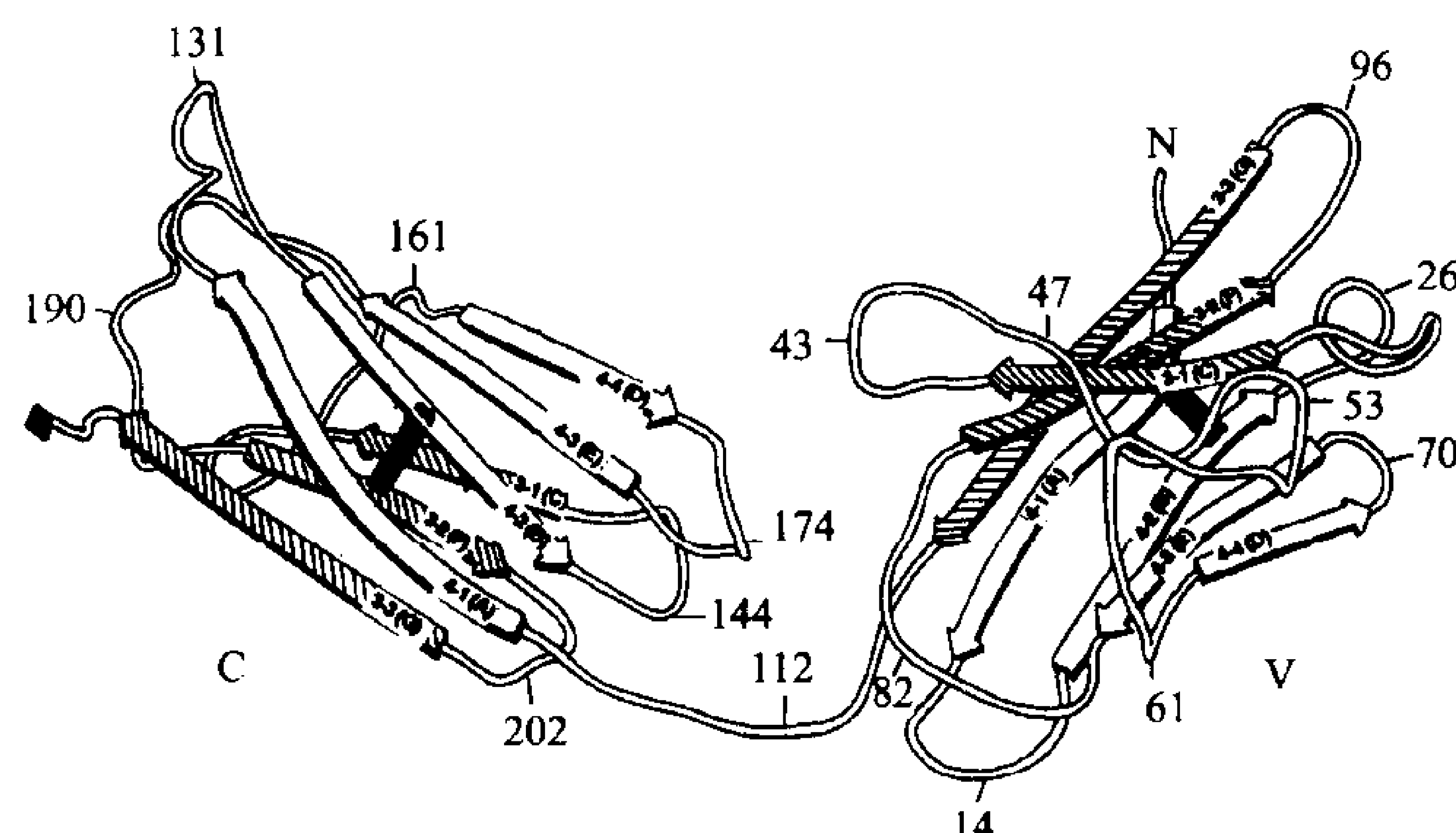


图 3.2　轻链 V 和 C 结构域的带状图。β 折叠股如箭头所示,包括 4 股无阴影和 3 股有阴影的,Edlmundson 及 Hood 对折叠股进行数字编码,链内二硫键由黑棍表示,将选择的氨基酸进行数字编码,位置 1 为 N 端,残基 26、53、96 相应的氨基酸位于 CDR1、2、3 中,各结构域的二聚化表面(C 区 4 折叠股,V 区 3 折叠股)朝上。

疏水核心的残基在促 β 片层折叠时起主要作用,因此使整个免疫球蛋白折叠。这些环肽残基序列变化是相当自由的,因此可以认为,环肽残基不论是在特异的抗体分子水平上,还是在自然种类的选择水平上都可以自由地作为进化选择的底物,这样一来,标准的免疫球蛋白同源结构域就成为机体免疫和物种进化的有效协同因子。

免疫球蛋白专业术语

轻链包含两个免疫球蛋白结构域,而重链有四到五个,这取决于抗体反应中重链的类型。不同的 Ig 结构域有不同的结构和功能特征,它们的命名多少也能反映这些差异,不论是重链还是轻链,N 端都存在可变区(V),不同的抗体分子间此区序列变异较广泛,轻、重链的可变区分别命名为 V_L 和 V_H。V 区决定了 Ig 的抗原特异性。

C 端结构域则相反,在同种型中序列变异极少,被称为恒定区(C),编号为 C_H1、C_H2 等。它们紧接着 V 区结构域排列。重链 C 区结构域与抗体的多方面功能相关,包括结合 Fc 受体,结合补体,胎盘转移,聚集以及黏膜分泌能力,因为不同同种型重链的 C 区结构是不同的(如不同同种型重链 C_H3 结构不同),这些不同也就决定了特异抗体的分类,现在人们将重链 C 区分为五大类:α、γ、δ、ε 和 μ。抗体重链类型与其功能相互

关联，因而免疫球蛋白用重链希腊字母对应的英文字母命名（IgA、IgG、IgD、IgE、IgM）。C 区特异性结构域通常用其重链来源表示（如 $C_{\mu}3$ 表示 μ 抗体的 C_H3 区）。由于免疫球蛋白结构域互相独立，特定同种型的特定结构域解释了全抗体的多种功能特点，与命名系统相一致。另一方面，轻链的恒定区只含 C 区，用 C_L 表示，轻链的两个类型 κ 链和 λ 链（C_{κ}，C_{λ}）尚未证明其与功能有何关联。

40

最后，免疫球蛋白还有位于重链 C_H1 结构域 C 端的铰链区。μ 和 ε 同种型重链的铰链区很长，好像一个多出的功能区，能看作是第五个 C 区，其他类型的重链铰链是较短易折叠的肽链，一般认为由 $C_{\mu}/C_{\varepsilon}2$ 演变而来。与免疫球蛋白其他结构域基因一样，铰链区也是由单独的外显子编码的。正如名称所示，铰链区在分子的抗原结合和发挥效应时有较大弹性。因此，铰链区促进了免疫球蛋白功能的两个独立因素的关联：与抗原表面大量决定簇相互作用（V 区介导）和与有限的效应活化分子相互作用（由 C 区介导）。而且，两重链间二硫键位于铰链区内，构成完整的四聚复合物。

因此在许多情况下，免疫球蛋白从基因和结构上划分的独立结构域有特异的功能特性。再加上免疫球蛋白一个结构域对应一个外显子，重链和轻链 C 区的不同结构域实际上是不同的基因[13]，这种类型的基因组合使识别特异抗原能力和特定时期的特定免疫反应完美结合，发挥恰当功能。在这点上，抗体真切地体现了结构和功能的紧密关联。

历史回顾

早在用 X 射线晶体衍射技术来揭示免疫球蛋白结构之前，已对其结构进行了许多重要研究，并与结晶学实验所得结论一致。其中许多实验应用蛋白质水解、还原、变性等技术重点研究 IgG 的基础蛋白化学。最先，用木瓜蛋白酶消化 IgG 可得到两种蛋白质片段：Fab 单价抗原结合片段和 Fc 易结晶片段[14]。之后不久胃蛋白酶处理 IgG 得二价活性的抗原结合片段，命名为 F(ab′)2[15]。而且此片段经还原处理可得两个单价的 Fab 片段。这些不同片段如图 3.1 所示。还原和离解 IgG 也证实完全相同的重链和轻链可通过二硫链组成复合体[16]。结合进一步的研究工作，研究者最终建立免疫球蛋白结构初步的模型：包括含四条多肽链——两条完全相同的重链和两条完全相同的轻链——以多个链间二硫键固定[17, 18]。现已知该结果是正确的。

早期对不同类型抗体的研究可以解释关于抗体方面资料：实验重点将免疫系统本身作为一种手段来解析免疫球蛋白结构[19~21]。作为大分子糖蛋白，抗体本身是强免疫原，可诱导强烈的体液免疫，研究者用免疫球蛋白制剂（起初为异源性全血清免疫球蛋白或同源性骨髓瘤或浆细胞瘤蛋白，后来是杂交瘤产生的单克隆抗体）作为抗原，将其注入异种动物或同种动物不同个体引发抗体反应。用此免疫法产生的抗体在解决免疫球蛋白结构几个关键因素上很有价值，并且抗血清所识别的抗原决定簇与免疫球蛋白已知的结构特点确实相关。

用这些抗血清（吸附后）作为试剂设计成一个三种血清型分类表，并将抗体分子列入不同的组。第一种称为同种型。同种型抗原决定簇位于 C 区，通过重链和轻链 C 区的不同相互区别。首先，重链分为五种，以指定希腊字母命名，如前述。五种同种型实际上存在于所有的哺乳动物中，说明 C 区基因的分化出现于哺乳动物进化的早期。同样，轻链 C 区分为 κ 型和 λ 型，不久以后，纯化技术使人们认识到人 α 和 γ 重链实际上包含几种相关成分，可再分为亚类。人 IgA 分为 $\alpha1$ 和 $\alpha2$ 亚类，人 IgG 分为四个亚类：$\gamma1$、$\gamma2$、、$\gamma3$ 和 $\gamma4$。小鼠 IgG 也分为四亚类（$\gamma1$、$\gamma2a$、$\gamma2b$ 和 $\gamma3$），尽管其结构和功能特点及缩写与人相应 IgG 不同，表明这种多样性发生于物种进化成不同的分支之后。每种不同的同种型（类或亚类）均由单倍体基因组上的独立 C 区基因决定。在所有物种正常个体血清中，所有同种型同时存在。

另一方面，同种异体决定簇存在于某一物种的某些而非全部抗体上。这些决定簇由特殊 C 区基因（重链或轻链）的一个等位基因编码，并作为常染色体性状按典型的孟德尔方式遗传。参考文献 22 对收集的人类同种异型作了概括，而参考文献 23 涵盖范围更广[22, 23]。同种型和同种异型均位于免疫球蛋白 C 区，而独特型抗原决簇是存在于抗体 V 区的抗原决定簇，与抗体结合抗原的特异性有关。它通常由特定的单个细胞产生，反映了各个免疫球蛋白分子间的区别。单克隆抗体独特型的决定簇称为独特位。但独特型的产生并

不总是只限于单个细胞。当两个细胞被相同的抗原刺激后,会产生具有相同独特型决定簇的抗体,这种独特型称为交叉反应独特型或共同独特型[24]。交叉反应独特型的存在说明不同的细胞对相同的 V 区基因的利用。因此,独特型应当被看作是免疫球蛋白分子的特异性,而不是有机个体的特异性。

为了了解免疫球蛋白的结构,人们运用不同的科学方法做了大量的工作。不管是运用蛋白质化学来研究其基本结构特点,还是通过操纵体液免疫反应将相互作用的免疫球蛋白归类,大部分的早期工作都明确或是回答了关于免疫球蛋白分子结构的许多重要问题。正如以下章节将要谈到的,从一级结构的氨基酸序列到四级结构的亚基结合,许多抗体的重要结构特点都是由这些最初的标志性研究推论而来。

免疫球蛋白的结构

一级结构——两个基因,一条多肽

免疫球蛋白由两个分隔存在的基因编码,这个一度引起争议的假说现在已经得到了证实。虽然免疫球蛋白的 V 区和 C 区结构有很多明显的共同之处,但由于它们的基因相互独立,故我们将它们分开来看。

V 区和 C 区最显著的差别在于它们的基因编排。不同的重链和轻链 C 区由不到 20 个基因编码,而 V 区基因(V_H、V_κ、V_λ)则多达数百个。更大的区别在于编码 V_H 或 V_L 结构域的基因最初并非完整地存在于基因组上,而是在体细胞分化(见第 5 章)过程中在基因水平重组产生的。V、D 和 J 片段重组形成具有功能的重链基因,V 和 J 片段重组形成具有功能的轻链基因,它们的重组增加了 V 区的多样性程度。由于这种基因的复杂性,序列的可变性成为可变区的标志。除了基因构造的差异,与 C 区相比 V 区序列还另有特点,最显著的是 V 区比含 110 个氨基酸的免疫球蛋白结构域前体多大约 16 个残基,这些多出的残基使 V 区可以用多出的两个 β 折叠股形成一个额外的免疫球蛋白折叠结构,与 V 区功能有关。此外,V(D)J 重组过程可进一步改变胚系编码的 V 区长度,影响 V 区的结构和功能。

轻链可变区

```
      1                                 A 27 F
Ag:   DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ------DINHYL
Len:  **V*****NS*AV*L*E*A**N*KS**SVLYSSNSKN**
Ti:   E*VL****GT**L*P*E*A*LS*R***S-----VSNSF*

Ag:   NWYQQGPKKAPKILIYDASNLETGVPSRFSGSGFGTDFT
Len:  A****K*GQP**L***W**TR*S***D******S******
Ti:   A****K*GQ**RL***V**SRA**I*D******S******

                                        109
Ag:   FTISGLQPEDIATYYCQQYDTLPRTFGQGTKLEIKRT
Len:  L***S**A**V*V*******YST*YS************T
Ti:   L***R*E***F*V*******GSS*S********V*L**T
```

κ 轻链恒定区

```
      108
Ag:   TVAAPSVFIFPPSNEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
Len:  ************************************
Ti:   **************D*********************

Ag:   KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
Len:  ************************************
Ti:   ************************************

                                      214
Ag:   LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Len:  **********************************
Ti:   **********************************
```

图 3.3 人抗体轻链氨基酸序列。短线表示为得到最优化的序列比对而引入的间隔;* 号代表与顶端序列一致的氨基酸。图中抗体是最早获得的免疫球蛋白分子,证实了 V 区和 C 区变异性显著不同。在不同的 V 结构域里的保守残基簇提示建立一个在多个序列之间进行精确定量分析变异度的系统十分必要(图 3.4)。修改自 Kabat 等的序列简图[24a]。

V 区形成重链和轻链 N 端的结构域,用来与抗原特异结合。V 基因在单个基因结构的水平和不同的 V 基因座上不断进化,从而增强了对抗原决定簇的识别能力。在人们开始弄清抗体蛋白的序列时(图 3.3),发现与 C 区相比,V 区明显存在更大的可变性。继而发明了一种定量描述这种可变性的方法:可变性即某一位点的不同氨基酸的数值除以该位点最常见氨基酸的出现频率所得的商[25]。因此一个残基固定的位点的可变性为 1,而当某位点完全随机地在 20 种氨基酸中选取时,可变性达到理论上限 400。为了研究某个特定蛋白的可变性,可以对可变性数值和残基数作坐标图来形象地表示,如图 3.4 所示。这种可变性坐标图不仅表明了 V 区序列多样的特点,从中也可看出可变性基本集中在三个区域,即所谓的高变区(hypervariable region, HVR)[26]。有人认为重链和轻链的高变片段可共同作用形成抗体结合位点,也被称为决定簇互补区(complement-determining region,CDR)。

通过可变性的分析发现,V 区中某些区域的序列在不同蛋白质间也保持着很好的一致性。据推测这些序列是 V

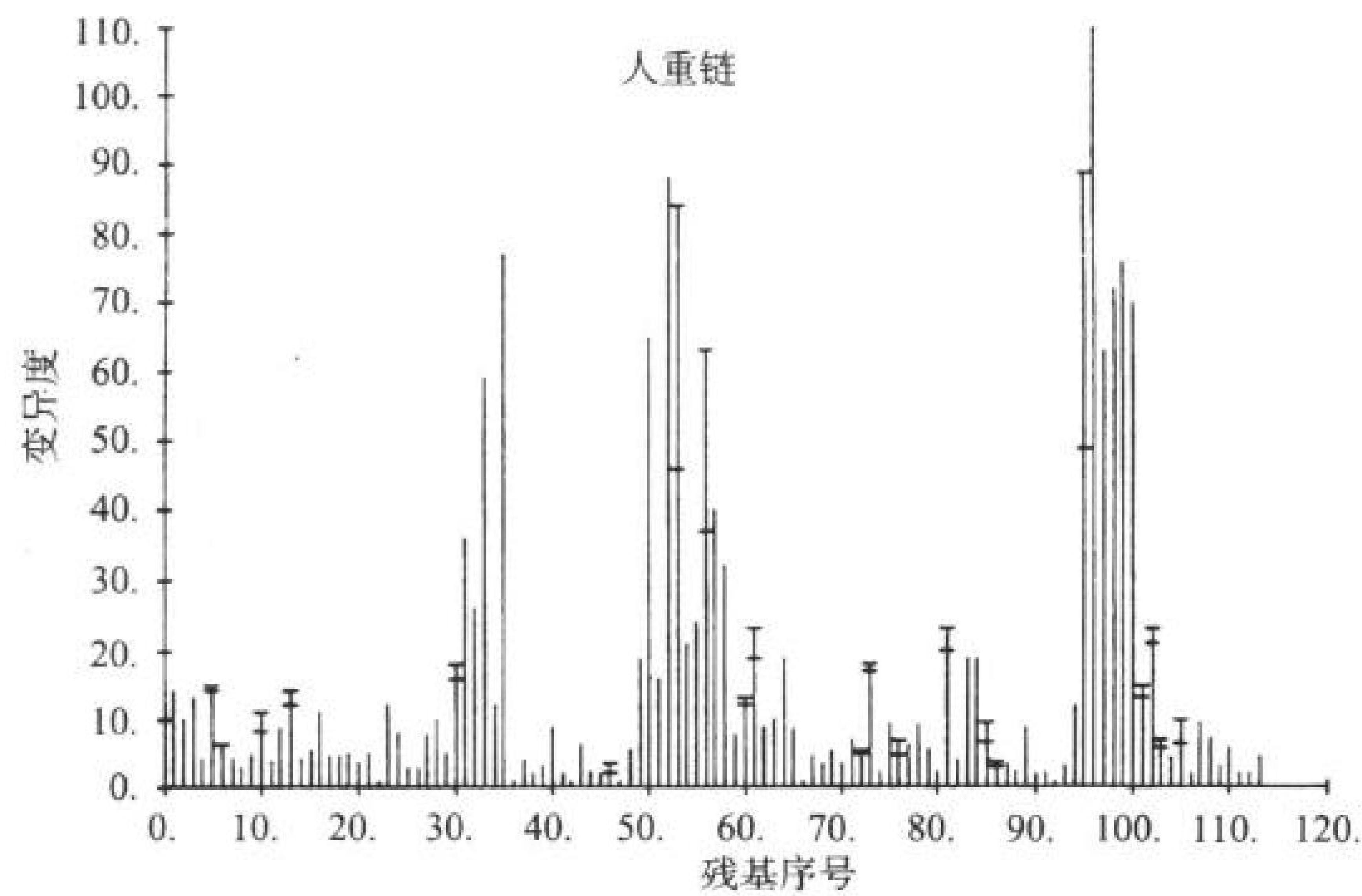


图 3.4　人重链变异度线条图。超变区显然位于三个最明显的峰线处。(经许可引自参考文献[24a]。)

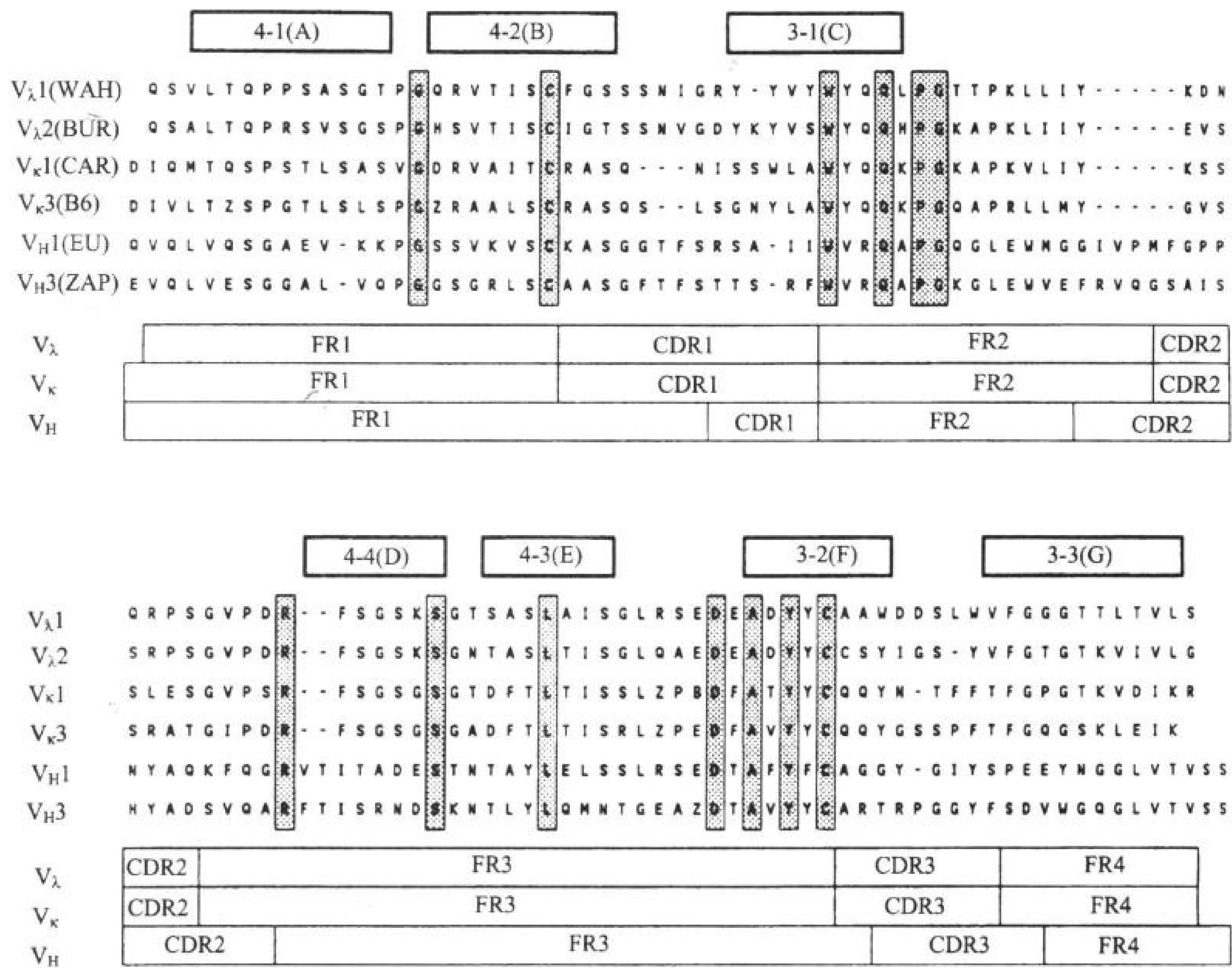


图 3.5　六种人的 V 区氨基酸序列同源性比对。序列上方方框表示结构域中的 β 折叠股。其数字编号依照于 Edmundson 而括号中的字母标号按照 Hood 的方法。短横表示为了获得最优化的同源性而加入的间隔。六个蛋白质之间的同源性用阴影框标示。序列下的方框描绘了 V 区亚结构域统计学意义上的界限(表3.1)。注意,四条轻链和两条重链上的 FR1、CDR1、FR2 以及 CDR2 片段的长度有所不同。

区形成固有折叠所必需的结构功能单位。由于它们为决定簇互补区提供了支持平台而被命名为骨架区(framenwork region,FR)。通过结构分析证实,骨架区主要占据了免疫球蛋白折叠区中 β 片层的位置,而 CDR 主要位于 V 区中靠 C 端的连接 β 片层的环状结构。在图 3.5 中有此种联接的线性表述,并可从图看出 CDR1,CDR2,CDR3 分别连接了 β 折叠股中 B 与 C,C 与 D 及 F 与 G。通过六种不同蛋白 V 区比较,我们可以

表 3.1　可变区统计学和结构亚单位的边界

亚结构域区	Ig 链	残基位点	结构环边界
FR1	重链	1 – 30	
	轻链	1 – 23	
CDR1	重链	31 – 35*	H1: 26 – 32
	轻链	24 – 34*	L1: 26 – 33
FR2	重链	36 – 49	
	轻链	35 – 49	
CDR2	重链	50 – 65*	H2: 53 – 55
	轻链	50 – 56	L2: 50 – 52
FR3	重链	66 – 94*	
	轻链	57 – 88	
CDR3	重链	95 – 102	H3: 96 – 101
	轻链	89 – 97*	L3:91 – 96
L3:91 – 96	FR4	重链	
	轻链	98 – 107*	

FR1 ~ 4(framework region,骨架区),CDR1 ~ 3(complementarity-determining region,决定簇互补区),H1 ~ 3(heavy chain variable loop,重链可变环),以及 L1 ~ 3(light chain variable loop,轻链可变环)的编号是根据 kabat 等人[1]的方法用保守残基的同源性权重来确定。* 号表示该区的长度差异取决于胚系 V 基因的使用和(或)连接的多样性。表中数据来自于 Kabat 等人[24a]以及 Chothia 和 Lesk[28a]。

发现其中有意义的序列:在所有 V 区的 FR4 中都有 W/F-G-X-G 存在[27];而在 V_H 的 FR2 中有独特的"G-L-E-W-疏水性氨基酸"存在;在 V_L 类似 FR2 部位有共同的"P-亲水性氨基-疏水性氨基-L-疏水性氨基"存在[28]。这些基序对于结构域的聚合作用是极其重要的,将在免疫球蛋白的四级结构部分讨论。重链和轻链 V 区另一个重要区别也在图 3.5 中表现出来:相对于 V_L 结构域,V_H 结构域有较长的 FR1 和 CDR2 段及较短的 CDR1 和 FR2 段。由于 V 基因众多,指定所有免疫球蛋白 V 区的 FR2 和 CDR 的界线比较困难。为了描绘重链与轻链这些区域,表 3.1 总结了这些基本位置。

几百种不同胚系 V 基因显然会使不同结构域产生不同的序列,再加之体细胞 V(D)J 的重组,使得 V 区变化更加多样,特别突出的是 CDR3 区[29]。在这一系统中,大概有 100 种独特的 V 基因(V_H、$V\kappa$ 或 V_λ 基因座)编码 V 区蛋白 CDR3N 端的 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3,而在 CDR3-FR4 片段的 C 端仅由 4 ~ 6 个 J 链接小基因编码。重链在 V 和 J 基因间还插入了 30 种 D 基因中的一种,从而形成完整的 V 功能区。V(D)J 基因片段重排和 V 区 FR/CDR 的结构的关系在图 3.6 中用图形表示出来。通过基因片段的分类组合形成了完整的重链与轻链,而不同的重链与轻链通过彼此不同的分类组合形成捆绑式的 V_H/V_L 二聚物,结果实际上导致了 V 区结构域结构种类的无限性。然而,在整个重组过程中,由于核酸外切酶的作用,非模板性的 N 端片段添加,模板内的 P 核苷酸的合成[30],以及 D 区的融合都可能使 CDR3 的多样性增加[31]。最后,除了这些由于基因随机性的重组和连接所导致的多变性之外,在体细胞高突变的作用下,V 区残余部分的改变又可产生新的变异性[32, 33]。

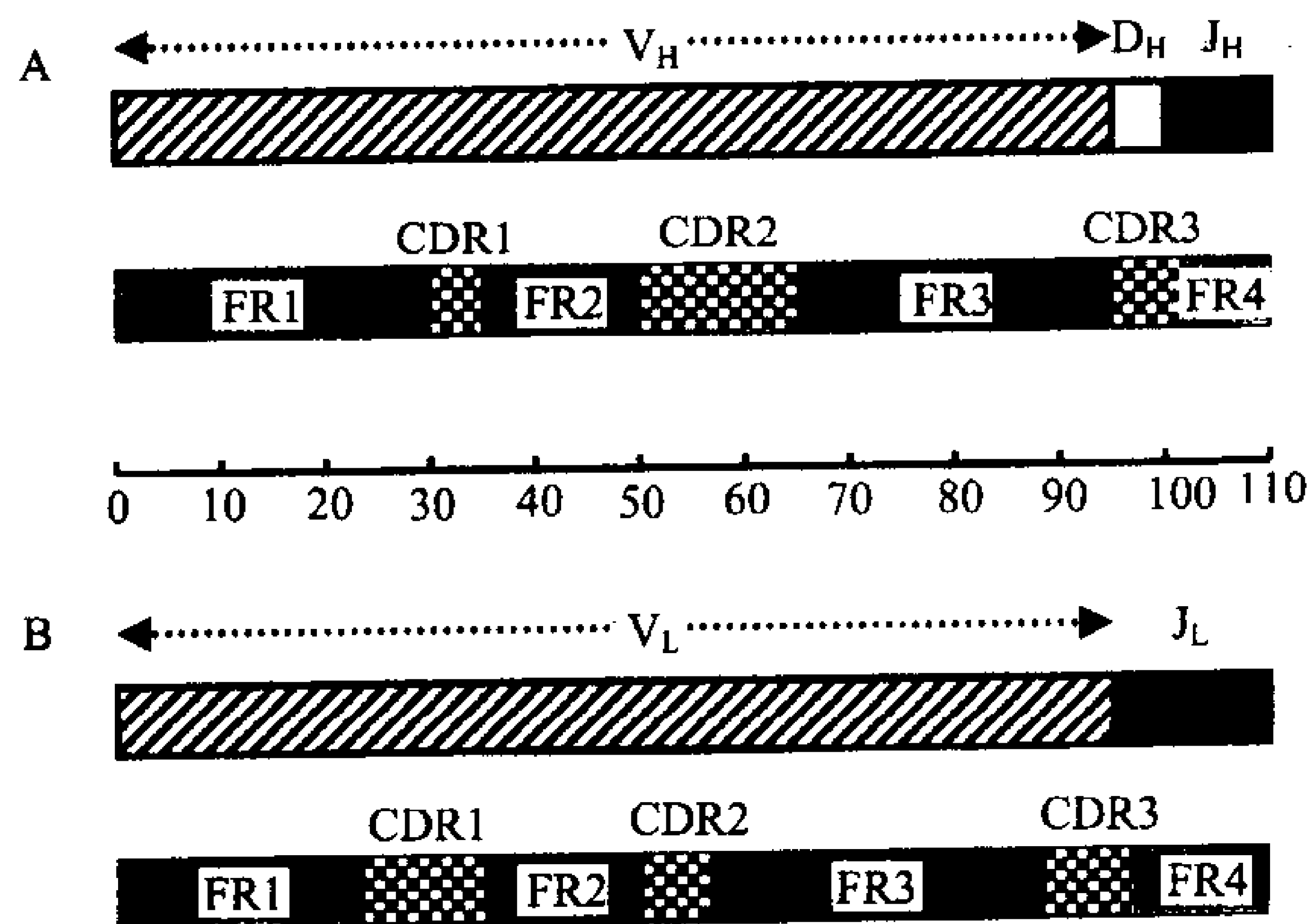


图 3.6　V 区基因重排后的基因结构及蛋白结构域亚单位的比较。A 重链区;B 轻链区。斜线框代表 V_H 和 V_L 基因片段,空白框代表 D_H 基因,黑框表示 J_H 和 J_L 基因片段。骨架区用阴影框表示而互补决定区用方格框表示。A、B 两图之间是一条近似的氨基酸大小标尺。

尽管表面上看 V 区序列的数目可能是无穷尽的,但还是制作了分类图表。这些分类是基于同系原则,这些原则又直接反映了抗体基因位点的发展。同组序列间比异组序列间有着更高的相似性,且都拥有相似的氨基酸置换模式。它们在分类中是作为一种标志物存在的。当然,在进化中相距最远的是 V 区,随后是 V_μ、V_κ 和 V_λ 之间的区别,它们来自分别不同的基因座。在人类,重链的基因座在 14 号染色体,κ 和 λ 的基因座则分别存在于 2 号和 22 号染色体上[32 ~ 36]。在小鼠这几种基因座分别存在于 12 号、6 号和 16 号染色体上[37 ~ 39]。V 区结构的另一些层次性也反映了抗体基因座的进化。V 基因分类标志的应用表明重链和轻链 V 座在几种脊椎动物间的发育(图 3.7)[40 ~ 44]。通过对 FR1 6 ~ 24 密码子区间进行核苷酸序列同源性比较,已经发现了三种 V_H 宗族。FR1 的这种展开序列在同一个宗族内是保守的,与此同时,一段与之相似的宗族(FR3 的 67 ~ 85 密码子区间)也能被用来鉴定属于同一宗族,但属于另一个不同的分类层次即家族的 V_H 的基因。

44

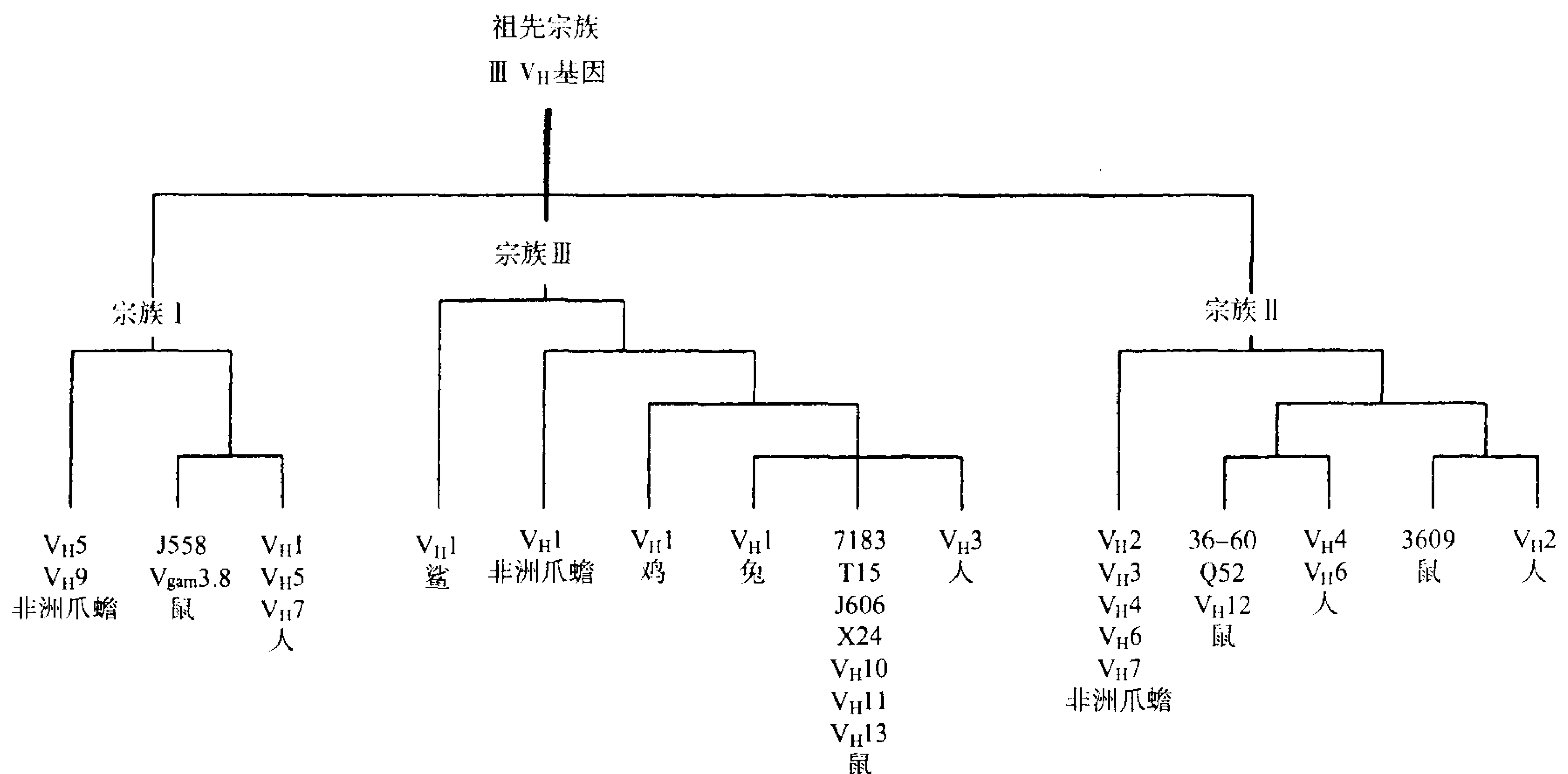


图 3.7　脊椎动物各种属的 V_H 基因按不同的宗族类型被划分成明显的序列簇。注意,在给定的种族中,几个不同的 V_H 家族能被归于同一个宗族,反映出它们内在的结构相似性。描绘进化相互关系的线条并未按照尺度来画。(经允许引自参考文献[42]。)

按经典的说法,家族就是最常用于对不同的 V 区基因进行确认和分类的一些编组[45~47]。同一家族 V 区基因的 DNA 有 80%是相同的。历史上,当基因组 Southern 印迹被用计算家族的近似大小时,这种同源的程度在不太严格的条件下也把充分的交叉杂交算在内,用以说明这种家族命名方式的意义。在蛋白质水平,同一家族的基因翻译产物中有 75%相同,而不同基因家族则少于 70%。按照这些标准,人类 V_H 基因可以分为 7 个家族,V_κ 基因主要分为 4 个家族,V_λ 基因分为 10 个家族。鼠(含有绝对多数的 V 区基因)的分类系统更为复杂,因为已发现了 14 个 V_H 基因家族和 20 个 V_κ 家族。图 3.8 所示人 V_κ 和 V_H 基因家族的几个例子,注意在属于同一家族的序列成对比较中有大量"共有片段"出现,在其他家族中则无。这些"共有片段"作为起区别作用的"残余特征",有助于迅速鉴定一段特定序列的"家族起源"。图 3.8 的序列也证明了 V 基因家族的另一个重要的特点:不同的家族常有不同的 CDR 长度。因此,不依赖于氨基酸序列,V 区家族内部拥有不同的结合位点,并由此影响它们的功能。

"共有片段"也用于进一步将家族分为亚家族,亚家族是针对一定范围的分类方案,是一些专门的类别,这主要是因为定义亚家族的一些参数没有标准化。一般来说,某一特定亚家族所具有的特征是复杂的,取决于其特异性。最终,在最具有描述性的分类水平上,经过 Rabbitts、Winter、Honjo 和其他许多人的工作[46~50],已经能对大部分人类 V 区基因进行鉴别、绘图,并在一定范围内测序。在同一家族内,单独的 V 基因片段可以同代表本家族的一段共有序列进行比较(图 3.9)。经过比较,可以明显地看出,单个基因间的差异主要存在于其 CDR1 和 CDR2 片段上。因此,有了基本序列的结构基础,甚至密切相关的 V 基因之间也可以采用相似的核心框架,但却有不同的 CDR1 和 CDR2 环状结构,结果基因组就会编码出非常多的潜在抗原特异性。事实上,该系统中单个 V 基因的抗原也存在多样性。凭借人们根据不同的基因和等位基因的多样性进行预测所得到的结果,加上抗体基因座多态性的存在,可以得到这样一个可能正确的结论,即免疫球蛋白 V 基因可能存在的形式将很难被识别和归类。简而言之,不同的基因座、宗族、家族、亚家族甚至单个 V 基因本身都起源于"复制事件",只有在进化过程中发生(染色体)复制的那段时期,一个基因或一组基因才与其他基因组分开。

V 区能提供与外来抗原决定簇相结合的位点,恒定区则有与自我分子相结合而调节生理和免疫效应的 *46*

```
Vκ1 CAR   DIQMTQSPSTLSASVGDRVAITCRASQNI  SSW     LAWYQQKPGKAPKVLIYKSSSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTFF
    DEE   ---------S---------T--C--G-SV       NKY-N-------------FAA---K--------------------G-L-----------SY--P
Vκ2 MIL   --VL----LS-PVTP-EPAS-S--S---L LZ-BGB Y-D--LZ---ZS-ZL---LG-NRA----N---------B---K--RV-AZ-VGV---N-ALQ-P
    TEW   --V-----LS-PVTP-EPAS-S--S--SL LH-DGFDY-N--L----QS-ZL---AL-NRA----D------------K--RVEA--VGV---NZALQAP
Vκ3 CLL   E-V-----A---V-P-E-ATLS-----SV  -NN     ---------QP-RL---GA-TRAT-I-A---------E------R--S----V-------NWP
    BL41  E-VL----G---L-P-ESATLS-----SV  --N     -------R-QS-RL--RDA--RAN-I-D-------------I--R-E-----V------S-SP
Vκ4 B17   --V-----DS-AV-L-E-AT-N-KS--SILY--DNKNY---------QP--L---CA-TR-----D------------------A--V-V------YNLP
    JI    --V-----DS-AV-L-E-AT-N-KS--SVLY--NNKNY---------QP--L---WA-TR-----D------------------A--V-V------D-IP
         |        FR1        |    CDR1    |    FR2    |CDR2|          FR3           | CDR3

VH1 20P3  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF  TGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWIN PWSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR
    51P1  ---------------S----------G--  SS-AIS-------------G-I -IF-TA------Q----I-A-E-T--------S---E---------
VH2 CE1   --N-RE--PALV-ATHTLTLT-TF--LSVNTR-NSVS-I--P--KA---LAR-D  -DDDKY-GTSLET-L-ISK---KNQVVLIVTNMDPA---T-----
    COR   --T-RE--PALV--TQTLTLT-TF--FSLSS--NCVG-I--P--K----LAR-D  -DDDKY-NTSLET-L-ISK---RNQVVLTNDPVDTA   T-----
VH3 30P1  E---LE--GGLVQ--G-LRL--A---F--  SS-A-S-------K----VSA-S GSG-S-Y--DSVK--F-IS--N-KN-L-LQMNS--AE--------
    56p1  -----E--GG-VQ--R-LRL--A---F--  SS-A---------K----VAV-S YDGSNKY--DSVK--F-IS--N-KN-L-LQMNS--AE--------
VH4 71-2  ----QE--PGLV--SETLSLT-TV--GSVSSGS--WS-I--P--K----I-Y-Y  Y--S---NPSLKS---ISV---KN-FSLK--SVTAA---------
    V2-1  ----Q-W--GLL--SETLSLT-AVY-GSV  S---WS-I--P--K----I-Y-Y  Y--S--NNPSLKS-A-ISV---KNQFSLN--SVTAA-----C---
VH5 251   E-------------E-L-I---G---S-  -S-WTG----M--K------I-Y -GDSD-R-SPS-Q-Q--HSA-K------LQW-S-KAS---M-----
    32    E-------------E-LRI---G---S-  -S-WIS----M--K------R-D -SDSY---SPS-Q-N--NSA-K------LQW-S-KAS---M-----
VH6 15P1  ----Q---PGLV--SQTLSLT-AI--DSVSSNSAAWN-I--S-SR----L-RTYYRSKWYND--VSVKS-I-INP---KNQFSLQ-NSVTPE---------
         |       FR1      |CDR1|   FR2   |     CDR2     |       FR3        |
```

图3.8　几个人 V_κ 和 V_H 基因家族成员序列。空格表示为得到最优化的同源性而引入的间隔。短线表示该处残基与顶部残基相一致。FR 和 CDR 之间的标准分界线分别标示在轻链和重链序列下。注意,图中有许多共同的替换(同一家族中存在的共同氨基酸,但在其他家族中并不存在)。

功能。轻链都有一个位于 V_L 的 C 端的恒定结构域(C_κ 或 C_λ),C_L 与重链的第一个恒定结构域 C_H1 能以二硫键配对,C_L 能否与其他一些生物因子特异地结合,目前还不知道。因此,能作用于轻链 C 区的物质也还未知。相反,重链的 C 区则决定了四肽链的结合、生物学特性及免疫球蛋白的生理功能。同种型抗体重链的 C 区由三个或四个结构域组成。第一结构域 C_H1 能介导与 C_L 的结合(前已详述),且是 Fab 片段的一部分,C 端的另二个或三个结构域则参与了重链分子的链间结合,形成 Fc 段。特异性的 C_H 结构域($C_\mu2$ 或 $C_\epsilon2$)还决定了所产生 Fab 的屈曲性,从而实现了 μ、ϵ 链 C_H1 与其各自的 Fc 相结合,且保持了其他 Ig 恒定区的特征。γ、α、δ 类的抗体则利用一较短的铰链区来实现这一功能,这一点在其他章节还要详述。

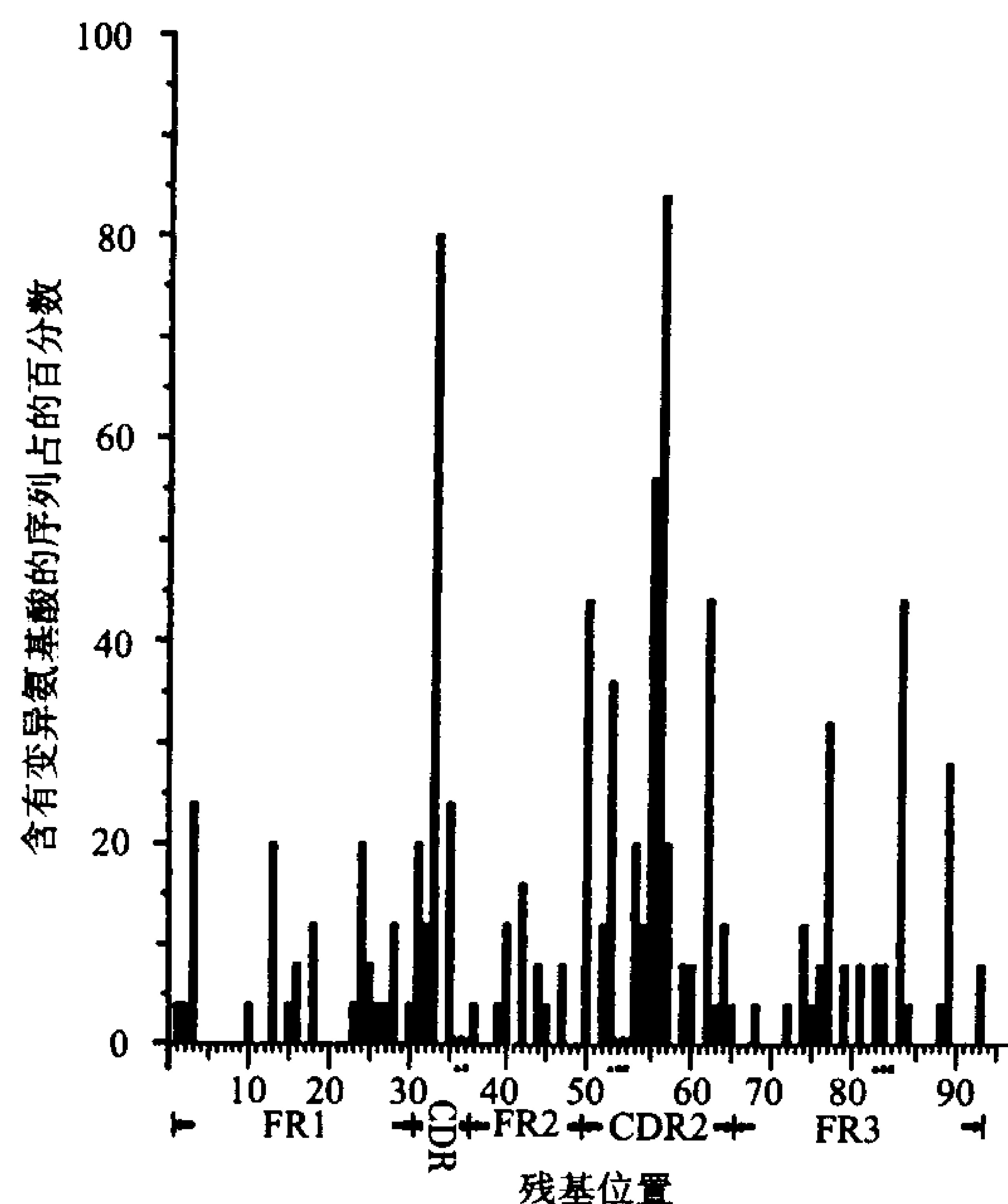


图3.9　一个 V 区家族内的序列变异。对鼠 V_H7183 家族的 25 个独立的胚系序列进行分析,得到该家族的一致性序列。各序列的变异程度用这些序列中所含特定位置的变异氨基酸(与一致性序列不同的氨基酸)的百分比来衡量。与多家族重链变异线条图(图 3.4)相似,同一家族中的高变区常常位于 CDR 内。(经许可引自参考文献[42]。)

前面的研究已指出 C 区序列是高度保守的,至少相对于 V 区(图 3.3 所示)而言,但是它们被命名为恒定区,事实上是不恰当的。例如,对一些初级种属中 V 区和 C 区序列比较的研究表明:连接恒定区 β 折叠股的环的长度变化程度超过了可变区[51]。而且,在同一种属的不同同种型之间,C_H 区总共只有 30% 的一致性。而在相应的同种型间,不同的结构域也有不同的序列保守程度。C_H1 在同种型中序列的相似性最高,这也许是因为它们都有与免疫球蛋白轻链相结合的功能。μ、α 和 γ 链的 C 端结构域($C_\mu4$、$C_\alpha3$ 和 $C_\gamma3$)间的相关水平比 Fc 的平均水平要高,正如 X 射线表明的那

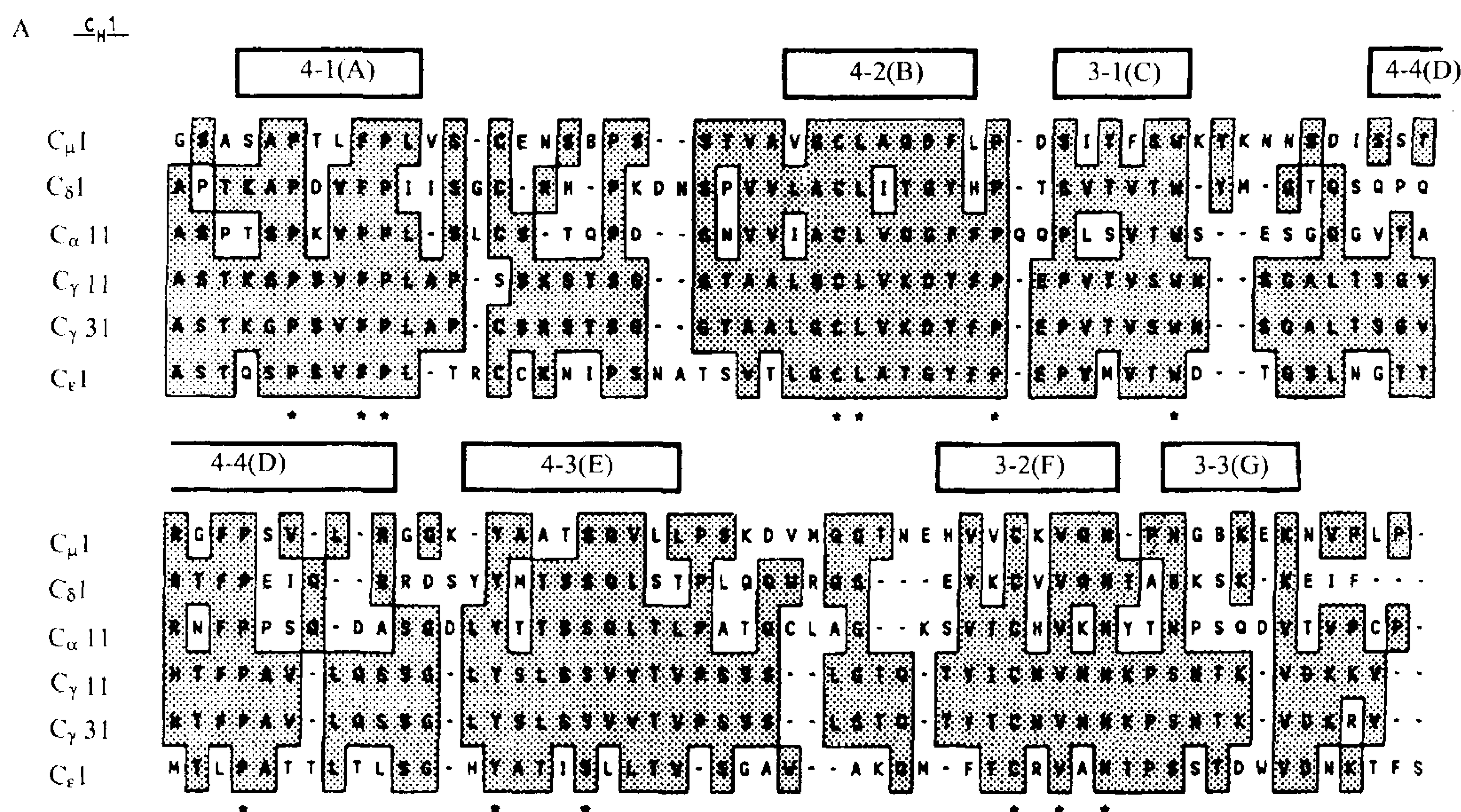
样，Fc 的 C 端结构域间有紧密的联系。这一序列的保守性可能也是由于和 C_H1/C_L 处相同的稳定作用。而且，就 μ 和 α 链来说，相对的高度同源性似乎更反映了最后一个结构域在多聚体形成中所具有的重要地位。另外，$C_\mu4$ 和 $C_\alpha3$ 的 C 端都有一个 18 个氨基酸的尾部序列。每一序列的半胱氨酸决定了两个亚单位间的二硫键连接和 IgM 及 IgA 的聚合作用[52]。和 V 区一样，共同的代表序列能用于鉴别不同结构域、类及亚类。在同种型的比较中，大多数保守性残基都明显地位于 β 折叠股，就像 V 区的骨架区（FR）一样，这些折叠股决定其结构域的正确折叠。另外，所有 C_H 序列中都存在组成链间二硫键的半胱氨酸及能防止其还原的色氨酸。

同种型的五条重链在进化上与 V 区有相同方式，都来源于一个相同的基因前体，通过其复制和变化衍生而来，这也许在形成原始有机物时就已发生，先于哺乳动物物种形成。因为所有哺乳动物都有这五类免疫球蛋白，事实上，已证明不同物种同种型间的序列相似性远远高于同一物种的不同同种型。比较图 3.10A 和图 3.11，亚类则代表了更多基因复制，因此，在不同的哺乳动物中有不同的亚类，例如，人有两个 α 基因座因此具有两个 IgA 亚类[53]，鼠只有一个 α 基因，兔子则有 13 个[54]。由于近代进化分歧，重链亚类呈现了更大的序列相似性，从 60% 到 90% 不等。图 3.10 中 α1 和 α3 链证明了这一点。虽然相关亚类 C 区具有高度一致性，然而极小的差别也会对功能产生很大的影响。例如，人的 IgG 有四个亚类（它们的序列彼此有 95% 的一致性），IgG1 和 IgG3 很容易与巨噬细胞及其他吞噬细胞相结合，而 IgG2 和 IgG4 的结合能力很差。这种结合由 Fc_γ 受体介导的，这一受体现已被精确地鉴定出来了（在本章后面有详细介绍）。类似的细微序列差异也能影响免疫球蛋白的分解、胎盘转移、与 SPA 的反应等。正是这种需要具备行使不同功能的选择压力，保持了哺乳动物中五种主要的 C_H 类型，同时也使同种属中分化出亚类。总之，进化上的分化使不同同种型具有了应对不同抗原进行免疫应答的能力。

47

48

虽然除结合重链外，目前没有证据表明轻链的 C 区有重要的生物学作用，已鉴定出多种形式的 C_L。首先，轻链包括 C_κ 和 C_λ——虽然在功能上没有差别——是以不连续基因座另外加上各自可能的 V 和 J 基因片段共同来决定的。这与重链的基因座形成了对比，在重链中任何重排过的 VDJ 都可能与任何同种型 C_H 通过“类型转换”（class swithing）而联合，虽然就抗体的功能而言，κ 和 λ 的同种型的差异与抗体的作用效率无关，但它们的确存在不同。在人类的球蛋白中，κ:λ 比率大约为 70:30，但在小鼠中大约 95% 的抗体都是 κ 型，这些不平衡的原因目前没有得到满意的解释，但很可能与各种生物基因组中可利用的 V_κ 和 V_λ 基因数目有关。有趣的是，与重链一样，轻链同种型也在不同种属之间较保守（图 3.12）。另外，在同一种属之内，κ 与 λ 间的差异比 C_H 同种型的差异要小，值得注意的是 C_κ 终末和 C_λ 倒数第二位半胱氨酸对于在轻链与重链间



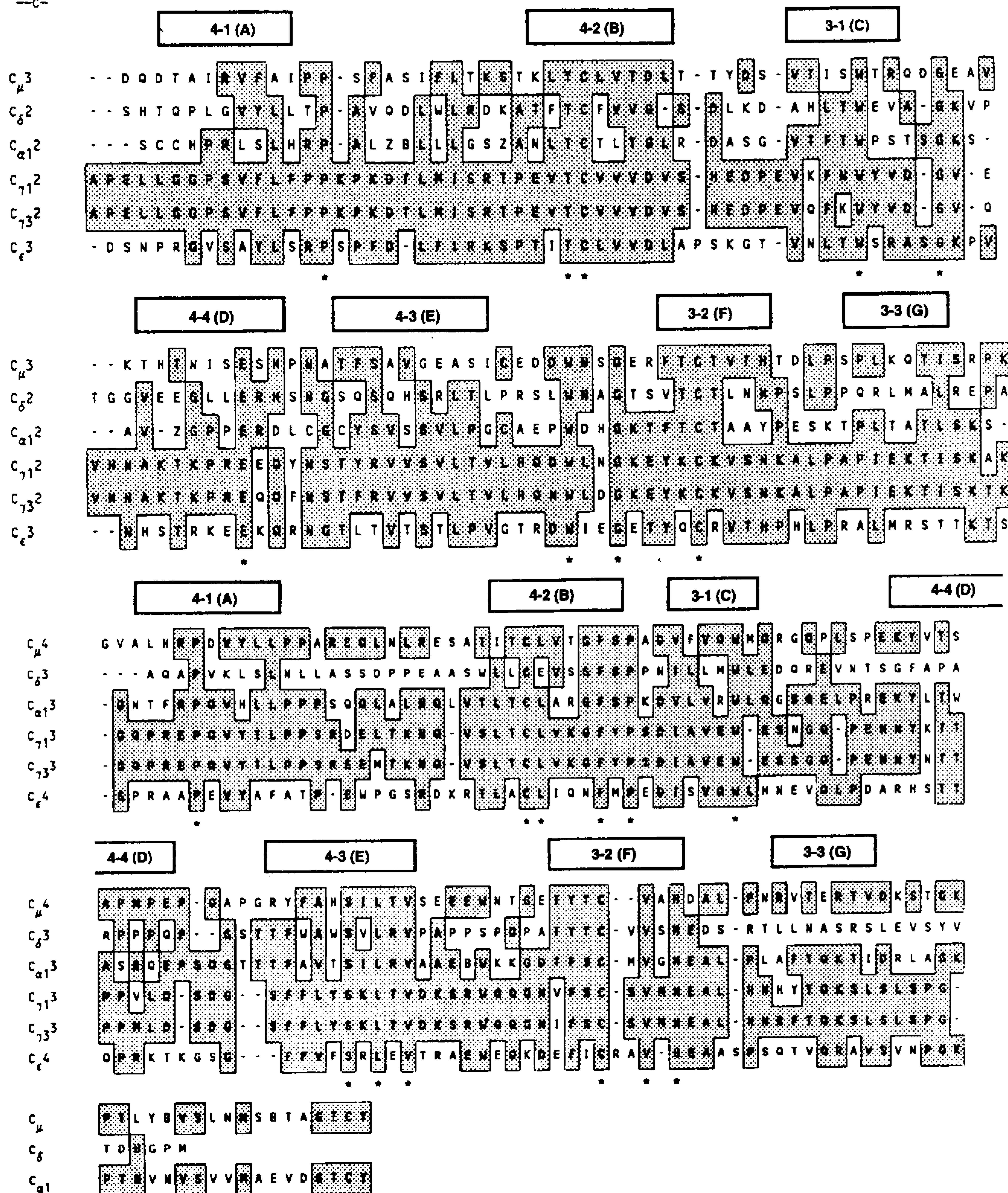


图3.10　人所有同种型(除 γ2、γ4 和 α2 外)C_H1(A)和 Fc(B)区氨基酸序列比对。阴影框表示两个或多个独特型共同的残基。* 代表所有 6 个序列均相同的残基。短线表示为了得到最优化同源性而引入的间隔。序列比对上方的白色框中的编号依照于 Edmandson 标准,而括号中的字母编号依照于 Hood 标准。

形成重-轻二硫键是极其重要的。C_L 区第二个多变区决定了 C_λ 的亚型,虽然在人和鼠中各自只有一个 C_κ 基因,但是其 λ 链亚型分别有五个和四个。λ 链恒定区的变异涉及 C_κ 功能区。尽管这一位点有一个 κ 恒定区基因,但是已经鉴定出三种 κ 链同种异型。这些等位基因的差异反映在暴露的 153 和 191 位残基上。因此,这些同种异型的标志可以作为抗原决定簇[55]。

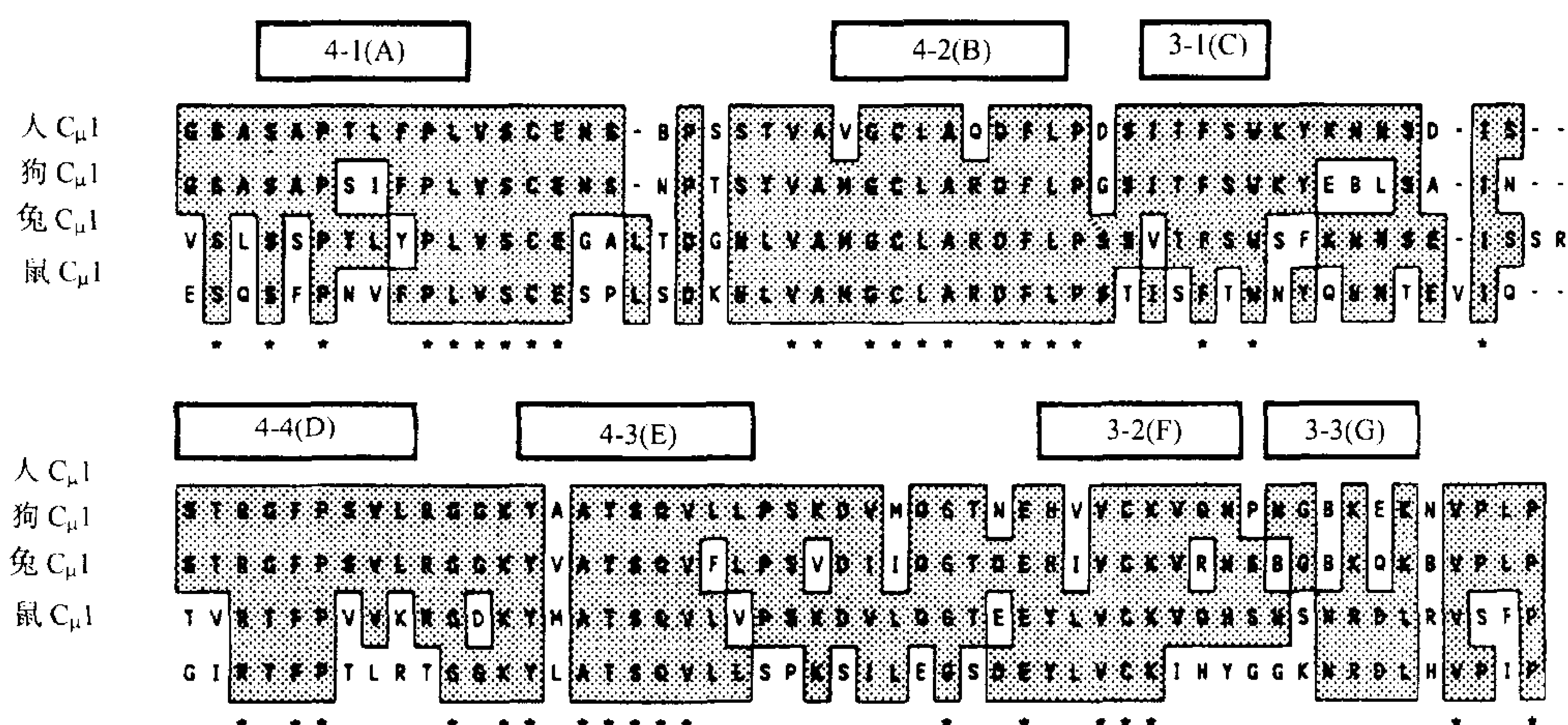


图 3.11　四种哺乳动物 C_H1 区蛋白序列同源性比对。各标记同图 3.10。注意，与图 3.10A 不同的 C_H1 之间的比对相比，本图中所加入的间隔较少而绝对保守区(＊)数目较多。

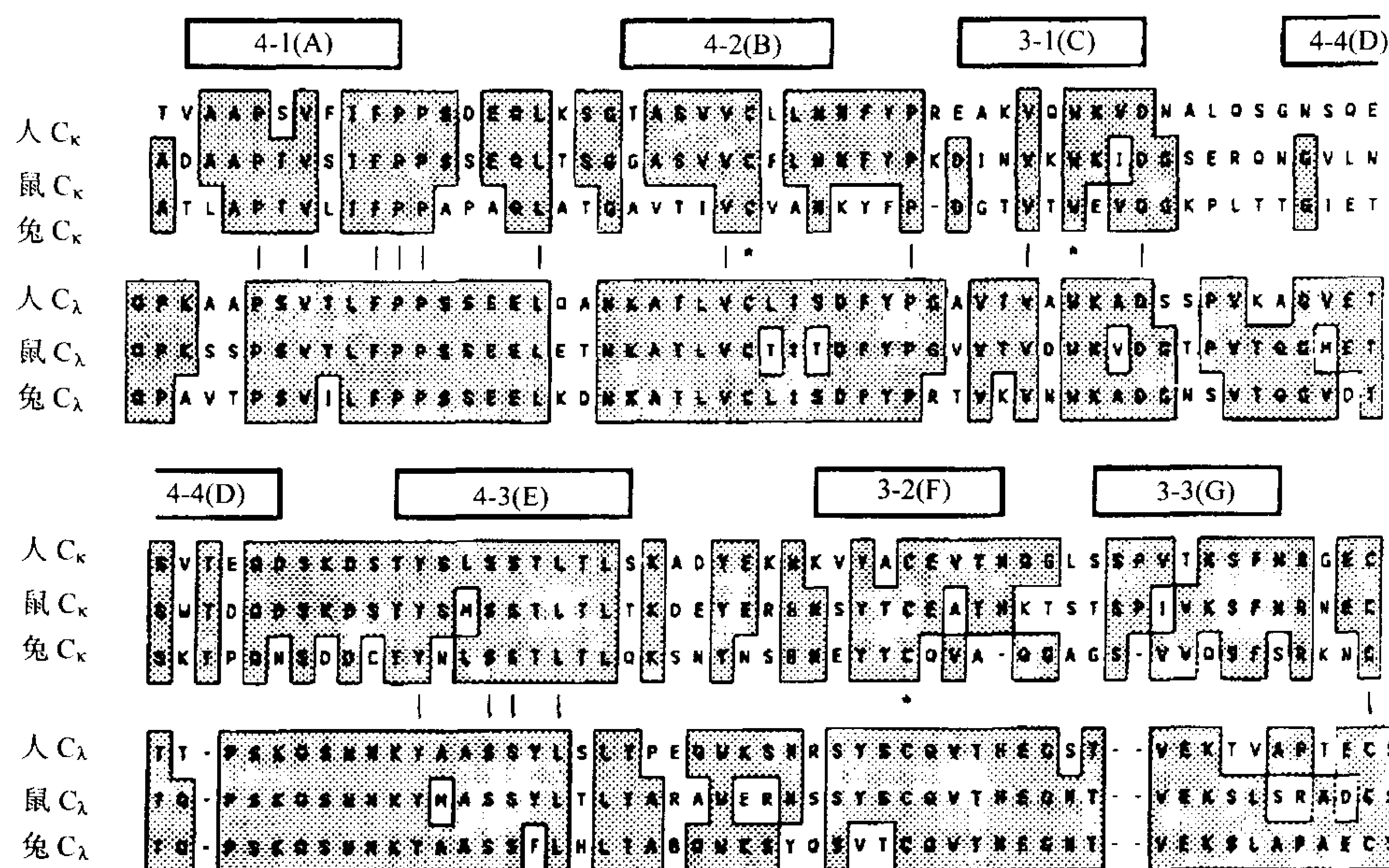


图 3.12　三种哺乳动物 C_κ 和 C_λ 区的序列比对。图中标示如图 3.10A 和图 3.11，但所有 6 个序列共有的氨基酸用垂直线标示，＊用来强调结构域中的核心保守色氨酸和半胱氨酸(同样为 6 个序列所共有)。如同图 3.11，间隔很少而物种之间存在高度同源性。

如上文所述，无论是 μ 或 ε 链中的各个不同结构域还是较短的 α、γ、δ 抗体上的特殊节段，铰链都是和免疫球蛋白上的 Fab 段或 Fc 段相连接的。然而，铰链结构在非哺乳动物的重链序列中缺乏的事实证明，这一结构的进化出现在哺乳动物中[51]。因此，本讨论限于哺乳动物，以人铰链序列为例。

铰链区不但联结着 Fab 和 Fc，而且起着维持抗体分子两个重链二硫共价键的作用，它们在同种型间呈现极其丰富的多样性，但一般来说是由惟一的外显子所编码的。举例来说，人类的 IgG1、IgG2 和 IgG4 的铰链区分别被一个短的外显子编码(12～15 个氨基酸)，而 IgG3 由四个外显子编码，这使它的铰链所跨越残基的数目大约是其他 γ 同种型的四倍多。由于不同铰链序列与 C_μ 和 C_ε 序列有相似性[56]，有人曾设想所有的铰链

来自于 $C_\mu/C_\epsilon 2$ 区,但不幸的是此铰链序列过于短小,因此无法让人确切地追踪其起源。通过铰链的比较可清楚看出,$C_\gamma 3$ 铰链来自于 $C_\gamma 1$ 铰链的复制。除了几个其他人类同种型铰链以外,图 3.13 列出了 C_μ 和 C_ϵ 的额外结构域。

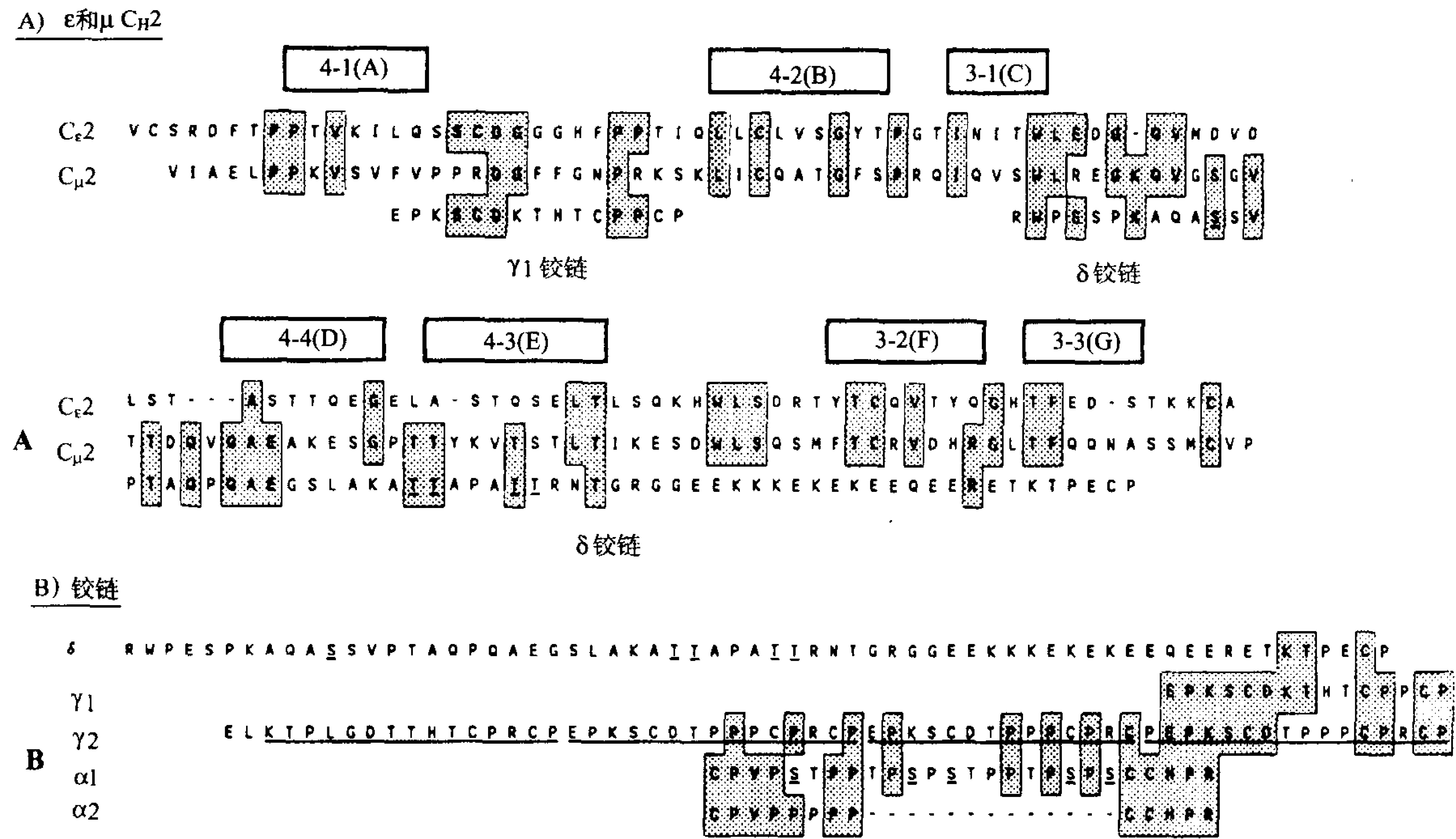


图 3.13 人 $C_\mu 2$、$C_\epsilon 2$ 结构域、γ1 和 δ 铰链结构域氨基酸序列对比(A),以及几种人免疫球蛋白铰链区(B)。图中标示如图 3.10A、图 3.11、图 3.12。图 A 中,$C_{\mu/\epsilon}2$ 区与两种不同的独特型铰链区进行了比较,显示了它们之间潜在的、尽管是有限的进化关系。图 B 表明了铰链区几种特性,注意铰链区中富含脯氨酸,半胱氨酸以及丝氨酸/苏氨酸,而这些氨基酸构成了不同独特型之间同源性的基础。可想而知,这种类间同源性较低而亚类间同源性相当高(比较 γ1、γ3 和 α1、α2)。注意,γ3 中有 4 个 γ1 的重复单位(其下标有下划线)。同时要注意的是,α1 上在 δ 和 α1 铰链中与 O-糖基有关的位点,如在 α2 上没有,其下也有下划线。

除了抗体的可变区、恒定区及铰链区之外,其他一级序列特征也在研究之列。例如,无论是免疫球蛋白的重链还是轻链都是由一条 16 ~ 26 个氨基酸长度的引导肽引导合成的,在翻译的过程中,引导肽引导 mRNA-核糖体-多肽复合物到粗面内质网,完成翻译。在多肽穿过粗面内质网的挤压过程中,信号肽便被特定的水解作用而去除。

50

最后,理解免疫球蛋白的一级结构,必须提到在细胞表面表达的免疫球蛋白序列。所有同种型的重链既可以分泌型抗体,又可以以 mIg 形式存在,作为 B 细胞受体的主要成分。分泌型与 mIg 形式的转化由 mRNA 3′末端选择性剪切决定。分泌型抗体的亲水 C 端残基被一个疏水氨基酸代替,便可完成膜表面免疫球蛋白的转变。这些序列的表达产物不仅使免疫球蛋白保持在细胞表面,而且对与抗体信号扩增及与最终活化有关[57, 58]。因此这种剪切事件的调节及其最终蛋白产物的表达在 B 淋巴细胞分化过程中受到严格的控制,这才能保证在不同的 B 细胞分化时期有与之相适应的膜表面免疫球蛋白和分泌抗体水平。

二级结构——免疫球蛋白的折叠

除铰链区和胞质区外,免疫球蛋白折叠的特征决定其一级结构到四级结构的各个方面。对于二级结构来说,便是 V 区和 C 区的不同模式的 β 片层结构形成。正如上文所述,所有的免疫球蛋白折叠都由两层反平

行的β片层以“三明治”的形式组成，包含一个内部疏水区。以前，人们认识到每个免疫球蛋白结构域都是由七条多肽β折叠股组成，其中的四条组成一个β片层，其余三条组成另一个。因此，一种专业命名法应运而生，它用数字(3-1,3-2,3-3 和 4-1,4-2,4-3,4-4)反映了一条折叠股(3股还是4股的)在β片层的位置。后来研究发现所有的 Ig 均以这种方式组织二级结构，但是在V区和C区中，这种二级结构的叠加存在不一致性；另外，一些额外的可变区氨基酸残基参与形成β折叠股，并形成了两条额外的β折叠股。最终，Ig V区折叠包括一个5条折叠股形成β的片层(相对于C区3折叠股片层)和一个4条折叠股形成的β的片层。第二种命名方法用字母(A、B、C、C′、C″、ζ、D、E、F 和 G)来命名β片层中的不同折叠股，因此这些“额外”的β折叠股有了系统的正式名称。图3.14显示的是各种类型的免疫球蛋白展开的V区和C区二级结构示意图。注意，当字母命名方法依次给蛋白质的初级结构命名时(A、B、C、D 等)，数字系统命名方法并不与之同步，对应此顺序其名称则为(4-1,4-2,3-1,4-4,4-3,3-2,3-3)。不仅如此，这种命名系统是为了与在完全折叠的免疫球蛋白域中各折叠股的三维位置及前后关系相适应而设计的，这将在下文予以解释。

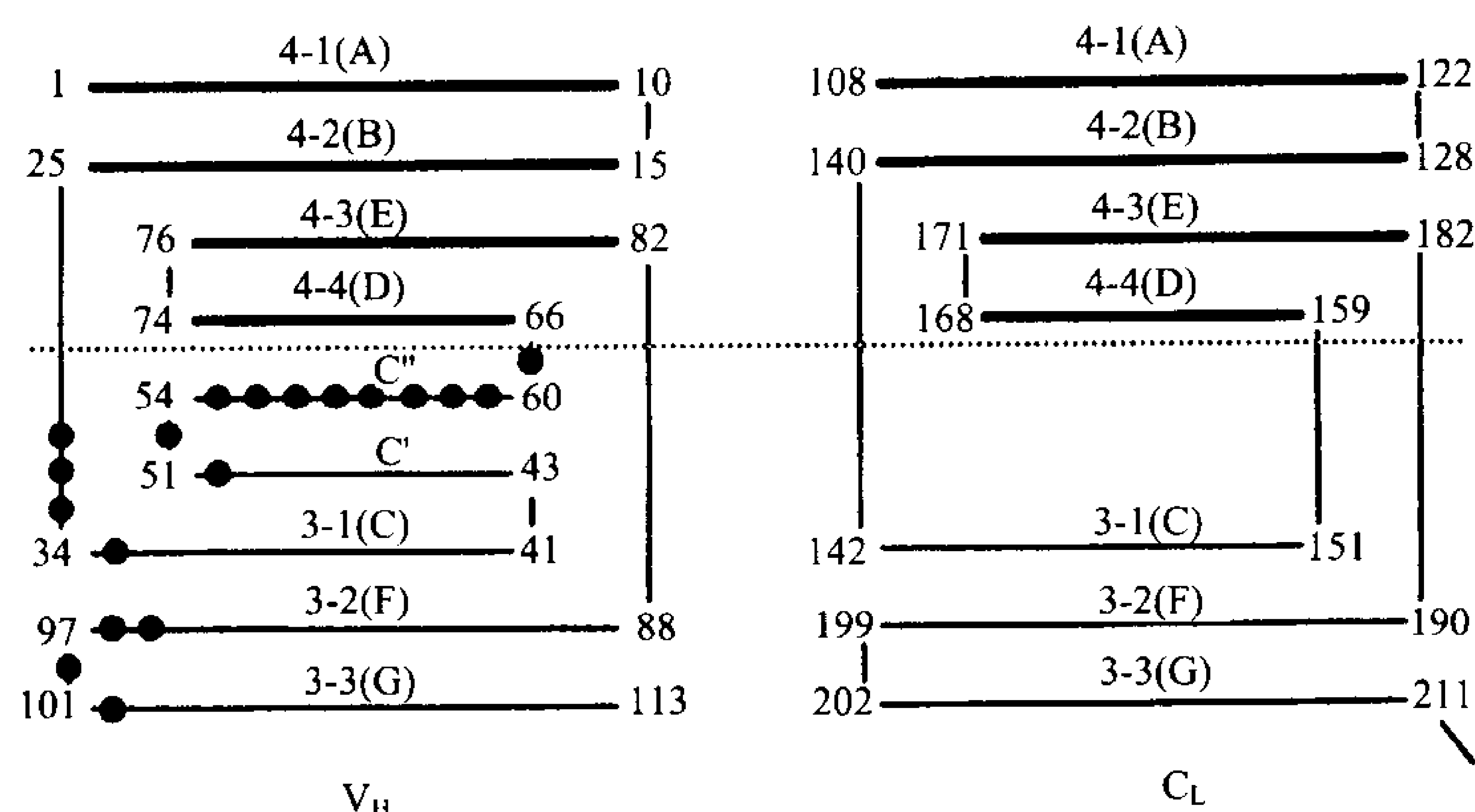


图3.14 展开的免疫球蛋白的二级结构图。水平线代表β折叠股，垂直线代表连接β折叠股的环。粗黑色水平线表示位于结构域中的4折叠面，细水平线表示3～5个折叠股的β片层。圆点表示 CDR 区。折叠股带按 Edmundson 进行数字编号，括号中的字母编号则按照 Hood 标准。在三维结构中，免疫球蛋白结构域是以圆点区为轴心，通过细水平折叠股在粗水平折叠股下方折叠而成的。

三级结构——免疫球蛋白的结构域

从逻辑上推论，如果免疫球蛋白折叠的β片层是抗体主要的二级结构蛋白基序，那么与充分折叠的三级结构相对应的是形成免疫球蛋白结构域。正如解释的那样，Ig 结构域是建立在两层β片层结构的前提之上的，如“三明治”般环绕着疏水侧链核心，形成了一个紧密的球状结构。当然，在这个通用的结构框架下，Ig 结构域的变异非常大，然而实际上这些免疫球蛋白 Ig 域与 IgSF 的其他成员有一些共同的特征。在 Ig 结构域的中心两个半胱氨酸形成域内二硫键，并含有色氨酸可以防止蛋白酶的水解。所有免疫球蛋白结构域——可变区或恒定区，重链或轻链——都有这三个重要的残基，并且它们在不同结构域位置保守。

51

除了这些重要的核心残基以外，尽管一级序列有明显不同，不同免疫球蛋白结构域仍能够维持相似的三级结构。由此可了解到这样的事实，那就是对于维持免疫球蛋白结构域折叠而言，某一特定位点的特定氨基酸残基没有该位置氨基酸的特征那么重要。换句话说，只要特定位点的氨基酸侧链适于β片层形成，并且在正确的位置有终止β折叠股的必需氨基酸残基，那么该位点具体是哪一个氨基酸也就并不重要了。

当然，还有其他的一些残基对免疫球蛋白结构域的适当折叠和功能形成是必要的，但这些都是针对某些特殊的结构域，而不是所有的免疫球蛋白内的结构域都必需的。比如，FR4 主要区域 W/F-G-X-G 是保守的，而只有在V区才形成对 V_H/V_L 正确聚合起重要作用的β凸出结构。同样的，V_H 特异性的(G-L-E-W-疏水)和 V_L 特异性的(P-亲水-疏水-L-疏水)FR2 区的主要部位，以及相应的β凸出，在免疫球蛋白结构域都有保守的三级结构。最后，就像我们在二级结构中讨论的一样，V和C区在免疫球蛋白折叠中的基础排列是不一样的，如V区是由一个4股(A、B、E 和 D)和一个5股(C″、C′、C、F 和 G)β片层组成，而C区组成是4股(A、B、E 和 D)和3股的(C、F、G)β片层。很明显，这就使可变区与恒定区在三级结构水平有所区别。

再则，当在考虑到一级和二级结构时，三级结构的检测能够使 V 区和 C 区之间的区别更加容易。在可变区方面，不管来自重链还是轻链，很明显，一个蛋白质分子的结构不足以代表整群分子。这是因为每一个结构域，V_H 或 V_L，事实上都是一个新的结构，并且只有通过晶体解析的方法才能明确其结构。尽管如此，却明显地存在与 V 区三级结构相关的两个主体结构。首先两个不同 V 区结构间的相似性与它们在基因水平上的相关性一致。也就是说，你能够合理地预测，两个不同的 V_H 的结构之间要比 V_H 与一个 V_L 的结构之间更为相似；两个属于同宗族的 V_H 区要比两个不同宗族的 V_H 更为相似。彩图 3.1 和彩图 3.2(见书末彩色插图)中比较了来自相同和不同宗族的抗体的 FR1 区分子模型，正像预期的一样，两个蛋白质存在整体上的一致性，但在几个关键性的残基上存在差异，并由此产生明显结构差异。在大多数情况下，这条原则适用于未知 V 区三级结构的推断。在这种情况下，重要的是用于归类宗族特征的 FR1 区是暴露的，并远离抗原结合位点，而与家族源性最有联系的 FR3 区域却临近抗原结合位点，并且能够影响它的构象，甚至直接与抗原相互作用。一些关于某些家族特征的描述反映出抗原结合的特异性，这些方法对三级结构的有效预测起着补充的价值。

关于 V 区三级结构的第二种普遍倾向是抗原结合位点是抗体多样性的巢式结构[42]。。回顾最初的抗体蛋白研究认为，抗体非保守超变区以及保守的框架区分别介导抗原结合和形成抗体的结构基础，而这个假说上已被证明是正确的。因为 FR 被证明由 β 折叠股组成，而 CDR 由无规则的环组成并参与 β 折叠股的相互连接。而且，通过近来对抗体结构的理解，人们认识到，作为一条普遍规律，Ig V 区多变的残基紧邻于抗原结合位点的附近，而那些最保守的氨基酸残基则远离于那些位点。彩图 3.3 则是这个概念的体现。因此为配体结合提供平台的三维结构在抗体间明显不同。

有几个因素影响着抗原结合部位的三级结构，而且它们的复合作用可能更加复杂。首先，两类序列在环区的变异能够完全改变抗原结合特异性和亲和力。不同 V 基因的应用及连接的多样性影响 CDR 的长度，其次，同样由于不同 V 基因的应用及连接的多样性及体细胞突变使得 CDR 在序列组成上明显不同。在这种情况下，多样性产生的机制在于 CDR 环区的氨基酸多样性，由此导致易于产生物理形状或化学本质不同的抗原结合位点。由于靠近 CDR 的 FR 区经常与抗原接触[60]，在此区的氨基酸改变也可改变结构的多样性，甚至 CDR 中天冬酰胺的糖基化残基也能改变环的构象和抗原结合特异性[61]。构象多样性也能在抗原结合位的表面多样化中起重要作用。就像前述 CDR 环之间及与 FR 氨基酸之间的相互影响[62, 63]。在这个研究中，不能通过简单的将 CDR 嫁接于不同的 FR 区的方法保证抗原的亲和力。进一步的研究证明 V 区能够在一级结构水平分成 FR 和 CDR，事实上，它们的协同合作比分离时更能促进抗原的结合。

由于免疫系统具有无限的产生新的可变结构域的能力，因此不可能对所有潜在 V 区结构进行说明，但说明相对少的恒定区三级结构是可能的。直到今天，X 射线衍射分析仅解析了 IgG1Fc 区的精细结构[11]。图 3.15A显示了 α 碳主链结构。再则，整个免疫球蛋白(一种铰链缺失的特殊 IgG1 分子)的晶体结构已被解析出来[64]。以 Fcγ1 样本为基础的其他 Fc 同种型，能够用同源的 IgG 序列以最小的能量计算推测出(图

52 3.15B)[65]。另外，大多数三维结构的研究均利用 Fab 或 Fv 段，这些分子常由细菌表达产生。值得注意的是，已获得 IgG Fc 段与葡萄球菌蛋白 A(SPA)的共同结晶，其中尤为重要的是，这个结构揭示了 SPA 可以与 $C_\gamma2$ 和 $C_\gamma3$ 结构域同时结合[12]。这与以前认为一个结构域就能执行一个 IgG 功能的观点相反。另一个例子也证实了这一点，Fcα 受体与人的 IgA 结合，也发生在 $C_\alpha2$ 和 $C_\alpha3$[66]。诸如此类的令人惊奇的结果提示，仍需利用晶体解析或其他方法对所有免疫球蛋白同种型的复杂结构做进一步的研究。总之，目前已获得的 IgG Fc 段拓扑学主要特性可以推广至其他类型免疫球蛋白，因为涉及这种变化的残基是保守的。

至于 V 区众多结构域，经过研究发现它的恒定区结构域与目前已知的大多数 C 区结构域的结构有一致性。至于 V 结构域，在这方面，最重要的是要考虑到 β 折叠股外可变性的高频率。C 区的保守性无论在不同类型 Ig 间还是在种间都比 V 区高(图 3.10 ~ 图 3.12)。但是即使这样，蛋白质的不同部分仍可以辨识。虽然

53 C 区结构域通常并没有描述为骨架区和高变区，但是用来分类V区的这种方法在讨论C区时仍是可以参考

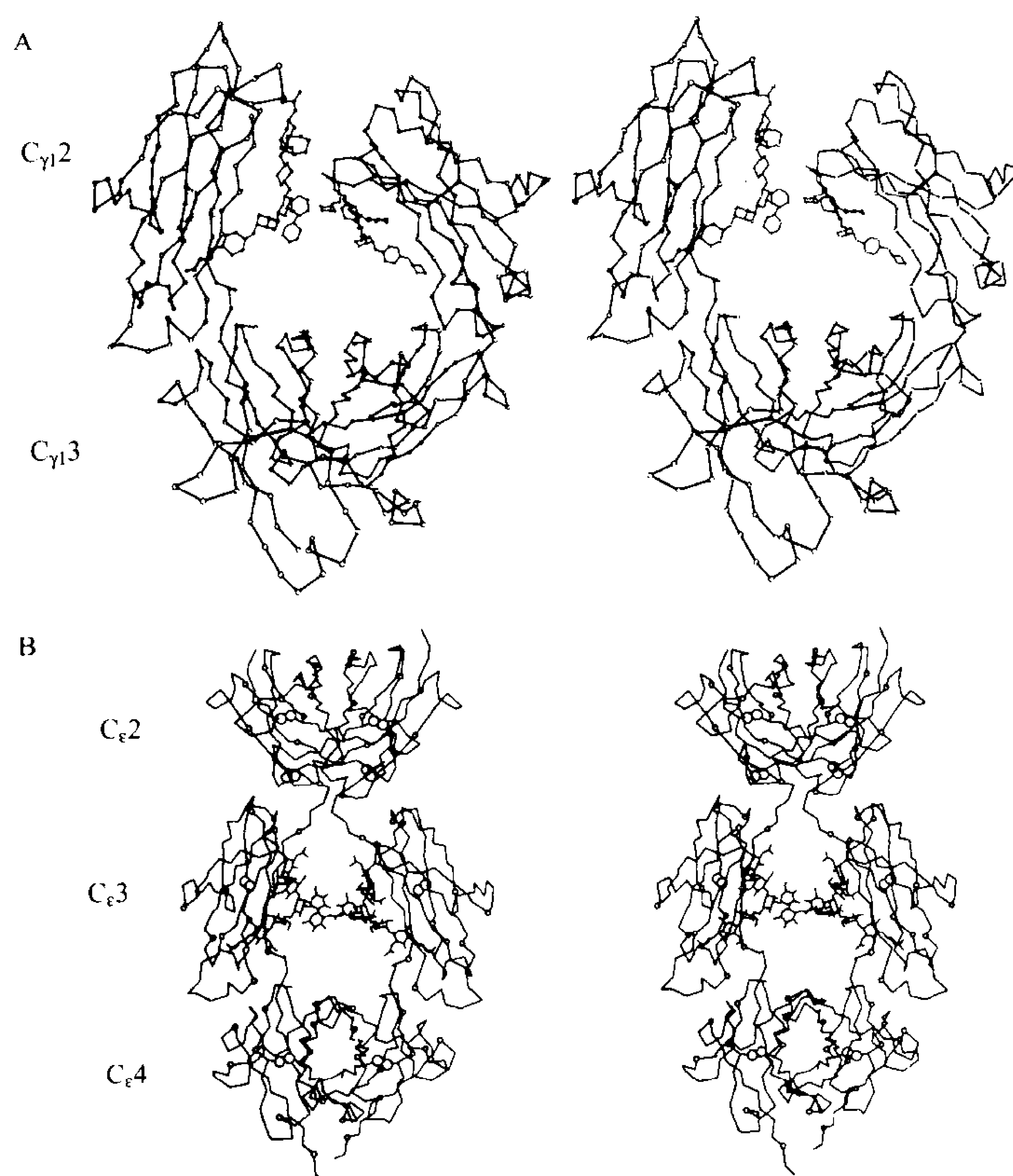


图 3.15 Fcγ1A 和 FcεBα-碳骨架立体图。两图中,C 端结构域形成二聚化,但倒数第二个结构域($C_\gamma2$ 和 $C_\varepsilon3$)通过碳水化合物的直接接触与其对应结构域结合。Fcε 的结构是以 IgG1 晶体为模型预测而来的,由于 IgG 结构中没有 $C_\varepsilon2$ 区,所推测出来的 $C_\varepsilon2$ 结构没有该分子中其他部分可信。(经允许引自参考文献[12,65]。)

的。例如图 3.10A 比较了人 C_H1 区的不同。这个区域不但表现为低保守性而且差异是必要的以保留其特异性。这些区域几乎无一例外地位于折叠股之间,特别是在连接 4-1 和 4-2(A 和 B),4-2 和 3-1(B 和 C),3-1 和 4-4(C 和 D),4-4 和 4-3(D 和 E),4-3 和 3-2(E 和 F)折叠股的环肽内。与之相反,在 β 折叠股(特别是 4-1,4-2,3-1,4-3 和 3-2)内发现高保守区域。在那里,还有介导结构域内形成二硫键连接所必需的氨基酸。主链的折叠、稳定和结构域的二聚化都需要这些氨基酸。

因此,在充分折叠的蛋白质内,与 V 区一样,抗体 C 结构域保守性最低的部分存在于连接不同 β 折叠股的环中,而且在 C 区结构域中,这些最不保守的部分位于 Ig 结构域两个末端散开的环中,这与 V 区中 CDR 成簇分布于结构域的一端不同。显然,这些环就是结合实验中所确定的功能结合位点。比如,IgG 与 $Fc_\gamma R$ Ⅰ受体的结合位点被定位于靠近铰链区的这样一个 $C_\gamma2$ 结构域的环。此外,以前所提到的 SPA 在 IgG Fc 段结合位置就在 $C_\gamma2$ 和 $C_\gamma3$ 区[12]。又比如,尽管没有 IgA 的晶体解析结构,将 IgA 序列以 IgG Fc 的三维结构为模型进行模拟,可以预测到一个 $C_\alpha3$ 结构域中暴露的环,该环可能介导与多聚化的免疫球蛋白受体结合。

因而,C 结构域之间最为不同的部分介导了不同的生物学作用,这种作用可以对免疫球蛋白进行类与亚类的划分。可以这样思考,就像推动 V 区多样性产生机制的力量一样,相似的选择压力也推动 C 区的进化,使它有不同的结合能力和功能作用,并利用结构域中的一个相似的区域来达到这一目的。对比不同区的三级结构发现,C 区结构域中这部分最易发生变化的区域被选择作为进化部位以获得新的生物学特征。

四级结构——免疫球蛋白单体

虽然,如前所述,免疫球蛋白结构域均能独立折叠成稳定的三级球蛋白结构,但是在正常生理条件下,既没见到个体的 Ig 结构域单独地存在,也没发现完整的重链或轻链。相反,天然形成的最简单的蛋白质形式是在图 3.1 已描述的免疫球蛋白单体。完整的单体抗体分子是由多重链间二硫键连接异质二聚体而形成的

四链二聚体，几乎所有的情况下，重链和轻链通过单个胱氨酸连接，形成带有一个完整的抗原结合位点的半单体。两条重链通过铰链区的一个或多个二硫键连接形成一个二价四聚体。

图3.16描述了人的五类免疫球蛋白分子二维特性。注意它们之间最主要的不同在于IgM和IgE同种型中存在一个额外的C结构域，以及不同分子中的二硫键的数目、位置以及糖类衍生物。像三级结构中的链内二硫键一样，连接重链和轻链的链间半胱氨酸是高度保守的。参与二硫键形成的半胱氨酸位于C_H1的N端和C_L的C端。IgG1是一个例外，其重链的半胱氨酸在C_H1的C端[55]。另一个经典成键方式的例外存在于IgA2的A2m[1]同种异型中，特殊的是，这种独特的同种型利用重链之间（重-重）和轻链之间（轻-轻）中的二硫键成对代替重-轻二硫键使这种四链聚合物稳定[67]。在不同的同种型，连接重链的链间胱氨酸在数目和位置上都是高度可变的。通常，重-重键在铰链区形成，在IgM和IgE中，则分别在$C_\mu 2$或$C_\varepsilon 2$结构域类似位置

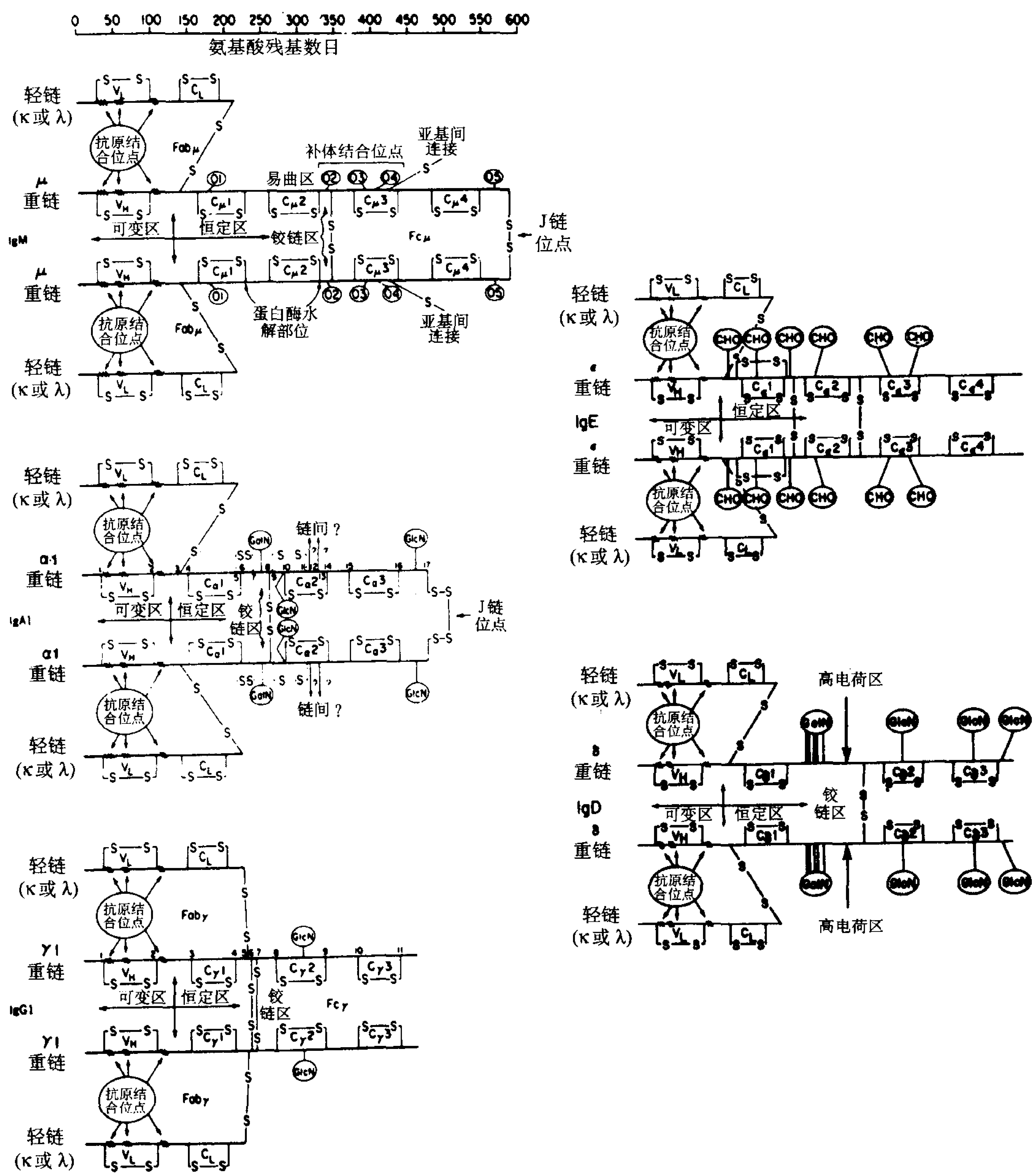


图3.16 五类人免疫球蛋白示意图。图示每种抗体的二硫键和糖基化位置。（经允许摘自参考文献[66a]。）

形成。此外，取决于抗体是否聚集形成多聚免疫球蛋白形式，IgM 和 IgA 都有二个额外的半胱氨酸具有双重作用。当 J 链介导的聚合发生时，C 端的一个额外半胱氨酸参与了二硫键形成。在 $C_{\mu}3$ 或 $C_{\alpha}2$ 结构域另一个半胱氨酸，在 IgM 或 IgA 多聚体中形成亚基间胱氨酸。IgM 和 IgA 的单体形式通过这些半胱氨酸或在链间（μ 和 α）或在链内（仅存在于 α）形成二硫键。

当四条链被链间二硫键连接成一个完整的免疫球蛋白单体时，逐一分析整个蛋白质的结构域可以对这些分子的四级结构有更好的理解。在此结构水平上，各个独立的结构域实际上由一系列的二聚分子[27]组成的一个抗体，这些二聚结构域可以通过蛋白酶水解和 X 射线衍射证实其是天然免疫球蛋白结构和功能的最小单位。接下来本文将以 N 端结构域形成的 Fv 段和 V_H/V_L 二聚体为开端，对这些结构模块进行综述。

Fv 段（彩图 3.4）是 Fab 片段上的可变部分，组成抗体上最小的抗原结合单位。可能由于这种特异性功能必需，V 结构域以不同于其他免疫球蛋白结构域的方式二聚化。在 β 折叠片层结构中，连续的氨基酸侧链以一定的角度突出于片层的两个不同的面。在大多数蛋白质，片层的两面性质不一样，比如一面疏水，与蛋白质其它部分相互作用，另一面就亲水而暴露于溶液中，因此亲水和疏水残基是交替排列的。但在二聚化的免疫球蛋白结构域中，这种交替模式被打破。因为形成二聚化表面的片层结构，必须同时和同一结构域的其他 β 片层以及邻近结构域的二聚化表面相互作用，因而亲水残基必须被疏水残基替代，以便形成二聚物。这种破坏交替亲水性的特征在形成二聚体的 Ig 结构域中普遍存在。V 结构域的相互作用不仅在 V_H 和 V_L 中特殊，这一点在当时是最先被认识到的，而且在所有已知的蛋白质结构中是惟一的[28]。与 C 结构域不同，V 结构域以五条 β 折叠股（这种情况只存在于 V 结构域中）构成了一个二聚体表面[68]，实际上，V_H/V_L 交界面由每个 V 区中的四条 β 折叠股 C′-C-F-G 组成。 *54*

这种独特的二聚结合对结构有着深远的影响。在这部分详细叙述三级结构。三个不同的 β 凸起被证实：一是 G 折叠股是所有 V 区所共有的；二是 V_H 区特异的部分定位于折叠股 C′上；第三是 V_L 区的特异性部分也定位在折叠股 C′上。值得注意的是，所有这些凸起都出现在各自 β 片层边缘的折叠股上。通常，β 折叠股折叠得非常紧密，以致中间的折叠股中的残基形成了层与层间的大多数接触。由于这些保守的 β 凸起，V 区边缘的残基侧链伸进了二聚体内部，阻碍了 V_H 和 V_L 紧密地联系。Fv 片段疏松的包装形成了一个合适小分子进入的亲水沟。这些沟主要由 HVR 残基线性排列而成，其余的 CDR 环在 V 区末端形成一个潜在的抗原结合位点，其表面区域大约为 2000 ~ 3000$Å^2$[69]。

许多参与 V_H/V_L 结构域间相互接触的保守残基已经被定位，在一条链的 FR2 与另一条链的 FR4 之间形成了由大约半数的疏水核心组成的接触面。其他主要的相互作用涉及一条链的 CDR3 与互补功能区的 FR2 和/或 CDR3。所有 V_L 中 12 ~ 21 及 V_H 中 16 ~ 22 位氨基酸残基参与介导链间的稳定作用[69]。考虑到 HVR 对于这种相互作用的巨大影响，有人认为它可以改变轻-重链配对的紧密关系。但是，有研究用不同个体，甚至是不同种的重和轻链证明了异种的重-轻链对可形成稳定的联系。这暗示 V_H 和 V_L 区的基本结构的保守性在整个进化中是持久的，至少在异种分子之间 C_H1 和 C_L 锚着产生相互作用的要素得到了保留。 *55*

在 Fv 和 Fb（C_H1/C_L 二聚体）片段之间，存在着一段短的多肽，这对于 Fv 的结合抗原能力，以及 C_H1/C_L 区甚至所有恒定区 C 端的正确二聚化都是很重要的。由 C 区 N 端残基相连的 V 区 C 端残基组成的这个区域在完整的 Fab 片段中连接 Fv 与 Fb，并称之为肘肽。共同地，一个免疫球蛋白 Fab 的两个"弯肘"也叫开关肽。若干个 Fab 晶体结构证明了成为易弯曲的片段的开关允许相当多的 V 和 C 区间的弯曲[70]。这被认为对于允许 Fab 段接连可变空间的表位是重要的。个体肘肽的另一个同样重要的特征是实际上它们在抗体区域的四级结构中可作异常的 180 度旋转，这对所有 C 区为了形成双聚体的正确定位来说是必需的[8]。

这些 180 度旋转存在于 V_H-C_H1 和 V_L-C_L 间的"弯肘"上，而且是 C 区正确位置所必需的。大多数 C 区 N 端，C_H1 和 C_L，可以结合形成 Fb 片段。C_H1 和 C_L 是 C 型 Ig 结构域的原型。就像所有 C 结构域一样，它们缺乏 V 区 5 折叠股片层中的 C′和 C″股。与 V 区相似，它们两个 β 片层之一也打破了交替亲水模式，但对于这些结构域来说，这些情况存在于免疫球蛋白 4 折叠股的那面（A-B-E-D）。作为一个结果——并且因为这许可

旋转的“弯肘”——C_H1 和 C_L 利用它们结构域的反面(相对于 V_H 和 V_L)去形成二聚化[68]。这些在二聚化 C 模块核心的弱极化残基在不同种属的 C_H1 及 C_L 中是保守的[8~10,12]。在这种条件下,(不像 V 区),它们趋向于主要存在中间的折叠股上(B 和 E)上,在那儿它们介导形成一种更“严整”的联系。因此,Fb 段经常被理解成一种 V 区紧凑的锚,在抗原结合区存在的地方形成一稳定的平台。Fb 段与铰链一起,也起着将抗原结合位点和巨大的 Fc 区隔开的作用。

在 Fab 和 Fc 区之间,免疫球蛋白铰链(或额外区域)是所有抗体结构和功能特性的关键决定簇。结构上说,铰链是由一个或多个二硫键连接的二聚肽的伸出部分,由脯氨酸、丝氨酸和羟丁氨酸支配。这些氨基酸组合使铰链具有易曲性并使一个抗体的 Fab 臂具有弯曲和扭曲的可动性。铰链易曲性允许 Fab 段能适应表位的排列,以二价结合抗原,从而使抗体有了更高的亲合力和多种功能。分子可以旋转的程度与 C_H1 末端和第一个重链间二硫键(“上铰链”)[71,73]间的长度密切相关;因此,IgG3 的易曲性远大于 IgG1。铰链长度和易曲性也可减少 Fab 段对其他分子接近 C_H2 的阻碍。例如,当正常人的 IgG1 活化补体时,铰链缺失的变异 IgG1 异型蛋白 Mcg 不能固定补体。因为 Fab 段剩余部分太靠近 C_H2 上 C1q 结合位点以致不能产生相互作用。

铰链作为一种延长的肽是免疫球蛋白中最不稳定,易于蛋白酶解的部分。早期研究结果使我们对 Fab 段与 Fc 段有了了解,就是由于铰链区的蛋白酶解消化作用。例如,具有长的且带电的铰链 δ 同种型,对蛋白酶解非常敏感,正好可解释其短的血清半衰期[74]。这一论断对 IgA 很重要,可对应于它在黏膜表面的基本功能,那里细菌和宿主来源的蛋白酶很丰富。例如,α1 铰链在只有 17 个氨基酸长度中就含有五个碳水化合物连接位点[75],这使得 IgA1 对肠内蛋白分解酶的分解作用有抗性。但是,多种细菌分泌靶向 α1 铰链的蛋白酶。人们推测作为一个进化的结果,IgA2 的铰链被删除了 13 个氨基酸,这就使分子重新具有了对第二形式蛋白酶解作用的抵抗力[53,76,77]。同样的,不同型的每一种铰链的结构特色都进化了,所以相应的免疫球蛋白被赋予了特殊的功能特点。

在铰链的 C 端,存在着 Fc 区。这样在 IgG、IgA 和 IgD 中,Fc 段就是两个 C_H2-C_H3 构成的二聚体;在 IgM 和 IgE 中,Fc 段由一对 C_H2-C_H3-C_H4 区域组成。结构上说,$C_\mu/C_\varepsilon3$ 与 $C_\gamma2$ 相等。且 $C_\mu/C_\varepsilon4$ 与 $C_\gamma3$ 是相互对应的。如上所述,绝大多数限定特定不同类型免疫球蛋白生理功能的位点位于 Fc 段。Fc 段最显著的四级结构的特征是 $C_\gamma2$(及与其结构相应物)不能形成二聚体。对这些区域的分析证明 C_H2 拥有介于 C 区和 V 区中间的混合结构,而 V 区是五折叠股/四折叠股夹层结构(在五折叠股表面二聚化),C 区是三折叠股/四折叠股夹层结构(在四折叠股表面二聚化)。$C_\gamma2$ 是四折叠股/四折叠股夹层结构。此外,位于结构域两面外侧表面的侧链取代物阻止在两面形成二聚体[11]。另一个认识到的混合特征是 $C_\gamma2$ 的 β 折叠股比 V 区的要长,但比 $C_\gamma1$ 和 $C_\gamma3$ 区的要短。最后,所有的 C_H2 区都是由靠近结构域(如图 3.1)中间的 *N*-连接的寡聚糖诱导形成的,除了 $C_\alpha2$,它产生于靠近于 C 端的位置。这些糖间的氢键在 C_H2 结构域之间起联系作用。另一个关于 C_H2 的重要特征是其 C 端与 C_H3 区(大约 340Å^2 表面区/结构域)的纵向联系阻碍了中间区域的弯曲[12],这不像 Fv/Fb 与分开 Fab 与 Fc 段的铰链之间的易弯肘。

Fc 段最后一个结构域是 $C_\gamma3$ 及其同类物,以与 C_H1 与 C_L 一样的方式成对。利用限制性蛋白酶解、还原和变性的研究最初将 C_H3 结构域的二聚体称为 pFc′。像 Fb 段一样,C_H3(1100Å^2/结构域),以每个结构域的 4 折叠股表面形成牢固联系的二聚体[11],也如 C_H1 和 C_L 一样,所有 C_H3 结构域的同种型在涉及成对结构域相互作用的核心残基上显示出保守性。从结构上来讲,区分不同 C_H3 结构域相应物的惟一特征就是 $C_\alpha3$ 和 $C_\mu4$ 结构域的 C 端上存在由 18 个氨基酸组成的尾链。这段序列对于多聚化作用很重要而且在下面关于免疫球蛋白的更高级结构的章节中,我们将作更深一层的讨论。综上所述,Fc 可以看作是 Fab 的一段近似物,在其 N 端有两个类 V 区(C_H2);而在其 C 端则有一恒定区(C_H3)模块,此恒定区以经典 C 型结构域为特征模式形成二聚体。

56

尽管在蛋白质水平上很多方面都具有相似性,五类 Fc 的四级结构中它们一个最显著的区别特征就在于

它们糖基化形式,而此糖基化形式具有重要的功能分型意义。譬如,IgG 分子中寡聚糖类部分仅占其质量的 2% ~ 3%,但这对于导致病原体清除和破坏的效应机制的活化相当重要[78~80]。如前所述,所有人类 IgG 类抗体分子的 Fc 段 C_H2 结构域内表面的 β4 折叠股(β股 D 与 E 之间)部位上的氨基酸侧链 Asn297 残基上都连有 *N*-连接寡聚糖类[81]。这种寡聚糖组分是一种很复杂的双触角类型,它具有六糖核心结构(GlcNAc2Man3GlcNAc)和一些可变的非核心糖残基例如岩藻糖、平分的 *N*-乙酰氨基葡萄糖、甘露糖和唾液酸(图 3.17)。总的来说,每个 Asn297 残基上共有 36 种结构独特的寡聚糖链。这种糖基化的精确性可能具有重要意义。

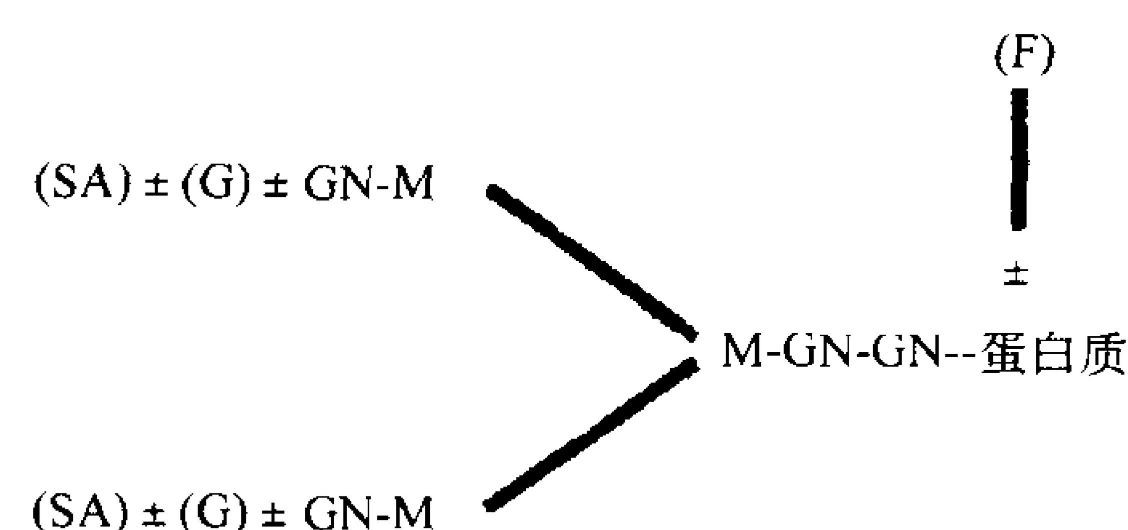


图 3.17 连接所有 C_H2 结构域的 *N*-连接糖示意图。复合形式的 *O*-连接糖的核心碳水化合物部分在开放类型中用糖残基代表。括号中是可能的外臂残基。所有可能的结合都被观察到。SA,唾液酸;G,半乳糖;GN,*N*-乙酰氨基葡萄糖;M,甘露糖;F,岩藻糖。*O* – 连接糖发生在 Asn-X-Ser/Thr(其中 X 不能为 Pro)的酰胺侧链。Ser/Thr 残基与酰胺组形成氢键,活化后连接到多萜醇介质(被寡糖转移酶所催化)的主要 *N*-乙酰氨基葡萄糖的残基上。(经允许摘自参考文献[81a]。)

对所有哺乳动物 IgG 而言,C_H2 碳水化合物位点具保守性特征,并且在人 IgM、IgD 和 IgE 分子中相应的位点也发生糖基化作用。如上所示,IgA 的 $C_\alpha2$ 结构域内也有一糖基化的位点,但它更靠近 C 端。人 IgM、IgA、IgE 和 IgD 分子的重链 C 区同样具有结合 *N*-连接寡聚糖。此外,IgA1 和 IgD 蛋白分子延伸的铰链区的丝氨酸及苏氨酸残基上也连有多聚 *O*-连接糖类。不论哪种构型的糖基化实际上是所有重链 C 区的一个特征,并且这也是免疫球蛋白的生物结构研究中最活跃的领域。

通过对糖基化和非糖基化的 IgG 构型比较,人们已经开始实验探讨 Fc 段寡聚糖的结构和功能。非糖基化的 IgG 可以通过在衣霉素(tunicamycin)(一类糖基化抑制物)存在的条件下,由处于生长状态的能产生 IgG 的大肠杆菌所产生,或通过碳水化合物受体序列进行突变序列而得到。抗体分子上的糖成分对其特征最显著的影响就在于蛋白质在体内的存在时间。通过研究糖基化与非糖基化的鼠源性/人源性嵌合 IgG1 分子在鼠血中的清除率表明,尽管两者半衰期相似,但非糖基化构型的清除是加速的。另外,半乳糖基化和非半乳糖基化的 IgG 还用来测定糖外臂在补体(C1q)介导细胞溶解作用的研究中。观察表明,暴露于 β-半乳糖苷酶而产生的半乳糖基化形式比非半乳糖基化的构型活性低两倍[82]。相关实验支持这种观点[83]。

通过对在酵母细胞中产生的人源性/鼠源性变异 IgG1 分子的研究,进一步表明了正确糖基化的重要性并预测 Asn197 连有高甘露糖型寡聚多糖。酵母 IgG1 产物不能活化 C1q 而启动人体内的补体激活系统,但在啮齿类动物内表达相同的嵌合 IgG1(并且正常糖基化),却能够很有效的活化此系统。寡聚糖类需要与甘露聚糖结合蛋白(一类具有补体 C1 功能的凝集素)一起才能发挥激活补体级联反应的功能。甘露聚糖结合蛋白的特异性是由甘露糖和 *N*-乙酰氨基葡萄糖残基形成。已有资料表明,此甘露聚糖结合蛋白能结合到非乳糖基 IgG 上末端 *N*-乙酰氨基葡萄糖残基[84]。

分析人体内三型 Fcγ 受体(FcγRⅠ、FcγRⅡ、FcγRⅢ)进一步证实了寡聚糖链修饰对抗体的重要性。FcγR 的 IgG 亚类特异性表明其识别作用与碳水化合物衍生物存在与否相关联。观察表明人体内非糖基化变异 IgG3 与所有的三型 Fcγ 受体的亲和性降低,而这一结果正好证实了上面的结论。此外,在功能水平上,用同样的非糖基化 IgG3 抗体使半抗原 RBC 致敏后,仍触发 U937 细胞产生超氧化合物,但相对于正常糖基化 IgG3,它需要更高水平的致敏作用。这种非糖基化 IgG3 同样不能被由 K562 和 Daudi 细胞表达的人 FcγRⅡ识别,同时玫瑰花结形成(由人体 NK 细胞表达的 FcγRⅡ介导)也减少,并本质上废除了抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用[85,86]。这些结论很明显说明了 Fc 段正确的糖基化至少在某些方面对免疫球蛋白正常结构识别和生物学功能非常必要。

糖基化在 Fc 段外也可能有一定重要性。估计高达 30% 的多克隆 IgG 分子 Fab 段连接有寡聚糖链。尽管目前还不清楚其连接于 $C_\gamma1$ 或 C_L 位点,但此糖链连接 V 区可能性最大。考虑到这一点,人们分析了人的 83 个功能胚系 V_H 基因片段的 DNA 序列,发现其中有 5 个可以编码出糖基化位点。但只有其中某些进行了

糖基化。通过对 V_H 和 V_L 序列的 cDNA 及蛋白分析，发现其中大约 25%可能具有糖基化序列，在这些序列中某些是通过体细胞突变及抗原性选择而产生的[87]。目前对 V 区糖基化研究在多数情况下发现寡聚糖类组分并不直接作用于配体结合，但能对抗体完整活性所必需的蛋白质三级、四级结构有精细影响。因而，免疫球蛋白分子的很多节段上都可观察到寡聚糖类，并且它能影响抗体与抗原结合和不同 Fc 相关功能的一些特性。

更高级的免疫球蛋白结构——多聚免疫球蛋白

免疫球蛋白结构上最为显著的特点就是，两种分别源于 IgM 和 IgA 的重链具有形成更高级结构——多聚复合物的能力。但 IgM 和 IgA 抗体并非总能形成多聚体。与其他同种型的 γ、δ 及 ε 链一样，μ 及 α 链也能以单体形式存在。除此以外，多聚免疫球蛋白(pIg)能表现为多种典型的形式，最常见的即二聚体 IgA 和五聚体 IgM，也有其他形式存在的报道。图 3.18 展示的是鼠五聚体、六聚体 IgM 及人二聚体、三聚体 IgA 的扫描电镜图。多聚化显然增加了抗体表面潜在的抗原结合位点；从效价上，则表现为多聚抗体对低亲和力表位结合的亲合力提高。这对于 μ 和 α 类抗体特别有利，因为黏膜表面受此类病原靶抗原(细胞壁多聚糖)袭击特别频繁，而 μ 和 α 类抗体正好位于黏膜表面的第一线。更进一步的，IgM 作为亲合力成熟尚未发生时，初次体液免疫发生的标志性抗体，需要以此形式增强亲和力来介导其后的功能性反应。除了在加强表观抗原亲和力之外，多聚 IgM 中数个 Fc 片段紧密排列的形式似乎也能影响抗体结合经典补体激活途径中相应补体成分的效力。pIg 的组装和分泌均涉及原单体免疫球蛋白的共价连接，而另两种辅助蛋白——J(连接)链和分泌片则在上述过程中发挥了重要作用。

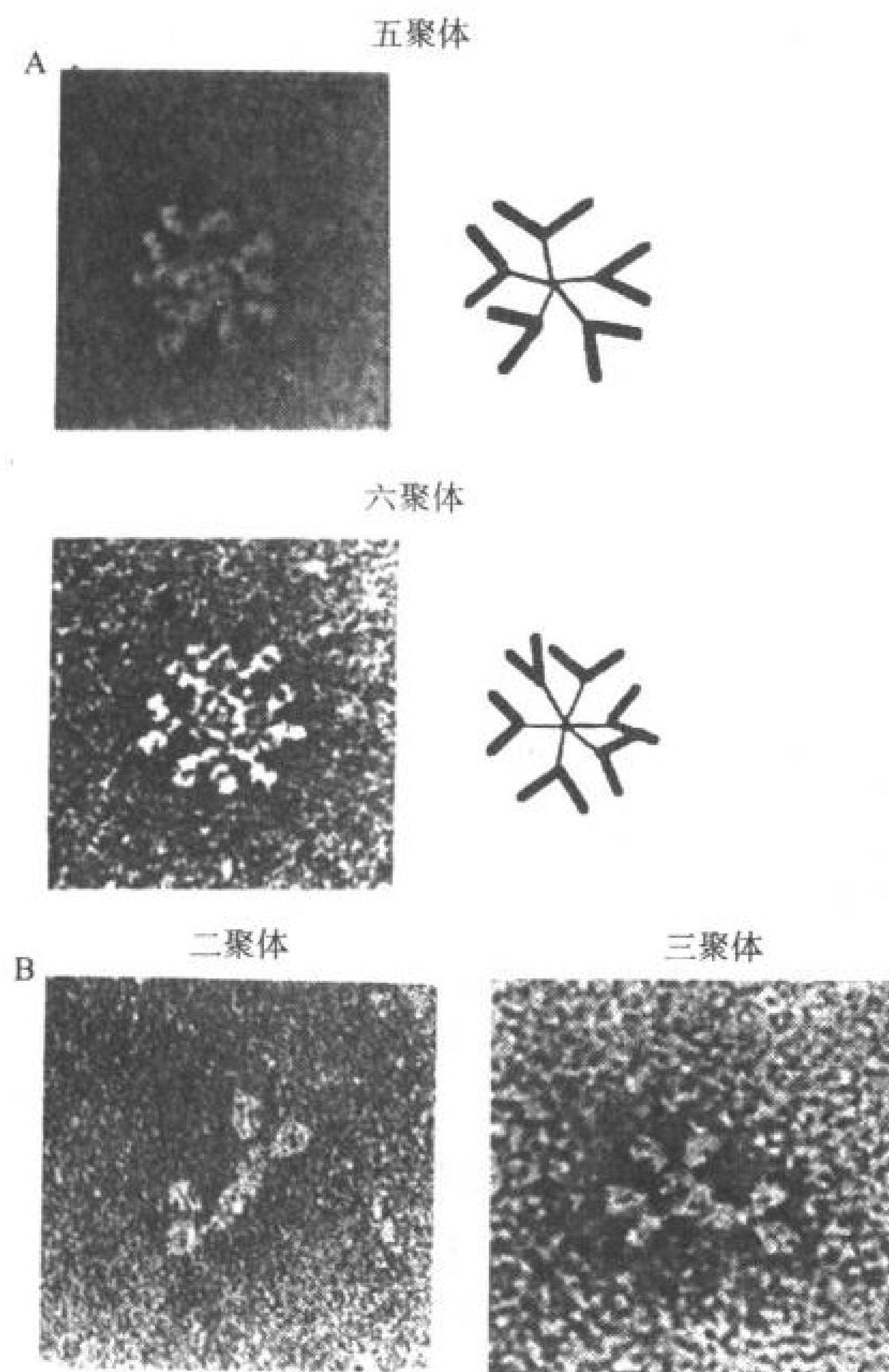


图 3.18 免疫球蛋白多聚体电子显微照片。A 为一鼠科 IgM 五聚体及其解释图(顶部)和一鼠科 IgM 六聚体及其图解(底部)。B 为人的 IgA 二聚体(顶部)和三聚体(底部)。所有放大倍数均为 600 000。(承蒙 K.H.Roux 的允许摘自参考文献[87a]。)

J 链是一个由 137 个氨基酸残基组成的多肽链，由能分泌 pIg 的浆细胞分泌产生，能与可形成多聚体的一个或多个免疫球蛋白单体上的半胱氨酸发生共价反应[88]。J 链本身是一个带有强负电荷的不稳定分子，具有 8 个半胱氨酸残基，能形成链间及链内二硫键[89]。人、鼠、兔，甚至两栖动物 J 链基因表现出的高度保守性提示 J 链结构在物种选择进化中保留下来的重要性。有报道证实脊椎动物 J 链与抗体蛋白无相关性，这也提示 J 链在发挥连接免疫球蛋白单位这一功能之前，可能还发挥过其他一些基本的蛋白质功能。无论怎样，尽管结构分析提示 J 链缺乏任何与免疫球蛋白同源的 DNA 序列，但它能折叠成类似免疫球蛋白 β 片层的结构[95]；在其链间半胱氨酸稳定自身结构的同时，另一些半胱氨酸残基则与一个或多个免疫球蛋白单体尾端的半胱氨酸形成二硫键，从而完成组装多聚免疫球蛋白[89]。尽管聚合过程的实际细节还有待进一步阐明，但现已清楚，18 个氨基酸残基组成的尾段及倒数第二个氨基酸残基——半胱氨酸残基在组装过程中是必需的[52,96]。

每个多聚体(二、三、四聚体等)都只含一个 J 链。J 链并不总是 pIgM 分子的组成部分，但对于 IgA 多聚体的形成是绝对必需的。J 链的分泌是被严格控制的[97]，并认为与 B 细胞的活性状态有关[98]。已证实，J 链

的高表达能导致正常 IgM 五聚体的产生;反之,低水平的 J 链则导致缺乏此蛋白质的 IgM 六聚体的生成分泌。有趣的是,这种六聚体 IgM 引起的补体溶细胞效力却比五聚体强 20 倍[99]。

第二种与多聚抗体分泌有关的辅助分子是从另一种属于 IgSF——pIg 受体(pIgR)——的蛋白质中获得的。它甚至不是由 B 细胞系分泌产生。分泌段(secretory component, SC)[也叫分泌片(secretory piece)]最初是作为一种与分泌状态的 IgA 和 IgM Fc 段紧密交联的多肽链而被发现的[100]。后来人们才认识到 SC 实际上是更大的跨膜蛋白 pIgR 的一部分[101]。pIgR 完整 cDNA 序列表明该蛋白包括七个结构域;前五个位于膜外,并与免疫球蛋白 V 区结构相似。第六个结构域包括一个跨膜区,并与 Ig 的 V 区部分同源,第七个则包含一个与 Ig 无关的 C 端膜内区[102]。前五个 pIgR 结构域实际上是作为原始分泌性免疫蛋白复合体的一部分。

58

pIgR 由呼吸、消化和泌尿系统管道的上皮细胞所合成,表达于基底膜表面,并与 pIgA 和 pIgM 以高亲和力的方式相互作用。已知 pIgR 其结合特异性取决于 N 端结构域,推想 J 链和 Fc $C_\alpha3/C_\mu4$ 因子均被此受体识别。有趣的是,虽 pIg/SC 结合的准确分子位点还未被确定,但至少在结构上已经证实,此位点保守性很高。研究表明,人类 SC 不仅可与人的 pIgA、pIgM 结合[103,104],还可结合一些哺乳动物的 IgM 和 IgA[105],甚至鸡 IgA[106]。这种交叉反应由 J 链而不是 Fc 区介导。

无论怎样,随着 pIgR 的第一结构域与 pIg 的 J 链 C 端的结合,第二结合点位于 pIgR 的第三、四、五结构域和抗体间,在 SC 和 $C_\alpha2/C_\mu3$ 间形成二硫键,这个共价键存在于 pIgR 第五结构域的 Cys467 和一个 IgA 亚单位重链 $C_\alpha2$ 结构域的 Csy311 位点间(一个 IgA 二聚体共有 4 个 $C_\alpha2$ 结构域)[107]。结合完成后,复合物通过笼状蛋白-有被小窝进行胞吞作用。然后,随着 pIgR 在第五、第六结构域间断裂,Poly-Ig/SC(现通称为分泌性免疫球蛋白)被胞吐至细胞外,释放分泌性免疫球蛋白到黏膜层表面[108]。现认为 SC 除了作为 pIgR 的 pIg 结合蛋白,还有保护粗糙黏膜上分泌性免疫球蛋白的重要作用。

在结构上,根据分泌性免疫球蛋白在 Ig 同源结构域概念上的扩展,多聚抗体意味着有很高的复杂性。根据具有少数保护核心残基和基本结构拓扑学单一 110 氨基酸结构域的基本原理,构造出一个复杂的分子例如五聚 IgM(包含 V 与 C 型 70 个不同的 Ig 结构域,但不包括 SC 参与构成的 Ig 结构域),一个分子可以识别 10 个(虽然空间限制使结合通常较少)完全相同的特异性抗原决定簇,也能参与行使一些其他重要生物学功能,这些将在下一节详尽叙述。

免疫球蛋白的功能

本章已提到了抗体的许多不同功能,比如介导与特异性决定簇相互作用的识别。然而,由于免疫球蛋白生物活性的多样性,所以最好将其作为单独的一部分来详细阐述免疫球蛋白功能的各个方面,并整合于生理学相关的上下文中。分泌性抗体能激活补体的经典途径和旁路途径(见第 29 章),穿过上皮细胞层在黏膜表面对病原体形成屏障(见第 27 章);穿过胎盘使胎儿和新生儿拥有母体体液免疫,通过巨噬细胞和粒细胞的调理过程诱导吞噬作用(见第 30、41 章);促进淋巴细胞和 NK 细胞引起的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(见第 17、31 章);促进嗜酸性粒细胞引起的脱粒作用(见第 32、35 章);另外还有直接结合和灭活外源抗体的作用(见第 39 章)。

以上还未涉及到表面免疫球蛋白引起的许多效应,如对激活作用的诱导(见第 7 章),分化(见第 6 章),无反应性(见第 20 章),甚至是 B 淋巴细胞的凋亡(见第 23 章),这将在本书的其他地方详述。B 记忆细胞的表面 Ig 具有作为一个具有识别、内在化、降解甚至将特异性抗原最终呈递给 T 细胞高亲和力受体的能力(见第 9 章),这说明 B 记忆细胞可作为一种抗原特异性抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC),这使它成为一个有独特高效率的细胞种类。而且,关于胞内抗体的研究文献呈上升趋势。这暗示着免疫球蛋白的新功能将被发现。

正如前面提到了免疫球蛋白的结构,通过对它分子结构的分析可确定其不同的功能特点,但也有例外。总的来说,抗体的不同功能可归因于其分子的不同结构域。在其可变区,需要考虑两个 V 区的结构,因它们

的基本功能是结合抗原。另外，还发现有某种超抗原与 V 区结合，在恒定区，由于 C_L 区没有效应特性，所以只剩下讨论其不同重链类型（IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE），它们的不同功能肯定也由其结构异质性决定的。

可变区的功能

两个 V 区（V_H/V_λ 或 V_H/V_κ）共同形成了抗体分子的可变区，提供靶向免疫应答效应臂的特异性。总的来说，两个 V 区都能提供高亲和力和特异性的结合位点。有许多单个 V 区结合抗原的例子，但当这两链协同作用时，抗体和抗原间的特异性紧密结合能力显著提高。

这里提到的高变区和决定簇互补区的概念是相关的。总的来说，V 区和抗原的结合位点绝大多数位于 CDR 的氨基酸残基和抗原的主要表位之间[109]。然而，最新研究表明在所谓的框架残基和抗原间存在着相当大的结合位点。戏剧性的是，在溶菌酶抗体的晶体上（彩图 3.6）特别显著，在那儿许多残基（特别在重链 FR3 区）直接与抗原[110]结合。CDR 提供所有结合残基的观点已超越了以往包括半抗原/抗半抗原系统的理论。只有当小分子有机半抗原成为“抗原”时，CDR 才能容易地提供能使抗原结合抗体的口袋（意指 V 区采用的特殊二聚体化的策略具有产生这种“口袋”的趋势）。对溶菌酶抗原抗体复合物，尤其是对溶菌酶残基 Gln121 的进一步观察有助于认清这种关系。Gln121 伸人 V_H 与 V_L 之间的缝隙，就像前面所描述的半抗原嵌入槽里一样。但另外缺少沟槽的残基似乎提供大量与抗体相作用的表面。实际上，与溶菌酶有反应性的其他抗体已经进一步证实这个面对面结合的概念[59]。也就是说，一般而言，大分子，例如抗体-蛋白复合物相互作用是两个蛋白质表面相互靠近。从这一点来讲，“口袋”的说法不太合适，因为一些非 CDR 残基（特别在 FR1 和 FR3）也经常参与其中。

正如所有的分子间作用一样，抗原抗体的相互作用只有当结合反应释放出足够的自由能，对热力学有利时才会发生。相互作用的亲和力与自由能变化（彩图 3.4）具有指数相关性。自由能是熵、焓变化之和，是熵升与焓降的有利结合。少数联合反应能够同时满足这两方面的要求，实际上一个组分的有利变化可补偿另一组分的不利变化。当抗体结合配体时，一个分子相对于其他分子的自由度就失去了（不利的熵变），大多数表位、骨架及互补位表面的侧链构型变化的稳定都会降低熵。因此为了刺激抗原结合抗体，必须尽量通过提高焓的减少量来抵消或减少熵的损失。在氨基酸水平上，这导致了对酪氨酸、色氨酸、丝氨酸和天冬酰胺结合位点的选择[111,112]。因为这些氨基酸残基具有较低的构型自由能，从而在抗原抗体结合中损失较少的熵。另外，这些残基的侧链助长了各种能引起焓变的化学作用，这对促进抗原抗体结合是必要的。

特别地，抗原抗体相互作用包括一系列的力，有电荷力（相反电荷间的吸引）、氢键（电负性原子之间共享的氢原子）、范德华力（相对的相邻极性原子团的分子周围电子云的波动）、疏水力（疏水基团对水分子的不利作用，并且趋向于聚集成团来排斥水分子）[113]。当然，盐桥及其他一些相互作用也参与某些特异性免疫球蛋白-配体复合物之中。同样值得重视的是，抗原抗体之间极少形成共价键。在能破坏这些键的溶剂如高盐溶液、有机溶液、尿素等存在下，抗原抗体复合物很容易分离开。

抗原抗体之间作用表面大对配体结合的热力学因素有利的，它们将尽可能地紧密结合。大的作用区域将排开更多的结合水，某种程度上可以减少蛋白质的熵降，获得一些疏水熵。然而令人惊奇的是，一些抗原抗体复合物实际上在它们的作用面上保留了水分子。然而它们常常不是干扰结合，而是通过结合于两表面的氢键促进抗原抗体结合[114]。比熵变更重要的是，对于抗原抗体大接触面，最主要的原动力是它们引起焓降的能力。这是通过表位与互补位同时发生各种化学作用介导的。

在典型抗原抗体结合区域之外的相互作用模型近来已经很普遍了，那就是超抗原。超抗原首次在“T 细胞的活化”部分提到过。某些分子（尤其是细菌产物）已被发现与许多不同的具有多种特异性的 T 细胞受体（T cell receptor, TCR）相互作用[115]。因此，超抗原的最初定义为能通过在结合槽以外结合特异性 V_β 链家族（TCR 重链）的 V 区来激活大量 T 细胞的完整蛋白质。典型 T 细胞超抗原同时能激活 T 细胞总数的 5% ~ 25%，普通抗原只能激活 0.01%。

近几年这个概念已经拓展到了 B 细胞[116,117]。SPA 是典型的 B 细胞超抗原。尽管已知 SPA 能结合特定

的免疫球蛋白 C 区——一直以来它作为一种有丝分裂原用于人体 B 淋巴细胞。现已表明 SPA 能结合特定的人 V_H3 编码的抗体[118,119]。它能与鼠免疫球蛋白 Fab 段结合,尤其是那些 J606 及 $S107V_H$ 基因家族编码的区域(与人 V_H3 属于同一宗族)。SPA 独立地结合 D、J_H 区及轻链可变区,尽管轻链影响了结合的延伸。由于其相互作用不依赖于抗体的特异性,以及 SPA 通常不阻断抗原的结合,故被认为是一种 B 细胞超抗原。SPA 还能传递激活信号激活具有 V_H3 受体的 B 细胞分化,并能刺激抗体产生。最近的研究证明[120],SPA 同时与 V_H 区的 FR1、CDR2 和 FR3 作用(图 3.19)。

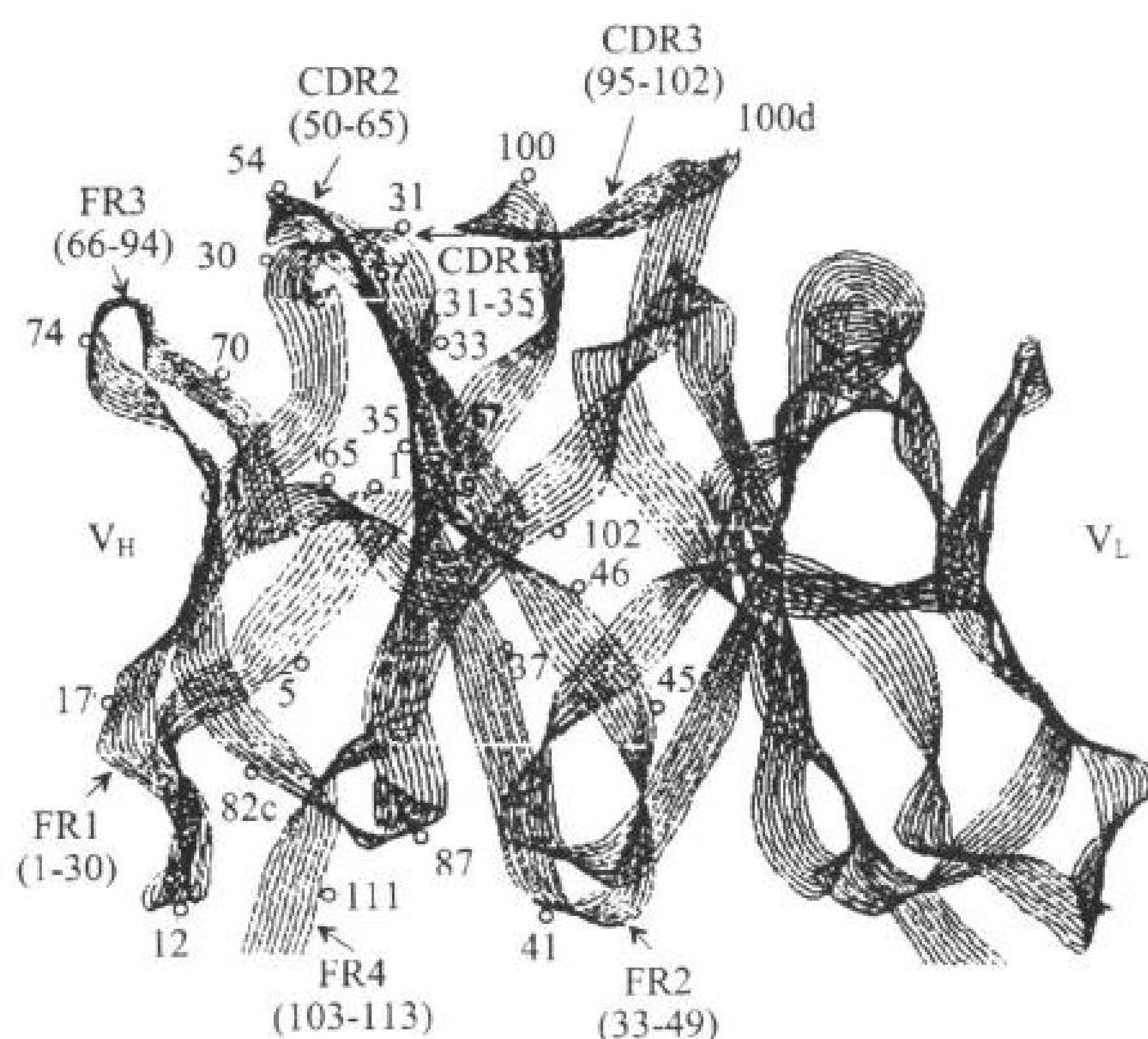


图 3.19　V_H3 抗体 KOL 的 Fv 片段的带形图。重链(左边)的 FR1、CDR2 和 FR3 亚结构域并列形成一溶剂暴露面,从而允许 SPA 结合。(经允许摘自参考文献[120]。)

也报道其他超抗原能够在普通抗原结合位点外的区域结合免疫球蛋白(基于它们的广谱特异性)。例如 HIV 表面抗原 gp120[121]像 SPA 一样结合 V_H3 编码的抗体以及与 TCR 相连的 CD4[122]。超抗原与抗体的结合同时需要 V_H 和 V_L 的参与(尽管轻链的独特性并不重要)。目前已知单个重链不结合 B 细胞超抗原,这表明轻链的作用在于可以改变抗体构象,若仅有 V_H 存在,将无法与 B 细胞超抗原结构。另外,有报道说,由某种风湿病因子的 IgM Fab 段与其自身抗原某种 IgG 的 Fc 段结合形成的晶体结构的观察中发现,抗体上的结合位点位于普通抗原结合位点的边缘,推测在抗体上还有更多可能的抗原结合位点的存在[123]。

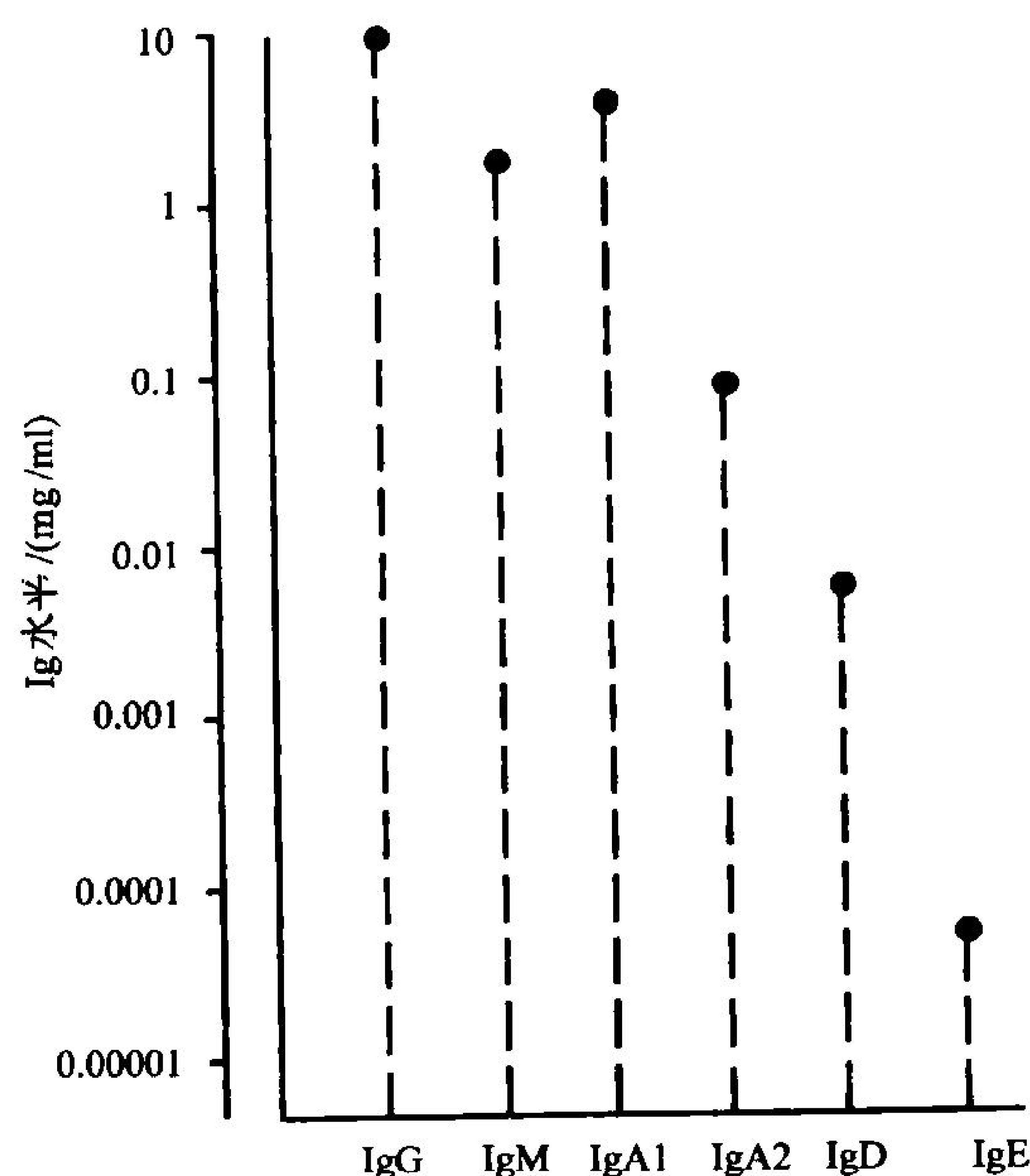


图 3.20　不同的人免疫球蛋白同种型的循环水平。注意图的对数标尺,另外人的两种 IgA 都表示出。(经允许摘自参考文献[123a]。)

恒定区功能

对于哺乳动物而言,它们都存在同样五大类抗体(尽管其亚型可能不尽相同),因此,有理由推测每一种类均有其特定功能。即使是只有一种免疫球蛋白类型甚至只有一条重链基因存在的低等生物,其抗体功能都各不相同。换句话说,鱼类、两栖动物、爬虫类存在比哺乳动物在基因水平上更少的免疫球蛋白同种型,但每个基因产生一种以上 C 区蛋白质。例如,鲨鱼体内既表达单体免疫球蛋白又同时表达多聚体免疫球蛋白;在鳐类、龟类和鸭类中有截短和全长的免疫球蛋白多肽版本;非洲蟾蜍免疫球蛋白既有糖基化形式也有无糖基化形式存在[51]。也就是说,在进化过程中不断产生新的抗体类型以满足不同生物学功能的需要。

总的说来,Fc 段(即恒定区)功能可概括为以下三点:①激活补体;②提供效应细胞(如吞噬细胞、嗜酸性粒细胞等)的结合位点;③作为分类的依据并提供转运位点。而且,不同类或亚类的抗体在生物体中还具有不同的稳定性。在以下几节中,我们将针对五种免疫球蛋白分子分别进行介绍(表 3.2,对人体五大类免疫球蛋白分子主要特性的小结;图 3.20,区别五类免疫球蛋白不同的血清浓度)。

表 3.2 人重链免疫球蛋白类别的物理、化学和生物学特性

特性	IgM	IgD	IgG	IgA	IgE
分子形式	五聚体,六聚体	单体	单体	单体,二聚体	单体
C 区结构域的数目	4	3	3	3	4
尾片	+	-	-	+	-
附属链	J 链, SC	无	无	J 链, SC	无
亚类	无	无	G1, G2, G3, G4	A1, A2	无
分子质量	950 kDa, 1150 kDa	175kDa	150 kDa	160 kDa, 400 kDa	190 kDa
碳水化合物含量/%	10	9	3	7	13
占总血清 Ig 的百分数	5% ~ 10%	0.3%	75% ~ 85%	7% ~ 15%	0.02%
成人平均血清水平/(mg/ml)	0.7 ~ 1.7	0.04	9.5 ~ 12.5	1.5 ~ 2.6	0.0003
合成速率/[mg/(kg·d)]	7	0.4	33	65	0.016
血清半衰期/d	5	3	23	6	2.5
抗体效价	10,12	2	2	2, 4	2
细菌溶解	-	?	+	+ + +	?
通过胎盘	-	-	+	-	-
结合肥大细胞/嗜碱性粒细胞	-	-	-	-	+
结合巨噬细胞	-	-	+	+	-
经典途径激活补体	+ +	-	+	-	-
旁路途径激活补体	-	-	+	A1 + , A2 -	-
其他生物学特性	初次抗体应答;分泌的免疫球蛋白	不明;可作为 B 细胞标志	再次免疫应答的标志	主要的分泌性免疫球蛋白	变应性和抗寄生虫应答

IgM

IgM 是在生物进化过程中出现最早的免疫球蛋白分子。它分五个亚类,因此也是免疫球蛋白分子中最具多样性的一种。μ 类重链是 B 细胞发育中最早出现的类型。IgM 是在初次免疫应答中产生的同种型。以表面免疫球蛋白形式出现的 IgM 是不成熟、成熟以及初始 B 细胞上的重要受体。IgM 占血清总免疫球蛋白含量的 5% ~ 10%,仅次于 IgA。它在黏膜免疫中发挥重要作用。IgM 分子最初被命名为巨球蛋白。据信,IgM 在所有的哺乳类物种中具有相似的功能。事实上,在大多数非哺乳类脊椎动物(除无颌鱼以外)[51]都测得有 IgM 样抗体(多聚的,含五个结构域的重链含有大量碳水化合物,在大多数 B 细胞上作为细胞表面受体)。无疑,IgM 的多聚体结构在进化过程中是高度保守的,可能由于多聚体结构相对单聚体而言具有更高的抗原亲合力。

61

IgM 的两种最普通的形式是膜结合型的单体和分泌型五聚体。细胞膜表面形成的 IgM 单体作为特异性的抗原受体有利于 B 细胞的活化,尽管活化信号实际上是由跨膜的辅助分子 Igα 和 Igβ 所转导的[124]。表面 IgM 单体的 $C_\mu 4$ 结构域是否参与与 α/β 异二聚体的相互作用还不清楚。但极可能其重要联系存在于细胞表面 IgM 特异性的跨膜区和胞质区[125]。膜结合形式的 IgM 对 B 细胞的发育有重要作用。在前 B 细胞阶段,μ 重链与轻链"替代"VpreB(类似于 V_L 结构域)和 λ5(一 C_λ 类似物)结合[126,127]。这一复合物通过辅助分子转导其他重链基因座等位排斥和随后轻链重排所必需的信号(见第 5 章)。最后,IgM 的重链与 λ 或 κ 轻链结合。

多聚 IgM(polymeric IgM, pIgM)也有其自身的功能特性。IgM 抗体是浆细胞受抗原诱导时最先分泌的;由于记忆 B 细胞并不大量分泌 IgM,所以 IgM 的升高表示近期有抗原出现。在较早的状况下,IgM 抗体普遍是低亲和力的,因为它们还未经体细胞突变和亲和力选择过程。虽然如此,pIgM 的高亲和力使它能有效地结合抗原。同样的,单一的多聚 IgM 分子能够有效地启动补体结合,尽管 C1q 对 C_μ 亲和力很低。IgM 的 C1q 结合位点已定位于 $C_\mu 3$ 结构域[128],在有糖链时,就表现出很强的结合力[129]。虽然 $C_\mu 3$ 结构域(和其结构类

似物)在进化上没有好的保守性,但来自不同种属的 IgM 和补体能够结合并保留活性,说明在脊椎动物的免疫球蛋白中补体识别位点可能相似。实际上,甚至爪蟾属 IgM 已经被证明能结合哺乳动物的补体组分[130]。已有研究表明 IgM 通过 $C_{\mu}1$ 结构域与 C3b 相互作用,由此可以使带有 IgM 的抗原抗体复合物间接介导胞吞作用。通过这种机制,C3b 一旦与其结合,则通过巨噬细胞上的补体受体提高其清除能力。

IgM 对抗原和补体的高亲合力在其充当第一线防御机制方面很重要。IgM 不仅是初次免疫应答的重要组成部分,而且像 IgA 一样,通过 pIgR 横过上皮,在黏膜表面作为重要的分泌性免疫球蛋白。由于在母乳中也存在分泌的免疫球蛋白,IgM 也能保护新生儿免受肠内病原菌感染直到婴儿的免疫系统功能完善。黏膜免疫中 IgM 应当是种系进化过程中最早出现的 Ig,因为在有些动物体内它是惟一的抗体。

IgD

血清中 IgD 的含量很低(不到血清 Ig 总量的 0.5%)。尽管 IgD 的合成也很少(比 IgM、IgG、IgA 的量都要少),但 IgD 对蛋白水解的降解作用有明显的易感性,这也许是血浆和体液中缺少 IgD 的原因。目前认为 IgD 有很长的铰链区连结 Fab 和 Fc 区,所以 IgD 的半衰期很短。无论是在免疫应答中或是下述 IgD^+ B 细胞受促有丝分裂原刺激的过程中,都无 IgD 分泌,尽管 IgD 免疫复合物的形成能激活旁路补体活化级联,但考虑到其低水平,此作用在体内可能不重要。实际上,IgD 结合于膜上或以可溶型存在时,其 δFc 段没有特定的已知功能。即使是这样,IgD 类抗体实际存在于所有哺乳动物,种间具有很高的保守性[131],存在 Fcδ 受体,所有这些提示它有某些不同的作用。两种独立起源的 IgD 基因敲除小鼠都不能令人信服地阐明其免疫功能。在一种品系中,把终止密码子插入到 $C_{\delta}3$ 区,记录到外周 B 细胞总数只有很微小的减少。在另一株,在其 $C_{\delta}1$ 外显子内插入一段核苷酸序列造成 $C_{\delta}3$ 移码突变,可以证明在 T 细胞依赖的抗原反应过程中,亲和力成熟延迟[133]。

尽管我们不知道 IgD 是否有特定功能,但它与 IgM 一起,是很多 B 细胞的主要表面组分。因为 μ 链和 δ 链的 C 区基因都转录为同样的初始 mRNA,只有经过不同的剪切才能产生 IgM 或 IgD。这种特殊的基因组结构促进了它们的共同表达,这在其他同种型的 Ig 中是不可能的(见第 5 章)。成熟的初始 IgM^+/IgD^+ B 细胞从骨髓迁移出[134],在人或鼠的机体中占外周 B 细胞约 90%。与其类似的是,次级淋巴类器官的初始滤泡内的 B 细胞表达 IgM 和 IgD,但当它们成熟变为记忆细胞时,通常不表达 IgD[135,136]。奇怪的是,对脾脏 IgM^+/IgD^+ B 细胞的研究表明 IgD 在胞膜表面的表达要比 IgM 水平高 10 倍[137]。使人迷惑的是 δmRNA 水平低于 μmRNA,而 IgD(至少在血清中)易于被蛋白酶解。如此高水平的 IgD 表达可能是由于 IgD 并不需要靠与其他蛋白质结合形成复合物以运输至细胞表面。这也是 IgD 与其他类型免疫球蛋白的区别[138]。IgD 在细胞表面高水平的表达及其内在的柔性[139],有可能使它在早期的抗原应答中起着作用[123a,140]。

62

除了 IgD 与 IgM 同时表达外,IgM 和 IgD 作为 B 细胞抗原受体还有许多共同的特征。同 IgM 一样,IgD 是通过非共价键与作为 BCR 信号传递成分 Igα/Igβ 异二聚体相结合的[138]。因此毫不奇怪,抗原与 BCR IgM 或 IgD 的结合能够独立地介导 B 细胞的活化、缺失及无反应性[141],而通过 IgM 或 IgD BCR 传递的信号是相同的,尽管它们之间有不同的动力学特征(见第 7 章)。特别有报道认为通过表面 IgD 传递的信号能够诱导 APC 功能[142],上调协同受体 B7-1 和 B7-2[143],诱导 IgM、IgG1、IgG2、IgG3 和 IgA 的型别转换[144],增加 IgE 分泌[145]。这些发现的生物学意义现在还不明确。事实上,有报道描述了一类新的生发中心 IgD^+ B 细胞。有证据表明在其 V 区有高达 80 个不同的体细胞突变位点,说明关于表达 IgD 的细胞以及 IgD 这种蛋白质,我们知之甚少。

IgG

IgG 是存在于血液、淋巴、腹腔液及脑脊液中的主要免疫球蛋白,其占血清总免疫球蛋白的 75% 以上,并且其合成速度很快[30mg/(kg·d)以上,仅次于 IgA]。高亲和力 IgG 的存在是再次体液免疫应答的一个标志。电泳时,IgG 蛋白移至血清球蛋白的 γ 区,因而早期也称 IgG 为 γ 球蛋白。实际上,IgG 有四个抗体亚类,这些

亚类各自显著的特点列于表3.3。IgG亚类对特异的免疫应答的选择并不是随机的，在鼠的系统中，抗糖类特异性主要存在于IgG3，抗蛋白质的存在于IgG1，抗病毒的则主要为IgG2a[148,149]。在人类中，抗多聚糖免疫原的活性主要取决于IgG1和IgG2，而抗蛋白质和抗病毒γ抗体有IgG1、IgG3和IgG4[150]。另外有一个现象就是特异的IgG亚类缺失所引起的临床综合征，现在知道为特异性的免疫缺陷（见第43章）。

表3.3 人类IgG亚类的特性比较

特性	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
二硫键	2	4	5～15	2
分子质量	146kDa	146kDa	165kDa	146kDa
占血清的百分比	34%～87%	5%～56%	0.5%～12%	7%～12%
成人平均血清水平/(mg/ml)	5.0±2.6	3±2.5	0.6±0.55	0.9±0.25
通过FcγR结合巨噬细胞	+	−	+	+
通过胎盘	+	+ +	+	+ +
抗体依赖的细胞毒作用	+ + +	+	+ + +	+
经典途径补体的激活	+ + +	+ +	+ + + +	+
替代途径补体的激活	+	+	+	+ + +

根据参考文献[140]改编。

IgG最主要的特点可能是其具有激活补体经典途径的能力。虽然四个亚类都能启动经典途径，但所起作用的程度不同（IgG3 > IgG1 > IgG2 > IgG4）[150,151]。要弄清不同的IgG亚类与补体不同成分的相互作用的方式具有一定的难度，不同观点的报道又使其更显复杂。关于C1q不能与IgG2或IgG4抗体结合或很难与其结合的实验结果令人困惑，因为IgG2与IgG4都能够激活经典途径。类似的，尽管Fcγ3与C1q有高亲和力[152]，但IgG1在加强补体介导的细胞溶解中有更高的效率。当将C1q结合位点移至铰链区附近的$C_{\gamma}2$结构域的C端时，研究者发现，IgG亚型激活补体的能力有所不同，可能与抗体特殊铰链所引起的空间结构的自由度的不同或其中发生缺失有关[155,156]。由于这个原因，γ3 C区的长铰链解释了IgG3与C1q的亲和力较IgG1高的原因。然而铰链缺失[157]或铰链互换[158]的试验所得出的数据与铰链是激活补体的关键因素相矛盾。因此，推测$C_{\gamma}2$结构域的正确糖基化是结合补体的必要元件。

补体在IgG1和IgG3之间（与对C1q的亲和力矛盾）所引起的细胞溶解功效不同的解释则更为错综复杂。这反映出IgG1和IgG3的C1q位点存在其他的不同之处，能影响补体的活化。也可能这种差异来源于这些分子在$C_{\gamma}1$结构域中另一个独立的位点，如IgM结合活化的C3b，并保护其不被抑制。这些独立的位点也可以解释IgG2与IgG4激活经典途径的能力，尽管它不能与C1q结合。最后，有研究表明IgG4能够有效地募集并活化旁路补体级联，借此可与其他三种亚型相区别。

IgG抗体与免疫系统的效应武器相联系的另一方式是通过Fcγ受体（FcγR）。有许多不同的IgG FcR存在（属于一类特殊的IgSF），每种亚型都有它们自己的外型，与不同的IgG亚类结合时的亲和力，不同类型的细胞的表达方式以及生物学功能均不同[159]。在免疫细胞类型中，IgG主要与巨噬、多核、淋巴细胞（包括B细胞）结合引发各种功能反应，如胞吞[160]。抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用[161]，二者最终都导致结合抗原的解构。特别是引发单核细胞抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用（ADCC）能力的次序是IgG1，IgG3 > IgG2，IgG4[152,162]。通过Fcγ受体传导的信号还调节淋巴细胞功能，其途径是上调或下调抗原呈递、细胞因子释放、细胞因子受体的表达和（或）其敏感程度，甚至免疫球蛋白的分泌。可溶性Fcγ受体也能结合IgG，尽管其意义还不明了[163]。最后，IgG Fc受体还能介导妊娠期内母体抗体穿过胎盘[164]，这就为发育中的、尚不具其他形式特异性体液免疫能力的胎儿提供了高亲和力的、能激活补体而产生效应的免疫球蛋白。IgG是血清中最稳定的Ig分子（半衰期超过3周），这使它的作用更显重要，在出生后也如此。

不同Fcγ受体结合四种IgG亚类时，其特异性接触残基是不同的。尽管一般以为Fcγ结合IgG的位点很

大程度上是重复的，但涉及到相互作用的精确元件存在微细差别。通过对此的研究，普遍认为该结合位点包括两部分，一为铰链区 C 端，另为涉及 C1q 结合的 $C_\gamma 2$ 区[86,165]，因为四种 IgG 同种型在此部位结构很不相同，所以这就能解释不同 IgG 与不同 Fcγ 受体结合的事实。

IgA

IgA 是外分泌体液（如唾液、黏液、汗液、胃液、泪液）中最主要的免疫球蛋白，也是初乳及乳汁中主要的免疫球蛋白，因此在维持婴儿消化道对病原体免疫功能中起作用[167]，分泌型 IgA 为含有 J 链及 SC 分泌片段的多聚物。此外 IgA（更多以单体存在）同时也是血清 Ig 的重要成分，大约占血清总 Ig 的 10%到 15%。IgA 的合成速度约是 IgG 的两倍，因此一天内 IgA 的生成量超过其他免疫球蛋白的总和。主要的 IgA 为分泌形式，多数 IgA 由位于小肠黏膜下层的 IgA 浆细胞分泌合成，故分泌型 IgA 分布于皮肤以外的一切“表层”。IgA 被认为是机体防御病原通过黏膜层的第一道防线，IgA 在黏膜免疫中的作用在天然体液免疫缺陷（IgA 缺乏）的患者有最突出的表现，这种情况下个体对通过黏膜屏障的侵袭易感，且呈反复感染的临床特征。

血清型和分泌型 IgA 由不同类群 B 细胞合成：呼吸道、泌尿道、胃肠道、哺乳组织的特定部位的浆细胞产生分泌型 IgA；血清型 IgA 则由骨髓、淋巴结、脾内浆细胞合成入血。尽管存在这种合成的区域性现象，但无论黏膜或其他系统与抗原接触后均可触发两种 IgA 的合成[168]。

在人类中，IgA 两个亚类（IgA1 和 IgA2）存在表达上的差异，于是二者的生物功能不同。IgA1 基本以单体形式存在，因此它是血浆中主要的 IgA 类型（图 3.20），骨髓中 90%具合成 IgA 能力的浆细胞合成 IgA1[169]。相反的，IgA2 呈多聚体，值得注意的是 IgA1 与 IgA2 结构上的差异主要位于铰链区，IgA1 铰链区有大量糖链（保护其免遭蛋白酶水解），IgA2 亚型中此铰链区结构大部分缺失，这可能是对细菌 IgA1 特异性蛋白水解酶的进化反应[170]。于是抵抗大多数水解酶的 IgA1 在血清中存在，以延长其寿命，而抗蛋白酶解的 IgA2 亚型则主要存在于接触细菌频率高的部位。

IgA 不引发明显的炎症反应，一般认为主要通过隔离、结合以及交联病原体从而阻止病原体穿过上皮并促进黏膜对病原体的清除[123,140]。需要注意黏膜发生的炎性反应对其屏障作用是不利的，因为组织损伤将破坏黏膜的完整性。同时，IgA 有经旁路途径激活补体的能力（仅 IgA1 有），还能调整巨噬、单核、中性粒细胞对抗原的胞吞作用（通过 Fcα 受体），因此提供了 IgA 免疫复合物在黏膜累积引起吞噬、处理的机制。一般认为与血清型 IgA 相比，Fcα 受体对分泌型 IgA 有较更高的亲和力，但令人费解的是 IgA 被识别的部位并不是二者存在差异的 J 链和分泌片段，不同于其他 IgSF 的 Fc 受体结合 C_H2 区近铰链区部位的位点，Fcα 受体结合 $C_\alpha 2$ 与 $C_\alpha 3$ 的交界部位，该部位亦为 SPA 结合位点[66]。最后，IgA 经 FcαR 可介导嗜酸性粒细胞脱颗粒，这与抗蠕虫免疫有关。因许多寄生虫通过黏膜途径进到寄生部位，因此抗蠕虫免疫也应是 IgA 的生物学功能之一。

IgE

IgE 是血清中含量最少的免疫球蛋白，其合成速度比其他 Ig 慢 25～2000 倍。其半衰期最短，亦不能通过经典或旁路途径激活补体，且不能对抗原产生调理作用。但 IgE 通过复杂的效应机制有效地弥补了这些不足。IgE 的基本功能是作为嗜碱性粒细胞和肥大细胞的特异性抗原受体，而这些细胞是炎症反应强有力的介导者。

产生 IgE 的浆细胞主要位于皮肤和肺，从 IgE 由这些 B 细胞释放起，循环 IgE 很快被粒细胞上对 IgE 有高亲和力的 Fcε 受体（FcεR Ⅰ；$K_D = 10^{-10}$ mol/L）结合，并在数周至数月的时间内稳固结合于其上。细胞一旦被许多这样的抗原特异性受体致敏（与抗原特异性 B 细胞不同，许多细胞可以通过其表面的 FCεR Ⅰ 受体获取 IgE，虽然不同的细胞其亲和力不同），多价抗原即可交联 IgE，间接交联 FcεR Ⅰ 分子，最终导致肥大细胞、嗜碱性粒细胞释放多种炎性物质和趋化因子。肥大与嗜碱性粒细胞分泌的颗粒功能极强，能迅速引起效应，包括黏液分泌、咳嗽、喷嚏、呕吐、腹泻和炎症等。这些反应在抗蠕虫免疫中起了重要作用（见第 38 章），同时

64

也导致对机体引起不利结果的过敏(见第35章)。在这些特应性的个体可观察到IgE分泌量增高及肥大、嗜碱性粒细胞表面IgE的量亦增加,这些可以解释IgE介导的不适当的炎症反应。

其他如朗格汉斯细胞和嗜碱性粒细胞也会表达高亲和力的Fcε受体[172, 173],但这些细胞上有该受体的理由尚不十分明了。此外,CD23表面抗原也表现出低亲和力IgE受体活性(FcεRⅡ)。CD23一般表达在单核和某些滤泡状B细胞表面,事实上单核细胞还可被诱导分泌可溶性的FcεRⅡ[174],其生理意义不清楚。考虑到循环IgE的量很少,并且此受体亲和力低,以及已知CD23可与CD11/CD18结合,IgE在体内是否是这些受体的重要配体值得怀疑。

像pIgR和一些FcγR一样,FcεRⅠ也是免疫球蛋白超家族的成员,IgE与其高亲和力受体的作用是最独特的Ig-FcR配体-受体对作用。用肽合成法合成IgE与FcεRⅠ结合的抑制物证实,IgE上的受体识别位点是位于$C_\varepsilon2$与$C_\varepsilon3$间的一个含76个氨基酸的多肽[175],后来确定位于$C_\varepsilon3$区。该区与IgG部的$C_\gamma2$区有同源性。与IgG的受体结合位点依赖铰链区序列不同,IgE的$C_\varepsilon2$铰链结构域在其结合反应中作用不大[176]。

免疫球蛋白超家族

免疫球蛋白超家族的演化

自抗体的序列和结构分析解释了免疫球蛋白基本构成后[7, 177],明显可以看出,生物演化过程使得其他重要分子亦具有与Ig分子同源的结构域。MHC基因序列、TCR和pIgR等一系列细胞膜表面的免疫系统蛋白质均具有V区和C区的类似结构域,同时,我们发现许多细胞黏附分子(cell adhesion molecule, CAM)包括有关轴突生长分子也含有免疫球蛋白样的结构域[178],这便很快证实了大量基因中公认有免疫球蛋白折叠类似序列的存在[2, 3, 179]。总体上看,这些基因牵涉到分子识别和细胞黏附。由于其包括一些多基因家族(V_H、V_L、TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、MHCⅠ、MHCⅡ、唾液酸黏附素、CAM),免疫球蛋白超家族(immunoglobulin superfamily, IgSF)指包含有一个或多个免疫球蛋白分子同源结构域的一大类基因。

至今,免疫球蛋白超家族包含了100个以上的基因,并且这些基因跨越了种系界线。异种动物体内已鉴定许多IgSF,鸡、斑马鱼、被囊动物、蝗虫、乌贼、海绵动物等都有IgSF成员,而且报道原核生物中具有与Ig分子同源的结构蛋白[180, 181],提示Ig原型的出现甚至早于真核生物进化。新近发现的一些分子具有新的功能(在蛋白质水平上),扩展了IgSF成员的功能范围。例如,人们认为大部分含有免疫球蛋白同源结构域的蛋白质作为细胞表面分子或分泌蛋白,主要参与介导识别与黏附功能。新近发现的一类细胞内肌蛋白[肌联蛋白(titin), telokin等]亦属IgSF,提示Ig折叠结构同样适于此类功能。

IgSF的演化一直是一个具有探索意义的研究主题,它牵涉到脊椎动物免疫系统及器官形成的一般过程。由于绝大多数IgSF成员具有黏附特性,人们推测最初的IgSF分子只是具有单一免疫球蛋白结构域、与黏附有关的胞外蛋白。而充实这一理论的权威说法是免疫球蛋白分子折叠紧密的β桶状结构具有极强的稳固性,因此在恶劣胞外环境下可增强其稳定性。更能支持这一理论假说的是基于许多IgSF蛋白可参与同型和异型分子间相互作用的事实,提示该结构可能扮演黏附分子的角色。

有一些证据提示,在真核生物进化早期,IgSF蛋白质就促进细胞聚集。例如,在交配时,酿酒酵母利用IgSF糖蛋白介导细胞接触[182]。IgSF可能亦代表了一个种系发生时器官最初形成的例子,如网柄菌属的黏菌(介于单细胞与多细胞真核生物之间)在环境缺乏营养时,采用一种非常类似Ig结构域的蛋白质介导多细胞间的聚集[183, 184]。

最后,我们向前追溯,可以发现原始IgSF糖蛋白可能介导了无脊椎动物群体的同种识别的最早进化事件[185]。有两个极好的例子支持这一观点。例如,腔肠动物水螅(*Hydra vulgaris*)和多孔动物海绵(*Geodia cydonium*),它们的受体酪氨酸蛋白激酶通过其胞外免疫球蛋白分子样结构域介导识别。根据这些证据可以合理地推断,脊椎动物免疫系统复杂的细胞和分子间相互作用(由IgSF中的许多成员介导)实际上可能是原

始的同种相互识别作用的外延。由此看出，脊椎动物移植耐受-排斥反应和集群非脊椎动物融合-排斥现象的相似性可能会有新的意义（见第 18 章）。

65

无论其起源怎样，免疫球蛋白结构域显然已被证实是生物进化的适应性产物，服从突变及多样性原理。首先，免疫球蛋白结构域即使它的一级结构发生显著改变，其三级结构仍能得到很好的保持[186, 187]。这在连接β折叠股的环中表现尤其明显，可使其功能分化产生多样性。其次，绝大多数免疫球蛋白结构域为独立的外显子编码，使它们可通过相对简单的基因事件实现复制。这种“一个外显子一个结构域”的定则也有助于剪接多样性的发生，进一步促进了不同 IgSF 分子的表达。许多 IgSF 外显子有一个惯例的剪接过程，一个外显子的 3′端也总是第一个密码子的起始部位，而下一外显子单元的 5′端是密码子的第二位点。因此，IgSF 的免疫球蛋白同源结构域可以很容易地发生串联扩增（美丽线虫肌蛋白 twitchin 含 26 个免疫球蛋白结构域），并产生具有多样性的新基因。最后，免疫球蛋白结构域趋于形成同源的或是异源二聚体的特性（免疫球蛋白也具此特性），是使蛋白质成为受体/配体的基础。不同的分子组合进一步增加了它们的多样性。

尽管基因超家族与生俱来有如此的复杂性和功能上的多样性，很早人们就认识到，基于序列和结构分析，IgSF 蛋白可再细分为不同的组，各组按免疫球蛋白折叠时β折叠股的排列进行区分，其图示见图 3.21。值得注意的是，V 组结构域由四折叠股片层结构和五折叠股片层结构组成，C 组结构域具有四折叠股及三折叠股片层结构，这些可通过位于 A、B 及 E 折叠股中 D 折叠股的位置（C1 组）或 G、F 及 C 折叠股形成的片层（C2 组）来识别。然而，IgSF 肌蛋白 telokin 的研究揭示了一个新的组，其结构域特征介于 V 和 C1 之间[188]。而且，许多 IgSF 黏附分子和细胞表面受体都似乎更接近此类（I 组），而非其初始划分的类型。不管怎样，IgSF 包含了惊人的具有结构相似性、但功能配置极广的蛋白质集合。除了 Ig 分子具有此类分子显要的特征外，许多 IgSF 蛋白在体液免疫中发挥重要作用，它们的结构与功能特性将在下节作简要概述。

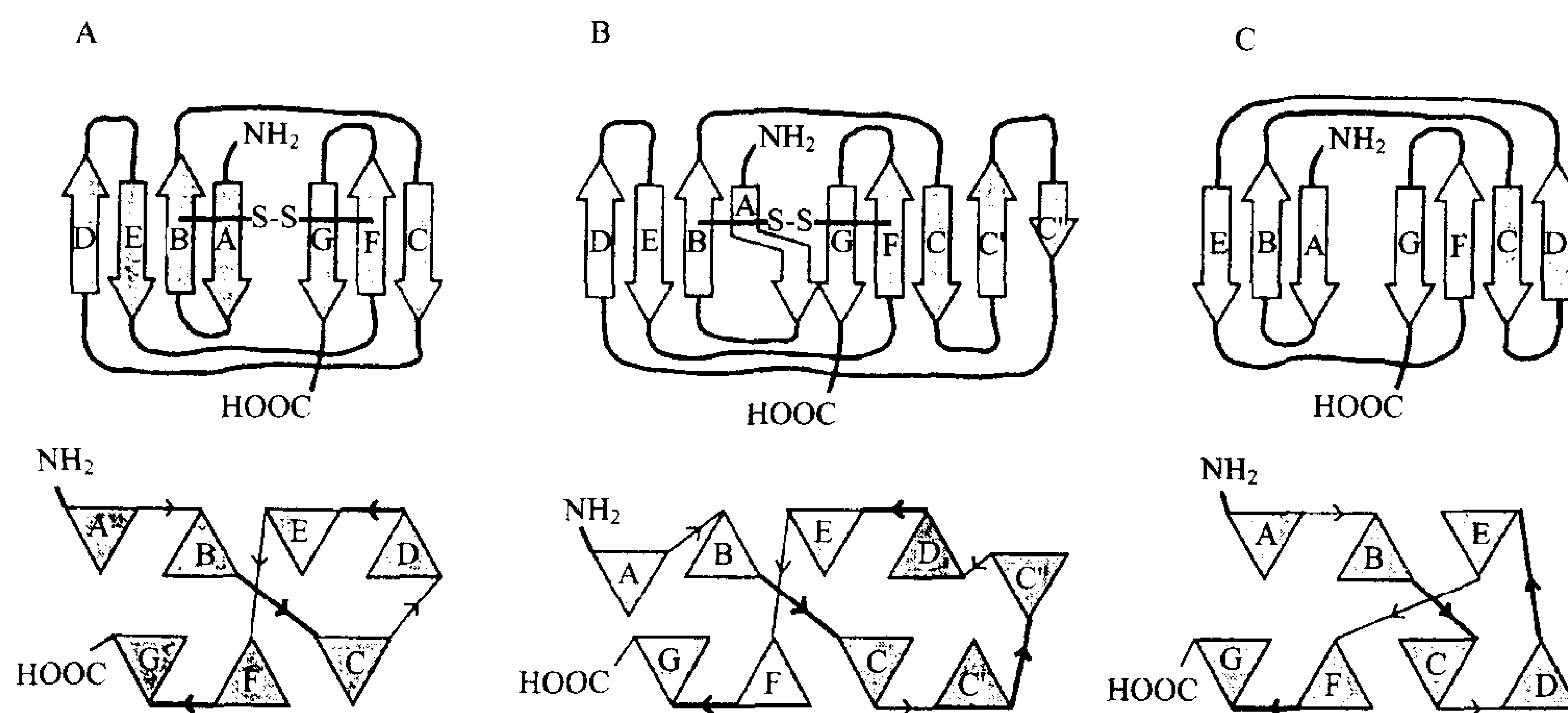


图 3.21　不同免疫球蛋白结构域类型的拓扑学。图 A、B、C 分别代表 C1 组、V 组和 C2 组。在图的上半部分，β折叠股用宽箭头表示，它们之间的插入环用细线表示。注意 V 型区有五折叠股和四折叠股面，而 C1 和 C2 型结构域有四折叠股面和三折叠股面。C 区样结构以它们的 D 折叠股的位置进行区分。在图的下半部分表示的是不同的β折叠股的端点视图。代表β折叠股的方向垂直于纸面向上，三角形（顶点向下）代表垂直于纸面向下。粗线代表位于免疫球蛋白折叠上方的连接环；细线代表结构域下方的连接环。（经允许引自参考文献[4]。）

FcR 受体分子

FcR 允许抗体与特异性和非特异性免疫细胞相互作用。这样，FcR 将体液免疫和细胞免疫联系起来，并且从整体上看，将获得性免疫和先天免疫联系起来。这种联系在免疫生物学功能中起两种至关重要的作用：

第一，FcR 使抗体可作为“标记物”，介导特定的细胞效应事件，如吞噬作用和 ADCC；第二，不同的 FcR 利用抗体作为整体免疫调节的介导者，它们传递的信号可诱导细胞因子分泌、细胞表面受体表达和广泛的分化事件改变[189]。

三大类分子可以结合 Fc 段：糖基转移酶（通过识别抗体上的寡糖衍生物而介导结合）、凝集素样分子和属于 IgSF 的受体。真正的 FcR 识别抗体蛋白质决定簇而非糖基决定簇，因此所有的 FcR 均属 IgSF。它们包括 FcγRⅠ、FcγRⅡ、FcγRⅢ复合物（CD64、CD32、CD16），FcεRⅠ和 FcαR（CD89）以及 pIgR。但低亲和力 IgE 受体（CD23/FcεRⅡ）不在此列所有淋巴系来源的细胞表达 FcR，虽然其种类及同种型特异性可存在很大差异[190,191]。各类 Ig 的受体被认为是具有生物学活性的，但人 FcμR 和 FcδR 尚未被克隆。至今为止，FcγR 和 FcεRⅠ是这些分子中了解得最为清楚。

FcγR 分子

IgG Fc 段的受体分为三型，FcγRⅠ（CD64）是高亲和力受体。它是惟一可以结合 IgG 单体的受体，它包括三个胞外免疫球蛋白样结构域。FcγRⅡ（CD32）和 FcγRⅢ（CD16）是低亲和力受体，它可与免疫复合物中的 IgG 相结合。它们都只有两个胞外的 Ig 同源结构域，图 3.22 为 FcγRⅠ、FcγRⅡ和 FcγRⅢ复合物以及 FcεRⅠ、Fcα R 复合物的结构示意图。

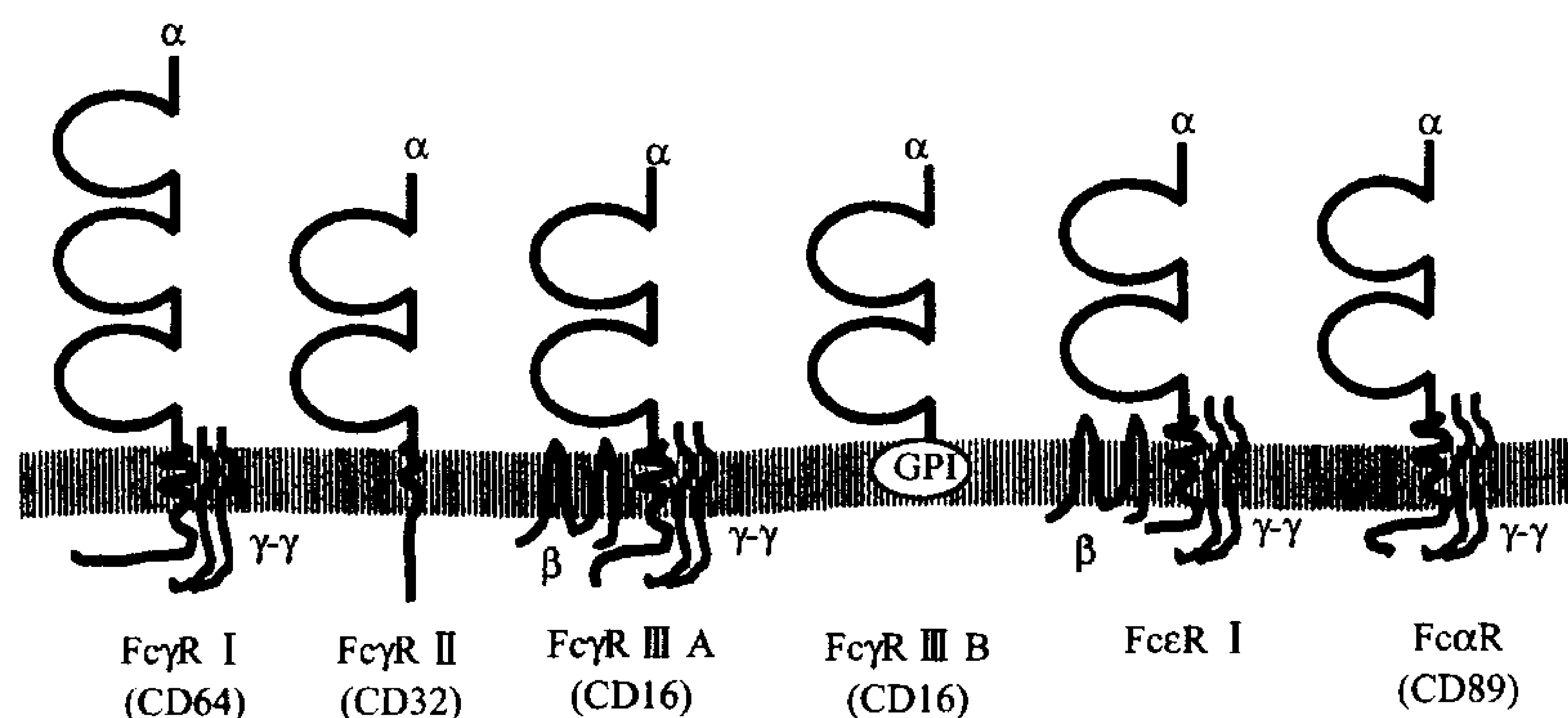


图 3.22 属于 IgSF 的人免疫球蛋白 Fc 受体结构示意图。每个圆形弧线代表一个 Ig 结构域。α 链是受体复合物特异性识别和结合的位点；β 和 γ 链介导受体的信号转导。

FcγRⅠ是 70kDa 糖蛋白，它在单核细胞和巨噬细胞表面低水平表达，IFNγ 可上调其表达，也可诱导中性粒细胞进行表达。其中 FcγRⅠ与 IgG1 和 IgG3 的亲和力最高（$K_D = 10^{-8}$mol/L），是与 IgG4 亲和力的 10 倍，不与 IgG2 结合。以功能上看，交联 FcγRⅠ分子的似乎可增强 ADCC 和细胞吞噬作用。由于 IFNγ 增强表达 FcγR 细胞的 ADCC 和吞噬活性，因此该受体在此类活动中起重要作用。

正像其他细胞表面的免疫球蛋白一样，FcγRⅠ需辅助蛋白传递信号。事实上，这是大多数 FcR（除 FcγRⅡ以外）的一个基本特征，IgSF 抗原受体（BCR 和 TCR）与 IgSF 间接抗原受体（FcR，它通过抗体桥联抗原和 FcR）均有此现象[193]。其中，FcγRⅠ的真正的信号转导分子是 12γ-kDa、称为 γ 亚单位或 FcRγ 的跨膜蛋白。这个术语可能会令人十分迷惑，因为 FcRγ 的“γ”不是 FcγR 复合物的一部分（γ 类免疫球蛋白的受体），而更像是多分子复合物中一个独立的亚单位。不管怎样，对 FcγRⅠ复合物而言，α 亚单位就是 IgSF 蛋白 FcγRⅠ；γ 亚单位就是 FcRγ，它们靠二硫键连接形成同型二聚体。使命名更加复杂的是：FcRγ 也是其他 FcR 复合物的一个亚基，包括 FcγRⅢA 和一些非 FcγR、如 FcεRⅠ和 FcαR 等复合物。有趣的是，FcRγ 与 TCR 相关蛋白 CD3ζ 高度同源。事实上，CD3ζ 虽然不能与 FcRγ 聚合形成异二聚体，但它可以在 FcγRⅢA 受体复合物中代替 FcRγ 作为信号转导亚单位[194]。

FcγRⅡ(CD32)的情况则更复杂，FcγRⅡ由 FcγRⅡA、FcγRⅡB 和 FcγRⅡC 三种不同但同源的基因表达产生。更复杂的情况是至少有两种 FcγRⅡ基因可通过不同的剪接方式产生多种亚型[195]。FcγRⅡA 基因有两种转录产物：FcγRⅡa1 和 FcγRⅡa2。FcγRⅡa1 有一个跨膜区；FcγRⅡa2 则没有。FcγRⅡB 可产生三种亚型：FcγRⅡb1、FcγRⅡb2 和 FcγRⅡb3，它们通过不同的剪切及变化的多聚腺苷酸化过程而产生。总的来说，FcγRⅡ变异体是表达最广泛的 FcγR，存在于 B 淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、巨核细胞和血小板上。其中，巨核细胞只表达 FcγRⅡA 的两种亚型。B 淋巴细胞表达 FcγRⅡB(b1 和 b2 转录物)和 FcγRⅡC，而骨髓单核来源的细胞至少表达三种基因中的一种或多种亚型[195]。

从功能的角度看，由于它们在多种细胞上表达，FcγRⅡ的信号可产生不同的效应。当细胞表面 FcγRⅡ与 IgG 免疫复合物结合后(所有亚类，但其结合的亲和力不同)，它们可导致几种生物学变化，最重要的是自然发生的免疫调节。通常，这些信号可下调由 IgG、IgA、IgE 介导的多种细胞类型的活化，包括单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞、朗格汉斯细胞和树突细胞。它们也可介导血小板在免疫复合物所在部位凝聚，并反馈抑制 B 细胞的增殖和抗体产生，特别是当两受体相互聚合时，FcγRⅡB 可抑制 BCR 介导的激活信号[196]。所有的 IgSF FcR 均可介导这种抑制信号。作为没有辅助蛋白的单链受体，FcγRⅡ能自己转导信号。这是通过其胞质区的免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif，ITIM)来实现的[197]。

67

IgG 与 FcγRⅡ的特异性结合位点首先被定位于受体 C 端的第二个胞外 Ig 样结构域[198]，这一位点由残基 Asn154-Ser161 构成，亦包括结构域 2 伸出的 Ser109-Val116 和 Phe129-Thr135，同时与结构域 1 也有接触[199]。总之，FcγRⅡ完整的胞外区三维模型提示：两个 Ig 样环共同位于接触界面上，参与 IgG 的识别。

最后介绍的一种 IgG FcR 是 FcγRⅢ(CD16)。FcγRⅢ有两个胞外 Ig 样结构域，它由两个不同的基因编码，它们在不同细胞类型上选择性表达。在单核细胞、巨噬细胞、NK 细胞表面上表达的是一种被称为 FcγRⅢA的跨膜糖蛋白。FcγRⅢA 受体蛋白有三个附属蛋白与之组成复合体，其中之一是分子质量为 30kDa 的 β 亚单位，它有四个跨膜区，它也是 FcεRⅠ复合物的组分之一[200]。其余与 FcγRⅢA 结合的附属蛋白是 FcRγ 亚基同型二聚体。如前所述，它亦是 FcγRⅠ、FcεRⅠ和 FcαR 受体复合物的组成部分。另一个 FcγRⅢ基因编码表达糖基磷脂酰肌醇连接的蛋白质，称为 FcγRⅢB。它只在中性粒细胞上表达。该基因缺陷的个体可发生阵发性夜间血红蛋白尿，其临床表现以反复发生感染和免疫复合物清除率降低为特征[201]。FcγRⅢ以低亲和力与免疫复合物中的 IgG1 和 IgG3 结合。FcγRⅢ介导的生物学活性包括 ADCC、吞噬作用及将内在化的抗原抗体复合物转运到抗原呈递途径。

FcεRⅠ和 FcαR 分子

高亲和力的 IgE 受体——FcεRⅠ是第一个、也是了解得最清楚的 FcR[202]。FcεRⅠ是一种跨膜蛋白，它有两个胞外 Ig 同源结构域，并像其他受体分子一样，与具有信号传递能力的辅助蛋白相结合。它在肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和朗格汉斯细胞有表达，也可在异位的单核细胞上表达[203]。与 FcεRⅠ结合的蛋白质与 FcγRⅢA 相同，为一个 β 亚单位和一个 FcRγ 蛋白同型二聚体。用基因打靶实验测定 FcεRⅠ复合物中三种蛋白质的功能已有了可靠的结论：受体 IgSF 链纯合子缺失的动物对过敏性反应有预期的抵抗力[204]；破坏 FcRγ 引起相同的表现，另外还可造成 ADCC 和吞噬作用缺陷，这与 γ 亚单位参与其他复合体功能的认识相吻合[205, 206]。

FcεRⅠ的 Fcε 结合位点被定位于胞外第二个 Ig 结构域的三段区间内[198]。应指出的是血清 IgE 在不依赖抗原的条件下与受体高亲和力结合(而其他类型抗体必须先结合抗原后才能被相应的 FcR 识别)，这样多价免疫原就可直接结合效应细胞，无须免疫球蛋白变构或免疫复合物形成。这使表达的 FcRⅠ的细胞具有快速反应的能力。交联受体引起的特殊生物学效应已在前面 IgE 的功能一节中讲述了。

最后提到的 IgSF 的 FcR 是 IgA 受体。FcαR(CD89)是最晚发现的，也是 Ig 受体中了解得最少的。它包括两个胞外 Ig 结构域，表达在单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞上。已鉴定出几种亚型：细胞表面有 FcαRa 型和 FcαRb 型，其中 FcαRa 有胞内区和跨膜区，FcαRb 则缺少这些区，因此呈分泌性表达或结合

在细胞膜表面(通过一种未知的机制);还有一个亚型,它甚至缺少近膜的 Ig 样结构域。从结构上看,FcαR 与 FcγR 分子同源。像 FcγRⅠ、FcγRⅢ和 FcεRⅠ一样,IgA 受体复合物含有 FcRγ 同型二聚体作为信号转导分子。FcαR 上的配体结合位点至今尚未确定。IgA 的结合位点及其与 FcαR 结合后介导的效应已在 IgA 功能一节中详细介绍。

共同受体 CD4 和 CD8 分子

体内具有抗原识别功能的并非仅限于免疫球蛋白,T 细胞表面的抗原受体(TCR)可以识别抗原肽。在免疫应答事件中,这些抗原性片段由 MHC 分子呈递给 T 细胞。TCR 识别抗原-MHC 是最基本的生物学相互作用,它启动、维持并介导细胞免疫。TCR 结合 MHC-抗原肽复合物也是募集许多体液免疫应答中所需的 T 细胞辅助的关键事件。当然,这些关键性相互作用的细节和介导的效应超过了本章的讨论范围(见第 8、9、10、11、12、13 章)。许多 IgSF 蛋白在免疫应答过程中发挥着重要作用,其中 TCR 共同受体——CD4 和 CD8 是具有这种功能关键性分子,在此值得一提。

CD4 和 CD8 是非免疫球蛋白 IgSF 的成员中较早知道其结构信息的分子[207]。它们在 T 细胞表面表达,以低亲和力与 MHC 非多态性位点结合,参与 TCR/MHC 的相互作用[208, 209](图 3.23)。根据它们对抗原的不同反应,T 细胞可大致分为两个功能亚群:辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞。这两种 T 细胞类型均利用相同的 TCR 基因成分编码它们的特异性抗原受体。一般而言(也有许多例外),T 细胞的功能效应与其结合的 MHC 类型相关联,表达在全身绝大多数细胞表面的 MHCⅠ分子特异性地启动细胞毒性 T 细胞反应;而表达在有限细胞类型上、主要是在专职抗原呈递细胞上的 MHCⅡ分子则触发辅助性 T 细胞功能。CD8 分子与 MHCⅠ类蛋白结合;而 CD4 与Ⅱ类分子结合。因此,这两种分子在决定 T 细胞介导的应答类型中发挥着重要的作用。

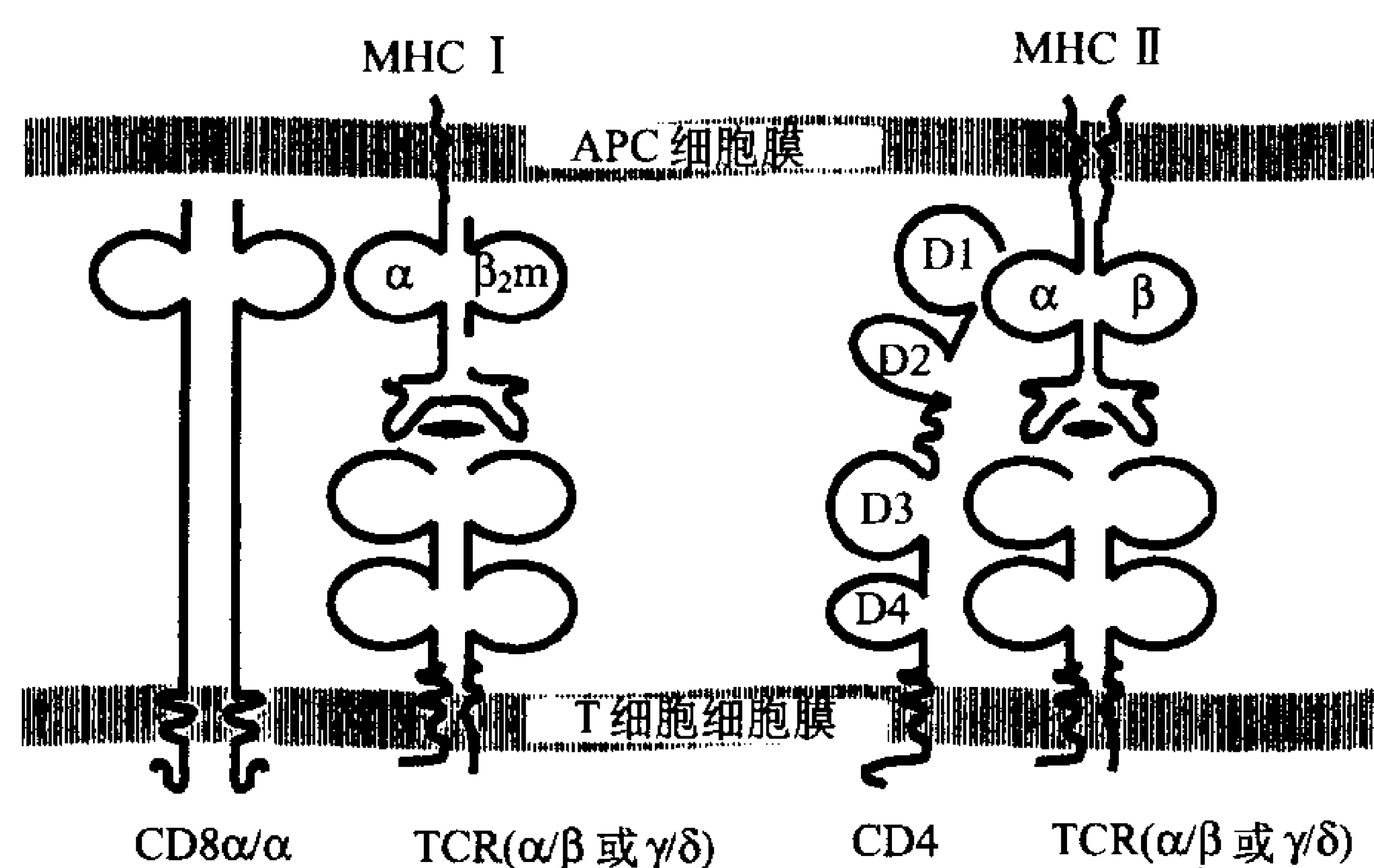


图 3.23 CD8 和 CD4 共同受体分子简图。图中在一个细胞膜上显示了两种 TCR/MHC 共同受体复合物,虽然 T 细胞主要只表达 CD4 和 CD8 分子的其中一种。圆弧线代表 Ig 结构域,灰色的卵圆形图标代表 MHC 分子呈递的肽。图中只画了 CD8α/α 同型二聚体,CD8α/β 异型二聚体以相同的模式与 MHCⅠ类分子结合。模式图显示的是最简单的化学结合模式;在文中还述及其他可能的相互作用模式。

68

CD8 和 CD4 是均属糖蛋白,它们当中的绝大部分具有跨膜段和一个很短的胞质尾[210]。两个分子的胞质尾均可与 Src 样酪氨酸激酶 $p56^{lck}$ 相互作用[211],后者被认为是胸腺分化[212]和 T 细胞活化[213]时信号传导所必需的。与这一观点相吻合的是,与 TCR 单独交联相比,和 TCR 一起共同交联 CD4 和 CD8 可显著增强 T 细胞活化(见第 12、13 章)。另外,通过作为黏附分子,CD4 和 CD8 还可增强 TCR 和 MHC 结合的亲合力,也就是两细胞膜上的分子间的黏附能力。总之,人们估计这些功能可以使抗原识别能力比基线水平(只有 TCR 与 MHC-抗原单独相互作用时)增强 100 倍。但是,无论它们的生物学功能如何相似,在结构上 CD4 和 CD8 仍有明显的差别。许多细节已经得到揭示,已进行了许多 X 射线晶体衍射解析,使人们对它们的显著特征有一个全面的了解。

CD8

CD8 是一个由二硫键连结的二聚物,并可进一步聚集成双体[214]。一个由两个 CD8α 亚基组成的同型二

聚体是首先得到鉴定的同Ⅰ型[215, 216]，随后又发现了 CD8α/β 异型二聚体。这两种蛋白质均为 34kDa，并在 N 端 Ig 样结构域有同源性(虽然仅约 17%相同)。由 50(α)和 30(β)个氨基酸残基组成的延伸的铰链区，其后有单一跨膜段和一个短的胞质尾。当 CD8β 链缺乏与 p56[lck] 相互作用的必需氨基酸残基时，异型二聚体仍可通过 α 亚基与之结合。而且，几个实验结果显示，异型二聚体具有同型二聚体所没有的特殊功能[217]。包括胸腺选择[218]、MHC 的亲和力增强[219]、p56[lck] 的活化[220] 都要归因于 CD8β 链介导(上皮内)。另外，不同细胞对不同亚型的表达也存在着差异：胸腺细胞和外周血 T 细胞为 $CD8\alpha/\beta^+$，$TCR\gamma/\delta^+$ 的上皮内淋巴细胞主要是表达 $CD8\alpha/\alpha^+$；$TCR\alpha/\beta^+$ 细胞两种分子均可表达。最后对 CD8β 的研究发现，两种基因编码此蛋白质[221]，此外还有不同的剪接形式，这就导致有七种不同的 CD8β 亚型表达[222]。其中四种缺乏跨膜段，提示一些 CD8β 亚型可能是分泌形式的。总之，这种蛋白亚基以及由之组成的 CD8 异型二聚体是仍需阐明的一个活跃的研究领域。

通过晶体衍射技术的进步，对于 CD8α/α 同型二聚体结构已了解得较为清楚。首先 CD8α/α N 端结构域得到了解析[223]。这一研究揭示，113 个氨基酸的片段形成的 V 型 Ig 结构域，由四折叠股和五折叠股构成片层结构(图 3.24)。与其 V 区类型拓扑学结构相吻合的是，CD8α 结构域通过其五折叠股面相互作用并二聚化，就与 Ig 的 V 结构域相同(彩图 3.7)。此外，CD8α 和 Ig 的 V 区在结构上有两个重要差异：首先 α 亚单位的“C′-C″”环对应于 CDR_2 是外展的(图 3.24d 右侧)；其次，已证实在 β 折叠股 B 和 F 之间有结构域内二硫键存在。此外 C 折叠股中的不成对半胱氨酸也是保守的。在啮齿类动物中，CD8α 亚单位中的该位点与 B 链 Cys 残基形成结构域内二硫键[224]。α 亚基的铰链区大部分的糖基化(通过 *O*-连接)，并因此拥有较为外展的结构[223,225~227]。这些延长的特殊结构十分重要，因为延伸的结构使 N 端 Ig 结构域与 MHC Ⅰ分子能很好地相互作用。

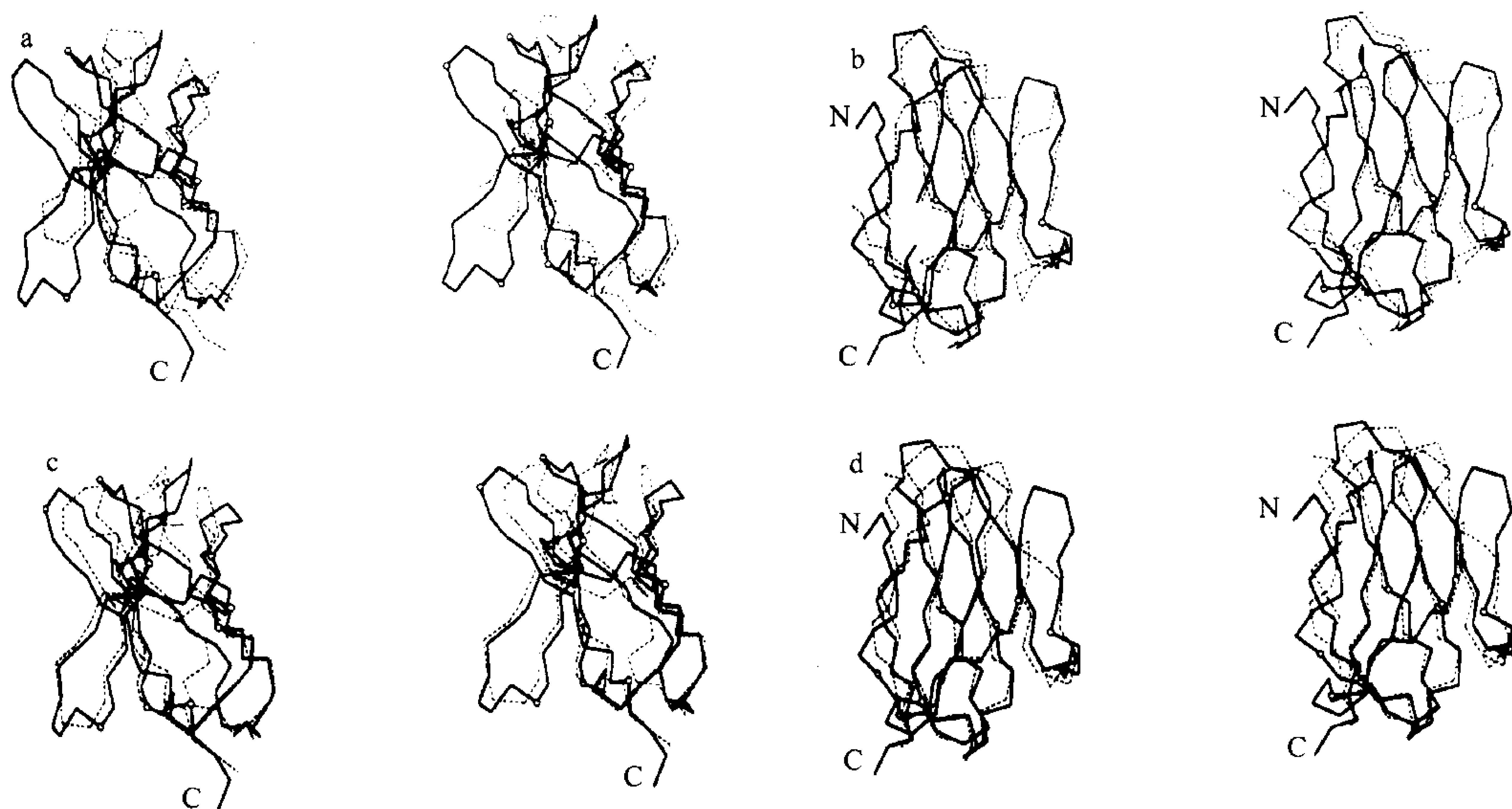


图 3.24 CD8α、CD4 结构域 1 和抗体 REI 的 V_L 之 α 碳链立体结构示意图。在(a，b)中，CD8α 的 Ig 结构域(实线)叠加在 CD4 结构域 1 之上(虚线)。在(c，d)中，V_L(虚线)叠加于 CD8α 上。a 和 c 部分是侧面图(平行于二聚化表面)；b 和 d 垂直于 β 片层面。所有的图中，CDR 环位于图的上方。比较 a 和 c 部分可以看出，与 CD8α 和 V_L 相比 CD4 D1 中的 F-G(左上)和 C-C′(左下)有环的截短。比较 N 端(b 和 d 的右边)，可以看到 CD4 D1 的 A 折叠股变短。CDR2 样的 C′-C″环(b 和 d 的右上)显示这一片段在 CD8α 和 CD4 D1 中较 V_L 有所延长。(经允许引自参考文献[207]。)

另一个有关 CD8 结构特征的重要方面是它与 MHC Ⅰ分子的相互作用。早先关于这一问题的实验提示，CD8α 的 CDR 样环参与识别 MHC Ⅰ α3 结构域的一个负电荷区[228]，前面提到的晶体结构证明该环是 CD8 上惟一的正电荷区，因而支持这一结论。突变体晶体衍射研究也提示，CD8α 的折叠股 A 和 B 上有与 MHC Ⅰ类分子 α2 区的接触位点[229]。每个 CD8 同型二聚体(CD8α/α)有两条 α 链，每条链上折叠股 A 和 B 并不在亚基聚

合面上，提示每个 CD8α/α 与 MHC Ⅰ分子的结合可能是二价的（如一个 CD8α/α 结合两个 MHC Ⅰ分子）。已发表的 CD8α/α 和 MHC Ⅰ-肽复合物晶体结构似乎可以回答这一问题[230]。同型二聚体不但与 α3 结构域，而且可与 α2 结构域相结合，甚至可以与 MHC Ⅰ中的 β_2 微球蛋白相结合。值得注意的是 MHC Ⅰ类分子 α3 内的负电荷区与两个 CD8α 的 CDR 状环的相互作用与抗原-抗体复合物的结合相似。但由于结合这样的环状结构需要 CD8 亚基，似乎 CD8/MHC Ⅰ相互作用的摩尔比应为 1:1。因为受体复合物成簇对产生胞内信号转导很重要，这是一个至关重要的信息，CD4 分子也如此。

CD4

69 CD4 分子有四个胞外 Ig 同源结构域（D1 ~ D4），以 55kDa 的单体位于细胞表面[231]。研究证实，HIV 借助 CD4 分子攻击 T 细胞。故此之后，CD4 即成为研究热点。像免疫球蛋白一样，蛋白酶解 CD4 可产生稳定的裂解片段。这些片段反过来成为最早的晶体结构解析底物。N 端（为远离 T 细胞的一端）D1、D2 部分是 CD4 结构最先被认识的部分，因为它们被证实含有 HIV 结合位点。这些研究[232, 233]描述了 N 端 V 型 Ig 样结构域（D1）和一个小的、不寻常的 Ig 样结构域（D2）。这两个结构域除具有前述免疫球蛋白超家族结构的共同点外，又各具特点。

D1 是由四折叠股和五折叠股肽链形成的结构域（彩图 3.7），含有结构域内二硫键及其的相应残基。与 Ig V 区相比，D1 有以下不同之处。第一，D1 区 A 折叠股已缺失（图 3.24），连接 β 折叠股的 C-C′及 F-G 的环长度也缩短了。由于 Ig（和 CD8）这些位点上的氨基酸参与形成二聚化，这被认为与 CD4 只以单体形式存在有关。此外，像 CD8 一样，D1 区中的 CDR2 一同源性 C′-C″环相对 Ig 分子也有所伸展（比较图 3.24b，图 3.24d）。实际上此扩展片段中的苯丙氨酸残基已被证实是 CD4 与 HIVgp120 结合的重要位点。第二，与 Ig 分子内 V、C 结构域间的连结肘肽相比，D1 与 D2 结构域连结紧密，D1 的 G 折叠股与 D2 的 A 折叠股在空间位置上相毗邻，故形成大量纵向连结，相互间移动度小。

D2 结构域更加特殊，仅由七个 β 折叠股组成，在 Ig 结构域中相对较小，类似 IgC 型结构域（彩图3.7）。其自身缺乏核心氨基酸，不能形成典型的结构域内胱氨酸，因而无法形成 β 片层间二硫键，而只是形成 β 片层内二硫键。尽管如此，D2 仍与其余 Ig 结构域相互作用，形成了免疫球蛋白样折叠。D2 的一级结构可变性较大，三级结构却较保守，此即为具有 IgSF 类分子特点的有力证据之一。

经 X 射线晶体衍射分析，D3、D4 的结构也已经明了[234, 235]。D3、D4 结构域的构象与 D1、D2 极为相似（彩图 3.7），支持了 CD4 是由含两个结构域的前体复制而来的假说[236]。D3 是一较大 V 型结构域，与 D1 具同源性；D4 结构域较小，与 D2 具同源性。D3 的 G 折叠股和 D4 的 A 折叠股也因紧密相邻而产生较大作用，严格限制了 D3、D4 间的可移动度。然而 D3 与 D1 的不同之处在于：第一，D3 缺乏结构域内的二硫键，内部相互

70 作用较弱。第二，D3 上的 C-C′环和 F-G 环相对于 IgV 区并未缩短，因此这些环不可介导 D3 结构域的二聚化（不像在 Ig Fv 段）。由于其 F 折叠股上 N 端糖基化位点的阻碍作用，D3 仍不能参与二聚化作用。最近，经晶体学研究发现，重组的可溶性 CD4 分子不仅具有上述 CD4 分子的结构特点，而且其 D1D2、D3D4 间的连结区为铰链区。这使得 CD4 分子奇迹般的像 Ig 分子一样可以“弯曲”[237]。

有关 CD4 与 MHC Ⅱ型蛋白分子间作用方式的研究表明：CD4 借助其 D1、D2 结构域内不同的氨基酸残基与 MHC Ⅱ型蛋白分子的 α2 与 β2 结构域相作用（图 3.23）。CD4 与 MHC Ⅱ类分子的作用位点较多，如 D1 结构域的两个侧面，D2 结构域的 F-G 环[238 ~ 240]。CD4 分子与 MHC Ⅱ型蛋白分子相互作用的化学计量学问题曾一度成为研究的热点。基于 D1 结构域两侧面均具有与 MHC Ⅱ类分子结合的可能性，有人认为一个 CD4 分子可与两个 MHC Ⅱ类分子结合，此所谓二价体复合物（bivalent complex）。此后通过对 MHC Ⅱ类分子的晶体衍射分析，发现它以二聚体的形式存在。奇怪的是：对可溶性的人 CD4 分子 D1 ~ D4 结构域的晶体衍射分析发现[237]，CD4 的 D4 结构域之间有同型二聚体的结合。这暗示着 CD4 二聚体的相对面可与两个独立的 MHC Ⅱ类分子结合。可见，起初的二价体复合物设想不无道理[241]。也就是说，除了这种二聚体间的相互作用，CD4 分子还有多个位点参与 MHC Ⅱ类分子的结合，并且这些氨基酸位点主要存在于 D1 结构域内。

结论

以上仅仅粗略地介绍了 IgSF 中各成员的结构和功能，若此皮毛内容能将读者领入 IgSF 这一美妙绝伦的、作为进化工具与分子主题的大千世界，编者将甚感欣慰。目前，随着科研的不断发展，展示在人们面前的不仅是抗体蛋白结构、功能上的多样性，各种令人意想不到的研究结果也层出不穷。TCR 及 MHC IgSF 蛋白在免疫应答中占有重要地位，有关研究也已硕果累累。CD4、CD8 等其他分子相对 Ig 而言，虽然并非为长期研究的重点，但它们仍然具有潜在的可研究性，并有望以此增强我们对 IgSF 结构多样性及其功能的更进一步了解。关于抗原识别受体和信号传导分子，如 Igα、Igβ、CD3 亚单位以及其他诸如 B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、CTLA-4、CD28 等分子的研究，虽然只是刚刚起步，但都极有可能成为将来研究的热点。总之，IgSF 的相关研究尚不成熟，不过只要我们留心免疫学领域抑或生物学领域，就不断会有 IgSF 的新成员带给我们如珍海拾贝的愉悦。

（杨　劲 译　周镜然 校）

参考文献

1. Dreyer WJ, Bennett JC. The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965;54:864–869.
2. Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily—domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 1988;6:381–405.
3. Hunkapiller T, Hood L. Diversity of the immunoglobulin superfamily. *Adv Immunol* 1989;44:1–63.
4. Brummendorf T, Rathjen FG. Cell adhesion molecules I: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile* 1995;2:963–1108.
5. Hilschmann N, Craig LC. Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965;53:1403–1409.
6. Silverton EW, Navia MA, Davis DR. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5140–5144.

6a. Carayannopoulous L, Capra JD. Immunoglobulins: structure and function. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*, 3rd ed. New York: Raven Press Ltd., 1993.

7. Hill RL, Delaney R, Fellows RE, Lebovitz HE. The evolutionary origins of the immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966;56:1762–1769.
8. Edmundson AB, Ely KR, Abola EE, Schiffer M, Panagiotopoulos N. Rotational allomerism and divergent evolution of domains in Ig light chains. *Biochemistry* 1975;14:3953–3961.
9. Davies DR, Padlan EA, Segal DM. Immunoglobulin structures at high resolution. *Annu Rev Biochem* 1975;44:639–667.
10. Amzel LM, Poljak RJ. Three dimensional structure of immunoglobulins. *Annu Rev Biochem* 1979;48:961–997.
11. Deisenhofer J, Colman PM, Epp O, Huber R. Crystallographic structural studies of a human Fc fragment. *Hoppe-Zeylers Z Physiol Chem* 1976;357:1421–1434.
12. Deisenhofer J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9 and 2.8 Å resolution. *Biochemistry* 1981;20:2361–2370.
13. Federation of American Society for Experimental Biology Symposium, "Two Genes, One Polypeptide Chain." *Fed Proc* 1972;31:176–209.
14. Porter RR. Separation and isolation of fractions of rabbit γ-globulin containing the antibody and antigenic combining sites. *Nature* 1958;182:670–671.
15. Nisonoff A, Wissler FC, Lipman LN. Properties of the major component of a peptic digest of rabbit antibody. *Science* 1960;132:1770–1771.
16. Palmer JL, Nisonoff A. Dissociation of rabbit γ-globulin into half-molecules after reduction of one labile disulfide bond. *Biochemistry* 1964;3:863–869.
17. Fleischman JB, Porter RR, Press E. The arrangement of the peptide chains in γ-globulin. *Biochem J* 1963;88:220–228.
18. Nisonoff A, Thorbecke GJ. Immunochemistry. *Annu Rev Biochem* 1964;33:355–402.
19. Natvig JB, Kunkel HG. Human Igs: classes, subclasses, genetic variants, and idiotypes. *Adv Immunol* 1973;16:1–59.
20. Nisonoff A, Hopper JE, Spring SB. *The antibody molecule*. New York: Academic Press, 1975.
21. Kindt TJ, Capra JD. *The antibody enigma*. New York: Plenum Press, 1984.
22. Hasemann CA, Capra JD. Immunoglobulins: structure and function. In: Paul WE, ed. *Fundamental immunology*, 2nd ed. New York: Raven Press, 1989.
23. Weir DM, ed. *Handbook of experimental immunology*, vol. 3, *Genetics & molecular immunology*. London: Blackwell Scientific Press, 1986.
24. Williams RC Jr, Kunkel HG, Capra JD. Antigenic specificities related to the cold agglutinin activity of gamma M globulins. *Science* 1968;161:379–381.

24a. Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. *Sequences of proteins of immunological interest*. Washington, DC: US Department of Health and Human Services, 1991.

25. Wu TT, Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence-Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 1970;132:211–250.
26. Capra JD, Kehoe JM. Hypervariable regions, idiotypy, and the antibody-combining site. *Adv Immunol* 1975;20:1–40.
27. Colman PM. Structure of antibody-antigen complexes: implications for immune recognition. *Adv Immunol* 1988;43:99–132.
28. Chothia C, Novotny J, Bruccoleri R, Karplus M. Domain association in immunoglobulin molecules. *J Mol Biol* 1985;186:651–663.

28a. Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 1987;196:901–917.

29. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575–581.
30. Meier JT, Lewis SM. P nucleotides in V(D)J recombination: a fine-structure analysis. *Mol Cell Biol* 1993;13(2):1078–1092.
31. Meek KD, Hasemann CA, Capra JD. Novel rearrangements at the immunoglobulin D locus. *J Exp Med* 1989:170:39–57.
32. McKean D, Huppi K, Bell M, Staudt L, Gerhard W, Weigert M. Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3180–3184.
33. Neuberger MS, Milstein C. Somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol.* 1995;7:248–254.
34. Croce CM, Shander M, Martinis J, et al. Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3416–3419.
35. Malcolm S, Barton P, Murphy C, Ferguson-Smith MA, Bentley DL, Rabbitts TH. Localization of human immunoglobulin kappa light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by *in situ* hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79(16):4957–4961.
36. Erickson J, Martinis J, Croce CM. Assignment of the genes for human λ immunoglobulin chains to chromosome 22. *Nature* 1981;294:173–175.
37. D'Eustachio P, Pravtcheva D, Marcu K, Ruddle FH. Chromosomal location of the structural gene cluster encoding murine immunoglobulin heavy chains. *J Exp Med* 1980;151(6):1545–1550.
38. Swan D, D'Eustachio P, Leinwand L, Seidman J, Keithley D, Ruddle FH. Chromosomal assignment of the mouse κ light chain genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76(6):2735–2739.
39. D'Eustachio P, Bothwell AL, Takaro TK, Baltimore D, Ruddle FH. Chromosomal location of structural genes encoding murine Ig λ light chains. *J Exp Med* 1981;153(4):793–800.
40. Schroeder HW Jr, Hillson JL, Perlmutter RM. Structure and evolution of mammalian V_H families: *Int Immunol* 1990;2:41–50.
41. Kirkham PM, Mortari F, Newton JA, Schroeder HW Jr. Immunoglobulin V_H clan and family identity predicts variable domain structure and may influence antigen binding. *EMBO J* 1992;11:603–609.
42. Kirkham PM, Schroeder HW Jr. Antibody structure and the evolution of immunoglobulin V gene segments. *Semin Immunol* 1994;6:347–360.
43. Kirkham PM, Elgavish RA, Schroeder HW Jr. Structure and evolution of mammalian V_κ families. *J Immunol* 1993;150:151a.
44. Kroemer G, Helmberg A, Bernot A, Auffray C, Kofler R. Evolutionary relationship between human and mouse immunoglobulin κ light chain variable region genes. *Immunogenetics* 1991;33:42–49.
45. Pascual V, Capra JD. Human immunoglobulin heavy-chain variable region genes: organization, polymorphism, and expression. *Adv Immunol* 1991;49:1–74.
46. Zachau HG. The immunoglobulin κ locus—or—*what has been learned from* looking closely at one-tenth of a percent of the human genome. *Gene* 1993;135:

167–173.
47. Frippiat JP, Williams SC, Tomlinson IM, et al. Organization of the human immunoglobulin λ light-chain locus on chromosome 22q11.2. *Hum Mol Genet* 1995;4(6):983–991.
48. Cook GP, Tomlinson IM, Walter G, et al. A map of the human immunoglobulin V_H locus completed by analysis of the telomeric region of chromosome 14q. *Nat Genet* 1994;7(2):162–168.
49. Matsuda F, Shin EK, Nagaoka H, et al. Structure and physical map of 64 variable segments in the 3′ 0.8 megabase region of the human immunoglobulin heavy chain locus. *Nat Genet* 1993;3:88–94.
50. Matsuda F, Honjo T. Organization of the human immunoglobulin heavy chain locus. *Adv Immunol* 1996;62:1–29.
51. Hsu E. The variation in immunoglobulin heavy chain C regions in evolution. *Semin Immunol* 1994;6:383–391.
52. Davis AC, Roux KH, Pursey J, Shulman MJ. Intermolecular disulfide bonding in IgM: effects of replacing cysteine residues in the μ heavy chain. *EMBO J* 1989;8:25–19–2526.
53. Mestecky J, Russell MW. IgA subclasses. *Monogr Allergy* 1986;19:277–301.
54. Burnett RC, Hanly WC, Zhai SK, Knight KL. The IgA heavy chain gene family in rabbit: cloning and sequence analysis of 13 Cα genes. *EMBO J* 1989;8:4041–4047.
55. Poljak RJ. X-ray diffraction studies of immunoglobulins. *Adv Immunol* 1975;21:1–33.
56. Huck S, Fort P, Crawford DH, Lefranc MP, Lefranc G. Sequence of a human IgG3 heavy chain C region gene: comparison with the other human Cγ genes. *Nucleic Acids Res* 1986;14:1779–1789.
57. Kocher HP, Bijlenga RK, Jaton JC. Biosynthesis and structure of membrane and secretory immunoglobulins. *Mol Cell Biochem* 1982;47:11–22.
58. Rogers J, Choi E, Souza L, et al. Gene segments encoding transmembrane carboxyl termini of Ig γ chains. *Cell* 1981:19–27.
58a. Tomlinson IM, Walter G, Jones PT, Dear PH, Sonnhammer ELL, Winter G. The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J Mol Biol* 1996;256:813–817.
59. Davies DR, Padlan EA, Sheriff S. Antigen-antibody complexes. *Annu Rev Biochem* 1990;59:439–473.
60. Wright A, Tao MH, Kabat EA, Morrison SL. Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *EMBO J* 1991;10:2717–2723.
61. Middaugh CR, Litman GW. Atypical glycosylation of an IgG monoclonal cryo-Ig. *J Biol Chem* 1987;262:3671–3673.
62. Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 1989;342:877–883.
63. Strong RK, Campbell R, Rose DR, Petsko GA, Sharon J, Margolies MN. Three-dimensional structure of murine anti-p-azophenylarsonate Fab 36–71. *Biochemistry* 1991;30:3739–3748.
64. Guddat LW, Herron JN, Edmundson AB. Three-dimensional structure of a human immunoglobulin with a hinge deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4271–4275.
65. Padlan EA, Davies DR. A model of the Fc of IgE. *Mol Immunol* 1986;10:1063–1075.
66. Carayannopoulos L, Hexham JM, Capra JD. Localization of the binding site for the monocyte IgA-Fc receptor (CD89) to the domain boundary between $C_\alpha2$ and $C_\alpha3$ in human IgA1. *J Exp Med* 1996;183:1579–1586.
66a. Putnam FW. *The plasma proteins: structure, function, and genetic control*, vol 3, 2nd ed. New York: Academic Press, 1977.
67. Grey HM, Abel CA, Yount WJ, Kunkel HG. A subclass of human γA-globulins (γ-A2) which lacks the disulfide bonds linking heavy and light chains. *J Exp Med* 1968;128:1223–1236.
68. Saul FA, Amzel LM, Poljak RJ. Preliminary refinement and structural analysis of the Fab fragment from human immunoglobulin *New* at 2.0 A resolution. *J Biol Chem* 1978;253:585–597.
69. Padlan EA. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 1994;31:169–217.
70. Davies DR, Sheriff S, Padlan E. Comparative study of two Fab-lysozyme crystal structures. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54:233–238.
71. Schumaker VN, Phillips ML, Hansen DC. Dynamic aspects of antibody structure. *Mol Immunol* 1991;28:1347–1360.
72. Wade RH, Tavequ JC, Lamy JN. Concerning the axial flexibility of the Fab regions of IgG. *J Mol Biol* 1989;206:349–356.
73. Dangl JL, Wensel TG, Morrison SL, Streyer L, Herzenberg LA, Oi VT. Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse Abs. *EMBO J* 1988;7:1989–1994.
74. Spiegelberg HL. The structure and biology of human IgD. *Immunol Rev* 1977;37:3–23.
75. Putnam FW, Liu YS, Low TL. Primary structure of a human IgA1 immunoglobulin. *J Biol Chem* 1979;254:2865–2874.
76. Plaut AG, Wistar R Jr, Capra JD. Differential susceptibility of human IgA immunoglobulins to streptococcal IgA protease. *J Clin Invest* 1974;54:1295–1300.
77. Plaut AG, Gilbert JV, Artenstein MS, Capra JD. *Neisseriagonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: extracellular enzyme cleaves human IgA. *Science* 1975;190:1103–1105.
78. Dwek R. Glycobiology–towards understanding the function of sugars. *Biochem Soc Trans* 1995;23:1–25.
79. Jenkins M, Curling E. Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. *Enzyme Microb Technol* 1995;16:354–364.
80. Schaffner G, Haase M, Geiss S. Criteria for investigation of the product equivalence of monoclonal antibodies for therapeutic and *in vivo* diagnostic use in case of change in manufacturing process. *Biologicals* 1995;23:253–259.
81. Beale D, Feinstein A. Structure and function of the C regions of immunoglobulins. *Q Rev Biophys* 1976;9:135–180.
81a. Jefferis R, Lund J. Glycosylation of antibody molecules: structural and functional significance. *Chem Immunol* 1997;65:111–128.
82. Tsuchiya N, Endo T, Matsuta K, et al. Effects of galactose depletion from oligosaccharide chains on immunological activities of human IgG. *J Rheumatol* 1989;16:285–290.
83. Tao MH, Morrison SL. Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. *J Immunol* 1989;143:2595–2601.
84. Wright A, Morrison SL. Effect of altered C_H2-associated carbohydrate structure on the functional properties and *in vivo* fate of human IgG1. *J Exp Med* 1994;180:1087–1096.
85. Lund J, Winter G, Jones PT, et al. Human FcγRI and FcγRII interact with distinct but overlapping binding sites on the human IgG. *J Immunol* 1991;147:2657–2662.
86. Canfield SM, Morrison SL. The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the C_H2 domain and is modulated by the hinge region. *J Exp Med* 1991;173:1483–1491.
87. Jefferis R, Lund J. Goodall M. Recognition sites on human IgG for Fcγ receptors: the role of glycosylation. *Immunol Lett* 1995;44:111–117.
87a. Davis AC, Roux KH, Shulman MJ. On the structure of polymeric IgM. *Eur J Immunol* 1988;18:1001–1008.
88. Mole JE, Bhown AS, Bennett JC. Primary structure of human J chain: alignment of peptides from chemical and enzymatic hydrolyses. *Biochemistry* 1977;16:3507–3513.
89. Koshland ME. The coming of age of the immunoglobulin J chain. *Annu Rev Immunol* 1985;3:425–453.
90. Max EE, Korsmeyer SJ. Human J chain gene. *J Exp Med* 1985;161:832–849.
91. Cann GM, Zaritsky A, Koshland ME. Primary structure of the immunoglobulin J chain from the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:6656–6660.
92. Hughes GJ, Frutiger S, Paquet N, Jaton JC. The amino acid sequence of rabbit J chain in secretory IgA. *Biochem J* 1990;271:641–647.
93. Mikoryak CA, Margolies MN, Steiner LA. J chain in *Rana catesbeiana* high molecular weight Ig. *J Immunol* 1988;140:4279–4285.
94. Takahashi T, Iwase T, Takenouchi N, et al. The joining (J) chain is present in invertebrates that do not express immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1886–1891.
95. Zikan J, Novotny J, Trapane TL, et al. Secondary structure of the immunoglobulin J chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:5905–5909.
96. Davis AC, Collins C, Yoshimura MI, D'Agostaro G, Shulman MJ. Mutations of the mouse μ chain which prevent polymer assembly. *J Immunol* 1989;143:1352–1357.
97. Mather EL, Alt FW, Bothwell A, Baltimore D, Koshland ME. Expression of J chain RNA in cell lines representing different stages of B lymphocyte differentiation. *Cell* 1981;23:369–378.
98. Randall TD, Parkhouse RM, Corley RB. J chain synthesis and secretion of hexameric IgM is differentially regulated by LPS and IL5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:962–966.
99. Randall TD, King LB, Corley RB. The biological effects of IgM hexamer formation. *Eur J Immunol* 1990;20:1971–1979.
100. Underdown B. Transcytosis by the receptor for polymeric immunoglobulin. In: Metzger H, ed. *Fc receptors and the action of antibodies*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1990.
101. Mostov KE, Blobel G. A transmembrane precursor of secretory component. *J Biol Chem* 1982;257:11816–11821.
102. Mostov KE, Friedlander M, Blobel G. The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains. *Nature* 1984;308:37–43.
103. Brandtzaeg P. Human secretory IgM. *Immunology* 1975;29:559–570.
104. Weicker J, Underdown BJ. A study of the association of human secretory component with IgA and IgM proteins. *J Immunol* 1975;114:1337–1344.
105. Mach J-P. *In vitro* combination of human and bovine free secretory component with IgA of various species. *Nature* 1970;228:1278–1282.
106. Bienenstock J, Perey DY, Gauldie J, Underdown BJ. Chicken γA: physiochemical and immunochemical characteristics. *J Immunol* 1973;110:524–533.
107. Fallgreen-Gebauer E, Bebauer W, Bastian A, et al. The covalent linkage of secretory component to IgA. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1993;374:1023–1028.
108. Bakos MA, Kurosky A, Goldblum RM. Characterization of a critical binding site for human polymeric immunoglobulin on secretory component. *J Immunol* 1991;147:3419–3426.
109. Hasemann C, Capra JD. Mutational analysis of arsonate binding by a CRIA+ antibody. *J Biol Chem* 1991;266:7626–7632.
110. Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SEV, Poljak RJ. Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. *Science* 1986;233:747–753.
110a. Davies DR, Sheriff S, Padlan EA, Silverton EW, Cohen GH, Smith-Gill SJ. Three-dimensional structures of two Fab complexes with lysozyme. In: Smith-Gill SJ, Sercarz EE, eds. *The immune response to structurally define proteins:*

the lysozyme model. Schenectady, NY: Adenine Press, 1989.

111. Padlan EA. On the nature of antibody combining sites: unusual structural features that may confer on these sites an enhanced capacity for binding ligands. *Proteins* 1990;7:112–124.
112. Mian IS, Bradwell AR, Olson AJ. Structure, function and properties of antibody binding sites. *J Mol Biol* 1991;217:133–151.
113. Mariuzza RA, Poljak RJ, Schwarz FP. The energetics of antigen-antibody binding. *Res Immunol* 1994;145:70–72.
114. Braden BC, Poljak RJ. Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *FASEB J* 1995;9:9–16.
115. Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM. Superantigens: mechanism ofT-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol* 1991;9:745–772.
116. Pascual V, Capra JD. B-cell superantigens? *Curr Biol* 1991;1:315.
117. Silverman GJ. Superantigens and spectrum of unconventional B-cell antigens. *The Immunologist* 1994;2:51–57.
118. Biguzzi S. Fcγ-like determinants on immunoglobulin variable regions: identification by staphylococcal protein A. *Scand J Immunol* 1982;15:605–618.
119. Sasso EH, Silverman GJ, Mannik M. Human IgM molecules that bind staphylococcal protein A contain V_HIII H chains. *J Immunol* 1989;142:2778–2783.
120. Potter KN, Li Y, Capra JD. Staphylococcal protein A simultaneously interacts with FR1, CDR2, and FR3 on human V_H3-encoded Igs. *J Immunol* 1996;157: 2982–2988.
121. Berberian L, Goodglick L, Kipps TJ, Braun J. Immunoglobulin V_H3 gene products: natural ligands for HIV gp120. *Science* 1993;261:1588–1591.
122. Lenert P, Kroon D, Spiegleberg H, Golub ES, Zanetti M. Human CD4 binds immunoglobulins. *Science* 1990;248:1639–1643.
123. Corper AL, Sohi MK, Bonagura VR, et al. Structure of human IgM rheumatoid factor Fab bound to its autoantigen IgG Fc reveals a novel topology of antibody-antigen interaction. *Nat Struct Biol* 1997;4:374–381.

123a. Simard J, Mak TW. Immunoglobulins and the B cell receptor. In: *Genetic basis of immune responses* (in press).

124. Hombach J, Lottspeich F, Reth M. Identification of the genes encoding the IgM-α and Ig-β components of the IgM antigen receptor complex by amino-terminal sequencing. *Eur J Immunol* 1990;20:2795–2799.
125. Williams GT, Venkitaraman AR, Gilmore DJ, Neuberger MS. The sequence of the μ transmembrane segment determines the tissue specificity of the transport of IgM to the cell surface. *J Exp Med* 1990;171:947–952.
126. Karasuyama H, Kudo A, Melchers F. The proteins encoded by the VpreB and λ5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with μ heavy chain. *J Exp Med* 1990;172:969–972.
127. Tsubata T, Reth M. The products of pre-B cell-specific genes (λ5 and VpreB) and the immunoglobulin μ chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J Exp Med* 1990;172:973–976.
128. Arya S, Chen F, Spycher S, Isenman DE, Shulman MJ, Painter RH. Mapping of amino acid residues in the $C_\mu3$ domain of mouse IgM important in macromolecular assembly and complement-dependent cytolysis. *J Immunol* 1994;152: 1206–1212.
129. Wright JF, Shulman MJ, Isenman DE, Painter RH. C1 binding by mouse IgM. *J Biol Chem* 1990;265:10506–10513.
130. Du Pasquier L, Wabl MR. Antibody diversity in amphibians: inheritance of isoelectric focusing antibody patterns in isogenic frogs. *Eur J Immunol* 1978;8: 428–433.
131. Lin LC, Putnam FW. Primary structure of the Fc region of human IgD: implications of evolutionary origin and biologic function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:504–508.
132. Nitschke L, Kosco MH, Kohler G, Lamers MC. IgD-deficient mice can mount normal immune responses to thymus-independent and -dependent antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1887–1891.
133. Roes J, Rajewsky K. Immunoglobulin D (IgD)-deficient mice reveal an auxiliary receptor function for IgD in antigen-mediated recruitment of B cells. *J Exp Med* 1993;177:45–55.
134. Forster I, Vieira P, Rajewsky K. Flow cytometric analysis of cell proliferation dynamics in the B cell compartment of the mouse. *Int Immunol* 1989;1(4): 321–331.
135. Black SJ, van der Loo W, Loken MR, Herzenberg LA. Expression of IgD by murine lymphocytes. Loss of surface IgD indicates maturation of memory B cells. *J Exp Med* 1978;147:984–996.
136. McHeyzer-Williams MG, Nossal GJ, Lalor PA. Molecular characterization of single memory B cells. *Nature* 1991;350:502–505.
137. Havran WL, DiGiusto DL, Cambier JC. mIgM:mIgD ratios on B cells: mean mIgD expression exceeds mIgM by 10-fold on most splenic B cells. *J Immunol* 1984;132:1712–1716.
138. Venkitaraman AR, Williams GT, Dariavach P, Neuberger MS. The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. *Nature* 1991;352:777–781.
139. Nezlin R. Internal movements in immunoglobulin molecules. *Adv Immunol* 1990;48:1–40.
140. Simard J, Mak TW. Immunoglobulins and the B cell receptor. In: *Genetic basis of immune responses* (in press).
141. Brink R, Goodnow CC, Crosbie J, et al. IgM and IgD antigen receptors are both capable of mediating B lymphocyte activation, deletion, or anergy after interaction with specific antigen. *J Exp Med* 1992;176:991–1005.
142. Morris SC, Lees A, Finkelman FD. *In vivo* activation of naïve T cells by antigen-presenting B cells. *J Immunol* 1994;152:3777–3785.
143. Brink R, Goodnow CC, Basten A. IgD expression on B cells is more efficient than IgM but both receptors are functionally equivalent in up-regulating CD80/CD86 co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 1995;25:1980–1984.
144. Swenson CD, Van Vollenhoven RF, Xue B, Siskind GW, Thorbecke GJ, Coico RF. Physiology of IgD. *Eur J Immunol* 1988;18:13–20.
145. Finkelman FD, Snapper CM, Mountz JD, Katona IM. Polyclonal activation of the murine immune system by a goat antibody to mouse IgD. *J Immunol* 1987;138:2826–2830.
146. Liu Y-J, de Bouteiller O, Arpin C, et al. Normal human IgD+/IgM+ germinal center B cells can express up to 80 mutations in the variable region of their IgD transcripts. *Immunity* 1996;4:603–613.
147. Billian G, Bella C, Mondiere P, Defrance T. Identification of a tonsil IgD+ B cell subset with phenotypical and functional characteristics of germinal center B cells. *Eur J Immunol* 1996;26:1712–1719.
148. Perlemutter RG, Hansburg D, Briles DE, Nicolotti RA, Davis JM. Subclass restriction of murine anti-carbohydrate antibodies. *J Immunol* 1978;121: 566–571.
149. Coutelier J-P, van der Logt JTM, Heessen FWA, Warnier G, Van Snick J. IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. *J Exp Med* 1987;165: 64–69.
150. Papadea C, Check IJ. Human IgG and IgG subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989;27:27–58.
151. Brekke OH, Michaelsen TE, Sandlie I. The structural requirements for complement activation by IgG: does it hinge on the hinge? *Immunol Today* 1995;16: 85–90.
152. Bruggemann M, Williams GT, Bindon CI, et al. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med* 1987;166:1351–1361.
153. Duncan AR, Winter G. The binding site for Clq on IgG. *Nature.* 1988;332: 738–740.
154. Tao M-H, Canfield SM, Morrison SL. The differential ability of human IgG1 and IgG4 to activate complement is determined by the COOH-terminal sequence of the C_H2 domain. *J Exp Med* 1991;173:1025–1028.
155. Tan LK, Shopes RJ, Oi VT, Morrison SL. Influence of the hinge region on complement activation, C1q binding, and segmental flexibility in chimeric human immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:162–166.
156. Sandlie I, Michaelsen TE. Engineering monoclonal antibodies to determine the structural requirements for complement activation and complement mediated lysis. *Mol Immunol* 1991;28:1361–1368.
157. Brekke OH, Michaelsen TE, Sandin R, Sandlie I. Activation of complement by an IgG molecule without a genetic hinge. *Nature* 1993;363:628–630.
158. Norderhaug L, Brekke OH, Bremnes B, et al. Chimeric mouse-human IgG3 antibodies with an IgG4-like hinge region induce complement-mediated lysis more efficiently than IgG3 with normal hinge. *Eur J Immunol* 1991;21:2379–2384.
159. Kimberly RP, Salmon JE, Edberg JC. Receptors for IgG. *Arthritis Rheum* 1995;38:306–314.
160. Indik ZK, Park JG, Hunter S, Schreiber AD. Structure/function relationships of Fcγ receptors in phagocytosis. *Semin Immunol* 1995;7:45–54.
161. Unkeless JC. Function and heterogeneity of human Fc receptors for IgG. *J Clin Invest* 1989;83:355–361.
162. Michaelsen TE, Aase A, Norderhaug L, Sandlie I. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity induced by chimeric mouse-human IgG subclasses and IgG3 antibodies with altered hinge region. *Mol Immunol* 1992;29:319–326.
163. Galon J, Bouchard C, Fridman WH, Sautes C. Ligands and biological activities of soluble Fcγ receptors. *Immunol Lett* 1995;44:175–181.
164. Saji F, Koyama M, Matsuzaki N. Current topic: human placental Fc receptors. *Placenta* 1994;15:453–466.
165. Sarmay G, Lund J, Rozsnyay Z, Gergely J, Jefferis R. Mapping and comparison of the interaction sites on the Fc region of IgG responsible for triggering ADCC through different types of human Fcγ receptor. *Mol Immunol* 1992;29: 633–639.
166. Canfield SM, Morrison SL. The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the C_H2 domain and is modulated by the hinge region. *J Exp Med* 1991;173:1483–1491.
167. Tomasi TB, Grey HM. Structure and function of IgA. *Prog Allergy* 1972;16: 81–213.
168. Lehner T, Bergmeier LA, Tao L, et al. Targeted lymph node immunization with simian immunodeficiency virus p27 antigen to elicit genital, rectal, and urinary immune responses in nonhuman primates. *J Immunol* 1994;153:1858–1868.
169. Mestecky J, McGhee JR. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol* 1987;40:153–245.
170. Qiu JZ, Brackee GP, Plaut AG, Sneller MC, Strober W. Analysis of the specificity of bacterial IgA proteases by a comparative study of ape serum IgAs as substrates. *Infect Immun* 1996;64:933–937.
171. Wang B, Rieger A, Kilgus O, et al. Human epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via FcεRI. *J Exp Med* 1992;175: 1353–1365.
172. Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, et al. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for IgE (FcεRI). *J Exp Med* 1992;175:

1285–1290.
173. Gounni AS, Lamkhioued B, Ochiai K, et al. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defense against parasites. *Nature* 1994;367:183–186.
174. Hashimoto S, Koh K, Tomita Y, et al. TNF-α regulates IL-4-induced FcεRII/CD23 gene expression and soluble FcεRII release by human monocytes. *Int Immunol* 1995;7:705–713.
175. Helm B, Marsh P, Vercelli D, Padlan E, Gould H, Geha R. The mast cell binding site on human immunoglobulin E. *Nature* 1988;331:180–183.
176. Nissim. A, Eshhar Z. The human mast cell receptor binding site maps to the third constant domain of IgE. *Mol Immunol* 1992;29:1065–1072.
177. Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ. The covalent structure of an entire γG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969;63:78–85.
178. Brummendorf T, Rathjen FG. Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6:584–593.
179. Edelman GM. CAMs and Igs: cell adhesion and the evolutionary origins of immunity. *Immunol Rev* 1987;100:11–45.
180. Hultgren SJ, Jacob-Dubuisson F, Jones CH, Branden CI. PapD and superfamily of periplasmic immunoglobulin-like pilus chaperones. *Adv Protein Chem* 1993;44:99–123.
181. Bateman A, Eddy SR, Chothia C. Members of the immunoglobulin superfamily in bacteria. *Protein Sci* 1996;5:1939–1941.
182. Wojciechowicz D, Lu CF, Kurjan J, Lipke PN. Cell surface anchorage and ligand-binding domains of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion protein alpha-agglutinin, a member of the IgSF. *Mol Cell Biol* 1993;13:2554–2563.
183. Ohno S. The origin of Igs and T-cell receptors is likely to be the cell death sensor of macrophages. *Res Immunol* 1996;147:247–252.
184. Noegel A, Gerisch G, Stadler J, Westfal M. Complete sequence and transcript regulation of a cell adhesion protein from aggregating *Dictyostelium* cells. *Embo J* 1986;5:1473–1476.
185. Mokady O. Occam's Razor, invertebrate allorecognition and immunoglobulin superfamily evolution. *Res Immunol* 1996;147:241–246.
186. Lesk AM, Chothia C. Evolution of proteins formed by β-sheets. *J Mol Biol* 1982;160:325–342.
187. Chothia C, Lesk AM. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J* 1986;5:823–826.
188. Harpaz Y, Chothia C. Many of the IgSF domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. *J Mol Biol* 1994;238:528–539.
189. Kolsch E, Oberbarnscheidt J, Bruner K, Heuer J. The Fc receptor: its role in the transmission of differentiation signals. *Immunol Rev* 1980;49:61–78.
190. Fridman WM. Fc receptors and immunoglobulin binding factors. *FASEB J* 1991;5:2684–2690.
191. Unkeless JC, Scigliano, E, Freedman VH. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* 1988;6:251–281.
192. Sandor M, Lynch R. The biology and pathology of Fc receptors. *J Clin Immunol* 1993;13:237–246.
193. Keegan AD, Paul WE. Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signaling pathways. *Immunol Today* 1992;13:63–68.
194. Lanier L, Yu G, Phillips J. Analysis of FcγRIII (CD16) membrane expression and association with CD3ζ and FcεRI-γ by site directed mutation. *J Immunol* 1991;146:1571–1576.
195. Cassel DL, Keller MA, Surrey S, et al. Differential expression of FcγRIIA, FcγRIIB and FcγRIIC in hematopoietic cells: analysis of transcripts. *Mol Immunol* 1993;30:451–460.
196. Heyman B. The immune complex: possible ways of regulating the antibody response. *Immunol Today* 1990;11:310–313.
197. Vivier E, Daeron M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today* 1997;18:286–291.
198. Hogarth PM, Hulett MD, Ierino FL, Tate B, Powell MS, Brinkworth RL. Identification of the immunoglobulin binding regions of FcγRII and FcεRI. *Immunol Rev* 1992;125:21–35.
199. Hulett MD, Witort E, Brinkworth RI, McKenzie IF, Hogarth PM. Multiple regions of human FcγRII (CD32) contribute to the binding of IgG. *J Biol Chem* 1995;270:21188–21194.
200. Letourneur O, Kennedy IC, Brini AT, Ortaldo JR, O'Shea JJ, Kinet JP. Characterization of the family of dimers associated with Fc receptors (FcεRI and FcγRIII). *J Immunol* 1991;147:2652–2656.
201. Selvaraj P, Rosse WF, Silber R, Springer TA. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature* 1988;333:565–567.
202. Metzger H. The receptor with high affinity for IgE. *Immunol Rev* 1992;125:38–48.
203. Maurer D, Fiebiger E, Reininger B, et al. Expression of functional high affinity IgE receptors (FcεRI) on monocytes of atopic individuals. *J Exp Med* 1994;179:745–750.
204. Dombrowicz D, Flamand V, Brigman K, et al. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity IgE receptor alpha chain gene. *Cell* 1993;75:969–976.
205. Takai T, Li M, Sylvestre D, et al. FcR γ chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 1994;76:519–529.
206. Clynes R, Ravetch J. Cytotoxic antibodies trigger inflammation through Fc receptors. *Immunity* 1995;3:21–26.
207. Leahy DJ. A structural view of CD4 and CD8. *FASEB J* 1995;9:17–25.
208. Rosenstein Y, Ratnofshy S, Burakoff SJ, Herrmann SH. Direct evidence for binding of CD8 to HLA class I antigens. *J Exp Med* 1989;169:149–160.
209. Weber S, Karjalainen K. Mouse CD4 binds MHC class II with extremely low affinity. *Int Immunol* 1993;5:695–698.
210. Littman DR. The structure of the CD4 and CD8 genes. *Annu Rev Immunol* 1987;5:561–584.
211. Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase $p56^{lck}$. *Cell* 1988;55:301–308.
212. Wallace VA, Penninger J, Mak TW. CD4, CD8 and tyrosine kinases in thymic selection. *Curr Opin Immunol* 1983;5:235–240.
213. Janeway CA. The T cell receptor as a multicomponent signaling machine: CD4/CD8 coreceptors, and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 1992;10:645–674.
214. Littman DR, Thomas Y, Maddon PJ, Chess L, Axel R. The isolation and sequence of the gene encoding T8: a molecule defining functional classes of T lymphocytes. *Cell* 1985;40:237–246.
215. Norment AM, Littman DR. A second subunit of CD8 is expressed in human T cells. *EMBO J* 1988;7:3433–3439.
216. Shiue L, Gorman SD, Parnes JR. A second chain of human CD8 is expressed on peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1988;168:1993–2005.
217. Wheeler CJ, von Hoegen P, Parnes JR. An immunological role for the CD8β-chain. *Nature* 1992;357:247–249.
218. Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, et al. Requirement for CD8β chain in positive selection of CD8-lineage T cells. *Science* 1994;263:1131–1133.
219. Renard V, Romero P, Vivier E, Malissen B, Luescher IF. CD8β increases CD8 coreceptor function and participation in TCR-ligand binding. *J Exp Med* 1996;184:2439–2444.
220. Irie HY, Ravichandran KS, Burakoff SJ. CD8β chain influences CD8α chain-associated Lck kinase activity. *J Exp Med* 1995;181:1267–1273.
221. Nakayama K, Kawachi Y, Tokito S, et al. Recent duplication of the two human CD8 β-chain genes. *J Immunol* 1992;148:1919–1927.
222. DiSanto JP, Smith D, de Bruin D, Lacy E, Flomenberg N. Transcriptional diversity at the duplicated human CD8β loci. *Eur J Immunol* 1993;23:320–326.
223. Leahy DJ, Axel R, Hendrickson WA. Crystal structure of a soluble form of the human T cell coreceptor CD8 at 2.6 Å resolution. *Cell* 1992;68:1145–1162.
224. Kirszbaum L, Sharpe JA, Goss N, Lahnstein J, Walker ID. The α-chain of murine CD8 lacks an invariant Ig-like disulfide bond but contains a unique intrachain loop instead. *J Immunol* 1989;142:3931–3936.
225. Classon BJ, Brown MH, Garnett D, et al. The hinge region of the CD8α chain: structure, antigenicity, and utility in expression of IgSF domains. *Int Immunol* 1992;4:215–225.
226. Pascale MC, Erra MC, Malagolini N, Serafini-Cessi F, Leone A, Bonatti S. Post-translational processing of an O-glycosylated protein, the human CD8 glycoprotein, during the intracellular transport to the plasma membrane. *J Biol Chem* 1992;267:25196–25201.
227. Boursier JP, Alcover A, Herve F, Laisney I, Acuto O. Evidence for an extended structure of the T-cell co-receptor CD8α as deduced from the hydrodynamic properties of soluble forms of the extracellular region. *J Biol Chem* 1993;268:2013–2020.
228. Sanders SK, Fox RO, Kavathas P. Mutations in CD8 that affect interactions with HLA class I and monoclonal anti-CD8 antibodies. *J Exp Med* 1991;174:371–379.
229. Giblin PA, Leahy DJ, Mennone J, Kavathas PB. The role of charge and multiple faces of the CD8 α/α homodimer in binding to MHC class I molecules: support for a bivalent model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1716–1720.
230. Gao GF, Tormo J, Gerth UC, et al. Crystal structure of the complex between human CD8α/α and HLA-A2. *Nature* 1997;387:630–634.
231. Maddon PJ, Littman DR, Godfrey M, Maddon DE, Chess L, Axel R. The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T-cell surface protein T4: a new member of the IgSF. *Cell* 1985;42:93–104.
232. Wang JH, Yau YW, Garrett TP, et al. Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature* 1990;348:411–418.
233. Ryu SE, Kwong PD, Truneh A, et al. Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature* 1990;348:419–426.
234. Brady RL, Dodson EJ, Dodson GG, et al. Crystal structure of domains 3 and 4 of rat CD4: relation to the NH2-terminal domains. *Science* 1993;260:979–983.
235. Lange G, Lewis SJ, Murshudov GN, et al. Crystal structure of an extracellular fragment of the rat CD4 receptor containing domains 3 and 4. *Structure* 1994;2:469–481.
236. Williams AF, Davis SJ, He Q, Barclay AN. Structural diversity in domains of the immunoglobulin superfamily. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54:637–647.
237. Wu H, Kwong PD, Hendrickson WA. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* 1997;387:527–530.
238. Fleury S, Lamarre D, Meloche S, et al. Mutational analysis of the interaction between CD4 and class II MHC: class II antigens contact CD4 on a surface opposite the gp120-binding site. *Cell* 1991;66:1037–1049.
239. Moebius U, Pallai P, Harrison SC, Reinherz EL. Delineation of an extended surface contact area on human CD4 involved in class II major histocompatibility complex binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8259–8263.
240. Huang B, Yachou A, Fleury S, Hendrickson WA, Sekaly RP. Analysis of the contact sites on the CD4 molecule with class II MHC molecule: co-ligand versus co-receptor function. *J Immunol* 1997;158:216–225.
241. Langedijk JP, Puijk WC, van Hoorn WP, Meloen RH. Location of CD4 dimerization site explains critical role of CDR3-like region in HIV-1 infection and T-cell activation and implies a model for complex of coreceptor-MHC. *J Biol Chem* 1993;268:16875–16878.

第4章 抗原抗体相互作用和单克隆抗体

Jay A. Berzofsky, Ira J. Berkower, and Suzanne L. Epstein[①]

抗原抗体的相互作用与其他生物分子间相互作用遵循共同的基本原则。也就是说,研究激素及其受体,酶和底物,或者氧气与血红蛋白之间相互作用的理论和实验方法,通常也可用于研究抗原与抗体间的结合。但是,它们之间也存在几个主要差别。首先,不同于大多数酶和许多激素结合系统,抗体并不会不可逆地改变与之结合的抗原。因此,至少在理论上,抗原抗体反应是可逆的。第二,研究者几乎可以制备与任何已知物质特异性结合的抗体。而且,对每一种抗原,你都可以找到这样的抗体,它的亲和力和特异性可与酶和底物,激素和受体相媲美。因此,通常可以将抗原和抗体间的相互作用作为大分子与其配体相互作用的模型。也正是具备可逆性和易于获得的特性,在对不断增长的、具有重要生物学和医学意义的物质进行鉴定、定量分析甚至纯化方面,抗体是一种不可替代的实验材料。

75

但是与酶相比,抗体的另一特性——庞大的异质性则是既往研究和使用抗体的主要障碍。从免疫血清纯化的抗体,即使都针对同一抗原分子,并具有相同的免疫球蛋白基本结构(见第9章),实际上也是由不同异质性抗体亚群组成的混合物。它们具有不同的亲和力、不同的精细特异性以及可用于区分交叉反应性抗

① J. A. Berzofsky: Molecular Immunogenetics and Vaccine Research Section, Metabolism Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892.

I.J. Berkower: Laboratory of Immunoregulation, Office of Vaccines, Center for Bilolgics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20892.

S.L. Epstein: Molecular Immunology Laboratory, Division of Cellular and Gene Therapies, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20892.

原的能力。单克隆抗体杂交瘤技术的诞生彻底改变了这一状况。对于任何一种抗原，只要能够制备它的抗血清，就能获得均一抗体[1]。当然，异质性抗血清仍被广泛使用。在某些方面，如沉淀反应中，抗血清还具有独特优势。因此在阅读本章以及本书的其他章节时需要始终牢记，从一种抗体与一种抗原的相互作用得到的原理，必须经修正和扩展以后才能适用于反应中的异质性成分。

本章将讨论抗原抗体相互作用的定量分析原理，研究这种相互作用的实验技术以及将抗体作为一种定量分析试剂的实验技术。然后讨论结合到抗体分子上的抗原的效应。最后讨论单克隆抗体的制备、使用及其特性。

热力学和动力学

亲和力的热力学

如上所述，抗原抗体相互作用的基本热力学原理与任何可逆性生物分子的结合反应是共同的。这里将主要阐明如何将这些基本原理运用于这个特殊的免疫学反应。

溶液中的化学平衡

假设 S 代表抗体的结合位点(antibody-binding site)，L 代表配体(抗原)的位点，SL 代表抗原抗体复合物，那么，反应如下：



$$S + L = SL \tag{1}$$

根据质量作用定律(mass action law)，

$$K_A = \frac{[SL]}{[S][L]} \tag{2}$$

其中 K_A 为结合常数(或亲和力)，方括号代表反应物的摩尔浓度。由此方程式可知，在某一组特定的条件(如温度、pH 值和盐浓度)下，当反应平衡时，抗原抗体复合物的浓度与反应物浓度乘积的比值总是一个常数。因此，只要两种反应物都不是有限的(如任何一个已经达饱和状态)，而且有足够的反应时间达到一种新的平衡，那么改变抗体或配体浓度总会改变复合物浓度。此外，在方程式中，抗体或配体的浓度是对称的，因而只要另一种反应物是充分过量的，抗体或抗原浓度加大 1 倍时，抗原抗体复合物的浓度也会增加 1 倍。之所以需要附加条件，是因为在上述公式中，[S]和[L]分别代表溶液中游离状态 S 和游离状态 L 的浓度，而不是将复合物包括在内的 S 或 L 的总浓度。因此，如果 L 不是充分过量，[S]增加一倍会导致一部分[L]转化成为复合物，[SL]的最终浓度会小于 2 倍。与此相类似，如果将反应体积减少一半，则抗体和配体的总浓度会增加 1 倍。此时如果两种反应物中形成复合物的比例很小(如在低亲和力结合的情况下)，复合物浓度会增至 4 倍。但在大多数实际情况中，复合物浓度会占到抗原或抗体或二者的很大比例，因此复合物浓度最终会增加，但增加倍数小于 4。从这个例子中还可以发现另一个很重要，也很明显，但经常被遗忘的原则，即方程式 2 中的各项为反应物的浓度，而不是数量。因此在一个小体积中加入少量的抗原抗体可以增加复合物的生成数，但如果在一个大反应体积中加入同样数量的抗原和抗体，生成的复合物数量会大大降低。这种改变与体积的平方成正比。因此在设计实验时，反应体积是一个重要的考虑因素。

图 4.1 显示在抗体浓度保持不变的情况下，增加游离配体浓度[L]对复合物浓度[SL]的影响。根据质量作用定律，可表示为：

$$[SL] = K_A([S]_t - [SL])[L] \tag{3}$$

或

$$[SL] = \frac{K_A[S]_t[L]}{1 + K_A[L]} \qquad (3')$$

$[S]_t$ 为抗体位点总浓度；即[S] - [SL][1]。反应的初始阶段，复合物浓度[SL]只是抗体总浓度$[S]_t$ 中的极小部分，因而随着配体的增加，复合物的浓度呈线性增长。但是随着抗体逐渐消耗，曲线的斜率逐渐降低，当所有的抗体被饱和时，复合物的浓度[SL]也逐渐接近一个平台值$[S]_t$。因此可以从饱和结合曲线(图 4.1)推算出抗体结合位点的浓度，即以放射性或其他方法标记配体，通过测定饱和状态时的结合的配体浓度计算抗体位点浓度[2]。这种测定方法有时被称为抗原结合容量(antigen-binding capacity)。

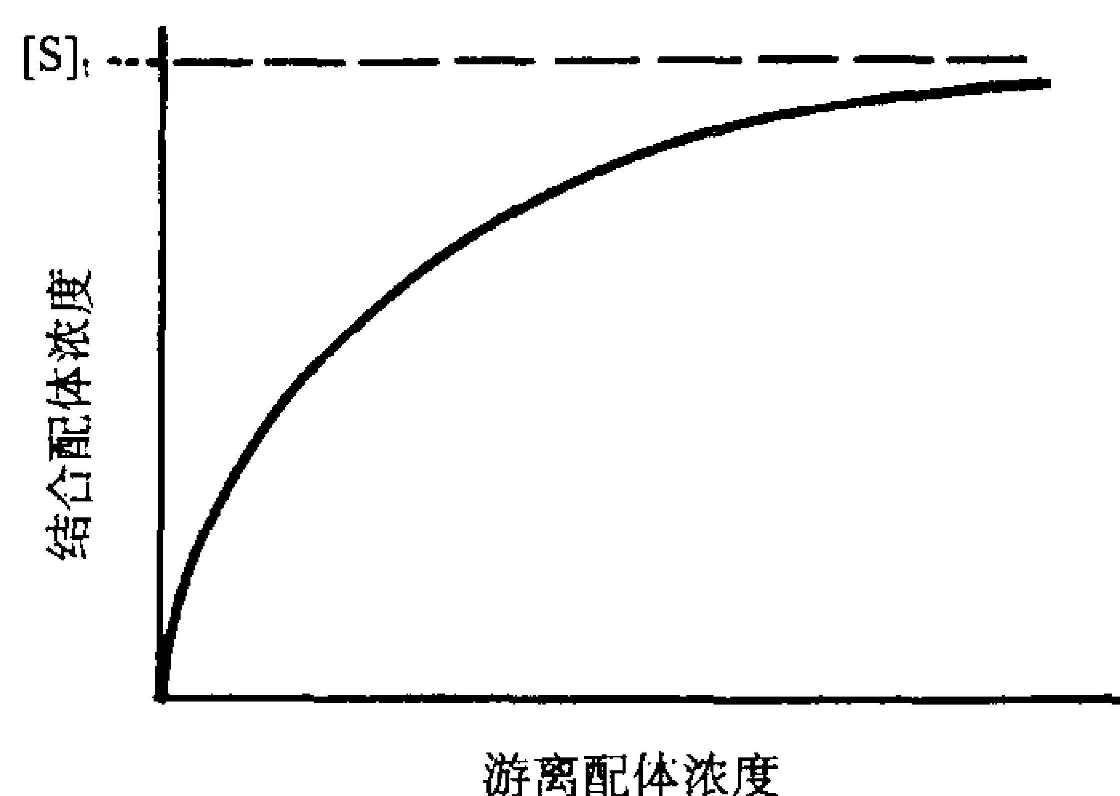


图 4.1 在抗体结合位点总浓度($[S]_t$)不变的情况下，结合配体浓度(bound ligand concentration)作为游离配体浓度的函数示意图。随着配体浓度的增加，曲线逐渐接近于一个平台，此时结合配体浓度等于$[S]_t$。

抗体开始饱和时所需的配体总浓度不仅是抗体浓度的函数，也是结合常数 K_A(或称为亲和力)的函数。如果方程式 2 中的所有浓度以摩尔表示，K_A 的单位为 L/mol 或升每摩尔。因此 $K_A[L]$的乘积是没有单位的。从方程式 3′可见，$K_A[L]$的乘积[3]接近 1 的水平决定了抗体的饱和程度。例如，当抗体的亲和力为 10^7 L/mol，配体浓度为 10^{-8} mol/L 时，即使配体总量相对于抗体总量是充分过量的，由于 $K_A[L]$的乘积为 0.1，抗体也不会呈饱和状态。从方程式 3′可知，本例中结合的抗体仅占总抗体的 0.1/1.1，约为 9%。下一节将详细介绍亲和力及其测定方法。

自由能

热力学中，亲和力 K_A 也是一个重要参数，因为它直接与反应自由能 ΔF 有关，如下式所示：

$$\Delta F^\circ = -RT\ln K_A \qquad (4)$$

$$K_A = e^{-\Delta F^\circ/RT} \qquad (4')$$

R 为气体常数[1.98717 cal/(K·mol)][4]，T 为绝对温度(热力学温度)，ln 为自然对数，e 为自然对数的底数。引入负号是因为通常将自由能的负向改变认为是阳性结合。ΔF°为标准自由能的改变，定义为单位浓度时，1 摩尔抗原和 1 摩尔抗体结合位点形成 1 摩尔复合物时的 ΔF。 77

需要指出的是，方程式 4 和 4′存在一个明显的矛盾[5]。在方程式 2 中，K_A 的单位定义为 L/mol(即升/摩尔)，但是在方程式 4′中，它没有单位。其中原因在于，为保证方程式 4′的严格性，K_A 必须以摩尔比例(mole fraction)而不是浓度来表示。溶液中某种溶质的摩尔比例为该溶质的摩尔数与溶液中所有成分的摩尔数之比。由于水(55mol/L)是大多数水溶液的主要成分，为实际应用方便，可将方程式 2 中的所有浓度除以 55mol/L，从而将 K_A 变为无单位的摩尔比例。这种转换使得方程式 4′更加严格正确，但是由此在方程式 4 中引入了一个附加项，$-RT\ln 55$[相当于稀释的熵(entropy of dilution)]。当 ΔF 间相减时，这个常数可以被去除，但在讨论 ΔF 间的比值时就不能被忽略。

从这些方程式中可以衍生出一个很重要的经验。由于 ln10 = 2.303，因此将亲和力提高 10 倍，温度为

---

① 原文可能有错误，应为[S] + [SL]。——译者注

② 严格地讲，只有对单价配体，这一方法才是正确的。但是大多数的多价配体在抗原充分过量，即测量时所处的平台期时，表现为单价配体的作用特点。

③ 原文可能有错误，应为 $K_A[L]/(1 + K_A[L])$。——译者注

④ 1cal = 4.184J，cal 非国际单位。——编辑注

⑤ 原文可能有错误，应为方程式 2 和 4′中存在一个明显的矛盾。——译者注

37℃(310.15K)时，自由能的改变 ΔF 仅有 1.42 kcal/mol。(25℃和 4℃时，ΔF 分别为 1.37 和 1.42 kcal/mol。)不及单个氢键能量(约为 4.5 kcal/mol)的 1/3。从另一个角度来看，当亲和力高至 10^{10} L/mol 时，相应的 ΔF 仅为 14.2 kcal/mol，约为 3 个氢键的结合能量。(当然，由于抗原抗体形成氢键时与水的氢键被打断，因此每个氢键的净能量约为 1kcal/mol。)从这个例子中可以清楚地看到，抗体结合位点中的接触残基与抗原(如蛋白质)中的接触残基通过疏水键、离子键或氢键相互作用时，相互排斥和相互吸引的力量是十分接近的。形成总排斥力量与总吸引力量的如此众多的残基中，只是几个千卡的差异导致了最终高亲和力的结合。如果 ΔF 再高，结合反应就可能因为亲和力太高而成为不可逆的。由此看来，抗原分子的微小变化就能导致亲和力的显著改变也就不足为奇了。单个氢键可以数倍地改变亲和力，同样的情况也可见于疏水性相互作用和其他形成的结合。在随后关于特异性以及抗原结构的讨论中，这一概念十分重要。

温度、pH 值和盐浓度的影响

前面提及，在一组给定的条件，如温度、pH 值和盐浓度下，K_A 是一个常数。但是，当上述条件发生变化时，亲和力 K_A 也会随之改变。我们已经看到自由能的改变对亲和力的影响依赖于温度。其实自由能本身也是温度的函数

$$\Delta F^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (5)$$

ΔH 为焓变(反应的热量)①，ΔS 为熵(该术语表示反应引起的混乱程度)②，T 为绝对温度(热力学温度)。

因此，结合常数 K_A 随温度变化的关系如下：

$$\frac{d\ln K_A}{dT} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2} \quad (6)$$

或

$$\frac{d\ln K_A}{d(1/T)} = \frac{-\Delta H^\circ}{R} \quad (6')$$

这些方程式的推导过程已超出本书范围[4]。但是从这些方程式可以得到以下提示。首先，通过作图，计算 $\ln K_A$ 随 $1/T$ 变化的斜率，可以获得反应的标准焓变 ΔH°。第二，对于总体上释放热量的反应(如形成氢键和极性键时大量负焓变导致的热量释放)，随着温度的增高，亲和力下降。因此许多抗原抗体反应在 4℃时的亲和力高于 25℃或 37℃时，即在给定的一组浓度条件下，较低温度可以达到最大亲和力。相反，非极性或疏水性相互作用主要来源于熵($T\Delta S$)，ΔH 接近零。在这种情况下，温度对亲和力的影响很小。

pH 值和盐浓度(或离子强度)对亲和力的影响主要取决于相互作用基团的特性。对抗原抗体反应的研究通常在中性 pH 值以及生理盐浓度(0.15mol/L NaCl)的情况下进行。如果相互作用主要通过离子间相互作用，高盐浓度会降低亲和力。

抗原抗体反应的动力学

抗原抗体结合的热力学和动力学之间的基本关系可用下式表示：

$$K_A = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (7)$$

k_1 和 k_{-1} 是正向(结合)反应和反向(解离)反应的速率常数。

①② 如欲详细了解这些概念，请参阅 Moore 等编写的物理化学教科书[4]。

正向反应很大程度上取决于扩散速率(理论上限为[10^9 L/(mol·s)]和一次碰撞导致结合的概率。后者则主要取决于抗原抗体以最适合方向发生碰撞的概率,以及结合所需能量。扩散速率常数可由 Smoluchowski 方程式[5]推算 *78*

$$k_{dl} = 4\pi\alpha D(6\times10^{20}) \tag{7a}$$

其中 α 为两种反应物半径之和(以 cm 表示),D 为两种反应物各自每秒扩散常数(以 cm^2 表示)之和,常数 6×10^{20}是将单位转换为 L/(mol·s)。例如,如果 $\alpha = 10^{-6}$, $D = 10^{-7}$ cm^2/s,那么 k_{dl}约为 7.5×10^8 L/(mol·s)。通常情况下,大的蛋白质抗原的结合速率慢于小的半抗原。这是由于碰撞方向效应(orientational effects in the collision)以及其他蛋白质间相互作用的非扩散效应导致 D 值较小。所以蛋白质抗原的结合速率通常在 $10^5\sim10^6$ L/(mol·s)之间(见后文)。当然,也可单独用扩散限制速率(diffusion-limited rate)来部分解释该现象。假设球形反应物的半径为 r_1 和 r_2,那么在方程式 7a 中,$\alpha = r_1 + r_2$,D 则和 $1/r_1 + 1/r_2$ 成正比。因此扩散速率常数与以下式成正比

$$(r_1 + r_2)\left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2}\right) = \frac{(r_1 + r_2)^2}{r_1 r_2} \tag{7b}$$

由此可见,如果 $r_1 = r_2 = r$,可从式中除去 r,方程式 7b 就等于 4。因此,当相互作用的两个分子大小相同时,反应的扩散速率常数与分子大小无关[6]。但是如果一个分子较大,一个分子较小,其速率将大于两个分子都是大分子的情况。造成这种差异的原因在于减少半径 r_1 而保持 r_2 不变(大于 r_1)时,对扩散常数 D 的影响大于对 α 的影响。因为扩散常数 D 与 $1/r_1 + 1/r_2$ 呈正比,半径较小时,D 值较大;而 α 仍然主要取决于大半径 r_2。例如,如果 $r_2 = r$,而 $r_1 = 0.1\ r$,那么方程式 7b 中的分子仅由 $4r^2$ 降为 $1.21\ r^2$,而分母则由 $1\ r^2$ 降到 $0.1\ r^2$,因此比值由 4 增至 12.1。从另一个角度看,与大的蛋白质抗原相比较,较小的半抗原由于具有较大的扩散能力,可以弥补其较小的结合区域,因为抗体可以向二者提供更大的结合区域。

解离速率 k_{-1}取决于结合键的强度[因为它影响到解离时的能障(activation energy barrier)]以及克服能障所需的热能 kT(其中 k 为 Boltzmann 常数)。解离所需的激活能量为初始能量与解离发生时系统必须达到的最高能量之间的差值。

正如 Eisen[7] 指出的,如果将分子大小和其他物理特性相近的一系列抗原分子进行比较,会发现它们与抗体的结合速率是十分相近的。亲和力的差异主要取决于解离速率的不同。

抗葡萄球菌核酸酶抗体就是一个很好的例子[8]。将核酸酶的多肽片段偶联于亲和层析柱,从抗天然核酸酶的抗体中分离纯化得到特异性针对 99~126 位氨基酸残基的抗体。这些抗体与天然抗原的亲和力为 8.3×10^8 mol/L, 结合常数 k_{on}为 4.1×10^5 L/(mol·s)。正如前面讨论到的,这个结合常数 k_{on}比小的半抗原分子低几个数量级[9]。将上述结果代入方程式 7,可知 k_{off}为 $4.9\times10^8 s^{-1}$。这是一个一级速率常数,可根据公式 $t_{1/2} = \ln2/k_{off}$计算出解离半寿期(half-time for dissociation)为 23 分钟。该速率也许代表了典型的高亲和力抗体($K_A \approx 10^9$ L/mol)与小的蛋白质抗原,如核酸酶($M_r \approx 17\,000$)反应时的情况。设计结合反应实验时,了解解离速率是十分重要的。因为如果测量的操作会干扰平衡,测量必须完成的时间(如分离结合部分与游离部分)就取决于解离半寿期。例如,解离半寿期为 23 分钟时,一个 2 分钟的操作程序意味着可以在明显的解离发生前完成抗原抗体复合物的稀释过程。但是,如果结合速率相同,而亲和力降低 10 倍,即使仍然保持在较高水平的 8×10^7 mol/L,在完成全部操作的时间内会有 50%的复合物发生解离。当我们讨论结合和亲和力的测定方法时,这一点尤为重要。

既然在设计实验时了解解离速率如此重要,那么有必要介绍一下它的测定方法。放射性标记抗原也许是最广泛运用的方法。反应达平衡后,测定结合的放射性活性的平衡浓度,随后加入过量的未标记抗原。由于放射性标记抗原刚解离就迅速被未标记抗原取代,放射性标记抗原重新结合的可能性很小。由此可以通

过测定结合至抗体的放射性活性随时间的减弱程度，计算解离速率①。

亲和力

从以上讨论可以明显地看到，抗原抗体反应的许多信息都与亲和力有关。因此，本节将对亲和力进行更详细的探讨，包括亲和力及其异质性(heterogeneity)的测定方法、多价抗体和(或)抗原的影响、以及发生在固相表面(双相系统)的抗原抗体相互作用的特殊效应。

与溶液中单价配体的相互作用

抗体与单价配体的相互作用是一种最简单的情况。其中可以包括抗半抗原抗体与真正的单价半抗原反应，以及从抗大分子的抗体中分离得到的特异性针对单个、非重复位点的抗体②。在后一种情况中，抗原是以单价方式与特定的研究用抗体发生反应。当然，识别的位点(抗原决定簇)必须是非重复性的，这个先决条件很重要。

如果抗体的结合位点各自独立(即抗原结合位点间无正向或负向协同作用)，那么与单价抗原反应时，可以将这些结合位点看作独立的分子。由此，在讨论许多问题时，我们可以使用“抗体结合位点浓度”(concentration of antibody-combining site)这一概念，而不管每个抗体分子上有几个位点(如 IgG 和 IgA 有 2 个，IgM 为 10 个)。

79

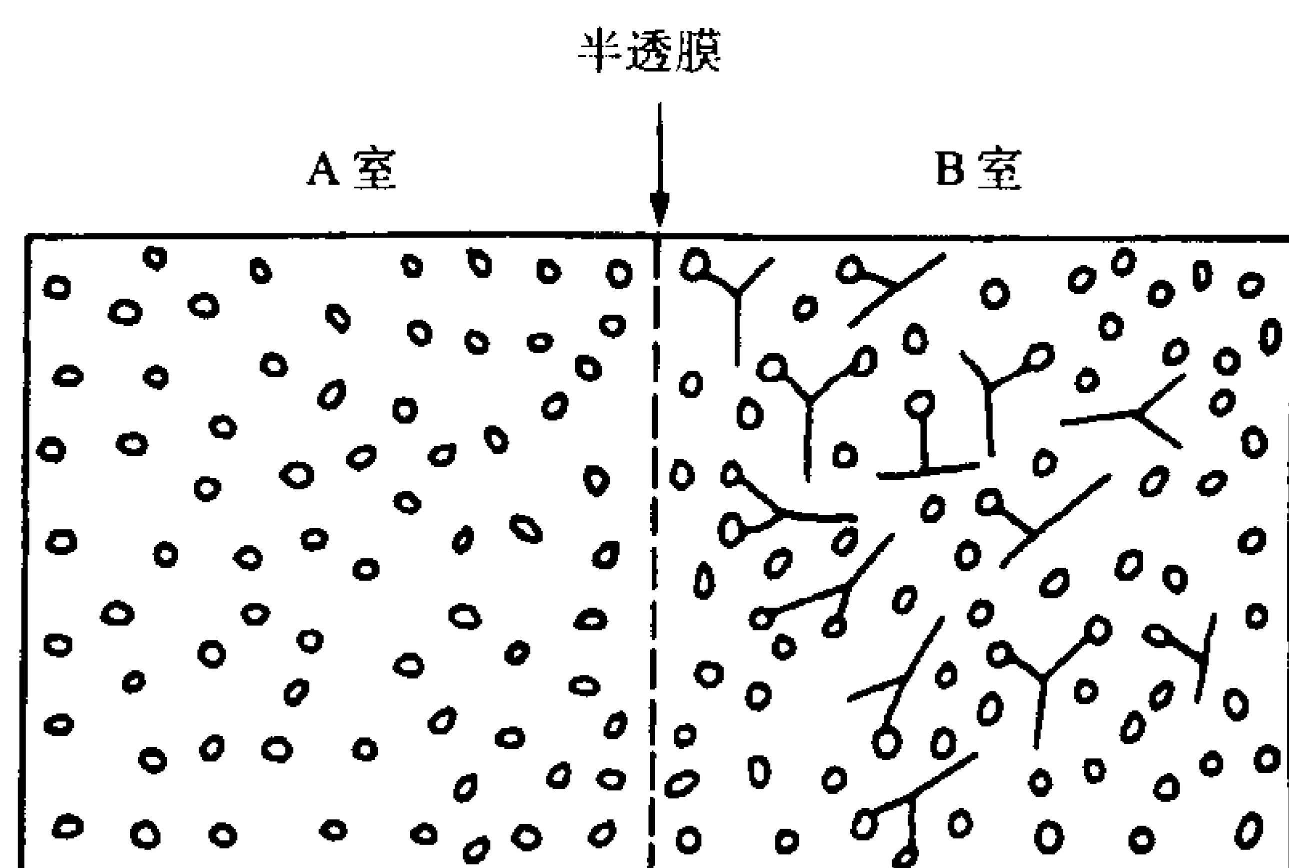


图 4.2　平衡透析。两个小室以半透膜分隔，半透膜允许配体自由通过而不允许抗体分子通过。在 B 室中加入抗体，在一个或两个室中加入配体。不论配体最初如何扩散，经过足够的时间达平衡后，配体分布如下：两个小室的游离配体浓度是相同的，B 室中还包含结合到抗体的额外配体。因此，结合配体浓度为两个小室的配体浓度之差，游离配体浓度为 A 室的配体浓度。由于这些浓度遵循质量作用定律(方程式 2)，可由方程式 3 或 3′，选择数种作图方式中的任一种，如 Scatchard 分析，计算亲和力 K_A。

测定一个抗体的亲和力，通常做法是保持抗体浓度不变，逐渐提高总的配体浓度，然后测定平衡状态时，结合的和游离的配体的浓度。也可改变抗体浓度，但分析过程稍复杂。平衡透析实验(equilibrium dialysis)也许是测定这些数据理论上最完美的方法[10,11]。图 4.2 对该方法进行了描述和解释。以半透膜分隔的两个小室，其中一个含有抗体，半透膜只允许配体(抗原)自由通过并在膜两侧达到平衡状态，而不允许抗体通过。与其他大多数方法相比，此方法最重要的特性是，在不干扰平衡的情况下就可测定两个小室各自的配体浓度。不足之处在于，此法只能用于可以自由通过半透膜的小分子抗原，且该半透膜不允许抗体通过。另一个技术缺陷是，测定结合抗原是以一个室的结合抗原与游离抗原之和减去另一个室的游离抗原量，因此结合抗原的测定必须依赖于游离抗原的测定。

另一类方法是使用放射性标记抗原与抗体反应以至平衡，然后采用物理方法分离游离抗原和结合抗原，再分别测定其含量。分离游离抗原和结合抗原的方法将在放射免疫分析方法一节中加以讨论。这类方法可以分别测定结合抗原和游离抗原，但可能干扰平衡。

① 这一方法假定所有结合位点是独立的，就如同抗体与单价配体。如果在结合过程中存在正向或负向的协同作用，加入大量的未标记抗原时，受体占位的改变就可能干扰已经结合到其他位点的放射性标记抗原的解离速率。

② 这种分离得的抗体可能是包含针对某一抗原结构域中相互交叠位点的不同抗体的混和物，但是因为两种抗体分子(或结合位点)不可能同时结合到同一抗原分子上，抗原仍然表现为有效单价形式。

Scatchard 分析

一旦获得实验数据，可以有许多种方法计算亲和力。这里将讨论两种。也许最为广泛使用的方法是 Scatchard 分析[12]（图 4.3，参考文献[13]）。质量作用定律可按方程式 3 的形式作图

$$[SL] = K_A([S]_t - [SL])[L] \quad (3)$$

80

分别以 B 和 F 代替[SL]和[L]，表示结合的和游离的配体。那么 Scatchard 方程式为：

$$\frac{B}{F} = K_A([S]_t - B) \quad (8)$$

请注意这个表面上非常简单的转换隐藏着一个十分重要的假定。方程式 3 圆括号中的[SL]代表结合抗体位点(bound antibody site)的浓度，因此($[S]_t - [SL]$)为游离的配体浓度[S]。但是在方程式 8 中，我们将[SL]替换为 B，表示结合的配体浓度。如果配体以单价结合，那么这个替换是正确的，因为每一个结合的配体分子相当于占用一个抗体位点。但如果配体为多价，可与多个抗体位点结合，那么方程式 8 只有在配体过量的情况下才是正确的，因为此时配体结合一个以上抗体的可能性很低。本节只讨论单价配体，但是将 Scatchard 分析运用于其他情况时，必须将此先决条件牢记在心。

从方程式 8 可以看出，B/F 对 B 作图时，应该为一条直线(单一亲和力时)，斜率为 $-K_A$，与横坐标的截距为抗体结合位点浓度(图 4.3)。这被称为 Scatchard 图，如果不是在恒定的总抗体浓度$[A]_t$，而是在不同的$[A]_t$情况下获得的数据，经过抗体浓度变换的另一种形式的 Scatchard 方程式就特别有用。但在这种变型中，需要单独测定总的抗体浓度，而不能通过图上截距计算。将方程式 8 除以总的抗体浓度(对于每个抗体分子上的位点数不作假定)可得到下式：

$$\frac{r}{c} = K_A(n - r) \quad (9)$$

其中 r 为每个抗体分子已被占据的位点数，n 为每个抗体分子的总位点数，c 为游离的配体浓度，即 $c = F$。即

$$r = \frac{B}{[\text{总的抗体}]} = \frac{B}{[A]_t}$$

$$n = \frac{[\text{位点数}]}{[\text{总的抗体}]} = \frac{[S]_t}{[A]_t}$$

其中$[A]_t$为总的抗体摩尔浓度。在这种 r/c 对 r 的 Scatchard 图中，斜率依然为 $-K_A$，r 轴上的截距为 n。由此可以测定每个抗体分子上的位点数。当然，如果从方程式 8 的截距中测定$[S]_t$，也可将$[S]_t$除以另外单独测定的抗体浓度，从而计算出每个分子的位点数。因此变换所有数据以适应 r/c 形式的惟一好处在于当数据是在抗体浓度改变的情况下获得的。如果不知道抗体浓度，只要抗体浓度保持不变，B/F 形式实际上提供了一个很方便的方法测量抗体(位点)浓度。既然已经知道不同类型抗体的 n 值(IgG 和血清 IgA 为 2，IgM 为 10)，进行抗体浓度与抗体位点浓度的转换在很多情况下是十分容易的事。

亲和力的异质性

如果实验用抗体为不同亲和力抗体的混合物时，分析就更为复杂。当抗体来源于免疫血清时，即使经过纯化使这些抗体成为单特异性的(例如所有的抗体都特异性地作用于抗原中的同一位点)，也不可避免地会遇到这一问题。例如，针对肌球蛋白的均一性单克隆抗体在 Scatchard 图上为一条直线(图 4.3A)，而用于制备该单克隆抗体杂交瘤的同一小鼠的血清抗体则表现为一条曲线(图 4.3B)。这种向上凹的曲线是异质性

抗体的典型表现。在激素和激素受体相互作用的系统中,受体位点间会发生负性协同作用(例如一个位点被占据后可降低邻近位点的亲和力)。此时,尽管不存在真正的亲和力异质性,也会由于负性协同作用的原因形成向上凹的 Scatchard 图。但是对于抗体,尚未证实这种构象效应,因而向上凹的 Scatchard 图意味着存在亲和力异质性。

理想情况下,可以想像所有沿着曲线切线的斜率代表着许多不同抗体亚群的亲和力。尽管这样在数学上并不严格正确,但事实上,曲线较陡峭的部分确实代表着高亲和力的抗体,而较平缓的曲线代表着低亲和力抗体。已经建立图形的分析方法来定量分析曲线的各个要素[14,15]。

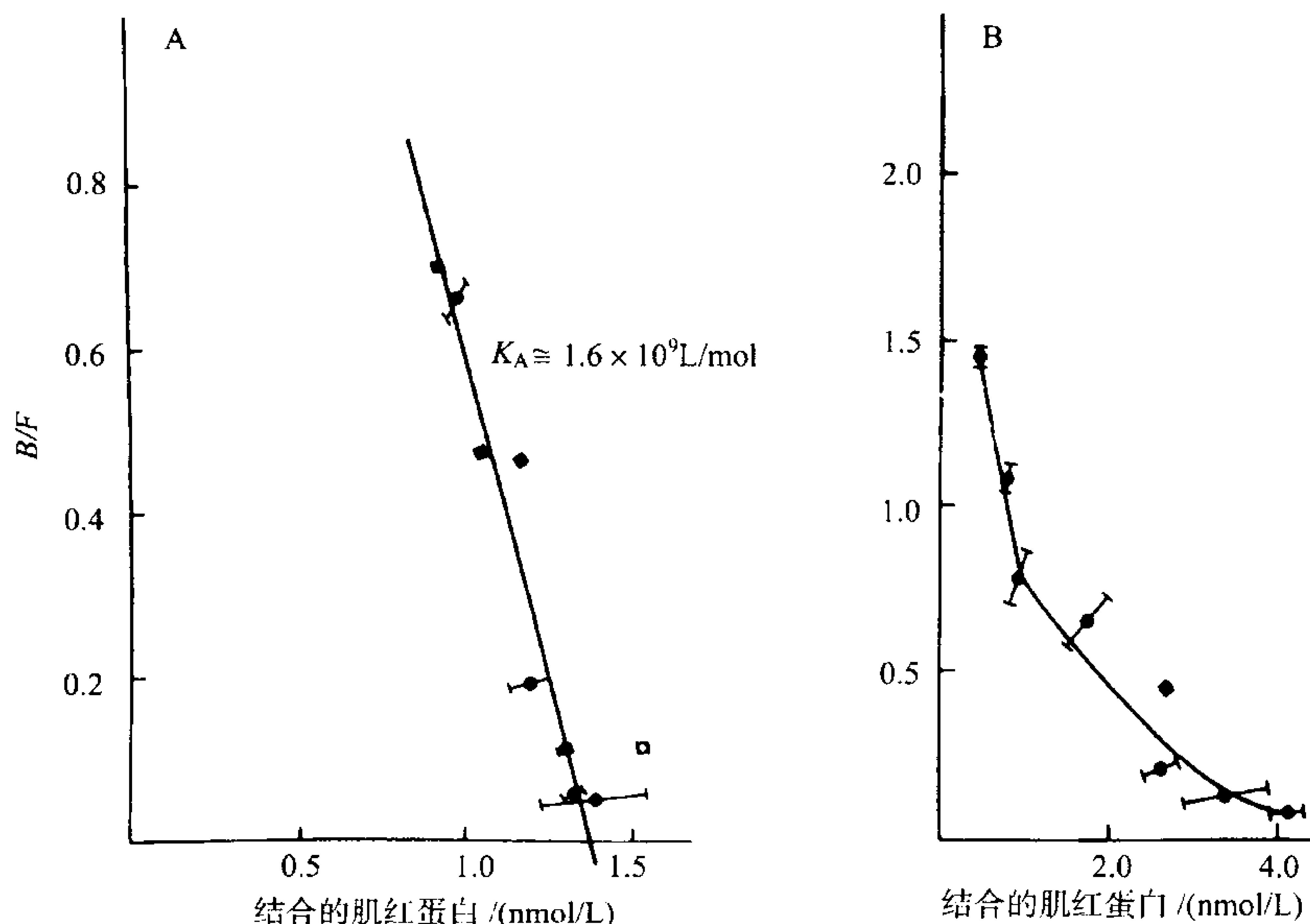


图 4.3 [^{3}H]标记的抹香鲸肌红蛋白与抗肌红蛋白单克隆抗体(A)以及血清抗体(B)结合的 Scatchard 分析。其中血清抗体源于制备该单克隆抗体杂交瘤时,提供融合用脾细胞的同一只小鼠。单克隆抗体(HAL 43 - 201E11 号克隆,5 号克隆)表现为一条直线,其斜率为 -1.6×10^9 L/mol,即 $-K_A$,直线在横轴上的截距为抗体结合位点数。相反,血清抗体表现为一条曲线(向上凹),显示了抗体的异质性。(经作者许可摘自参考文献[13]。)

Munson 和 Rodbard[16]就开发出一个综合性的和多功能的计算机程序(LIGAND),可以用任意数量的具有不同亲和力的抗体亚群拟合曲线。基于本章的目的,我们只讨论两种亲和力的情况,以及具有更大异质性时可能存在的平均亲和力类型,此外还包括以数学的方法估计异质性的程度(类似于变异性)。

当混合抗体中仅包含两种不同亲和力(k_1 和 k_2)的抗体亚群时,将方程式 3′的内容代入,可得到下式:

$$r = r_1 + r_2 = \frac{n_1 k_1 c}{1 + k_1 c} + \frac{n_2 k_2 c}{1 + k_2 c} \tag{10}$$

那么

$$\frac{r}{c} = \frac{n_1 k_1}{1 + k_1 c} + \frac{n_2 k_2}{1 + k_2 c} \tag{10'}$$

其中下标代表两个亚群。以 r/c 对 r 作图,可得到一个双曲线,其渐近线实际上就是两种成分的线性 Scatchard 图(图 4.4)。Bright 对这种情况进行了图形分析[17]。在 $c\to0$ 以及 $c\to\infty$ 的情况下,很容易发现横坐标的截距正是 $n_1 + n_2$(或在 B/F 对 B 的形式下,截距为结合位点总浓度$[S]_t$),纵坐标上的截距为 $n_1 k_2 + n_2 k_2$。因此,仍然可以从横坐标的截距中求得 n 的总和或$[S]_t$。问题在于如何获得两种抗体各自的亲和力

(k_1 和 k_2)和浓度(相应于 n_1 和 n_2)。如果 k_1 大于 k_2,可以根据两个截距的切线的斜率大致估计出亲和力,但是它不会完全平行于两个渐近线,而给出真正的亲和力,根据 n_1 和 n_2 以及 k_1 和 k_2 的相对大小,总会引入一定的误差。Bright[17]采用图形分析方法以及 Munson 和 Rodbard[16]采用计算机程序的方法都已经解决这一问题。

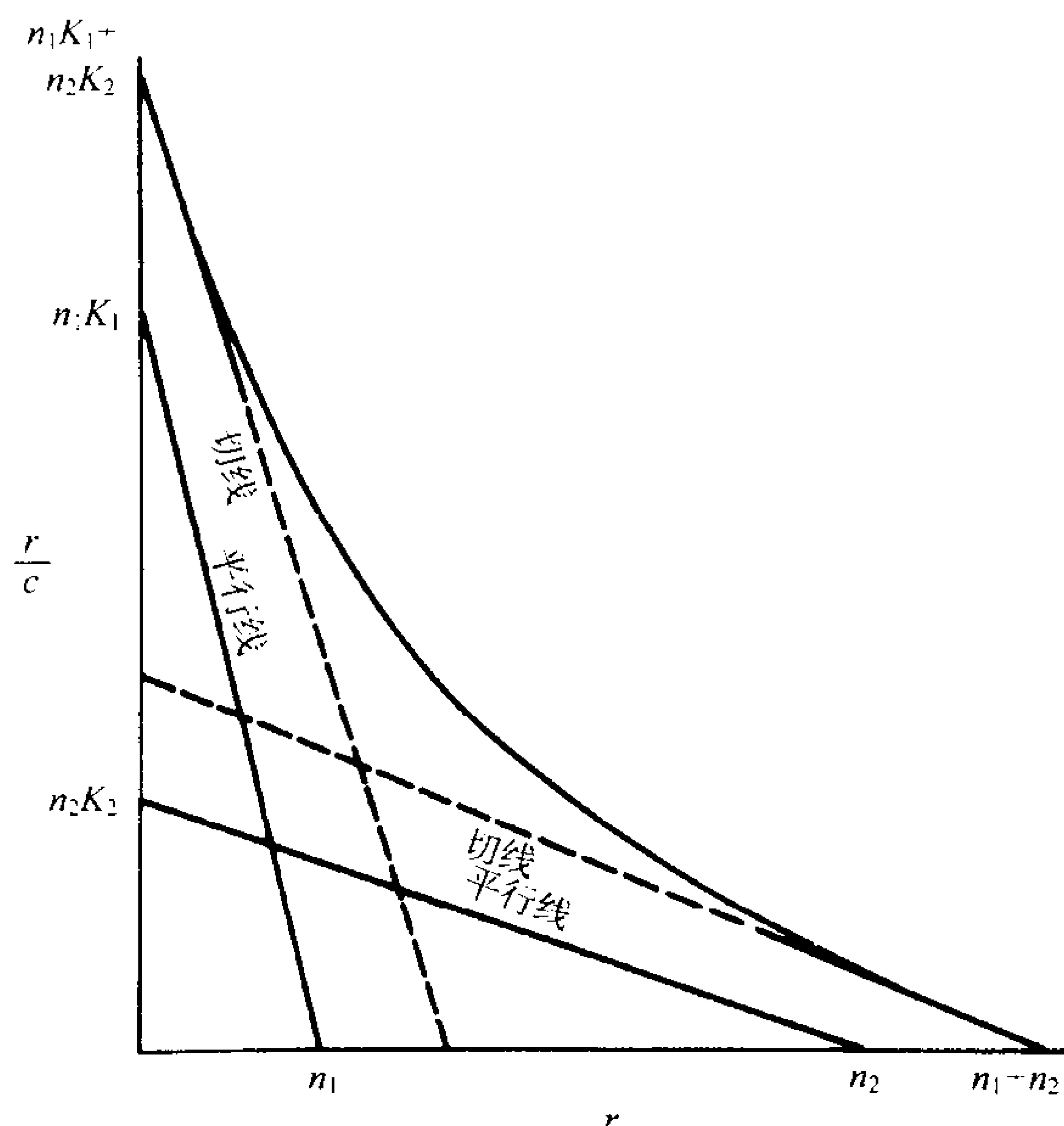


图 4.4 包含 2 种不同亲和力的抗体混合物的 Scatchard 曲线图分析。假定 2 种抗体的亲和力分别为 K_1 和 K_2,每个分子上的结合位点数分别为 n_1 和 n_2。r 为结合抗原浓度除以总的抗体浓度(也就是每个抗体分子上的结合位点数),c 为游离抗原浓度。图中双曲线可被分解为它的 2 个渐近线,分别相当于抗体混合物中 2 种成分的线性 Scatchard 图。双曲线在截点处的切线与渐近线相近,因此切线的斜率只是近似于而非精确等于 2 种抗体的亲和力。但在 r 轴上的截距相当于 $n_1 + n_2$。需要注意的是,在此例中,n_1 和 n_2 必须以抗体总浓度,而不是每一种成分的抗体浓度来定义。

81

平均亲和力

当然,在实际工作中,很少能事先知道混合物就是由两种亚群组成,而且绝大多数抗血清的不均一程度更为复杂。因此,上述情况主要用于说明原理,而不具有实际价值。当面对一个 Scatchard 曲线图时,通常更关心的是平均亲和力(average affinity)是多少?也许还有亲和力的变异性(variance of the affinities)有多少?而不太可能确定存在多少不同亲和力亚群。

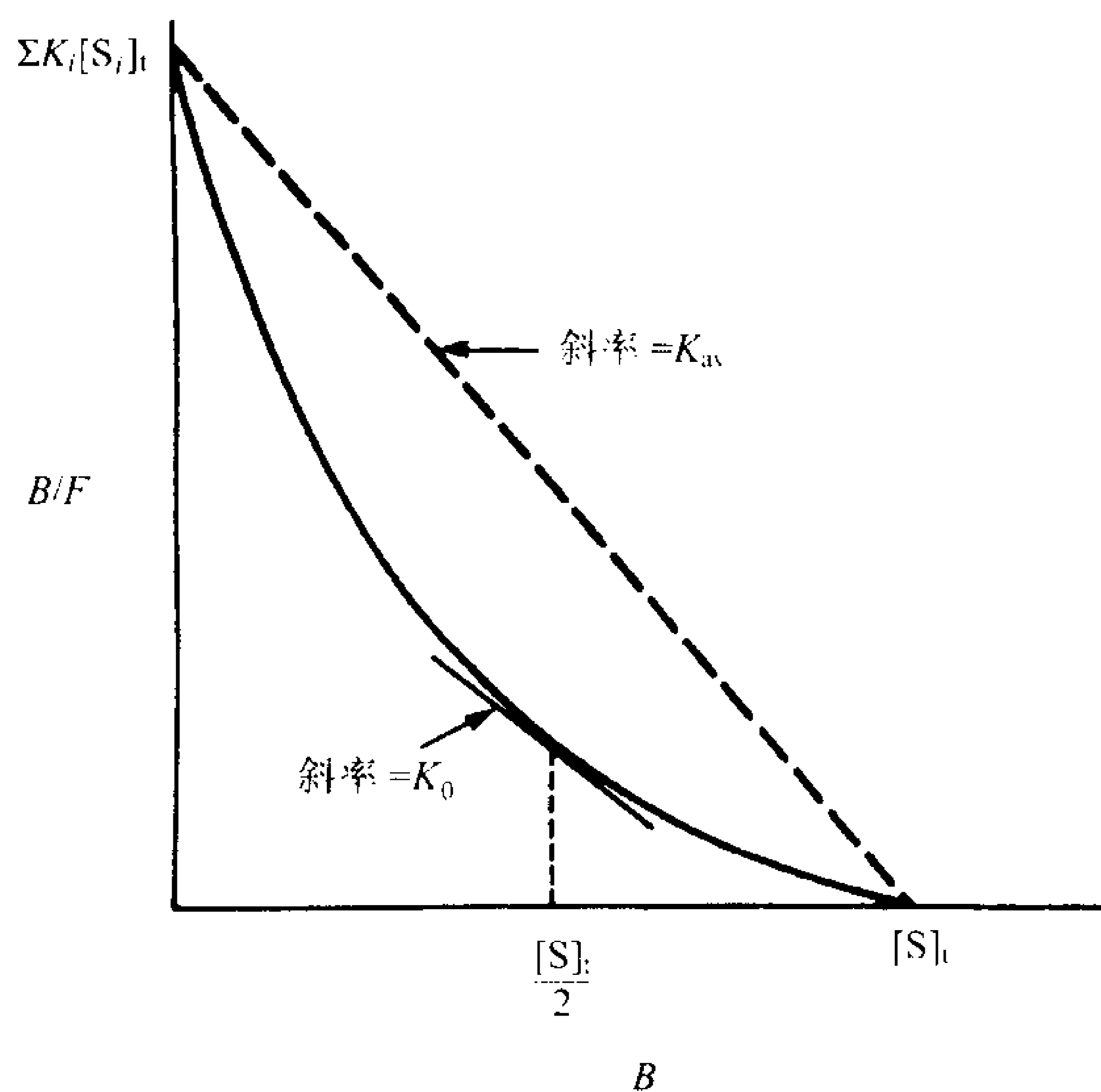


图 4.5 根据 Scatchard 图定义不均一抗体亚群的平均亲和力类型。K_0 为一半的抗体位点被结合,即 $B = [S]_t/2$ 时,切线的斜率。因此,K_0 相当于亲和力中位数。K_{av} 为截点之间弦的斜率,相当于亲和力的加权平均,即根据每一种亲和力在抗体亚群中的比例加权。(摘自参考文献[18]。)

假设有 m 个亚群,各自具有不同的位点浓度 $[S_i]$ 和亲和力 K_i,那么游离配体浓度 [L] 以及结合配体的抗体的各自比例可由方程式 3′得到:

$$B_i = \frac{K_i[S_i]_t[L]}{1 + K_i[L]} \tag{11}$$

结合浓度的总和为

$$B = \sum_{i=1}^{m} B_i = \sum_{i=1}^{m} \frac{K_i[S_i]_t[L]}{1 + K_i[L]} \tag{11'}$$

以 F 代替 [L] 并除以该值,可得到下式:

$$\frac{B}{F} = \sum_{i=1}^{m} \frac{K_i[S_i]_t}{1 + K_i} \tag{12}$$

或等价于

$$\frac{r}{c} = \sum_{i=1}^{m} \frac{K_i n_i}{1 + K_i c} \tag{12'}$$

可将它们看作普遍意义上的方程式 10 和 10′。取 $F \to 0$ 和 $F \to \infty$ 的极限时，又可知：

$$\text{纵坐标的截距} = \sum_{i=1}^{m} K_i[\mathrm{S}_i]_\mathrm{t} \tag{13}$$

$$\text{横坐标的截距} = \sum_{i=1}^{m}[\mathrm{S}_i]_\mathrm{t} = [\mathrm{S}]_\mathrm{t} \tag{14}$$

因此仍然可以从横坐标的截距计算总的抗体位点浓度(图 4.5)[18]。

从 Scatchard 图上可以得到两种类型的平均亲和力[18]。也许更广泛使用的 K_0 实际上更准确地说应该是亲和力中位数(median affinity)，而不是亲和力的平均值(mean affinity)。它定义为一半位点发生结合，即 $B = [\mathrm{S}]_\mathrm{t}/2$ 时，切线的斜率(图 4.5)。第二种类型的平均亲和力，K_{av}，为亲和力的加权平均，即根据每一种亲和力在抗体亚群中的比例加权。因此得到比值：

$$K_{av} = \sum_{i=1}^{m} \frac{K_i[\mathrm{S}_i]_\mathrm{t}}{[\mathrm{S}]_\mathrm{t}} \tag{15}$$

82 从方程式 13 和 14 可知，K_{av}为 B/F 和 B 轴上两个截距的比值，即弦的斜率(图 4.5)。因此，与 K_0 相比，K_{av}这一类加权平均亲和力在某些情况下很容易从图上获得，这一特性在其他类型的图上也是十分有用的。

异质性指数：Sips 图

对异质性的抗血清，可能希望了解亲和力异质性的程度。例如，当亲和力的分布符合正态(高斯)分布时，希望知道其方差[19,20]。目前已经建立的许多复杂分析方法不需要对分布的形态作出许多假设[21~23]，但是由 Sips[24] 首先提出的第一个，也是最广泛使用的异质性指数(Indices of Heterogeneity)强制性假设亲和力符合一种分布，即近似于正态分布。Nisonoff 和 Pressman[25] 将它们运用于抗体的异质性，并由 Karush F 和 Karush SS[26] 进行了总结。将数据拟合于假设的结合函数

$$r = \frac{n(K_0c)^a}{1 + (K_0c)^a} \tag{16}$$

除了异质性指数 a，此方程式类似于方程式 3′和 11(Langmuir 吸附等温线)。指数 a 的允许范围在 0 到 1 间。当 $a = 1$ 时，方程式 16 等同于方程式 3，无异质性。当 a 向 0 降低时，异质性增加。为从图上求得 a 值，可将方程式 16 进行代数变换后作图：

$$\lg\left(\frac{r}{n-r}\right) = a\lg c + a\lg K_0 \tag{17}$$

因此，$\lg[r/(n-r)]$对 $\lg c$ 的斜率即为异质性指数 a。

C. DeLisi(私人通讯)根据自由能 $RT\ln K_0$ 推导出 Sips 分布的变异性[第二势差(second moment)]。结果显示，分布的离散度(dispersion)或宽度为 a 的函数：

$$\frac{\sigma_{\mathrm{Sips}}^2}{R^2T^2} = \frac{\pi^2(1-a^2)}{3a^2} \tag{18}$$

这对于计算 σ_{Sips}值很有用处，只要认识到这不是一个真正的高斯分布，σ_{Sips}值就可看作是标准差的近似。此外，正如上面提到的，使用 Sips 分布需要假设亲和力(实际上为自由能)是对称于平均值连续分布的，近似于高斯分布。通常这种假设是不成立的。

B/F 对 F 或 T 作图

另一个估计亲和力的有效方法是将 B/F 对 F 或 T 作图，B、F 和 T 分别代表结合的、游离的以及总的配

体浓度[18](图 4.6)。为使讨论简单化,让我们定义结合/游离的比值,B/F,为 R,定义 R_0 为截距,或游离配体 $F \to 0$ 时的极限。首先,当为均一抗体时,从方程式 3′可知

$$R = \frac{B}{F} = \frac{K[\mathrm{S}]_t}{1 + KF} \tag{19}$$

以及

$$R_0 = \lim_{F \to 0} \frac{B}{F} = K[\mathrm{S}]_t \tag{20}$$

定义图的中点为 R 降至初始值 R_0 一半,即 $R = K[\mathrm{S}]_t/2$ 时所对应的点(图 4.6)。当为均一性抗体(即单一亲和力)时,进行简单代数变换[18],以 $K[\mathrm{S}]_t/2$(即 $R_0/2$)代替方程式 8 中的 B/F,可见在中点①:

$$F = \frac{1}{K} \tag{21}$$

并且

$$B = [\mathrm{S}]_t/2 \tag{22}$$

那么总浓度 T 为:

$$T = B + F = \frac{[\mathrm{S}]_t}{2} + \frac{1}{K} \tag{23}$$

因此,如果以 B/F 对 F 作图,中点就是 $1/K$。但是通常更方便的实验方法是将 B/F 对 T 作图。在这种情况下,中点不再简单地为亲和力的倒数。从方程式 23 可见,如果假设中点为 $1/K$,导致的错误偏差为抗体结合位点浓度的一半。因此,只有在$[\mathrm{S}]_t/2$ 明显小于 $1/K$,即抗体浓度低于解离常数时,以 B/F 对 T 作图,才能较好地根据中点估计亲和力的大小。事实上,如果亲和力太高,以至于 $1/K$ 明显小于$[\mathrm{S}]_t/2$ 时,只能测定抗体浓度,而完全不能测定亲和力[18](图 4.6)。

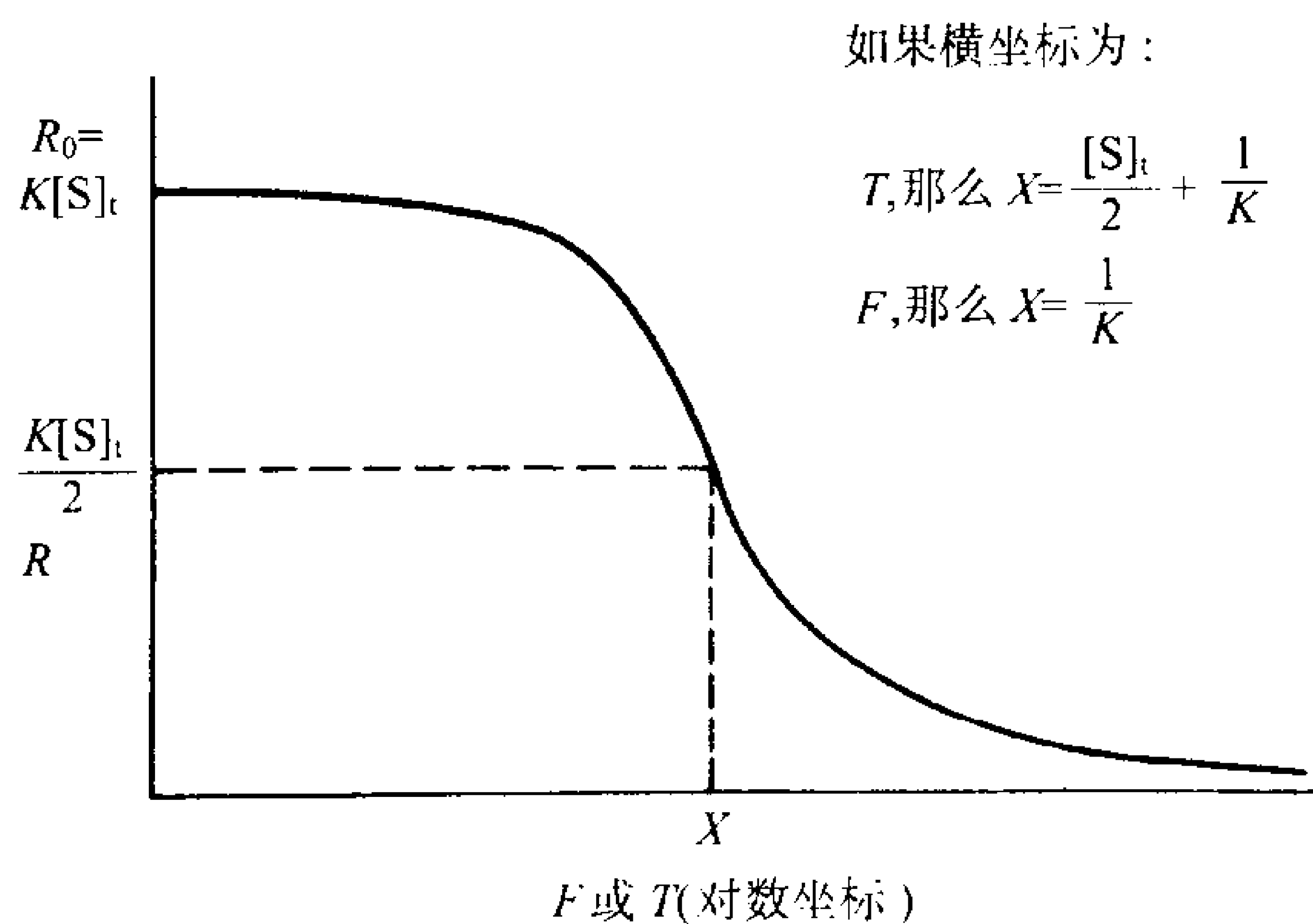


图 4.6 结合/游离的比值 R 作为游离抗原浓度(F)或总抗原浓度(T)的函数示意图。曲线类似于 S 形。在 R 对 T 图中,曲线的中点($R = R_0/2$ 时)包含 1 个依赖于抗体位点浓度($[\mathrm{S}]_t$)的项,而在 R 对 F 图中,曲线的中点正是 $1/K$,与抗体浓度无关。(摘自参考文献[18]。)

83

对异质性抗血清,我们已看到

$$R_0 = \sum_{i=1}^{m} K_i[\mathrm{S}_i]_t \tag{13}$$

因此,在中点,即 $B/F = R_0/2$ 时,很容易发现

$$K_{av} = \left(\frac{B}{F}\right)\left(\frac{2}{[\mathrm{S}]_t}\right) = \frac{R_0}{[\mathrm{S}]_t} \tag{24}$$

因此仍然可以按上述定义的方法[18]测定平均亲和力。

将 B/F 对 F 的曲线看作一个阶跃函数(step function),就可得知,不管平均亲和力的大小,亲和力异质性的作用总是使曲线变宽或使斜率变缓。对每一个亲和力为 K_i 的抗体亚群,在游离配体浓度 $F = 1/K_i$ 时,会

① 需要特别注意的是,R_0 必须是 F 真正接近于 0 时的 B/F 的极限。在 RIA 实验中,示踪剂的浓度明显大于 $1/K$,即使将未标记配体的浓度降至 0,也不能真正达到 R_0 的极限。因此,示踪剂浓度也必须是忽略不计的,否则会错误低估 R_0,导致错误测定亲和力。

有 B/F 的 50%发生中和。在 F 值较低的情况下，高亲和力抗体会发生中和，而低亲和力的抗体需要更高的 F 才能被中和。由此产生的阶跃函数类似于 pH 滴定中不同 pK 值产生的连续跃迁。

内在亲和力

我们曾经详细讨论过的亲和力 K_A，又被称为内在亲和力(intrinsic affinity)，即溶液中每个抗体结合位点的亲和力。之所以能够这样处理，而不管抗体的价数，是因为在所有的方程式都使用结合位点浓度[S]，而非抗体分子浓度[A]。当抗体为多价，并且使用总抗体浓度而非位点浓度时，即使不存在结合位点间的协同作用，也会由于统计的原因，使实际的亲和力(actual affinity)不同于内在亲和力。如果我们检视 IgG 这一类二价抗体时，就可以发现产生这种差异的原因。假设两个位点是等价的，并且互不影响邻近位点的结合。在整个过程中配体为单价。那么存在两个结合步骤：



$$A + L \underset{}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} AL,\ AL + L \underset{}{\overset{K_2}{\rightleftharpoons}} AL_2 \tag{25}$$

相应的实际亲和力为

$$K_1 = \frac{[AL]}{[A][L]},\quad K_2 = \frac{[AL_2]}{[AL][L]} \tag{26}$$

如果两个等价位点的内在亲和力为 K，那么 K_1 实际上是两倍 K，因为在第一步，第一个配体将要结合时，提供的位点数[S]为抗体浓度的两倍。但是，一旦第一个位点发生结合，第一步的反向(解离)反应只能发生在一个位点，即被结合的位点。相反，对第二步，正向反应只有一个可供结合的位点；而反向反应，$AL_2 \rightarrow AL + L$，任何一个位点都可以发生解离回到 AL 的状态。第二个位点的结合不需要第一个位点发生解离，并且由于位点是相同的，并不能找出差别。因此对第二步，反向反应的表观位点浓度(apparent concentration of site)是正向反应的两倍，因此第二步的亲和力 K_2 将仅是内在亲和力 K 的一半。

这种统计效应很容易推广至具有 n 个位点的抗体[27]：

$$K_1 = nK \text{ 和 } K_n = \frac{1}{n}K \tag{27}$$

对于中间步骤，可有两个导出项[7,27]，并得出

$$K_i = \frac{n - i + 1}{i}K \tag{28}$$

在[L]很低，以至于抗体只有一个位点与单价抗原结合时，如果对有效亲和力(effective affinity)(基于摩尔抗体浓度)感兴趣，实际亲和力就比内在亲和力更为重要。那么对于 IgG 或 IgM(每个分子上分别具有 2 个或 10 个位点)，表观亲和力理论上为内在亲和力的 2 倍或 10 倍。在大多数情况下，使用位点浓度和内在浓度更为容易。上面提及的各种分析方法，如 B/F 对 F 作图或 Scatchard 图中，不论是 B/F 对 B 作图，还是 r/c 对 r 作图，都会生成内在亲和力。也正是内在亲和力揭示了抗体与配体相互作用的特性。

一旦涉及多价配体这个领域，多价抗体与多价配体之间多点结合的实际亲和力或有效亲和力会大大高于每一个结合位点的内在亲和力。这将是下一节的主题。

与多价配体的相互作用

到目前为止，我们仅讨论了单价配体，以及对特定的抗体而言，配体表现为有效单价的情况。但是，在很多情况下，配体拥有多个重复相同的抗原决定簇，而且每一个抗原决定簇都可独自与二价或多价抗体上的各

个结合位点相结合①。虽然任何单个抗体结合位点与抗原决定簇相互作用的内在亲和力都与前一节讨论的相同,但是由于单个抗体分子即可与单个多价抗原一个以上的抗原决定簇结合,表观或有效亲和力会更高。Karush 将这种现象称为"单配二价"(monogamous bivalency)。像这样单一抗体分子与单一抗原分子的结合既可发生在溶液中,也可发生于一种分子在溶液中,而另一种分子在固相表面,如细胞膜或微量滴定板。我们首先讨论在溶液中的情况,然后讨论当一种反应物结合于固相表面时,需要额外考虑的因素。

单配二价

Crothers 和 Metzger[29] 以及 Karush[28] 曾对一种二价抗体与具有两个抗原决定簇的抗原发生反应的情况作过详细研究。假定抗体的两个位点分别为 S 和 S′,抗原决定簇为 D 和 D′。需注意的是,实际上我们并不能区分 S 和 S′以及 D 和 D′。抗原和抗体的相互作用可分为两个步骤,一个是双分子间反应(bimolecular reaction)



紧接着是一个分子内反应(intramolecular reaction)

84



第一步的结合常数 K_1 与内在亲和力 K 相关。只是因为 S 和 S′以及 D 和 D′之间的简并性(degeneracy),需要简单地乘以统计因子 4。这是抗原抗体典型的二级反应(second-order reaction)。但是,第二步(方程式 30)则为一级反应,因为反应物 S′和 D′已通过第一步形成的 S—D 键形成化学连结(虽然是非共价的),第 2 步反应实际上是单一复合物分子在两种状态间的互换。一级平衡常数 K_2 不同于 K_1,并非溶液中 S 和 D 浓度的函数。正向反应可能更依赖于复合物的几何形状以及臂的柔韧性;或者说 S′和 D′相互碰撞的概率以及它们以正确方向反应以至结合的概率依赖于 S′和 D′链间的距离以及移动的自由度,而不是溶液中的分子密度(即浓度)。

另一方面,第二步中反向反应的速率常数与简单的单价反应 SD→S + D 一样。这是因为解离反应依赖于 S′D′(或 SD)间的强度,而不受其他 SD 间相互作用的影响,除非为保证 S 和 D 以及 S′和 D′能够同时结合,在它们之间形成角度时引入了拉力。值得注意的是,如果假定一个类似反应 S′—S—D—D′中均为共价连结,那么与该反应的内在亲和力 K_2'相比,第二步的 K_2 将具有统计因子 1/2。因为在方程式 30 的正向反应中,只有一对可以发生反应,而在反向反应中,无论是 S′和 D′或 S 和 D,任一对发生解离均可产生同样的结果。

如果希望了解整个反应的表观亲和力或观察到的亲和力(observed affinity)



由于两个反应步骤的自由能,ΔF_1 和 ΔF_2 是可以相加的,因而观察到的亲和力将是 K_1 和 K_2 的乘积

$$K_{obs} = K_1 K_2 \tag{32}$$

这里 K_1 和 K_2 的定义中已包含统计学上的简并性因子(statistical degeneracy factor)②。如方程式 7 所示,平衡常数 K_1 和 K_2 均为正向和反向速率常数的比值。除了前面提到的第二步正向反应,4 个速率常数均与

① 如果只有抗原为多价,抗体仍为单价,如 Fab 片段,那么仍然可以采用前面讨论的方法进行分析。

② 如果不将这些统计因子(statistical factor)包括在 K_1 和 K_2 中,方程式应为:$K_{obs} = 2K_1K_2$

S 和 D 之间的内在亲和力有关。因此，假设已经知道内在亲和力 K，预测 K_{obs} 的困难将主要来自对 K_2 的几何(空间)分析。Crothers 和 Metzger[29] 对特定情况下的这一难题进行了分析。定性地讲，K_2 是大于还是小于 K，取决于以下因素：第二步中 S′和 D′的强制接近度(enforced proximity)，以及相应于 S 和 S′之间易于接近的可能距离，D 和 D′之间的距离，后者则取决于抗体臂的长度和它们之间铰链区的柔韧性(见第 3 章)。因此，既然 K_1 的值与 K 相近，只受统计因子的影响，此单配二价反应的表观亲和力，K_{obs}，可能会显著地低于或显著地高于 K_2。如果 K_2 与 K 处于同一数量级，那么 K_{obs} 就会是 K_2 的几个数量级，变得十分巨大(例如，如果 K 约为 10^9 L/mol，那么 K_{obs} 就会大约为 10^{18} L/mol)。解离半寿期会长至数千年。虽然在实际上，可能由于结构的限制[30]，单个位点的表观亲和力很少能够大于 K 几个数量级，但从中也可看出这样的单配二价反应何以能够表现为不可逆性的。

既然单配二价可导致表观亲和力的明显增高，那么当 IgM 分子与一个多价配体多点结合时，表观亲和力就可能更高。IgM 结合至小的单价配体时为 10 价，当它结合至大的多价配体时却往往由于空间限制而表现为 5 价。但是，即使是 5 点结合也可导致非常紧密的相互作用。因此，对于同一抗原，即使 IgM 分子的内在亲和力往往低于 IgG 分子[28]，IgM 的表观亲和力却可以高许多。

双相系统

在双相系统(two-phase system)中，同样也可见到由于多点结合导致亲和力增加的现象。例如多价抗体结合至细胞表面抗原或人工介质表面[如琼脂糖凝胶(Sepharose)或微量滴定板的塑料表面]；多价配体结合至 B 细胞表面、Sepharose 微球或塑料板上的抗体；或任一成分结合至抗原-抗体沉淀。基于前面提到的原因，多价抗体或多价抗原与固相表面的多个位点单配结合时，表观亲和力会很大，甚至反应变为不可逆性的。

但是，另一种效应也可提高双相系统的有效亲和力，而且即使对单价抗体(Fab 段)或单价配体也是适用的。该效应源自固相表面结合位点的有效局部浓度(effective local concentration)明显增加，如果相同数量的位点分布于整个溶液中，浓度就会大大降低[31]。从另一角度来看，产生此种效应是因为在液相和固相的交界处，没有遵守关于结合常数 K_A 的一个基本假定，即反应物随机分布于溶液中。(在某种程度上，多价导致的亲和力增高也是由于这个原因。)DeLisi[32] 以及 DeLisi 和 Wiegel[33] 分析了这种情况，并将反应分为两步：①扩散过程，这一步使抗原和抗体以正确的方向相互接近；②反应过程本身。当抗原和抗体到达复合物的位置，但尚未发生反应时，此时的复合物称为遭遇复合物(encounter complex)。反应可用以下方程式来表示：



$$S + D \underset{k_-}{\overset{k_+}{\rightleftharpoons}} S\cdots D \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} SD \tag{33}$$

其中 S 为抗体位点，D 为抗原决定簇，k_+ 和 k_- 为正向和反向扩散速率常数，k_1 和 k_{-1} 为遭遇复合物形成后，正向和反向反应速率常数。如果遭遇复合物处于一种稳定态，总的速率常数为

$$k_f = \frac{k_1 k_+}{k_1 + k_-} \tag{34}$$

85

$$k_r = \frac{k_{-1} k_-}{k_1 + k_-} \tag{35}$$

其中下标 f 和 r 分别表示正向和反向[32]。根据方程式 7，结合常数为二者的比值，或

$$K_A = \frac{k_1 k_+}{k_{-1} k_-} \tag{36}$$

k_1 和 k_- 相对数量级决定了遭遇复合物的可能命运：倾向于相互结合形成 SD 或者随反应物的扩散而分开。

现在假设 k_- 慢于 k_1。那么SD结合复合物可能与遭遇复合物S…D互换数次后，遭遇复合物才能分开，并且其中一个反应物扩散到溶液中。如果表面有多个抗原位点D，那么在SD解离形成S…D后，即使是单价抗体(Fab)也更倾向于与原位点或邻近位点重新结合，而不是扩散到溶液中，这一过程同样依赖于上述速率常数的相对数量级。以更大的可能性与表面再结合而不是扩散开是这一效应的基本特性。DeLisi[32]以及DeLisi和Wiegel[33]给出了与细胞反应时的数学处理方法。

Silhavy等[34]则对于同一或类似效应给出了一个略有不同但十分有用的分析。他们将某种能够与其配体有效结合的蛋白质放入透析袋，然后研究配体从透析袋扩散出来的过程。当配体浓度足够低，以至于游离蛋白质位点过量时，配体从透析袋中退出的速率就不再简单的是其扩散速率，也不是简单的蛋白质配体复合物的解离速率。他们发现，在这些条件下，配体的退出速率遵循准一级动力学(quasi-first-order kinetics)，只是其半寿期长于无蛋白质情况下的半寿期，二者的比值为$(1+[P]K_A)$

$$t_+ = t_-(1+[P]K_A) \tag{37}$$

其中[P]为蛋白质位点浓度，K_A 为亲和力，t_+ 和 t_- 为透析袋中有或无蛋白质时的半寿期。

此例中，蛋白质位于溶液中，因此研究者可以使用实际蛋白质浓度和实际内在亲和力 K_A。当蛋白质位于两相的表面时，很难知道将什么作为有效浓度。但是由于透析袋中蛋白质局部浓度很高，可近似看作结合于固相表面的局部高浓度。两种效应的作用机制及其意义是基本相同的。例如，在透析的情况下，10μmol/L的中等抗体位点浓度和10^8 L/mol的亲和力可使配体的退出速度(rate of exit)降低1000倍。原本需要3小时完成的透析现在需要4个月的时间！很容易看出保留效应(retention effect)如何使中等强度的亲和力表现为无限大的亲和力(也就是反应表现为不可逆性)。保留效应也不仅仅适用于免疫系统，它还适用于蛋白质的局部浓度也可能很高的细胞表面或细胞成分之间的相互作用。特别是双相系统的原则也适用于T细胞表面抗原特异性受体与B细胞一类的抗原呈递细胞或靶细胞表面的MHC分子复合物之间的相互作用。

最后值得指出的是，由于保留效应依赖于局部未结合位点的冗余度，加入充分过量的非标记配体可中和这些位点，进而减轻或消除保留效应，大大加速标记配体的解离或退出速率。非标记配体的这一作用可用于测定保留效应，只是必须意识到，在某些情况下，同样的结果也可能是由于受体位点间的负性协同作用所致。

放射免疫分析和相关方法

自从1960年Yalow和Berson[35]首次提出放射免疫分析(radioimmunoassay，RIA)以来，该方法已迅速成为检测各种生物分子浓度的各项技术中，应用最为广泛，灵敏度最高的技术之一。本章前面几节已经涉及到理解和应用RIA技术的大多数基本原则。本节将讨论RIA的概念和方法步骤。如需详细的操作步骤，我们推荐Chard[36]、Rodbard[37]以及Yalow[38]等人的专著。

RIA的中心思想在于，高度放射性标记的痕量抗原与低浓度的特异性高亲和力抗体之间的结合，对于未标记抗原的竞争十分敏感，同时也是十分特异性的。因此，可以通过观察样品中抗原与标记抗原竞争性结合抗体的能力测定样品中的抗原浓度。即使待测分子处于包含其他多种物质的体液中，这一方法也可用于测定极低浓度的分子。在RIA中，研究者需要制备适当的高亲和力抗体和放射性标记抗原，建立结合和游离标记抗原的分离方法，确定满足最大灵敏度的最适抗体浓度和标记抗原浓度，根据已知浓度的竞争性非标记抗原绘制标准曲线，最后从中读出待测样品的抗原浓度。研究者还必须选择处理数据的最佳作图方法或计算方法。在本节中，我们将讨论除抗体制备方法以抗原标记方法以外的其他操作步骤及其缺陷。

结合抗原和游离抗原的分离

不论研究者采用什么参数衡量待测样品中未标记抗原的竞争量，这一参数总会是结合或结合和游离标记抗原的函数。因此，最重要的技术要求是明确地分离结合抗体的标记抗原与游离标记抗原的能力。通常

要求物理性分离结合的和游离的标记配体，以及独立测定两个组分的放射活性。如果在结合的组分中污染了游离的配体，或与此相反，都会得到错误的结果，其程度取决于所得数据在结合曲线上的位置。

液相分离方法

86 液相分离方法的优点在于结合过程与抗体的内在亲和力相关。但是，分离结合抗原和游离抗原的过程必须不干扰平衡。基本方法有三种：沉淀结合抗原的抗体，游离抗原保留在溶液中；沉淀游离的抗原，抗体和结合的抗原保留在溶液中；采用凝胶过滤，根据分子的大小将游离抗原和结合抗体的抗原分离。对于大批量的样品，最后一种方法过于繁琐，而且费时太长，很难保证分离过程不干扰平衡。因此，RIA 中很少使用凝胶过滤柱。

沉淀抗体也许是应用得最为广泛的方法。如果抗原（M_r 30 000）明显小于抗体分子，那么使用硫酸铵[39]或聚乙二醇（M_r 6000，10%m:m）[40]将绝大部分的抗体沉淀下来时，抗原仍然可以保留在溶液中。因此，上述两种试剂是最为常用的。例如，完成聚乙二醇的沉淀和离心步骤总共只需不到 2 分钟的时间，因而加入聚乙二醇导致的稀释效应尚未发生，就已经完成了结合抗原和游离抗原的分离[41]。（注意：如果没有使用全血清，就必须加入非特异性的载体 γ 球蛋白，以形成肉眼可见的微粒。）但是，如果抗原的分子质量大于 30kDa 到 40kDa，或者抗原不是球蛋白，完全沉淀抗体所需的聚乙二醇浓度就可能沉淀 10% 的游离抗原，由此产生无法接受的高背景值。如果抗体主要是某种 IgG 亚类，可结合葡萄球菌蛋白 A 或蛋白 G，则可以利用蛋白 A 或蛋白 G 与 IgG 的高亲和力结合，通过结合蛋白 A（或蛋白 G）的 Sepharose 或福尔马林杀死的葡萄球菌（Cowan I 株）来沉淀抗体。将带有抗体及其结合抗原的微球或葡萄球菌离心，游离抗原就保留在溶液中[42]。最后，也可使用源于另一种属的特异性二抗来沉淀抗体。这种方法最为广泛，但也是最麻烦的一种方法。正如下面将要讨论到的，导致沉淀最完全时，并非抗体过量时，而是在滴定曲线中点处的等价点（point of equivalence），此时抗原（实为一抗）和抗体（二抗）浓度接近一致。因此，必须加入载体免疫球蛋白以维持免疫球蛋白浓度恒定，同时通过滴定二抗（抗免疫球蛋白抗体）来确定等价点。更糟的是，由于晶格以及足够大凝集块的形成速度远远慢于抗原抗体结合反应本身，沉淀反应是十分缓慢的。通常二抗孵育时间需要 24 ~ 48 小时甚至更长，在此期间，由于二抗的稀释作用，会导致抗原抗体相互作用的重新平衡。加入低浓度的聚乙二醇增强沉淀可以部分缓解上述问题。

另一类分离方法是将游离抗原吸附在某种试剂上，而将与抗体结合的抗原保留在溶液中。为达此目的，最广泛使用的试剂是活性炭和滑石粉。但由于与这些试剂的结合取决于抗原的大小和疏水性，这些方法只适用于某些抗原。此外，尽管这些方法花费不多且快速，但为了获得可重复的结果以及避免吸附抗原抗体复合物，必须很小心地调整和检测 pH 值、离子强度以及温度。最后，由于这些试剂与抗原的亲和力很高，因而会与低亲和力的抗体产生竞争，从而改变平衡。而且，碳元素会淬灭 β 闪烁计数，因而只能使用发射 γ 射线的同位素，如 ^{125}I。

固相分离方法

在 RIA 中应用固相分离的主要优势在于：①便于处理大批量样品；②由于固相液相交界面的效应而可能提高亲和力（相对于抗体的内在亲和力）。但是，伴随的不利因素在于：由于同样的效应，不可能测定真实的内在亲和力。分离方法本身十分简单。事先将抗体结合至固相表面，如 Sepharose 微球、试管壁或微量滴定板。在最后一种方法中，由于大多数的蛋白质可与塑料非特异性结合（聚氯乙烯优于聚苯乙烯），通常只需简单地将抗体包被于塑料孔，然后用同样的方法以无关蛋白质（如牛血清白蛋白）封闭未结合位点即可。为避免血清中其他蛋白质的竞争，包被抗体必须经过纯化。包被于塑料的抗体浓度可通过改变抗体孵育浓度或塑料类型来加以调整。一旦塑料孔（或 Sepharose 微球）被包被后，就可将它们与加入或未加入未标记抗原的标记抗原共同孵育，漂洗后直接计数结合至塑料孔或 Sepharose 的放射性。当需要处理大批量样品时，微量滴定板就显得特别有用。但是，由于包被到固相表面的抗体浓度甚至抗体量都是不知道的，亲和力也不是内

在亲和力,因而不能应用这些方法研究抗原抗体作用的化学反应本身。此外,在这些方法中,通常只测定结合抗原的量,而很少独立地测定游离抗原浓度。不过,如果研究的目的仅仅在于从标准曲线上比照测定未知竞争物的浓度,微量滴定板的方法是最理想的。Zollinger 等[41]曾经详细分析过该方法的最适参数。

Friguet 等[43]建立了一种基于酶联免疫吸附实验(ELISA)的亲和力测定方法,也可同样运用于 RIA。这种方法使用游离的抗体,而将抗原包被于微量滴定板,检测的是游离抗原竞争性阻断溶液中的抗体结合至板上抗体①的能力(见图 4.9B)。因此结合至板上抗体为溶液中平衡后的游离抗体。所测亲和力为抗体与溶液中抗原的亲和力,而不是与板上抗原的亲和力,因此不直接受到表面多价的影响。但是,正如 Stevens[44]指出的,若要严格准确地测定亲和力,则必须使用单价的 Fab 片段,因为一端结合至板上抗原,另一端结合至溶液中抗原的二价抗体会被计为游离抗体。由此低估配体占据的抗体结合位点数,导致对亲和力的低估。Stevens 还提出一个基于二项式分析方法修正此偏差。随后,Seligman[45]指出,固相表面抗原的性质和密度也可能影响对亲和力的测定。

优化抗体和标记抗原浓度以提高检测灵敏度

检测方法的灵敏度主要受限于抗体的亲和力和浓度、标记抗原浓度以及数据的精确度(可重复性)等参数。一般而言,抗体亲和力越高,检测灵敏度越高。一旦制备可得到的最高亲和力抗体,这个参数就划定了其他参数的影响范围。例如,由于待测样品中非标记抗原将与标记抗原竞争,因此,标记抗原浓度越低,可检测的非标记抗原浓度就可越低。从前面的理论推导可知[36],可检测的最低点取决于亲和力 K_A。滴定曲线的陡峭部分将出现在浓度为 $1/K_A$ 左右。如果配体浓度远低于 $1/K_A$,大多数的抗体位点将空置,因而竞争就不是特别有效。所以,将标记抗原浓度数倍低于 $1/K_A$ 是没有意义的。因此,尽管通常情况下提高标记抗原特异性的放射活性而降低其浓度是十分有效的,但必须意识到 $1/K_A$ 的限制。另外,如果特异性活性高于最佳灵敏度所需要的程度,可能导致抗原的变性,并明显降低检测时的每分钟计数,从而不得不延长计数时间。

与此相类似,降低抗体浓度至某一点时也可增加灵敏度。其限制取决于 $1/K_A$ 以及背景非特异性结合。显然,如果降低抗体浓度以至于未加入非标记抗原时,标记抗原的结合与背景太接近,就可因精确度的丧失导致灵敏度的丧失。通常,应将无竞争物时的结合标记抗原计数控制在 0.2 以上,接近 0.5 的水平[46]。

优化标记抗原与抗体最适浓度的一个简单操作程序是:首先确定最低标记抗原浓度,以使 1/10 到 1/2 的标记抗原发生结合时所需的计数时间和计数精度达最佳;然后,保持标记抗原浓度不变稀释抗体,直到无竞争的情况下,结合抗原与游离抗原之比接近 1.0(结合抗原/总抗原 = 0.5)。此时的抗体浓度和标记抗原浓度通常已接近最适灵敏度的要求。需要意识到的是,如果改变标记抗原浓度,抗体的浓度也需要作相应调整,才能使灵敏度达到最优化。

数据分析:图像法和数字法

我们已经分析过 Scatchard 图(结合抗原/游离抗原对结合抗原作图)和测定亲和力用到的结合抗原/游离抗原对游离抗原或总抗原浓度作图。后者特别适用于由竞争曲线组成的 RIA。实际上,独立变量(independent variable)必须总是抗原浓度,因为这是已知的数量,并通过改变它来生成标准曲线。让我们分别用 B、F 和 T 来代表结合、游离以及总的抗原浓度。我们已看到,在测定亲和力 K_A 方面,B/F 对 F 作图比 B/F 对 T 作图更为有用。但是在 RIA,需要测定的数量为 T,相应地,在生成标准曲线时已知的独立变量也是 T。RIA 与先前讨论过的情况的另一个区别在于,RIA 中既有标记的抗原,也有非标记的抗原。但是,因为只有具有放射性的抗原才被计数,所以非独立变量,如 B/F,为结合的示踪剂与游离示踪剂的比率。如果假定

---

① 原文可能有误,应为抗原。——译者注

标记抗原与非标记抗原与抗体的结合是等价的，即具有相同的 K_A，那么在平衡时，非标记抗原的 B/F 与标记抗原的 B/F 是一样的。但是上述假设并非总是成立的，需要用试验来检测。不过，即使上述假设不成立，也可从标准曲线上读出未知样品的浓度，但是任何更多的分析十分复杂。

如图 4.6 所示，当 F 或 T 的“数量”采用对数坐标时，B/F 对 F 或 T 作图表现为 S 形曲线。B/T 对 F 或 T 的曲线也与此相似。需注意，由于 $B+F=T$，那么

$$\frac{B}{F}=\frac{B}{T-B}=\frac{B/T}{(1-B/T)} \tag{38}$$

以及

$$\frac{B}{T}=\frac{B/F}{1+B/F} \tag{39}$$

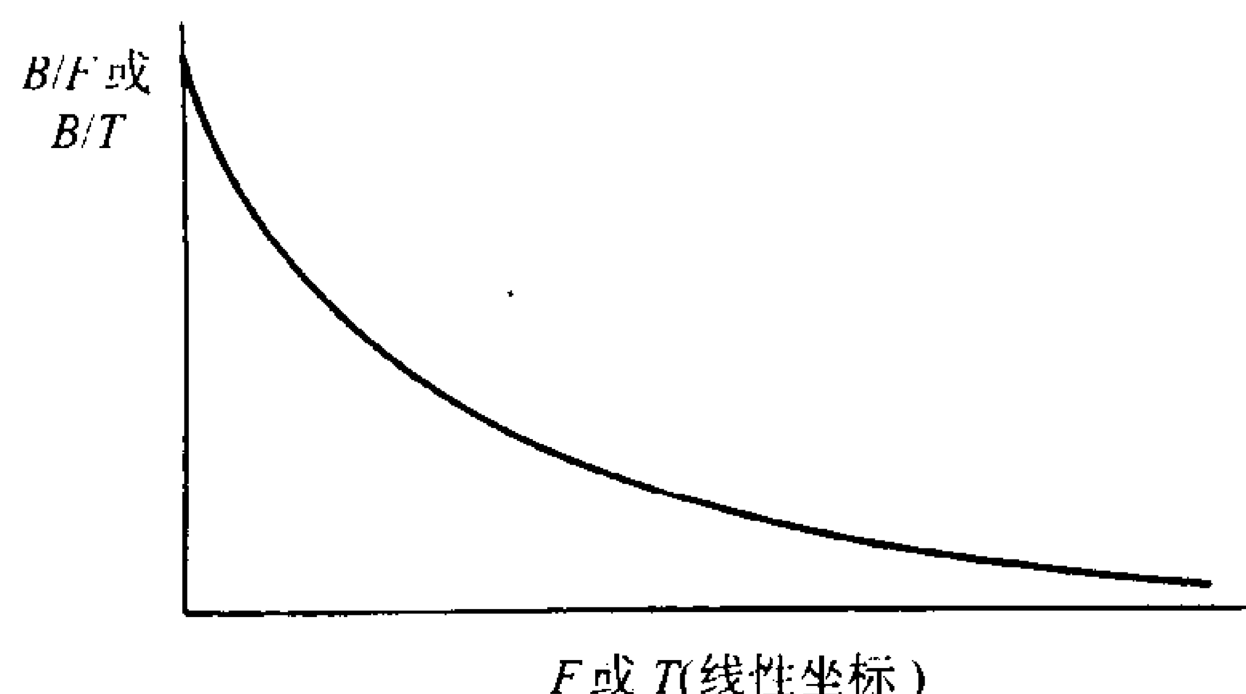


图 4.7　B/F 或 B/T（结合与游离或总抗原浓度之比）作为游离抗原（F）或总抗原浓度（T）函数的示意图。与图 4.6 不同的是，本示意图采用线性坐标而非对数坐标。

这种转换十分有用。如图 4.7 所示，如果将 B/F 或 B/T 对 F 或 T 在线性坐标轴上作图，那么曲线类似于双曲线。B/F 对 T（对数坐标）作图是最早用于 RIA 数据分析的方法，也一直是最有用的方法。曲线最敏感的区域位于斜率最大的部分。

概率分析的结果表明，如果抗原具有多个抗原决定簇，而且每一个相互独立，又都能与抗体同时结合，那么，能够被抗体识别的抗原决定簇越多，曲线的斜率越陡峭[47]。多个抗原决定簇结合导致的斜率增加效应，其原因在于，在 RIA 中，不论是一个抗体分子或多个抗体分子与抗原结合，该抗原均被计数为结合抗原。只有在没有抗体分子结合的情况下，该抗原分子才被认为是游离抗原。因此，某一抗原分子被认为是游离抗原的概率为每一个抗原决定簇表现为游离状态的概率的乘积。实验也证实该效应可导致十分陡峭的斜率[47]。

分对数转换（logit transform）则可在大多数情况下实现数据的线性化[48,49]。具体方法是，首先计算 B/B_0，其中 B_0 代表在没有竞争物的情况下，结合示踪剂的浓度。随后将此比值按下式进行分对数转换，

$$\mathrm{logit}(Y)=\ln\left(\frac{Y}{1-Y}\right) \tag{40}$$

88

ln 为自然对数。$\mathrm{logit}(B/B_0)$ 对 T 作图通常表现为一条直线（图 4.8）。在最简单的情况下，即单克隆抗体与单价抗原相结合，斜率通常为 -1。图形的线性化显然对于图形的插补十分有用，可方便地从标准曲线上计算出抗原浓度。线性化的第二个优点是便于进行平行性检测（tests of parallelism）。如果待测样品与生成标准曲线的抗原为同一抗原，那么在分对数-对数坐标体系中，未知样品的稀释曲线应与标准曲线平行（当然，平行并不能保证它们为同一抗原）。否则分析无效。

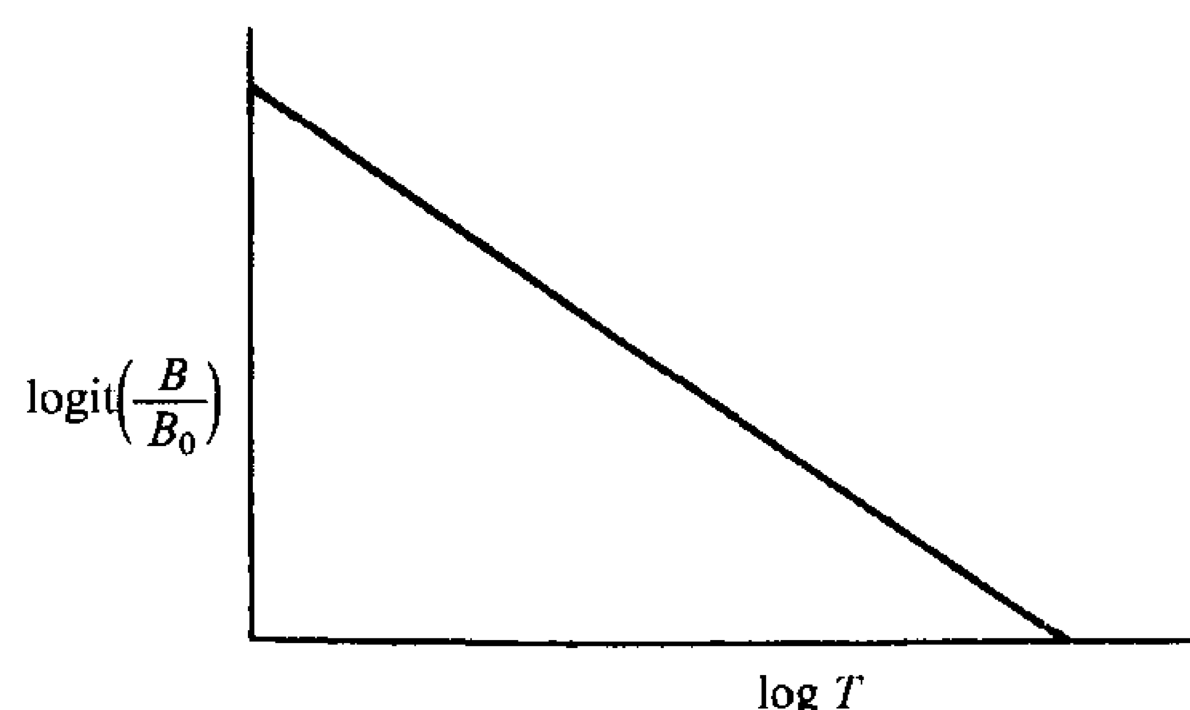


图 4.8　实现 RIA 数据线性化的分对数－对数坐标示意图。B 和 T 分别为结合抗原浓度和总抗原浓度，无非标记抗原加入时的结合抗原浓度为 B_0。分对数函数的计算方法如方程式 40 所示，$\mathrm{logit}(Y)=\ln[Y/(1-Y)]$。

Feldman 和 Rodbard[50] 以及 Rodbard[37] 对上述数据分析方法以及其他一些方法有更进一步的讨论，包括数据的统计分析。同时，还有一些计算机程序用于 RIA 数据的快速分析，也不必人工绘制标准曲线。这些计算机程序都基于这些或其他一些相近的方法，而对结果的准确解释则依赖

于对上述概念的理解。

B、*F* 和 *T* 的修正

在结束 RIA 数据分析这一节内容以前，我们必须讨论一下实验对照的设定和数据的修正，以避免得出错误结论。

首先，在任何沉淀抗体和结合抗原的方法（或使用固相结合的抗体）中，总有一部分抗原在没有特异性抗体的情况下也会发生沉淀或非特异性的结合。因此，实验中必须以正常血清（或根据所用抗体的类型采用相应的等价物）作为对照以测定非特异性的或背景的结合。非特异性结合总是随着抗原浓度的提高而线性增加，而且对于标记抗原或非标记抗原的结合比例应该是一样的，因而它不会饱和。如果 F 是单独测定的，那么只需将对照值从 B 中减去，而不用修正 F。如果 F 是通过 T 和 B（标记的示踪剂）的差值计算而来，那么由于 T 也必须用非特异性结合量进行修正，F 则会受到影响。或者说有意义的总抗原应是特异性结合的与游离的抗原之和。任何非特异性结合的抗原都应从它出现的项式中减去。

第二个修正可能不是十分明显，那就是免疫性失活的放射性标记。在很多情况下，放射性标记的示踪剂中总会有一些污染，如游离的放射性同位素、与抗原纯化过程中产生的杂质结合的同位素、或者是与变性抗原偶联的同位素（这些抗原可能在放射性标记的过程中发生变性）。放射性标记的物质中可与抗体反应的部分可通过下述方法测定。即保持低浓度的标记抗原不变，然后逐渐加大抗体的浓度。如果没有无活性物质的污染，那么所有的放射性活性应该都能被充足的抗体的所结合。如果结合的示踪剂达平台时低于 100% 的结合，那么表示只有这部分在检测中是有活性的。从下面的例子中我们可以看到修正无活性部分的重要性。假设示踪剂中只有 80% 是有活性的，而 20% 是无活性的，再假设真实的 B/F 值为 3，那么根据方程式 39，$B/T=0.75$。这些值只涉及示踪剂中 80% 有活性的部分。另外 20% 的部分不会与抗体结合，因而会被错误地归于游离示踪剂部分，使检测的游离抗原量加倍。因此，测得的 B/F 值将只有 1.5（也就是 0.6/0.4）而不是真实的 3（也就是 0.6/0.2）。从 Scatchard 图上计算亲和力时，这个因子 2 就会导致严重偏差。此外，由于 20% 的示踪剂强制性地处于游离状态，B/F 永远不会超过 4（也就是 0.8/0.2），那么就会在 Scatchard 图的高 B/F 值区域形成一个平台。为修正这个潜在的严重问题，必须测定每一批示踪剂中无活性部分的比例，然后从 F 和 T 中减去。如果 B 和 F 是单独测定的，示踪剂的 T（不是包括非标记竞争物的总配体）是由 $B+F$ 计算而来，那么一个简便的修正方法是计算 $B/T=B/(B+F)$，除以有活性的示踪剂的比例（在此例中为 0.8），然后根据方程式 38 转换为 B/F。

非平衡放射免疫分析

到目前为止，我们都是假设同时加入示踪剂与非标记的竞争物，而且有充足的孵育时间以达平衡。当然，为测定亲和力，必须使反应达平衡。但是，如果实验的惟一目的在于通过 RIA 测定竞争物的浓度，那么可以先加入竞争物使其与抗体反应，然后加入示踪剂进行孵育。当孵育时间很短时，就不能形成新的平衡，但可借此提高检测灵敏度。重要的是给竞争物一个竞争优势。从剂量-效应曲线（B/T 对加入的总抗原作图）可以看到，低剂量区域的斜率增加，提示检测灵敏度增加。Rodbard 等[51] 对这一过程有详细的数学分析。但是，值得注意的是，采用非平衡的条件需要对时间和温度进行严格控制。

酶联免疫吸附实验

检测抗原抗体反应的另一个固相检测系统为酶联免疫吸附实验（Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA）[52]。原则上讲，ELISA 与 RIA 的惟一区别在于抗原或抗体是与酶而不是与放射性同位素共价结合，因此检测的是结合的酶的活性，而不是每分钟的放射性计数。在实践中，由于非放射性物质的安全性和便利性，以及商品化的酶联板检测仪只需几秒时间即可测定 96 孔吸收值，ELISA 更为受到欢迎。由于 ELISA 和

89

RIA 遵循同样的热动力学限制，酶检测的摩尔浓度范围也和放射性同位素相当，因而 ELISA 与 RIA 的灵敏度和特异性相近。下面介绍采用 ELISA 检测特异性抗体、抗原或交叉反应抗体的 4 种基本策略。

如图 4.9A 所示，间接法是测定未知抗血清样品中特异性抗体最简单的方法。因为大多数蛋白质均可与塑料非特异性结合，因此可将抗原非共价吸附于酶联板的每个孔中，洗去过剩抗原后，将酶联板与白蛋白溶液共同孵育以阻断残留的非特异性蛋白结合位点。然后加入待检测的抗血清，其中特异性的抗体就可与固相抗原相结合。洗去非结合的抗体，加入酶标抗免疫球蛋白抗体。这些抗体与特异性结合到抗原的抗体结合，引入共价结合的酶。洗去未结合的酶标抗体，加入底物。酶作用于底物产生带有颜色的产物，可在酶联检测仪上测定增加的吸收值。

虽然该方法十分简单，也十分敏感，但用于定量分析则比较困难。在某个限定范围内，光密度值增加与第一步时加入的特异性抗体量成正比。但是，结合的抗体量并不能直接测定。而是必须通过已知浓度的抗体绘制标准曲线，然后从中估计样品的抗体浓度。该方法测定微量的抗体浓度时，灵敏度很好，特别是当采用亲和纯化的抗免疫球蛋白作为酶联试剂时。一次制备的抗免疫球蛋白抗体可用于检测针对许多不同抗原的抗体。显然，检测方法的重复性取决于每孔的抗原包被量是否均一，而检测方法的特异性则取决于包被抗原纯度。

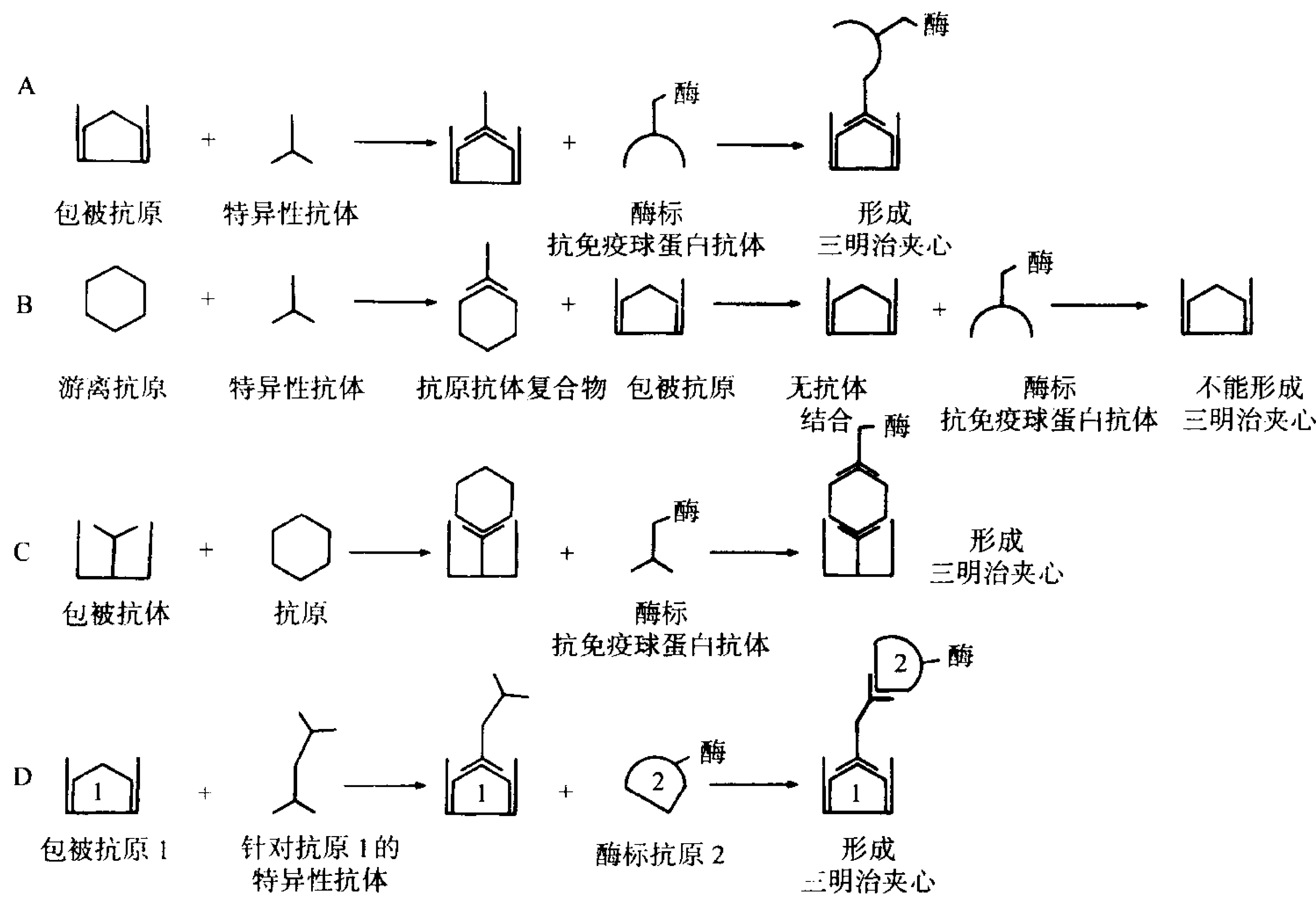


图 4.9 采用 ELISA 技术检测特异性抗原-抗体反应的四种基本策略。A：直接结合；B：半抗原抑制；C：抗原夹心；D：抗体夹心。

图 4.9B 显示以竞争法检测抗原。第一步，可溶性的抗原与限量的特异性抗体混合。然后将混合物加至抗原包被的酶联孔，后续步骤与图 4.9A 相同。第一步形成的任何抗原抗体复合物都将减少结合至板上的抗体量，因而最后一步测定的吸收值也会降低。本方法可用于估计游离抗原的亲和力，该亲和力与抗原的半数抑制浓度（half-inhibitory concentration）有关。Friguet 等[43]详细描述了采用该方法测定亲和力的数学分析方法，Stevens[44]随后进行修改，与前一节中关于 RIA 固相方法的讨论相同。此外，溶液中抗原与板上抗原的交叉反应性也可通过该方法进行估计。

图 4.9C 显示以夹心法检测抗原。特异性抗体包被于酶联板，然后抗原与固相抗体结合，最后加入酶标二抗。二抗与固相抗原-抗体复合物结合并引入酶。洗去过量抗体，加入酶的底物。生成带颜色的产物是测

试样品中抗原浓度的函数,具体浓度值可从标准曲线获得。检测特异性取决于包被于板上的抗体与待测抗原之间的特异性。灵敏度取决于包被在酶联孔中的一抗的亲和力和用量,使用亲和纯化的抗体包被可提高灵敏度。两种抗体要形成夹心三明治,需要抗原为二价,或两种抗体特异性地针对同一抗原分子的不同抗原决定簇。如果两种抗体为针对同一抗原分子的两种不同的单克隆抗体,这一技术还可用于确定两种抗体能否同时结合到同一种抗原分子,或它们是否竞争性结合到同一位点,或结合的位点十分邻近而相互产生空间位阻[53]。

图 4.9D 显示以夹心法检测抗体的交叉反应性。以抗原 1 包被酶联板,然后加入针对抗原 1 的特异性抗体。洗去过量抗体,加入酶标抗原 2。如果结合的抗体可与抗原 1 和抗原 2 发生交叉反应,那么酶标的抗原 2 可被吸附于固相酶联板上,并通过酶催化反应的吸收值增加来测量。此方法已用于分析针对两种独特型的抗独特型抗血清的交叉反应性,或用于检测抗独特型抗体(见第 3 章)。也可采用其他形式的抗原抗体组合。引入额外的检测试剂可增加灵敏度,但同时也会增加背景和变异性。

采用第一种方法的一个实例即是测定人血清抗流感病毒抗体[54](图 4.10)。在不同的列上交替包被流感病毒或牛血清白蛋白。在每一个方格的最上面两个孔中加入 1/10 的稀释人血清,然后从上到下依次做 4 倍稀释。最后一个有颜色的孔代表了抗体效价,而白蛋白包被孔中无颜色产生显示了反应的特异性。该方法也运用于制备单克隆抗体杂交瘤细胞时筛选培养上清。ELISA 的灵敏度和简便快速使其可对产生抗体的大量酶联孔进行筛选。采用这种方法筛选得到的克隆倾向于具有较高的抗原亲和力,这也许是由于低亲和力的抗体在漂洗步骤发生解离。

需要注意的是,天然蛋白质抗原包被于固相表面时(图 4.9A),可能导致蛋白质构象改变。例如,Darst 等采用一组针对肌球蛋白的构象特异性单抗发现,当肌球蛋白结合至固相表面时,某些单抗的表观亲和力改变大于其他一些单抗。采用图 4.9B 和 4.9C 的方法可以避免这一问题。

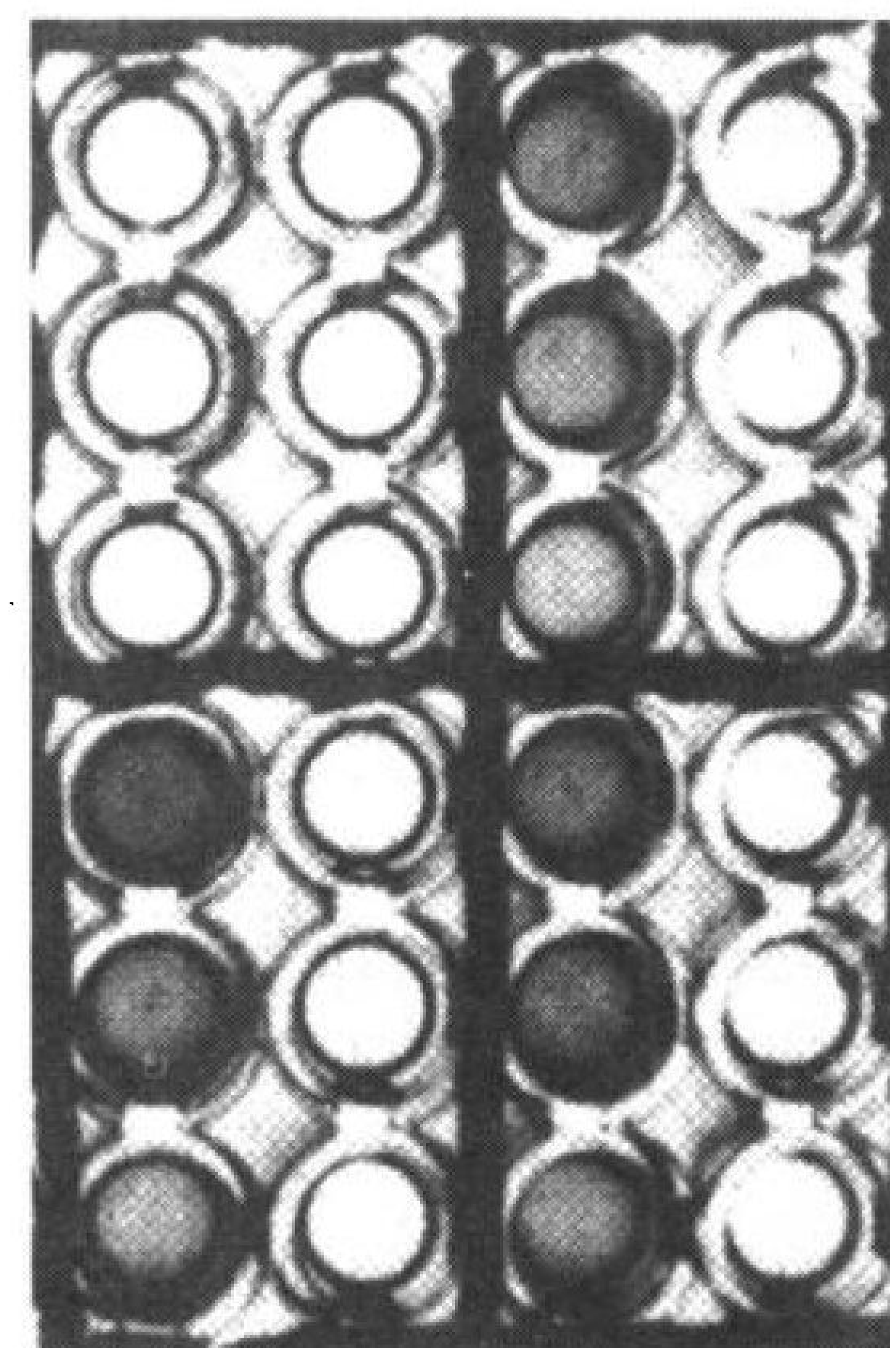


图 4.10 典型的 ELISA 结果(采用直接结合法)。在不同的列上交替包被流感病毒或牛血清白蛋白。在每一个方格的最上面孔中加入稀释的用于检测抗流感病毒抗体的人血清,从上到下依次做 4 倍稀释,然后加入酶标的羊抗人免疫球蛋白作为二抗。(承蒙 R. Yarchoan 和 D. L. Nelson 博士提供照片。)

ELIspot

对普通 ELISA 方法进行改进,就可在单个细胞水平检测抗体产生情况。具体方法是,以抗原包被组织培养板,然后将不同的细胞在板上培养 4 小时。培养期间,B 细胞定植于板底并分泌抗体,抗体与邻近的抗原结合,就像是形成一个细胞足印。将细胞洗去,加入二抗,如酶标的羊抗人 IgG。洗去未结合抗体,在软琼脂中加入酶的底物。在接下来的 10 分钟内,在最初 B 细胞分泌抗体的部位,被局限化的酶将底物转换成不溶性的染料并形成黑点。

采用此方法,可从 10^6 脾脏细胞中检测到少至 10~20 个产生抗体的 B 细胞,而经免疫的小鼠,结果通常在 200~500 之间[56,57]。显然,要使用这一方法,必须使检测方法的灵敏度能够检测免疫后单个 B 细胞分泌的抗体量,特异性方面则必须能够忽略大量的非免疫性 B 细胞所产生的非特异性抗体。灵敏度取决于分泌抗体的亲和力和数量,也可通过滴定包被的抗原量来优化。

这类分析方法可直接测定发生反应的 B 细胞数量,因而对于体外分析抗体产生的细胞条件很有用处。ELIspot 还可用于检测抗原过量的情况下抗体的产生情况。例如,在急性感染[58]和自身免疫性疾病[59]中,抗原量大大超过产生的抗体量。但是,即使循环中的抗体不能被检测到,这一方法也可直接检测产生抗体的 B 细胞。该方法还可用于检测特定组织(如滑膜)中自身反应性抗体的产生情况。使用两种检测抗体,分别针对不同的免疫球蛋白类别并与不同的酶相偶联,再使用两种可以产生不同颜色染料的底物,就可同时检测分

泌 IgA 和 IgG 的细胞[60]。采用 ELIspot 的方法还发现了包含 CpG 序列的细菌 DNA 是一种多克隆的 B 细胞有丝分裂原[61]。

91　ELIspot 也被用于检测分泌的抗原,与检测抗体不同的是,以抗体包被培养板,然后通过酶标二抗来检测抗原(如图 4.9C 所示的夹心 ELISA 方法)。例如,以包被抗 IL-4 单抗的培养板检测分泌 IL-4 的 T 细胞[62]。采用这种方法,即使现在尚未发现 Th2 细胞的细胞标记,也可以检测 Th2 细胞的数量。

特异性和交叉反应

抗体或抗血清的特异性(specificity)定义为它们区别诱导其产生的同源性抗原(homologous antigen)或免疫原(immunogen)与其他抗原的能力。实际工作中,研究者不可能检测所有的其他抗原,而只能是所选择的部分抗原。从这个意义上讲,特异性只能通过实验方法,在一组选定抗原中加以确定。Karush[28] 为此提出一个相关概念,选择性(selectivity),意指抗体以全或无方式(all-or-none fashion)区分两种相关配体的能力。因此选择性既取决于抗体与这两种配体的相对亲和力,也取决于检测反应的实验下限。例如,一个针对碳水化合物的抗体,如果它与免疫原的亲和力为 10^5 L/mol,与相关碳水化合物的亲和力低 100 倍,只有 10^3 L/mol,就可能检测不到,因而表现出较高的选择性。另一方面,如果一个抗体与同源性抗原的亲和力为 10^9 L/mol,即使它与相关配体的亲和力低 100 倍,但仍然可以很容易地检测到,因而表现出较低的选择性。

相反,交叉反应性(cross-reactivity)定义为抗体与免疫原以外相关配体反应的能力。更为常见的是从配体的角度来看待交叉反应性。因此,研究者可能说抗原 Y 与抗原 X 有交叉反应,因为抗原 Y 可与抗 X 的抗体结合。值得注意的是,从这个意义上讲,是两个抗原具有交叉反应,而不是抗体。但是,X 和 Y 两个抗原的交叉反应性只能通过特定抗体或抗血清来加以确定。例如,另一组不同的抗 X 抗体可能完全不能与 Y 反应,因而对于这些抗体,Y 与 X 没有交叉反应。也可从另一个意义上来使用这一概念,比如说某些抗 X 抗体可与抗原 Y 发生交叉反应。

在大多数情况下,交叉反应性配体与特定抗体的亲和力低于免疫原。但也有交叉反应抗原比同源性抗原具有更高亲和力的例外情况。这一现象被称作反常性(heteroclicity)。如果某种抗原比免疫原具有更高的亲和力,则称之为反常的(heteroclitic)。出现这种情况的抗体也被称作反常抗体(heteroclitic antibody)。一个很好的例子是由 C57BL/10 小鼠产生的针对半抗原乙酰硝基苯基(nitrophenyl acetyl, NP)的抗体。Mäkelä 和 Karjalainen 发现这些抗体与交叉反应性半抗原乙酰硝基吲哚苯基(nitroiodophenyl acetyl, NIP)的亲和力高于免疫原本身。另一个例子是关于 retro-inverso 或 retro-D 肽[64~68]。通过将氨基酸的手性由 L 转换为 D,同时将氨基酸的序列反转,可以得到一个新的多肽,除部分氨基酸,如苏氨酸(Thr)和异亮氨酸(Ile)具有第二个手性中心,其余氨基酸的侧链与原始的 L-氨基酸肽大约处于同样的位置。这个新的多肽表现出对蛋白水解酶的抵抗力。但是其主链的 NH 和 CO 部分是反转的。仅针对侧链的抗体不能区分这两种多肽,而同时识别主链和

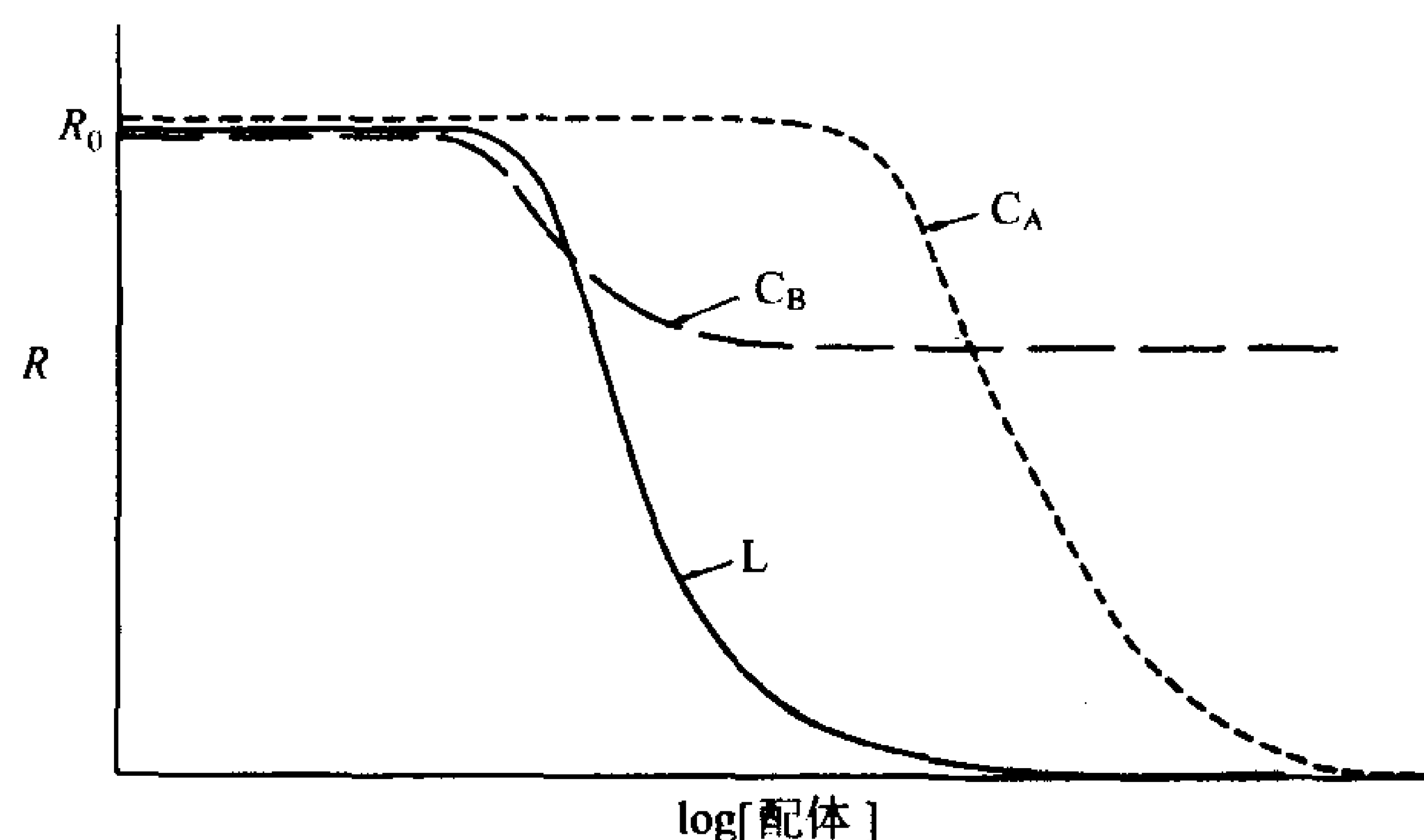


图 4.11　同源配体 L 以及交叉反应性配体的 RIA 结合曲线示意图。交叉反应性配体 C_A 表现出 1 型或真实的交叉反应性,它可以完全抑制标记配体的结合,但亲和力低于同源配体。配体 C_B 表现出 2 型或抗原决定簇共有的交叉反应性,达平台时不能 100% 完全抑制,但其亲和力不一定低于同源配体。纵坐标 R 为放射性标记配体的结合抗原与游离抗原之比值,R_0 为所有配体(包括标记配体)趋于 0 时,R 的极限性。(经作者许可摘自参考文献[70]。)

侧链的抗体则可以区分这两种多肽,亲和力也有所不同。对组蛋白 H3 一个 6 肽的研究表明,针对 6 肽的某些单抗与 retro-D 形式多肽的亲和力高于天然序列本身,而其他一些单抗并非如此[66,67]。前者即是反常性的一个例子。除了拥有更高的亲和力,还由于 retro-D 形式的多肽可以抵抗蛋白水解作用[64~68],因而可能在体内的活性更高(在检测亲和力的差异时,必须保证检测过程中多肽的稳定性不影响表观亲和力)。作为药物时,这种稳定性使其具有更大的优势[64,65,69]。

在许多实际情况中,交叉反应性的检测方法包括沉淀素反应(precipitin),特别是在琼脂中的沉淀反应(Ouchterlony 法),或者血凝实验(见后面对两种方法的介绍),或其他类似方法。这些方法的共同之处在于,它们事实上不能很好地区分亲和力的差异和浓度的差异。由于这个原因以及免疫血清的异质性,导致交叉反应性和特异性这两个术语在使用中十分模糊。随着 RIA 技术的出现,这种术语以及数据解释上的模糊已变得十分明显。

为解决此问题,Berzofsky 和 Schechter[70] 定义了两种形式的交叉反应性以及相应的两种形式的特异性。两种形式的交叉反应性可用两种典型的竞争性 RIA 曲线来表示(图 4.11)。实际上,大多数的抗血清同时存在两种现象。

1 型交叉反应性,或真实的交叉反应性(true cross-reactivity),定义为两种配体可能以不同的亲和力与同一抗体分子上同一位点结合的能力。例如,两种相关半抗原,二硝基苯酚(dinitrophenyl, DNP)和三硝基苯酚(trinitrophenyl, TNP)就可以不同的亲和力与 DNP 诱导的抗体反应。对蛋白质抗原,这种差异可能源于氨基酸序列的微小改变(如苏氨酸与丝氨酸之间的保守性替换),或者是构象改变,如将蛋白质裂解成片段(图 4.12)[70~74]。如果一个多肽片段包含某个抗原决定簇的所有接触残基(contact residues),那么就可能与天然决定簇产生的抗体发生交叉反应。只是由于多肽可能没有保留天然构象(见第 4.19 章),因而亲和力较低。图 4.11 中竞争物 C_A 显示了这种亲和力的差异,当 C_A 的浓度足够高时,可完全取代示踪剂,但 C_A 的浓度必须高于同源配体 L 才能产生抑制效应。

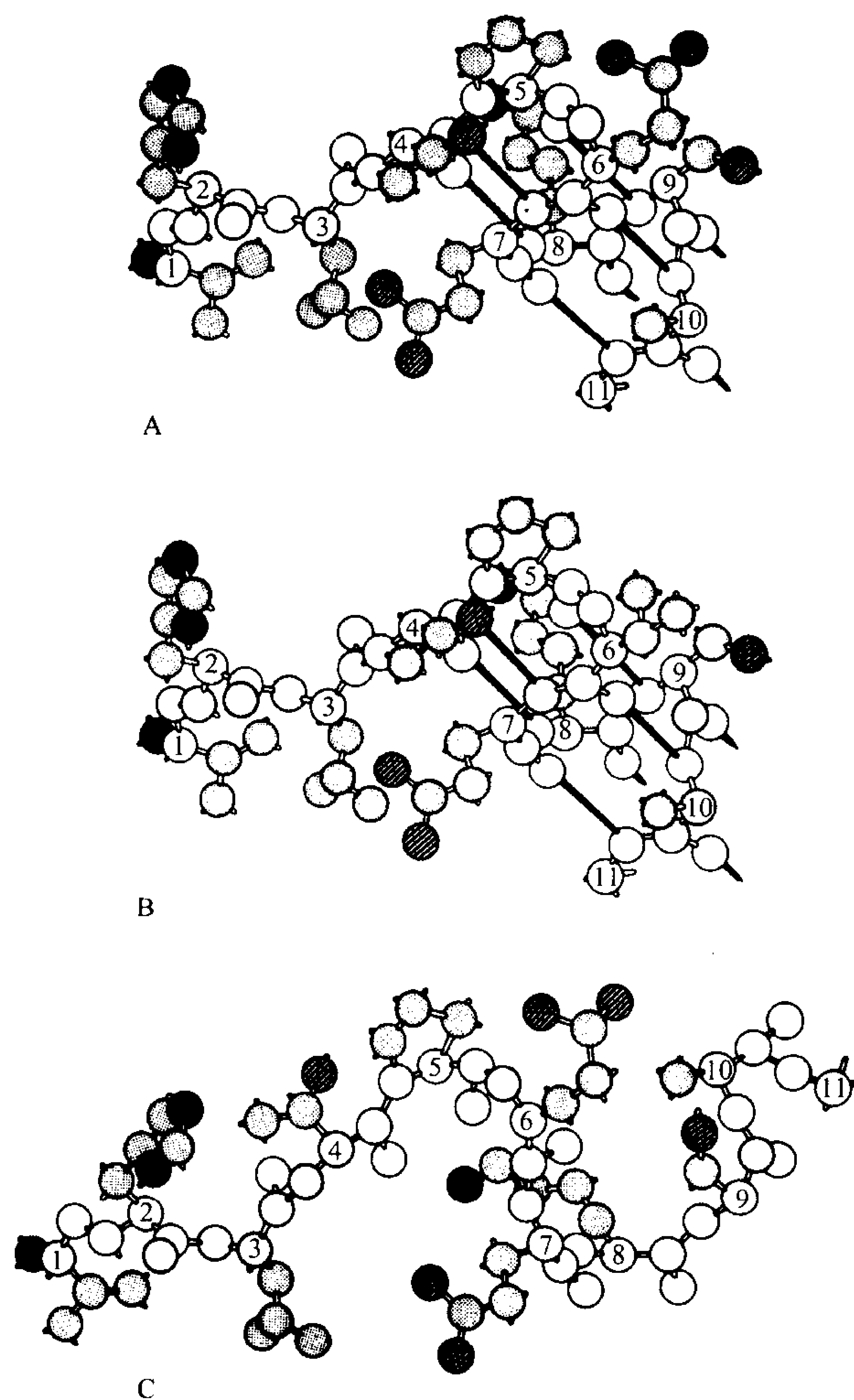


图 4.12　血红蛋白 β 链 N 端区域示意图。A: $β^A$ 链起始部分的 11 个残基。B: $β^S$ 链的相应区域。其中第 6 位的缬氨酸被替换成谷氨酸,从而形成一个新的抗原决定簇,可据此分离出一种新的抗体亚群[71,72]。C: 图 A 中蛋白质变性,去折叠后的示意图。该区域可从蛋白质中被裂解下来,或合成这段多肽[73],导致抗原反应性的改变。针对血红蛋白(或血红蛋白 β 链)的抗血清可与 B 和 C 中的结构发生交叉反应,但是分子机制是不同的。多肽骨架原子由白色表示,侧链上的氧原子用阴影表示,氮原子用黑色表示,碳原子用细条纹表示。(摘自参考文献[70]、[74]。)

92

从亲和力差异分离出的另一个问题是,交叉反应的配体是与异质性免疫血清中的全部抗体,还是其中一部分抗体发生反应。这种交叉反应性,我们称之为 2 型交叉反应性或共同反应性(shared reactivity)。它显然只发生于抗体为异质性的情况下,大多数的抗血清均是如此。此时,交叉反应配体的亲和力可能高于、低于或等同于诱导抗体产生的同源性配体。因此,竞争曲线并不一定向右侧偏移,但是如图 4.11 中的竞争物 C_B 所示,抑制活性达到平台时,小于完全抑制的程度。举一个例子,让我们假设某一个蛋白质有两个抗原决定

簇 X 和 Y,该蛋白质的免疫血清中包含抗 X 和抗 Y 的抗体。在一个突变的蛋白质中,抗原决定簇 Y 发生改变而不能被抗 Y 抗体识别,但是抗原决定簇 X 是完整的。该突变蛋白质就可表现为 2 型交叉反应性。它可以与野生型蛋白质竞争抗 X 抗体(甚至可能具有相同的亲和力),但不会竞争抗 Y 抗体。

偶尔的情况下,当测定的抗原抗体反应存在二级反应(secondary reaction)时,即使单克隆抗体也可能表现出 2 型交叉反应性。例如,Sharon 等[75]和 Cisar 等[76]观察到均一的骨髓瘤或杂交瘤抗原与葡聚糖反应时,平台值低于 100%的结合。此例采用的方法是定量沉淀素反应(quantitative precipitin),因而不同复合物具有不同溶解性可能是导致平台的原因。如果在溶液中直接观察抗原抗体反应,而不必通过可能不完全的二级反应,均一抗体与其均一抗原反应达平台时,理论上不会低于 100%的反应或抑制。因此,观察到平台时,应该考虑存在二级竞争反应。

当然,两种类型的交叉反应可以同时发生。一个典型的例子即是在 1 型交叉反应中讨论过的多肽片段。设想该片段虽然没有保持抗原决定簇 X 的天然构象,但包含其残基,而不包含天然蛋白质中具有的抗原决定簇 Y 的残基。如果天然蛋白质的抗血清由抗 X 和抗 Y 的抗体组成,多肽将只与抗 X 的抗体竞争(2 型交叉反应性),而且即使是对这些抗体的亲和力也低于天然的蛋白质。因此,竞争曲线将向右偏移,且在完全抑制前达平台①。

93 对于均一抗体(如单克隆抗体),只会发生 1 型或真实的交叉反应。通过前面提到的类似于 B/F 对 F 的方法可以定量测定不同交叉反应性配体的亲和力差异。假设配体 X 和 Y 与同源配体 L 交叉反应同一单克隆抗体。将示踪配体 L 的结合/游离比($B/F=R$)对竞争物 X 和 Y 的对数浓度作图,在适当的条件下,可得到两条平行的竞争曲线(图 4.13)[70]。第一个条件是游离示踪剂的浓度小于示踪剂亲和力的倒数 $1/K_L$。在此例中,当 $R=R_0/2$,即中点时[70]:

$$K_X \cong \frac{1}{[X]_{free}} \tag{41}$$

其中 K_X 为 X 的亲和力。这类似于方程式 21,即非标记的同源性配体作为竞争物的情况。这同样类似于方程式 23,如果使用竞争物的总浓度$[X]_t$,而不是游离浓度$[X]_{free}$,就会产生一个误差项,即

$$[X]_t(\text{at} R = R_0/2) = \frac{1}{K_X} + \frac{[S]_t}{2} \tag{42}$$

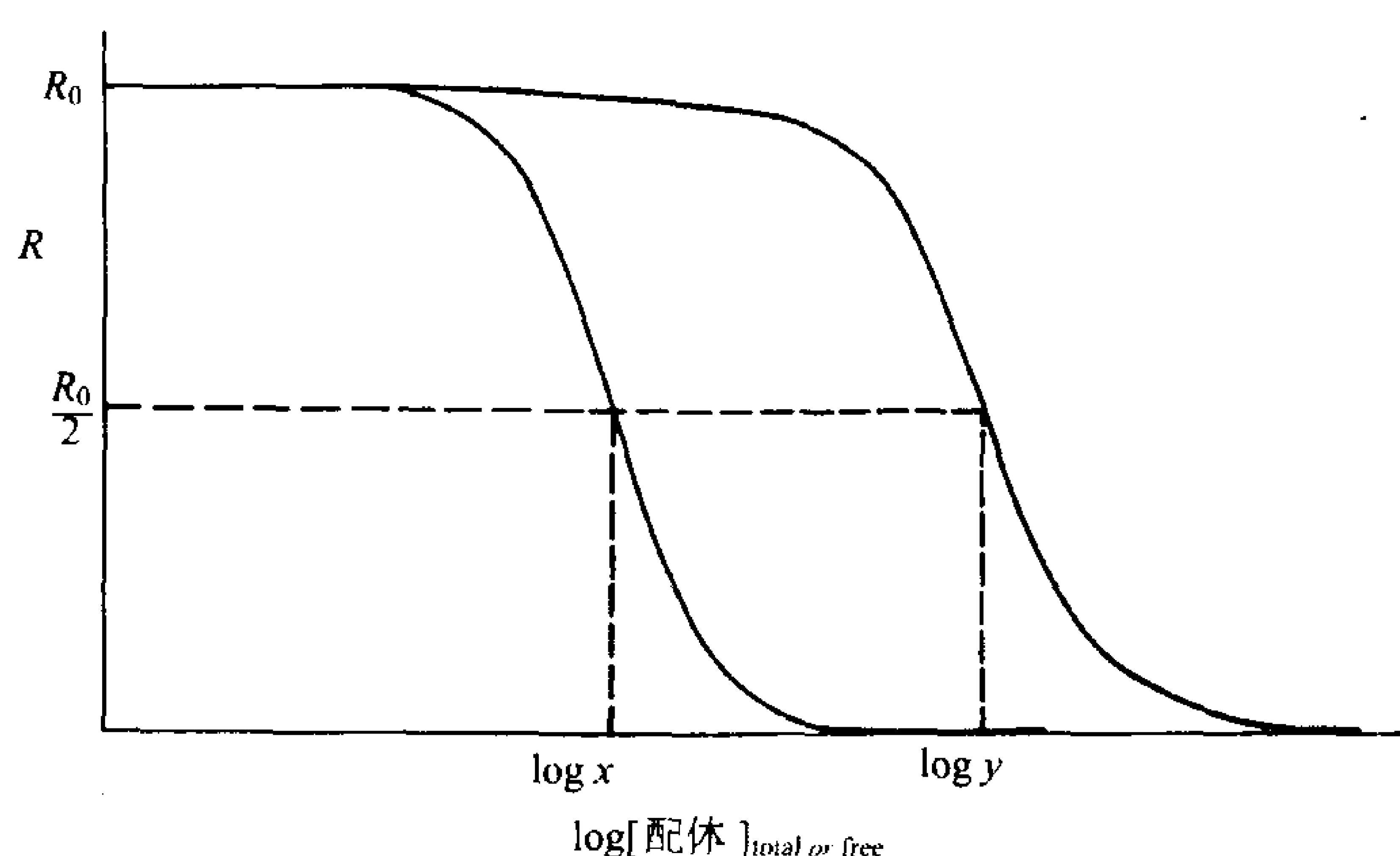


图 4.13 RIA 结合曲线示意图,显示两种交叉反应性配体的不同亲和力对中点斜率的影响。纵坐标 R 为放射性标记结合抗原与游离抗原之比,为所有配体浓度趋于 0 时,R 的极限。如果 x 和 y 是 R 降至 $R_0/2$ 时配体 X 和 Y 的浓度,那么当横坐标为总的配体浓度时,$x=1/K_X+[S]_t/2$, $y=1/K_Y+[S]_t$,其中$[S]_t$ 为抗体结合位点浓度,K_X 和 K_Y 为相应配体的亲和力;当横坐标为游离配体浓度时,$x=1/K_X$, $y=1/K_Y$, x/y 的值(或在对数图上 log$x$ 与 log$y$ 的差值)对应于亲和力 K_Y/K_X 的值。注意对数图上,中点斜率是一样的,但若 X 在线性坐标上,Y 的中点斜率将只是 K_Y/K_X。(经作者许可摘自参考文献[70]。)

① 实验中也可能出现一种模糊不清的情况,以至无法区别两种类型的交叉反应性。例如,所有抗体都可与抗原决定簇 X 发生反应,只是亲和力的范围很广,其中某些抗体可能与交叉反应性抗原决定簇 X′以极低亲和力结合,以致于表面上看起来,它们完全不能与 X′结合。那么即使所有抗体都是特异性针对 X,且 X 和 X′的惟一区别在于亲和力不同,X′的竞争曲线也会在完全抑制前到达平台。

因此，当竞争物处于线性刻度时，无论是以游离或总的竞争物浓度作图，竞争物 X 和 Y 在中点的差值相当于 $1/K_X - 1/K_Y$，只有在使用游离配体浓度时，中点浓度的比值等于 K_X/K_Y。最后一点十分重要。因为研究者通常以竞争物的对数浓度作图，此时两条曲线在对数刻度上的位移相当于[X]/[Y]，而不是二者之差值[70]。

当满足第二个条件，即结合的示踪剂浓度小于抗体位点浓度$[S]_t$时，曲线(在线性刻度上)在各自中点处(此时 $R = R_0/2$)的斜率对应于该竞争物的亲和力，K_X 或 K_Y[70]。(只要保持示踪剂 L 同时小于 K_L 和$[S]_t$，就可同时满足上述两个条件)当$[X]_{free}$和$[Y]_{free}$位于对数刻度上，斜率就会相同(也就是曲线相平行)。因为在任一点上，以反对数作为横坐标，平行线在对数刻度上向右偏移 m 倍，陡峭的程度就会是 $1/m$。

当抗体亲和力不均一时，曲线会变宽，从而不再平行。当特异性不均一时，就会发生 2 型交叉反应。应该指出的是，在 B/F 对游离竞争物作图中，达平台时的抑制部分不会与竞争物反应的抗体部分成比例，而是与其加权部分成比例，即将抗体浓度以它们与示踪剂的亲和力加权[70]。

这两种类型的交叉反应性自然导致特异性的两种定义[70]。某一异质性抗血清的总体特异性是由这两方面的特异性组成的。1 型特异性基于抗体对同源配体以及任何交叉反应性配体的相当亲和力。如果与同源配体的亲和力远远高于任何测定的交叉反应性配体，那么就称该抗体对同源配体有高特异性，即它可以很好地区分同源配体与其他配体。如果与交叉反应性配体的亲和力低于实验条件下的检测阈值，那么 1 型特异性就导致前面讨论过的选择性[28]。特异性甚至可表示为与同源配体和交叉反应性配体的亲和力的比值[77]。大多数的免疫化学家将 1 型特异性称为真实的特异性(true specificity)，正如我们将 1 型交叉反应性称为真实的交叉反应性。

94

一般使用的交叉反应性这个术语包括 2 型或部分反应性(partial reactivity)，这导致特异性的第二个定义。这个定义只适用于异质性的抗体，如抗血清。我们称之为 2 型特异性。如果混合物中的所有抗体都可以与免疫原反应，但是只有一小部分与任何的单个交叉反应性抗原反应，那么称该抗血清对于免疫原是相对特异的。注意在此定义中，不管与交叉反应性抗原反应的亚群的亲和力是高还是低(1 型交叉反应性)，只要该亚群只是抗体中的一小部分，混合物仍是特异性的。因此，2 型特异性取决于抗体在异质性抗血清中的相对浓度，而不是亲和力。还需注意的是，可以用抗体亚群的相对浓度比较同一抗血清对两种交叉反应性抗原的特异性。但是，如果希望通过比较两种抗血清中，与同一配体反应的抗体的比例，来衡量两种不同抗血清的特异性，则是无意义的。虽然 2 型特异性不如 1 型特异性的概念标准，但在 Ouchterlony 双向免疫扩散这一类实验中，测定的主要是 2 型特异性。而在血球凝集这一类实验中(后面将讨论)，2 型特异性和 1 型特异性同样重要。2 型特异性还自然地引申出多重特异性(multispecificity)的概念。

多重特异性

多重特异性的理论是由 Talmadge[78] 和 Inman[79,80] 首先提出并进行分析，然后由 Richards 等[81] 在结构水平上加以讨论的。该理论设想了一种机制，不需利用抗体结构(或结构基因)的多样性，就可解释抗血清的高度多样性和特异性。其基本观点是，任何一种抗体实际上都可高亲和力地与一组广泛的高度多样性的抗原结合。当以免疫原 A 免疫时，得到的是许多不同的抗体，它们的共同之处在于都可以与免疫原 A 反应。而实际上每一种抗体都可以与其他抗原反应。但是，如果与 B 结合的抗体少于 1%，与 C 结合的抗体少于 1%，依次类推，那么根据 2 型特异性，总的抗血清会表现出对 A 有高特异性的。值得注意的是，与 B 结合的亚群可能与 B 的亲和力等于或高于与 A 的亲和力，因而该该亚群对 A 不是 1 型特异性。当以 B 来免疫，或者以可以与该抗体反应的数百种免疫原来免疫时，就会得到同样的亚群。其结果是，某一有机体可以产生的高特异性(2 型)抗血清的多样性远远高于所需的 B 细胞克隆(或抗体结构)的多样性。但是，多重特异性的概念还只是一个有趣的假说，并未得到实验证实[70]。

其他方法

本节介绍测定抗原抗体相互作用的几种方法。其他有用的技术还包括抗原结合后的抗体色氨酸荧光淬灭技术[82](一种敏感的方法,适用于动力学一类反应迅速的实验)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用、包括流式细胞仪在内的免疫荧光技术、免疫组织化学技术、抗体介导的抗原偶联的噬菌体噬斑形成抑制实验[83](因为即使对几个噬菌体的抑制都可以检测出来,此方法的灵敏度与 RIA 相当)。

定量沉淀素反应(quantitative precipitin)

很早就知道抗体可以中和致病菌,也能在细菌培养上清中形成沉淀。抗血清的这两种活性对于免疫的菌株是高度特异的。沉淀物中包括抗体蛋白和细菌产物。上清中的抗体量下降,并在合适的条件下完全丧失中和细菌的能力。但是沉淀中既包括抗体蛋白也包括抗原蛋白,因而定量测定沉淀的抗体是十分困难的。直到 Heidelberger 和 Kendall[84,85]发现纯化的肺炎球菌胞壁多糖可以沉淀抗肺炎球菌抗体后,这一问题才得到解决。因为在此例中,沉淀中的蛋白质含氮量均来源于抗体。因此,保持抗血清用量不变,逐渐增加多糖抗原用量,然后测定沉淀中抗体蛋白质含量,对抗原用量作图,可得到如图 4.14 的曲线。

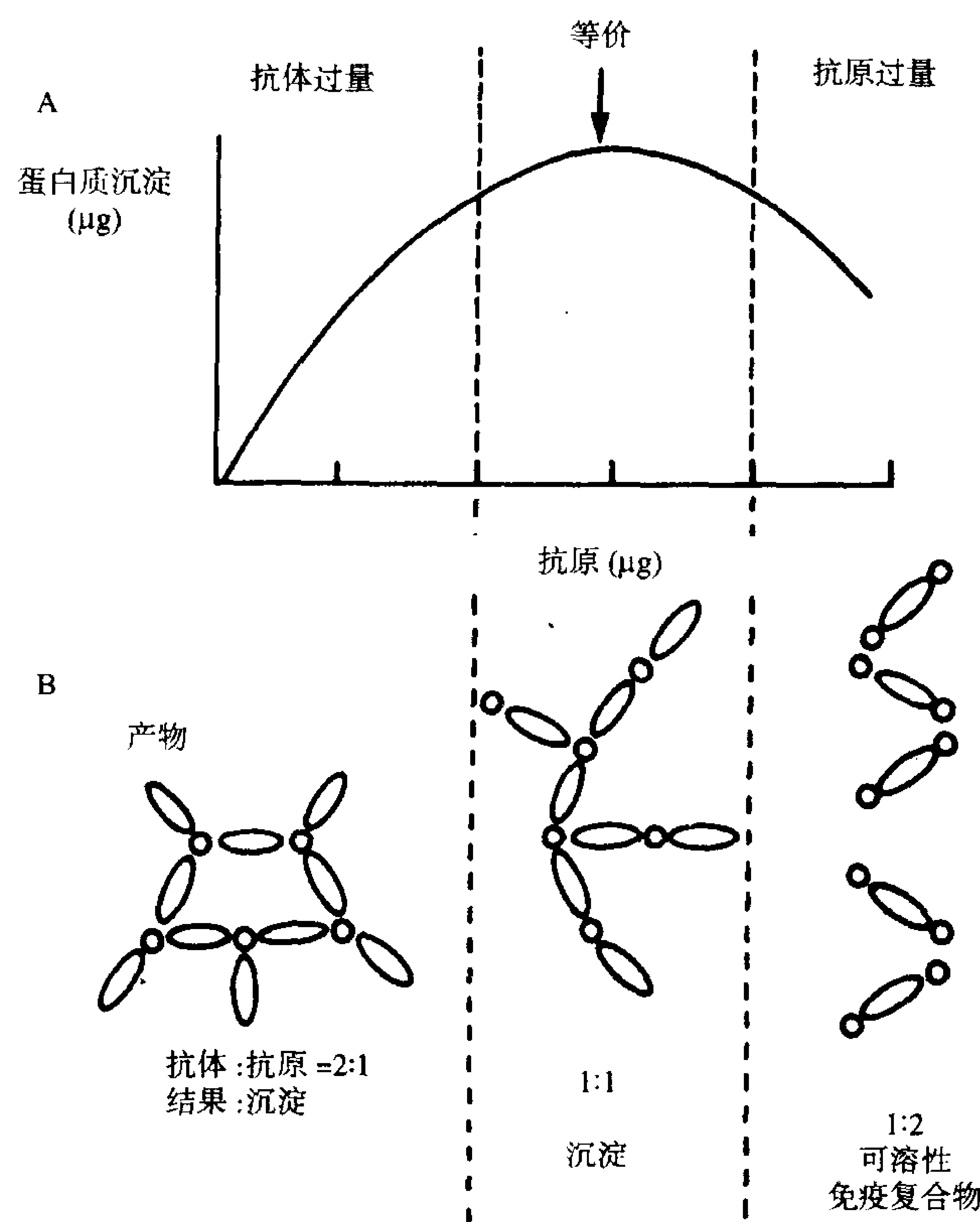


图 4.14 定量免疫沉淀实验。保持特异性抗体用量不变,逐渐加大非蛋白质抗原用量。此图显示沉淀中的抗体量(A)以及抗体与抗体量的比值(B)。抗原过剩时,可在上清中发现可溶性免疫复合物,沉淀量减少。

如图 4.14A 所示,沉淀的抗体量最初逐渐增加,达到一个平台,然后下降。沉淀量最大时,也正是抗体中和活性完全丧失的时候,称为等价点(equivalence point)。等价点时的抗体蛋白总量被认为是等于相应体积抗血清中的特异性抗体总量。曲线的上升部分称为抗体过剩区(antibody excess zone)(抗原有限),而在等价点以后的曲线部分被称为抗原过剩区(antigen excess zone)。

图 4.14B 详细分析了抗体和抗原过剩区中上清和沉淀的情况。当抗原有限时,沉淀中的抗体与抗原比值较高。此区上清中包含游离抗体,而不能检测到抗原。当加入更多抗原后,沉淀中抗体总量增加,但是抗

体与抗原的比值下降。等价点时,上清中检测不到游离的抗体或抗原。继续加入抗原,沉淀中的抗体量下降,但抗体和抗原的比值不变。此时由于抗原过剩,导致抗原抗体复合物成为可溶性的,上清中含有抗原抗体复合物,但不能检测到未反应的抗体。

网格学说(lattice theory)[84,85]通过建立沉淀反应的模型来解释以上现象。此理论假定抗体为多价而抗原为二价或多价。因此,抗体与抗原相连,其中抗原再与另一个抗体相连,依此类推形成一条长链。复合物越大,可溶性产物越少,直至形成沉淀。在抗体过剩区,当3个抗体与1个抗原结合时就形成了一个分支点,从而产生大的不溶性复合物。例如,抗体与抗原的比例为3:1时,每1个抗原分子可与3个抗体分子结合形成三维的网格结构。但是,当等摩尔数量的抗体与抗原混合时(等价区),2个以上抗体与1个抗原分子结合的可能性就会下降。因此,分支点的数量下降,从而形成抗原与抗体交错的长链,而很少有分支。当抗原过剩时,沉淀接近成为摩尔比为1:1的线状链。进一步提高抗原比例,更多抗原将只有一个抗体或没有抗体分子与之结合。与一个抗体相结合意味着链的末端,因此可发现链的长度缩短,产物逐渐变小以至可溶。在抗原过剩区可检测到这种可溶性抗原抗体复合物,而不能检测到游离抗体。

除了以统计的方法解释观察到的沉淀现象,网格学说还作出一个很重要的预测,即抗体是二价或多价的。后续对抗体的结构特性研究(见第3章)也揭示了抗体的分子质量和价数。除IgM为功能五价,可以更有效地产生沉淀,其余抗体确实均为二价。

当抗原分子上存在多个同样的抗原决定簇,或者同一抗原拥有许多不同的抗原决定簇,而每一个抗原决定簇均可与异质性抗血清中不同抗体亚群发生反应时,抗原表现为多价。对于前者,第19章有一个很好的例子说明如何通过沉淀或不能产生沉淀来确定抗原决定簇。多糖的优势抗原决定簇通常为链的非还原性末端。具有分支链的多糖不只一个末端,因而是多价的。如右旋糖酐(葡萄糖的多聚物)这一类无分支的链,对于末端特异性的抗右旋糖酐抗体是单价的,因而不会发生沉淀[86]。但是,另一组抗右旋糖酐抗体特异性地针对葡萄糖的内在部位(internal glucose moiety)。由于右旋糖酐中拥有许多这样的内在单位,因而对于内在 α(1→6)连接的葡萄糖特异性抗体是多价的。因此,无分支的右旋糖酐多聚体可用于区分末端特异性和内在特异性的抗体,因为它可以沉淀后者而不能沉淀前者[86,87]。单体的蛋白质抗原,如肌球蛋白(见第19章)或溶菌酶,可被看作第二种情况。因为它们与异质性的抗血清是多价的,而对单克隆抗体则是单价的。这一结果源于每一个抗原分子具有多个抗原决定簇但每一个抗原决定簇只有一个拷贝的事实。因此,采用多特异性的抗血清时,其中的每一个抗体可与一个抗原决定簇反应,抗原可结合一个以上的抗体从而形成网格。但是,如果抗体只针对一个抗原决定簇(如单克隆抗体),不会产生沉淀。在这种情况下,抗原抗体反应必须通过其他类型的结合实验进行测定,如前面介绍过的RIA和ELISA。

免疫扩散(immunodiffusion)

免疫沉淀最为有用的应用是与扩散系统相结合[88]。将一滴蛋白质溶液轻轻地放入一盘水中,不扰动液体即可观察到扩散现象。根据Fick原理,蛋白质在液体中的移动速率与浓度梯度和蛋白质扩散系数(diffusion coefficient)的乘积成正比:

$$\frac{dQ}{dt} = -DA\frac{dc}{dx} \tag{43}$$

其中 Q 为单位时间 t 内扩散通过区域 A 的物质量,D 为扩散系数,取决于分子的大小,dc/dx 为浓度梯度。由于抗体分子的体积很大,其扩散系数很低,因而在大多数系统中,抗体通过5~20mm的区域通常需要一天甚至更长的时间。为了在如此长的时间内保持液相的稳定,需要在不影响蛋白质的迁移的条件下,加入凝胶基质作为支持物。实际工作中发现,0.3%~1.5%的琼脂或琼脂糖可允许大至抗体的蛋白质通过,并且可以防止机械和热量导致的对流。通过仔细地调整抗体和抗原的浓度,该系统可对抗原性成分的数量以及某一给定成分的浓度进行简单分析。通过调整反应物进入凝胶的方式,免疫扩散可用于分析抗原性相同还

95 96

是不同,或者部分交叉反应,以及抗原的纯度和抗体特异性。下面讨论常用的4种方法。

一维单向扩散(single diffusion in one dimension)

本方法中,将抗体与凝胶混合,然后加入玻璃试管中。再将含有抗原a的溶液铺于凝胶表面,抗原即开始向凝胶基质中扩散(图4.15A)。经过一段时间,当抗原a的浓度与凝胶中抗a抗体达等价时,在t_1的位置形成一条沉淀线。随着抗原的进一步扩散,该位置的抗原过剩,t_1位置的沉淀消失,等价线迁移到t_2的位置。根据Fick定理积分,我们发现迁移的距离与时间的平方根成正比。如果a和b两种抗原同时扩散,抗血清中也包含针对它们的两种抗体,就会形成两条独立的沉淀线。它们以不同的速率移动。移动速率取决于样品中的抗原浓度,扩散系数(抗原大小)以及琼脂中的抗体浓度。但是,由于沉淀线随时间而移动,此方法很难用于定量测定。

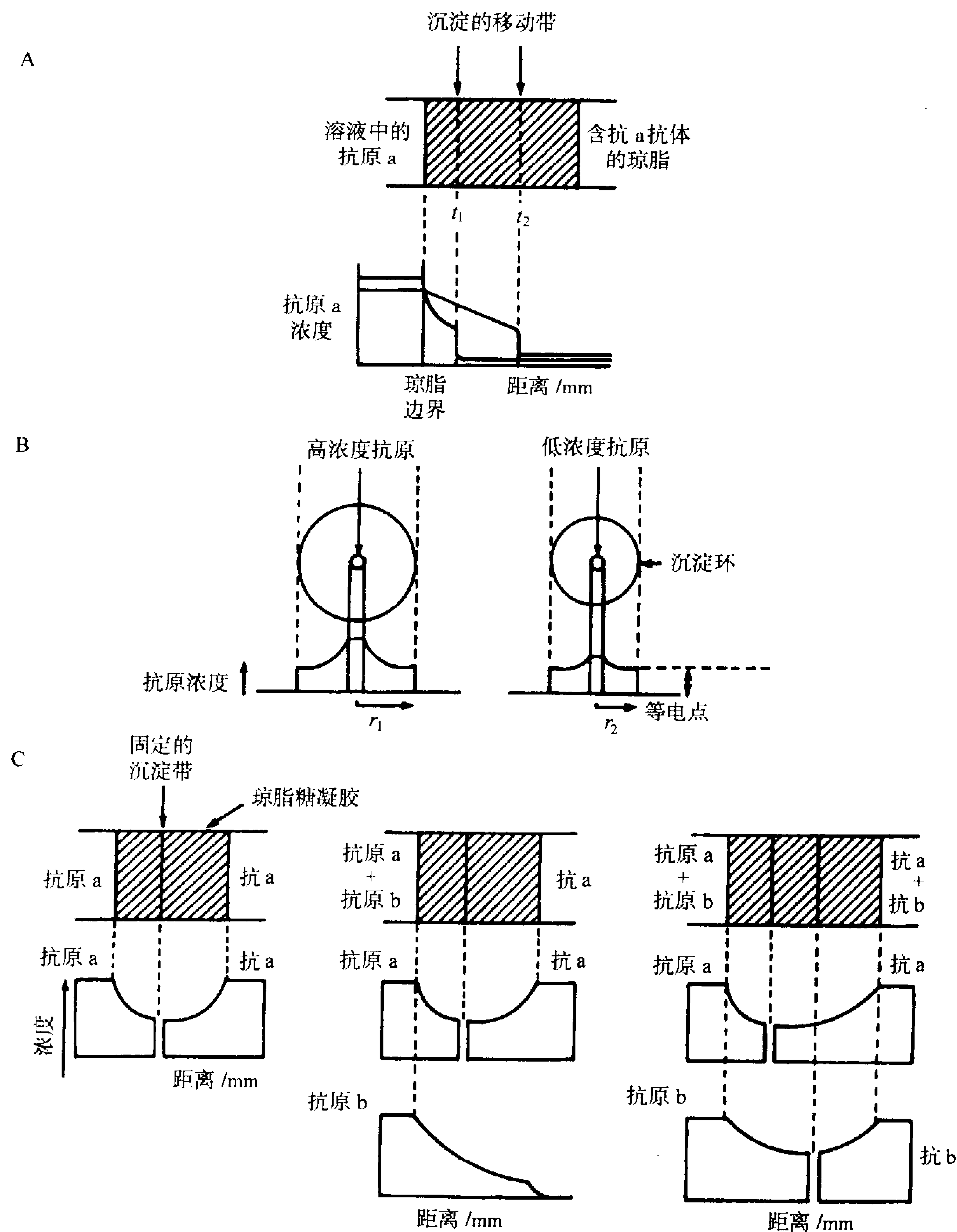


图4.15 免疫扩散。A:一维单向扩散; B:二维单向扩散; C:一维双向扩散。每幅图下半部分的纵坐标为扩散物的浓度。

二维单向扩散(single diffusion in two dimensions)

本方法中[89~92]，按前面同样的方法将抗体混合于凝胶中，但扩散在二维中进行(图 4.15B)。将凝胶铺于皮式培养皿(petri dish)，并在其中打孔，小孔中加入包含抗原 a 的溶液。通常将不同稀释度的抗原加入一系列小孔中。经过一段时间，抗原从每个小孔中扩散出来形成梯度。达某一个扩散半径时，抗原浓度将与凝胶中的抗体等价，形成一个沉淀环。最初的抗原浓度越高，抗原形成沉淀前的扩散距离越远，形成的沉淀环面积越大。沉淀环的面积直接与最初的抗原浓度成正比。作为一种简便的定量测定方法，此方法广泛运用于免疫球蛋白类型的测定。即小孔中加入待测血清，而将针对不同免疫球蛋白类型的抗血清混合于凝胶中。如果降低凝胶中的抗血清浓度，抗原就必须达到更低的浓度时才能成为等价的，那么沉淀环的半径变大，检测的灵敏度也相应提高。但是，不能过分稀释抗血清，否则不能形成沉淀。

97

一维双向扩散(double diffusion in one dimension)

将纯化的琼脂糖在玻璃试管中形成凝胶。一端加入含有抗原 a 的溶液，另一端加入抗 a 的抗体。在最初几小时内，两种反应物分别向凝胶的另一端扩散(图 4.15C)。最后，抗原分子与抗体分子相遇；在凝胶的某一点上，扩散的抗原和抗体均达到足够的浓度，导致沉淀产生。表现为如左图所示的单一沉淀线。沉淀线的位置由诸多因素共同决定，包括抗原抗体的浓度以及各自的扩散系数。形成的沉淀线成为反应物继续扩散的屏障，因此沉淀线是稳定的。如中间图所示，免疫无关抗原 b 的扩散将不受 a-抗-a 沉淀的影响。如右图所示，如果抗血清中存在抗 b 的抗体，抗原 b 将独立地形成一条沉淀线。因此，可以通过沉淀线是否存在来判断一种抗原是存在还是不存在。沉淀线的数目反映了凝胶中抗原抗体系统的数目。这种分离抗原抗体系统的能力使免疫扩散法成为估计抗原纯度或抗体特异性的简便方法。

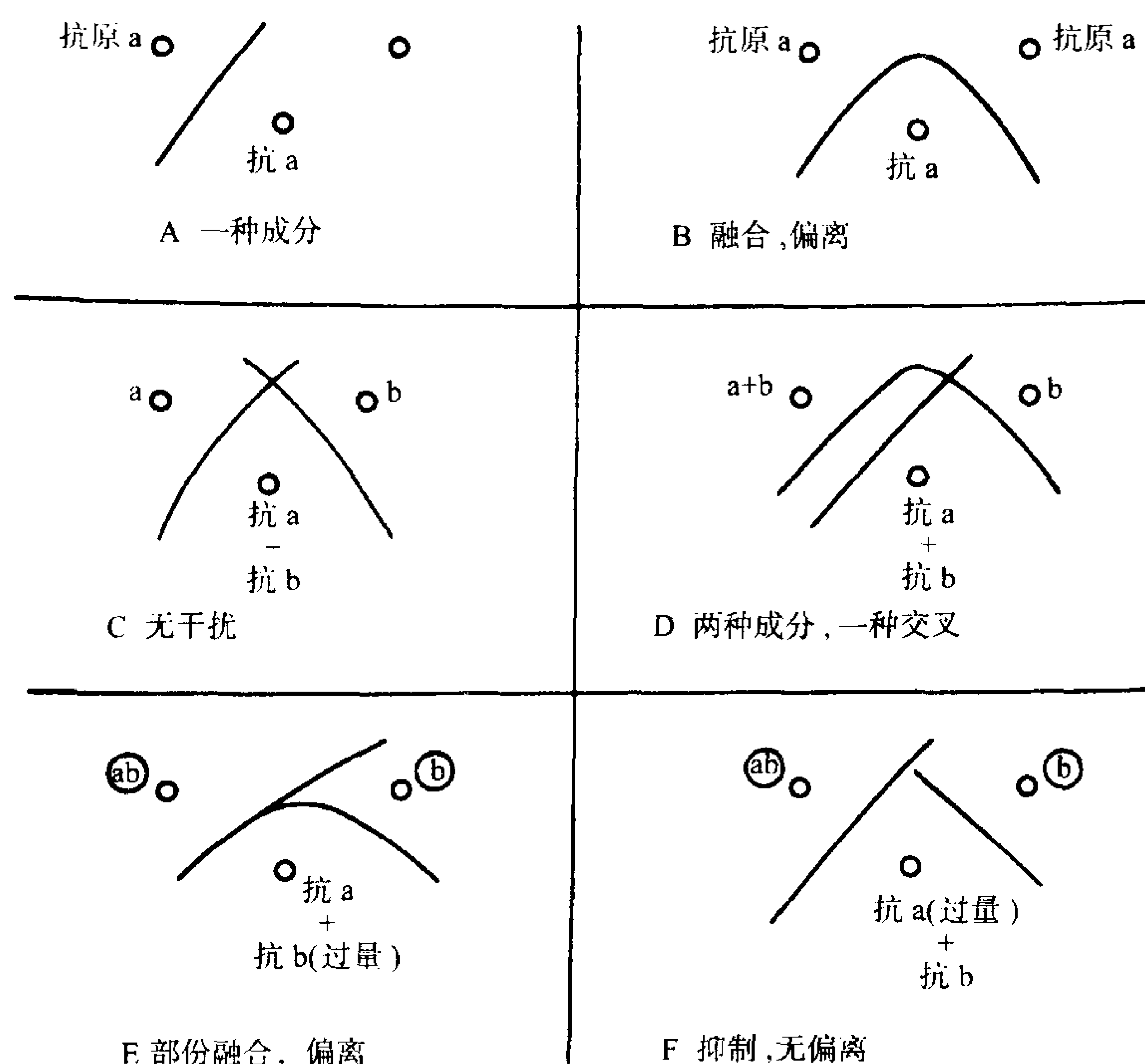


图 4.16 二维双向扩散。交叉反应导致抑制(沉淀线变短)或偏离(沉淀线弯曲)。图 B 和 D 显示一致线，图 E 显示部分一致线[88]。

二维双向扩散(double diffusion in two dimensions)(Ouchterlony 法)

在本方法中[88],将纯化的琼脂糖铺于皮式培养皿形成凝胶,然后按图 4.16 的方式在凝胶上打三个或更多的小孔。抗原 a 或 b 加在上方孔中,包含抗 a 或抗 b 抗体的抗血清加在下方孔中。如前面介绍,每一个抗原抗体反应系统都将在孔间形成它们自己的沉淀线。如图 4.16A 所示,沉淀线在孔的两侧延伸距离相等。当不同孔为不同抗原时(图 4.16C),沉淀系统不会在免疫化学方面相互作用,因此沉淀线交叉。但是,当两个孔为相同抗原时(图 4.16B),每一条沉淀线都将是相关抗原抗体的屏障,使其不能通过沉淀线。从而使孔那一侧的沉淀线变短。此外,从邻近孔中扩散的抗原使抗原过剩区偏移,导致沉淀线向下偏离,在两孔间相遇。沉淀线完全融合(fusion)而没有小刺(spur)时(比较图 4.16B 和 4.16E),称之为一致线(a line of identity),表明能够与一个孔中抗原发生反应的所有抗体也能与另一个孔的抗原发生反应。

图 4.16D 显示了本方法的强大分析能力。当把一个混合的抗原标本置于一个孔中 ,而将纯化的抗原 b 置于另一个孔中,抗 a 和 b 的抗血清可得到如图所示的结果。在左边孔形成 2 条沉淀线,右边孔形成 1 条沉淀线。完全融合的沉淀线表示第 2 条线为抗原 b;第 1 条线为抗原 a。假设两种抗原的扩散系数相近而两种抗体的用量相同,那么根据迁移的相对距离,可知抗原 a 的量高于抗原 b。最后,由于抗原 a-抗 a 的沉淀线没有缩短,表明右侧标本中没有污染抗原 a,两种抗原也没有交叉反应。

仔细分析图 4.16E 和 4.16F 的结果可以揭示抗原或抗体的部分交叉反应情况。在左侧孔中加入包含抗原决定簇 a 和 b 的抗原,在右侧孔中加入抗原 b。针对两种抗原的抗体置于下方孔中。如果抗 a 的抗体过剩,可得到如图 4.16F 所示的结果。抗 a 抗体与(ab)抗原反应形成了左侧的沉淀线。这条沉淀线继而成为阻止抗 b 抗体扩散的屏障,因此使右侧孔的沉淀线变短。但是右侧的 b-抗 b 沉淀线并不阻止抗 a 抗体的迁移,因此左侧的沉淀线没有缩短。由此形成一个小刺。如果抗 b 的抗体过剩,就形成图 4.16E 的结果。抗原(ab)和抗原 b 被同一抗体所沉淀,导致了部分融合和偏离(deviation)。但是也可观察到抗 a 抗体与(ab)抗原形成的小刺。当使用混合的抗体和部分交叉反应性抗原时,形成沉淀前沿(leading edge of precipitation)的抗体成分决定了最后的沉淀线方式。

在这里,我们需要再次强调:通过 Ouchterlony 双向免疫扩散法检测到的交叉反应性实际上是我们先前定义的 2 型交叉反应性。该方法并不适合于测定亲和力的差异,即对 1 型交叉反应性进行定量。此外,如果采用放射性标记的抗原,然后以放射自显影的方法检测沉淀可以提高灵敏度。

免疫电泳

某些抗原抗体系统过于复杂,采用双向免疫扩散时,要么沉淀线太多,要么沉淀线过于靠近,影响结果判断。免疫电泳(immunoelectrophoresis)的方法则是将一个方向上的电泳(图 4.17)与垂直方向上的免疫扩散相结合。第一步,根据电荷的不同将待测标本中的抗原进行电泳分离,从而使不同抗原的扩散原点分离开。如右图所示,这相当于将每一种抗原分别置于不同的孔中。然后在琼脂上打一个水平槽,将针对所有成分的抗血清加入其中。在分离的抗原和线性来源的抗体之间即发生免疫扩散。由三种抗原组成的混合物的结果类似于将三种抗原分别置于不同的孔中[88]。沉淀线之间的融合、偏离和抑制可按上述方法进行同样的分析。由于电泳过程中扩散的原点被拉宽,因而每一条沉淀线的分辨率会有某种程度的下降。但是先行的电泳极大地有利于未分离的人血清蛋白进行免疫扩散。如果从一个孔中开始免疫扩散,将只能看到较粗的沉淀线。如图 4.17B 所示,可将单特异性的抗血清置于一个平行槽中,从而鉴定形成的沉淀线。免疫电泳通常用于诊断人血清中的骨髓瘤蛋白。将待测血清加入孔中进行电泳,随后与抗人血清、抗人 κ 和抗人 λ 的抗血清进行免疫扩散。与抗人 IgG 的沉淀线的弧形变宽,提示存在一个不正常的抗体类别。在相同的电泳迁移率下,与抗 κ 形成沉淀线,而不能与抗 λ 反应,或与此相反,强烈提示骨髓瘤或单克隆丙种球蛋白病(monoclonal gammopathy)。因为已知这些蛋白质都来自于单一克隆,要么合成这种轻链,要么合成另一种轻链。所有正常人免疫球蛋白的电泳结果都包括两种轻链,其中 κ 和 λ 之比为 2:1。如图 4.17C(患者)所示,γ 迁移率处反

常的弧形可与抗 IgG 和抗 κ 的抗血清反应，而不能与抗 λ 反应。因而可确定为 IgG-κ 单克隆蛋白质。如果另一名患者的反常血清成分可与抗 IgG 和抗 λ 反应，而不能与抗 κ 反应，则可确定为 IgG-λ 骨髓瘤蛋白。

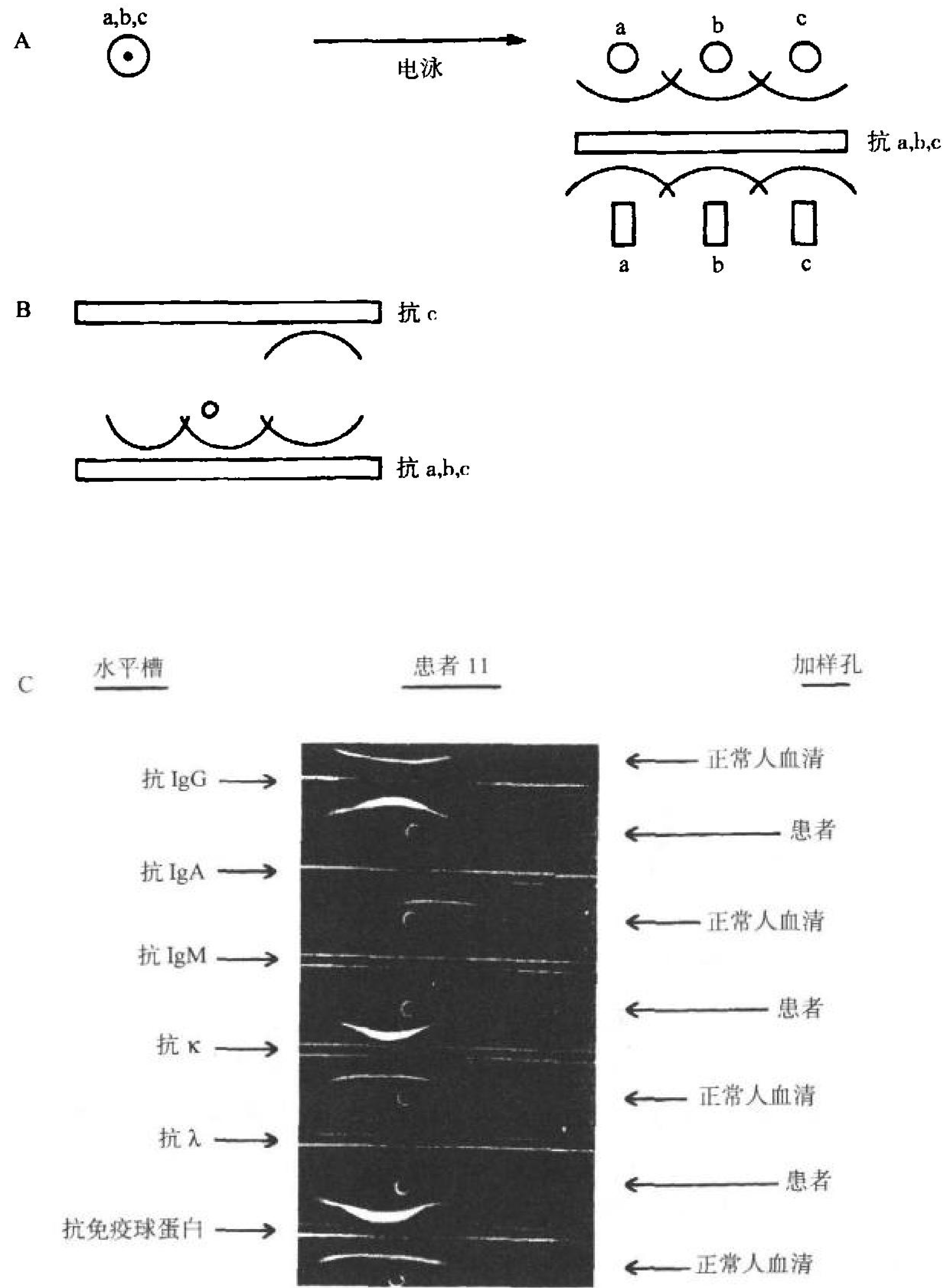


图 4.17　免疫电泳。包含 a、b、c 3 种成分的抗原在琼脂糖凝胶上电泳，使抗原在水平方向分离。然后在凝胶上挖一个水平槽，加入针对所有成分的抗血清。分离的抗原与槽中抗体的免疫扩散过程相当于 3 种抗原分别位于 3 个孔中的情况（图 A）[88]。在第 2 个槽中加入单特异性的抗 c 抗体，以鉴定抗原 c（图 B）。图 C 显示该技术应用于人血清中骨髓瘤蛋白的检测。在圆孔中加入患者或正常人的血清进行电泳分离。然后在水平槽中加入抗血清，在垂直于电泳方向上进行免疫扩散。与抗 IgG 和抗 κ 血清的反应反常性增强，而不能与抗 λ 抗体反应，提示存在单克隆的蛋白质（IgG，κ），因为多克隆的免疫球蛋白应该与两种抗轻链抗体都能反应。不能与抗 IgM 形成沉淀线，与抗 IgA 抗体的沉淀线减弱，均反映此种疾病所具有的典型正常免疫球蛋白降低。（得到 NIH 临床化学部 Theresa Wilson 的许可使用这些图片。）

火箭电泳

如同前面介绍的二维免疫扩散实验，在一个玻璃片上铺上包含特异性抗体的琼脂糖，将抗原加至琼脂糖上的小孔。然后加上电场，带电荷的抗原可在凝胶中迁移，而抗体分子由于处于等电点而基本上固定于凝胶中。不同于前面介绍的扩散方法，本方法利用电场的力量使抗原迁移，而不是抗原浓度梯度。由于所有的样品都会从起始孔中迁移出来，可以使用较低的抗原浓度。当抗原在凝胶中迁移时，抗原与局部的特异性抗体发生反应。最初抗原过剩，因而形成可溶性的免疫复合物（Ag_2-Ab 或 Ag-Ab），结合的抗原迁移速度变缓，过剩的游离抗原则迁移得更快。当游离抗原达到某一位置，与抗体达到等价时，形成免疫沉淀。经验观察的结果表明，抗原抗体沉淀的边界形成一个火箭形状，指向电场的方向，而火箭的高度直接与最初的抗原浓度成正比[93]。这是因为大多数的抗原依电场的方向迁移，很少发生扩散。

99

火箭电泳（rocket electrophoresis）的优点在于提供了一个可以定量的结果，而且比二维单向扩散更为敏感。由于火箭的高度与抗原浓度呈线性正比关系，可以将待测样品与一系列已知抗原浓度的标准品作比较，从而测得其抗原浓度。降低凝胶中抗体浓度，将使抗原迁移更远的距离才能达到等价点，可以增加火箭高度，提高灵敏度。对大多数抗原，实际检测极限为 1～10ng。

血凝和血凝抑制实验

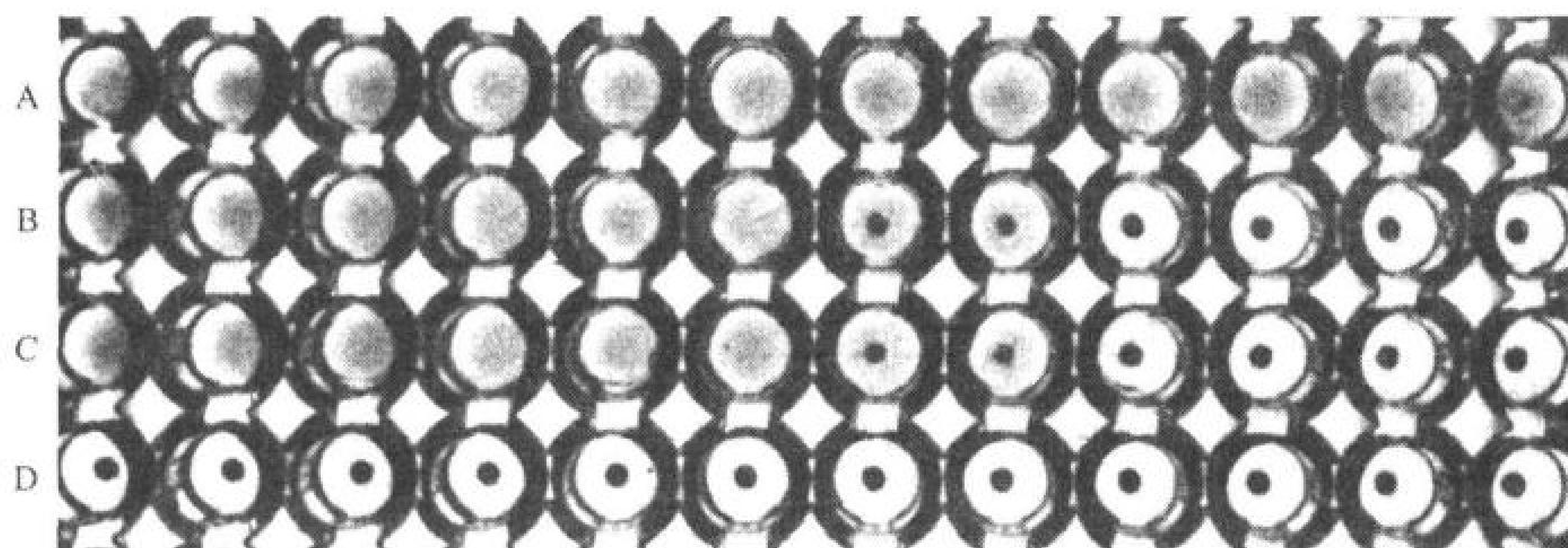
血凝实验（hemagglutination）

本方法是以抗原包被红细胞，再加入抗体使其发生凝集。这是一个十分敏感的检测方法，可对抗原抗体反应进行半定量分析[94]。由于抗原不是内源性地存在于红细胞表面，此反应又称为被动血凝试验（passive hemagglutination）。未经处理的红细胞带有负电荷，由于静电作用不易发生凝集。但经鞣酸处理后（0.02mg/ml，37℃，10min），它们就容易发生凝集。

未经处理的红细胞有较强的吸附能力，很容易包被多糖抗原。经鞣酸处理后的红细胞也很容易结合蛋白质抗原，成为一种敏感试剂。对于其他各类抗原则各不相同，变异性较大，这是影响该方法运用于某些抗原的限制性因素。轻度凝集或部分变性的蛋白质抗原显然更易发生吸附[94]。在吸附步骤，抗原中的杂质可能竞争蛋白质结合位点，因此抗原纯度十分重要。经过鞣酸处理和吸附，可将红细胞保存于 1%的血清中防止自发性凝集。如果鞣酸处理效果不理想，可用氯化铬（chromic chloride）处理。氯化铬可以中和细胞表面的负电荷，从而有利于某些蛋白质抗原的吸附。此外，还可用二价交联试剂，如双偶氮联苯胺（bis diazobenzidine）或戊二醛，或碳化二亚胺（carbodiimide）中间产物将抗原共价结合于细胞表面。

检测特异性的抗体时，在 U 型底的微量滴定板上加入梯度稀释的抗血清（图 4.18），然后加入 1%的抗原包被红细胞 0.1ml，混合后静置 2 小时。如果存在特异性抗体，凝集红细胞沉积成一层覆盖孔的整个圆底。未凝集的红细胞则从侧壁滑下，在孔的最下方形成一个圆点。样品效价为明确发生凝集时的最高稀释度。凝集的细胞形成松散网状物，甚至可以在沉积后重悬，再次沉积后会得到同样的结果。当使用超免疫（hyperimmune）的抗血清时，可观察到高剂量的抗体抑制凝集的现象，称为前带效应（prozone effect）。对前带效应有两种解释。一种说法同定量沉淀素实验中的前带现象，在抗体大量过剩的情况下，每一个细胞都被不同的抗体分子所包被，因此不太可能发生由同一抗体分子导致的交联。第二种解释认为存在一些无效抗体（inefficient antibody）占据抗原位点却不能导致细胞凝集[7]。无效抗体或“阻断”抗体（“blocking” antibody）通常为低效价的，而凝集反应仍可在在高稀释度时发生。为保证抗原的特异性，应在实验前以未包被的红细胞吸附抗血清，并在每一次实验中均应包括未包被红细胞的对照。

本方法的最大优势在于将分子事件转变为整个红细胞的凝集，使其灵敏度远远高于沉淀反应，而反应的特异性与免疫沉淀相同。例如，以一种抗原包被有核红细胞，而以另一种抗原包被无核红细胞，将它们混合后分别与特异性针对两种抗原的抗血清反应，结果出现两种类型的凝集物，每一种凝集物中只包含一种类型



100

图 4.18　血凝试验。在板上最左边的孔中加入抗血清，然后从左至右作梯度稀释。抗原包被的红细胞加至每个孔中，使其沉积。结合的抗体可阻止红细胞形成紧密的小团。红细胞在孔底形成一层覆盖孔的整个圆底时所对应的最高稀释度为抗体效价。此图中，B 排为 212，C 排和 D 排为 27。E 排为免疫前血清对照。B 排的第一个孔显示轻度的前带效应。（承蒙 D.L.Nelson 和 R.Yarchoan 博士提供照片。）

的红细胞。血凝实验的一个缺陷在于，抗原包被的变异性较大，从而显著影响凝集反应的灵敏度。此外，IgM 的凝集能力是 IgG 的 750 倍，可能影响根据效价解释实验数据。最后，可能仅仅因为主观上对终点的判断不同而使效价有 2 倍的改变。

血凝抑制实验（hemagglutination inhibition）

一旦确定了抗血清效价，抗原包被的红细胞与抗血清之间的反应就可作为一个敏感的方法用于抗原的检测。保持抗体用量不变（抗体浓度为产生凝集反应所需抗体浓度的 2 倍），加入不同量的游离抗原。当一半或更多的抗体位点被游离抗原占据时，凝集反应将被抑制。同理，可将抗体与抗独特型抗血清共同孵育，由于抗独特型抗体会与抗体的可变区结合，通过空间位阻作用阻断抗原的结合，因此，抗体与抗原包被红细胞之间的凝集反应会受到抑制。这就提供了一种敏感的方法，用于检测和定量测定抗独特型抗体。

免疫印迹

聚丙烯酰胺凝胶电泳（polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE）是蛋白质分析中最有用的技术之一。该方法通过电场力，使带电荷的蛋白质在凝胶中迁移。如果使用十二烷基磺酸钠（sodium dodecyl sulfate, SDS），蛋白质的迁移距离就与其分子质量的对数成反比。如将核糖体或病毒进行电泳，其复杂结构中的不同蛋白质成分可根据其特征性的分子质量在凝胶的相应位置形成清楚的条带，并可用特异性的抗体加以鉴定。但是，抗体很难扩散到大多数的聚丙烯酰胺凝胶中，因此必须将蛋白质条带从凝胶转移至硝酸纤维膜，使其可以与抗体发生反应。抗原在膜上的位置完全忠实于它在凝胶上的位置，因此很容易检测与特异性条带（对应于蛋白质抗原）结合的抗体[95]。

免疫印迹（immunoblot, Western blot）一个很重要的应用在于观察病毒成分与特异性抗体的相互作用。将病毒抗原用 PAGE 分离，再将所有条带电转移至硝酸纤维膜。加入与抗原反应的抗体，再加入酶标或放射性标记的二抗，以检测抗原抗体带。酶在局部发生颜色反应，显示出抗原条带的位置，或者将硝酸纤维膜在照相底片上曝光，以显示放射性标记情况。因为检测方法是抗原特异性的，只有病毒抗原才能与抗体反应并显示出来，所以可以使用病毒抗原的粗提物作为电泳样品。

101

图 4.19 是一个典型的实验结果。将人 1 型免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus type 1, HIV－1）培养于敏感细胞株 H9，再通过沉淀的方法从细胞培养上清中浓缩病毒颗粒。PAGE 分离病毒蛋白，再用感染患者的血清进行免疫印迹检测。抗血清所识别的每一条抗原带均已被确定为一种病毒成分或蛋白质前体。使用单特异性的抗血清，可以发现 gp160 前体被加工成 gp120 和 gp41 外壳蛋白，p66 前者则被加工成反转录

酶的成熟蛋白形式 p51。p24 和 p17 是病毒的核心抗原[96]。在实际工作中,这样的检测可用于感染的诊断,血液制品的筛选以降低 HIV 传播的危险性,以及新疫苗免疫原性和保护效应的检测。

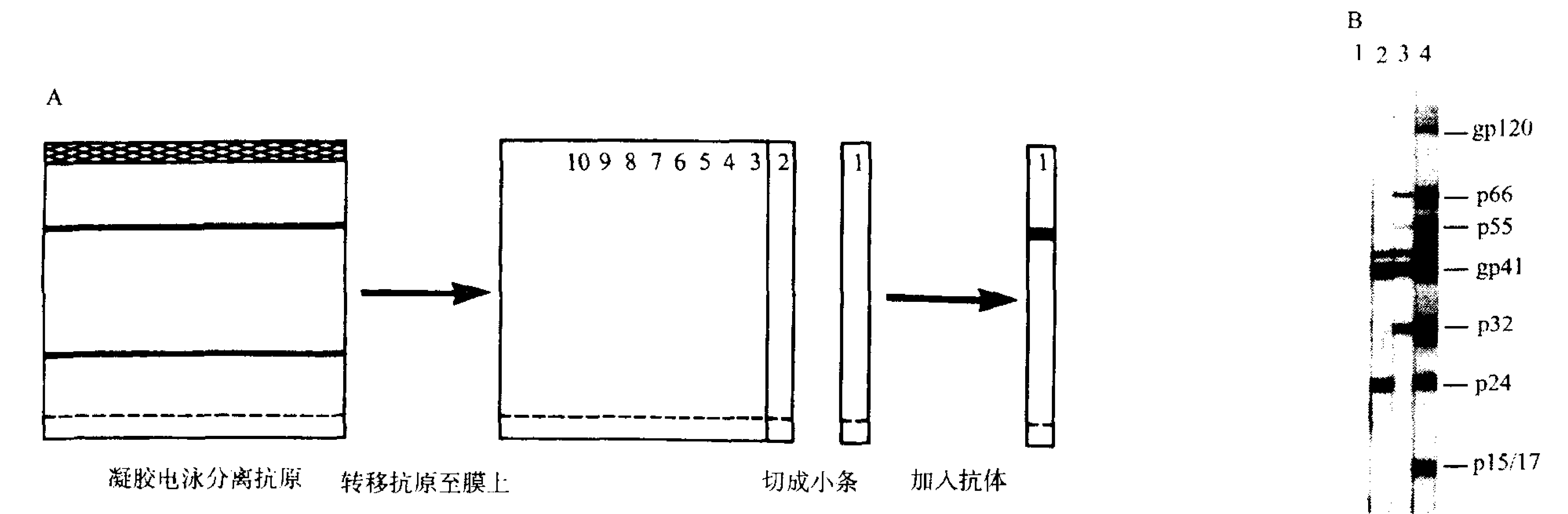


图 4.19 免疫印迹技术。A:制备抗原中的不同成分在聚丙烯酰胺凝胶中分离成不同的条带。然后将它们电转移至膜上。再将膜切成小条,每一个小条与检测抗体共同孵育,随后加入酶标二抗。如果抗体与某种抗原成分结合,可在小条的相应位置形成黑色条带。B:用含有 HIV-1 病毒抗原的小条检测 AIDS 患者的临床标本,显示抗 gag、pol 和 env 蛋白的抗体。第 1 道为阴性对照,2~4 道为 3 名不同患者的血清。

单克隆抗体

在免疫学研究中,均一性免疫球蛋白一直发挥着重要作用。自 20 世纪 60 年代以来,因为人和动物的骨髓瘤蛋白在研究抗体这一类具有多样性的蛋白质方面具有独特的优势,它们一直被作为免疫球蛋白的代表来加以研究。Potter 及其同事就鉴定了多种小鼠骨髓瘤,并确定了部分骨髓瘤的抗原特异性[97]。这些工作为研究免疫球蛋白的结构、功能和遗传学奠定了基础。但是,那时尚不能诱导产生具有预定特异性的单克隆免疫球蛋白。

Köhler 和 Milstein[1,98] 以及 Margulies[99] 建立的杂交瘤技术实现了这一目标。从此,单克隆抗体在生物学的研究和应用中发挥了巨大的作用。无论是制备和纯化大量的抗体,并保证不同批次的一致性,还是从杂交瘤细胞株中获得免疫球蛋白的 mRNA 和 DNA 都变得相对容易了许多。

杂交瘤的建立

本节将就建立杂交瘤的技术进行综述,并对涉及的一些问题进行讨论。但并不提供一个实验室使用的详细操作步骤。如需了解这方面内容,请读者参考这方面的专论和综述[3,100~103],以及包括许多建议和需要避免的问题在内的一个详细的实验室方案[104]。

分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞由两种类型的体细胞融合形成。一种细胞是来源于免疫动物的抗体产生细胞,这些细胞在组织培养时,会在相对较短的时间内发生死亡。另一种细胞是骨髓瘤细胞,它赋予杂交瘤细胞永生培养特性。骨髓瘤细胞是带有药物选择标记的变异体细胞,只有与脾细胞融合的骨髓瘤细胞才重新获得丢失的酶,可在选择性培养基中存活。杂交瘤的制备能否成功取决于两种细胞的特性、融合条件、以及后续的选择和筛选工作。图 4.20 为制备杂交瘤的全部过程。

102

免疫动物

目前已根据经验建立了用于融合的免疫程序。可使用标准程序以外的多种改进程序,它们之间的主要

差别在于融合前 2～4 天静脉注射抗原加强免疫。静脉注射的重要性和时间主要与优先融合的细胞类型有关：研究发现制备杂交瘤的最佳时间早于噬斑形成细胞和血清抗体的最佳产生时间，而与增殖的高峰相符[105]。某些研究者认为，不应该在抗体效价最高的时候进行静脉注射加强免疫和融合，而应该等到抗体水平下降时再进行[101]。

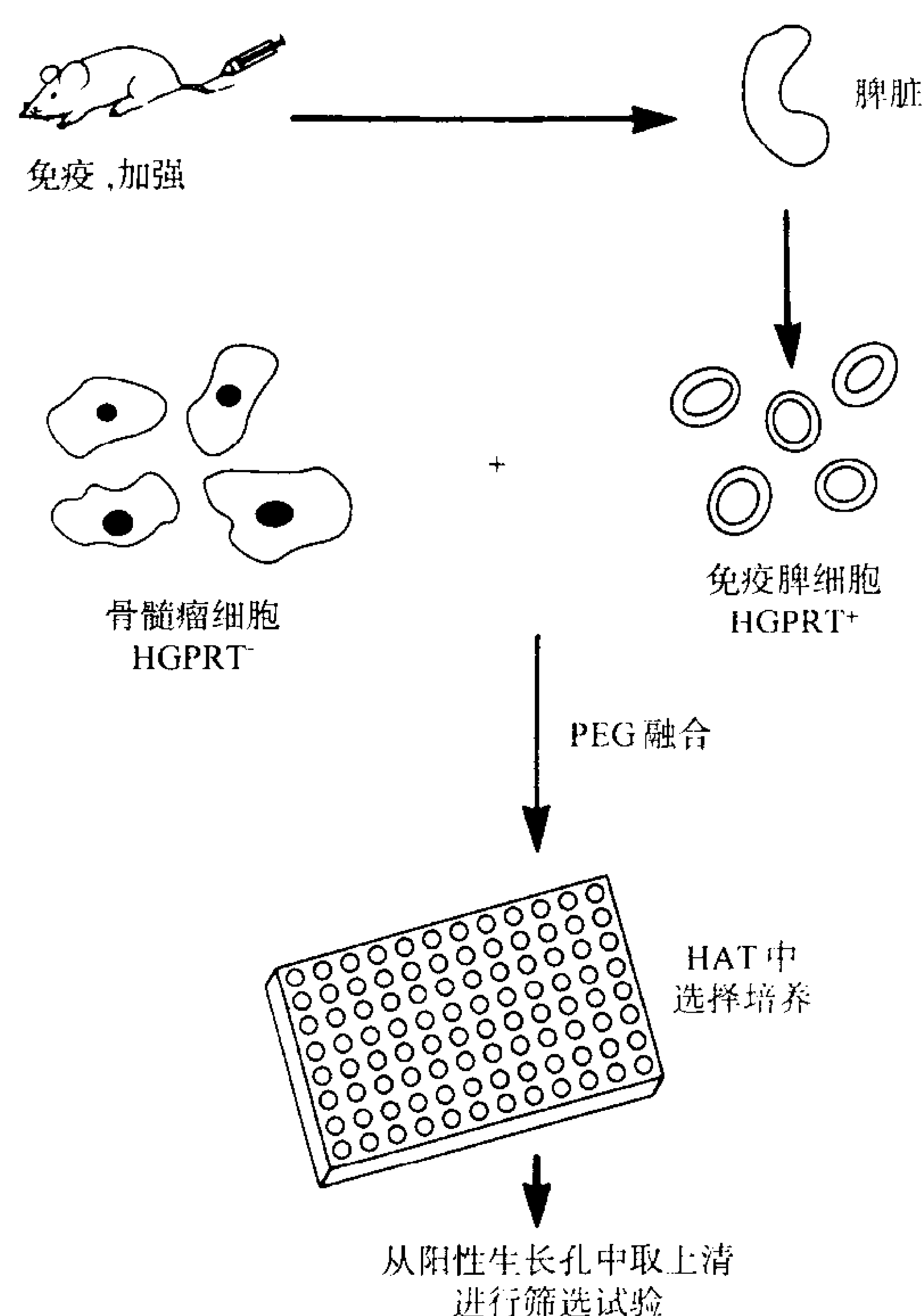


图 4.20　杂交瘤的制备过程。来自免疫供体的脾细胞与带有选择性标记(图 4.21)的骨髓瘤细胞融合，然后在选择性培养基生长直到有肉眼可见的克隆生长，随即检测其上清的抗体分泌情况。

融合使用的骨髓瘤细胞株

建立药物敏感的骨髓瘤细胞变异株为制备杂交瘤细胞提供了技术上的便利。通常使用的选择性标记对包含次黄嘌呤、氨基喋呤和胸腺嘧啶核苷(HAT)的培养基敏感。图 4.21 显示了涉及的生化途径。氨基喋呤阻断了嘌呤的从头合成。脾细胞中含有参与嘌呤补救合成途径的次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase，HGPRT)，因而可在 HAT 培养基中存活，但除非与骨髓瘤细胞融合获得永生性，否则会在较短时间内死亡。对于经过诱变和选择获得的 HGPRT 阴性的骨髓瘤细胞，除非与脾细胞融合获得 HGPRT 酶，否则也会在 HAT 培养基中死亡。因此，在融合后的数天内，会有大量细胞死亡，只有脾细胞与骨髓瘤细胞的融合细胞才能存活下来。其他的药物标记，如乌巴因(ouabain)耐受，只在偶尔的情况下使用。

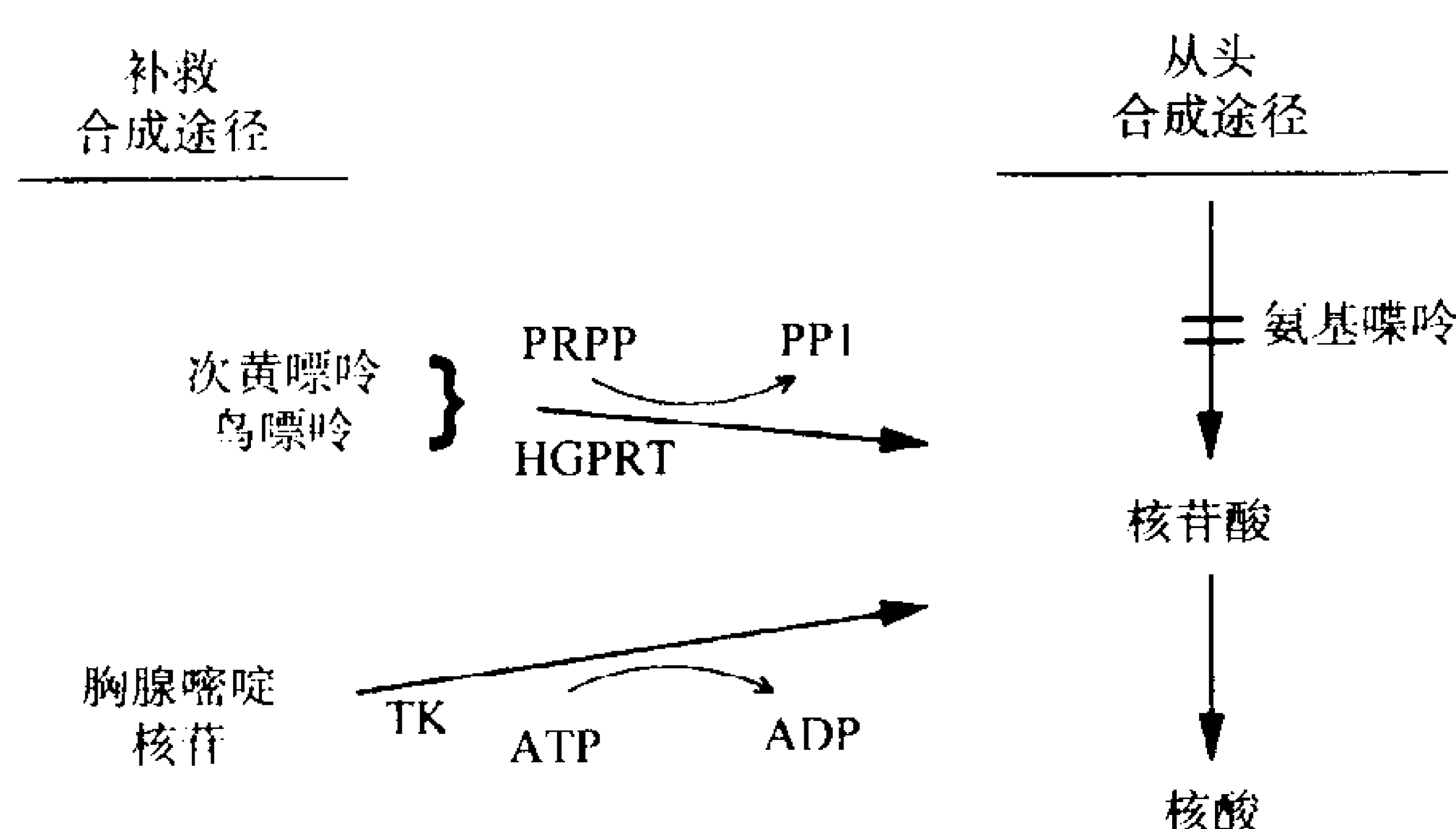


图 4.21　融合用突变细胞内的核苷酸生物合成途径。突变细胞缺乏 HGPRT 或 TK，不能通过相应的补救合成途径合成核苷酸，因而在含有氨基喋呤的培养基内，由于从头合成途径被阻断，该细胞不能存活。但是，当突变细胞与脾细胞融合后获得 HGPRT 或 TK 后，可以通过补救合成途径在选择性培养基中存活。HGPRT：次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶；TK：胸苷激酶。

最初使用的骨髓瘤细胞保留了分泌自身免疫球蛋白的能力[1]，但后来均被表达一条内生性链(endogenous chain)[98]或不能表达免疫球蛋白[106,107]的骨髓瘤变异体所取代，因此融合的细胞将主要或专门分泌预定特异性抗体。这在技术上提供了很大的便利，假设一个细胞可以产生两种重链和两种轻链，它们之间可以随机组合，那么就会有六种类型的抗体，而其中只有一种是研究者所需要的。

应该定期地将骨髓瘤细胞放回选择性培养基，如 8-氮杂鸟嘌呤中培养，以保证它们没有逆转为药物抵抗的表型。某些通过缺失突变建立的对药物敏感的细胞株可能没有必要进行这一工作。8-氮杂鸟嘌呤插入到 DNA 中依赖于补救途径，因而可以选择性地杀死 HGPRT 阳性的细胞。

融合方法

103 用于细胞融合的试剂有数种。早期的体细胞融合通常使用仙台病毒[1]。后来聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)取代仙台病毒而广泛地运用于常规融合中。两种方法均是随机融合。因此,许多融合的细胞可能不能产生抗体,而那些产生抗体的融合细胞所分泌的抗体可能并不具有预期特异性。

融合效率主要与使用的试剂有关,但具体机制很不清楚。因此,应在实际融合中检测和筛选每一个批次的 PEG、小牛血清或其他血清,从中选择不影响融合效率的试剂。仅仅观察试剂能否支持细胞生长还不够。支原体污染也可能干扰融合,因而必须进行支原体检测。

在阳性生长孔中,分泌所需特异性抗体的比例存在很大变异。最初的融合实验报道,分泌抗绵羊红细胞抗体的融合细胞约占总融合细胞的 10%[1],但是很多抗原的阳性率远远低于这一数值。通过随机融合方法产生的杂交瘤细胞阳性率太低,使许多研究者尝试将针对特定抗原的细胞进行选择性融合。选择性融合的方法是通过生物素-亲和素桥联的一类方法将抗原直接或间接连接到骨髓瘤细胞表面,然后将免疫的脾细胞与抗原包被的骨髓瘤细胞混合,使其发生凝集,再通过加入 PEG[108]或在强电场作用下[109],使凝集的细胞发生融合。

筛选方法

用于检测上清中抗体的方法与研究这些抗体的方法是一样的。已经成功运用的方法包括:RIA,ELISA或其他结合试验;免疫荧光或流式细胞仪;细胞毒性试验;生物学效应的激活或阻断试验,如细胞介导的淋巴细胞溶破试验(cell - mediated lympholysis, CML),受体激活,淋巴因子活性。也可通过杂交的方法检测细胞中特定类型的免疫球蛋白 mRNA,并不检测上清中的抗体[110]。

选择一种筛选方法的重点在于该方法不应有太大的波动而导致许多假阳性,使得大量精力投入到无用杂交瘤细胞的克隆上。清晰地分辨阳性和阴性通常比检测的灵敏度更为重要。大多数培养上清中至少含有每毫升数毫克的抗体,完全能够满足大多数方法的检测要求。

一个好的筛选方法还应该能够方便地检测数百个样品,并且很快出结果,这样在得到鉴定结果时,细胞仍然是完好的。如果检测需要的参数太困难或需花费很长时间,通常的做法是先用另一个方法初筛,然后用严格的实验对初选者进行鉴定。例如,可用一个简单的结合实验进行初筛,然后再用免疫沉淀法检测阳性孔以确定与特定成分的结合。如果选择的克隆需要同时具备两种或两种以上的特性,这种多重筛选方法也十分有用。

如果检测方法的灵敏度较高,以致可以检测到混在一组阴性克隆中的一个阳性克隆,那么,即使这种方法不能用于很大量的样品,也可用来检测来自不同杂交瘤细胞组的上清,然后再对阳性组中的各个成分进行鉴定。

融合后的步骤

一旦确认阳性孔,就必须将杂交瘤细胞克隆化以保证它只分泌一种抗体,此外,还需将细胞冻存以备今后使用。由于这一工作会花费大量的人力和物力,因而必须采用有效的策略。

通常在克隆化以前,最好再进行一次检测。只有在第二次筛选时能够产生特异性抗体的杂交瘤细胞才进一步地作克隆化处理。克隆化的方法包括有限稀释法或软琼脂克隆选择法。不管采用哪一种方法,最好能迅速地进行克隆,以避免同一孔中可能存在的不分泌抗体的细胞或阳性细胞的变异体快速生长,超过了产生抗体的细胞。可能由于体细胞杂交瘤是非整数倍的染色体,容易丢失染色体,新产生的杂交瘤细胞在分泌抗体方面往往是不稳定的。因此在确定有活性的克隆建立以前,必须保留未克隆的细胞株。最后,必须将分泌预定抗体的克隆进行扩增,收集上清以制备抗体,冻存细胞,再将冻存的细胞复苏以确认细胞的传代能力和抗体分泌能力。

从小鼠以外其他种属制备杂交瘤

小鼠是制备杂交瘤最常使用的免疫动物。但是,由于各种各样的原因,使用其他种属的动物也有其优点。如果感兴趣的抗原在小鼠是非多样性的,那么小鼠的抗原对于其他种属具有免疫原性,而在小鼠本身却是耐受的。从临床运用角度来看,小鼠的抗体会诱导抗小鼠免疫球蛋白的免疫应答,从而可能产生副作用,因此,制备人的杂交瘤十分重要。

已经建立几种在小鼠以外建立杂交瘤的方法。首先,可以用小鼠骨髓瘤细胞进行种属间杂交。获得的杂交瘤细胞通常不稳定,会丢失染色体,但有时选择的克隆可以稳定地产生抗体。成功的例子包括:大鼠与小鼠融合以产生抗小鼠 Fc 受体的抗体[111],仓鼠与小鼠融合以产生抗小鼠 CD3 的抗体[112],家兔与小鼠的融合也有报道[113]。

第二种方法是使用相应种属来源的骨髓瘤细胞。目前已建立许多种属的带有药物选择标记的骨髓瘤变异体。Bazin[114]就建立了大鼠骨髓瘤细胞株 IR983E。这种方法可以避免种间杂交的不稳定性,还可在同源宿主中制备腹水。

制备人的杂交瘤具有特殊重要意义。因为在运用于治疗时,人的杂交瘤可以避免其他种属杂交瘤导致的针对免疫球蛋白的免疫应答。由于这方面问题的临床重要性,我们将在应用一节中进行详细讨论。

利用基因库制备单克隆抗体

104

通过杂交瘤技术制备的单克隆抗体来源于免疫动物的 B 细胞。也可采用基因库和表达系统来制备单克隆抗体。该技术的优势在于避免了免疫动物和筛选上清的繁琐工作,而且可以绕开免疫耐受。因此,即使相应的动物种属表达该抗原,也可以制备其单克隆抗体,包括那些高度保守的抗原,通常找不到不表达该抗原的相应动物。

采用该技术的第一种方法是制备 V_H 和 V_κ 库,然后在细菌中表达。在某些情况下,单独的 V_H 结构域就可与抗原以较高亲和力结合,因此可以直接筛选基因库的表达产物[115]。进一步的改进方法是,分别制备 V_H 和 V_L 库,然后通过酶切、混合和在库的酶切位点重新连接,制备组合库[116,117]。还可用一段连接物(linker)使 V_H 和 V_L 同时表达于一段共价多肽上;由于连接物有一定柔韧性,从而允许 V_H 和 V_L 以正常的三维构象方式连接,形成一个抗原结合位点[117]。

另一个技术改进是将 V_H 和 V_L 与噬菌体外壳蛋白以融合蛋白的形式表达于噬菌体表面,从而可以从大量序列中进行快速筛选[117~119]。筛选方法是以抗原包被某种固相表面,然后吸附展示抗体的噬菌体,从而将编码特定 Fv 的噬菌体阳性克隆筛选出来。

噬菌体展示技术也被用于组合的可变区基因库[118,119]。在一项研究中,以来源于免疫小鼠的经重排后的 V_H 和 V_L 基因制备 V_H-连接物-V_L 库,然后从中筛选与抗原结合的噬菌体。也可以已知活性的 V_H 或 V_L 基因与来源于免疫小鼠的所有另一条链制备分层库(hierarchic library),然后从中发现新的活性组合[118]。

以 PCR 方法从人的外周血[120]、骨髓[121]或人细胞重新免疫的 SCID-人小鼠(human cells reimmunized in SCID-hu mice)[122]中扩增人的抗体基因序列,然后使用噬菌体技术从中选择与抗原结合的克隆,从而获得所需特异性的人源性抗体。抗乙肝表面抗原[120]或 HIV 包膜[121]的抗体就是采用这一方法获得的。

但是早期噬菌体技术获得的抗体往往亲和力较低,这是该技术的主要限制之一。主要原因在于抗体是通过随机产生的,没有经过进一步的体细胞突变过程,因而不能像体内抗体那样有结构上的精细调整。目前已建立几种提高亲和力的方法。其中之一是使用高突变的细菌株(bacterial mutator strain)[123]来实现超突变(hypermutation)和选择。大肠杆菌的 mutD5 株含有一个错误倾向的 DNA 多聚酶Ⅲ,比野生型突变率高 10^5 倍。

如果一个编码抗体 V 区的噬菌体感染这样的细菌,抗体序列就可能发生突变。因此单个细菌内会同时

含有野生型和突变型的噬菌体，导致噬菌体表面呈现混合序列的蛋白质。因此，在筛选高亲和力突变体以前，必须将噬菌体在非突变倾向的细菌(nonmutator bacteria)内生长，使每一个细菌只包含一种抗体序列，只展示相应的一种抗体。经过多轮的突变和在非突变倾向的细胞内生长，就可从中筛选出亲和力增加100倍的高亲和力抗体[123]。也可以通过点突变的方法改变超变区内影响解离速率的残基来提高亲和力[124]。

在上述讨论的各种库中，V_H 和 V_L 是随机组合的，因此产生的抗体并不能真实地反映免疫应答过程中抗体的选择和表达[116]。也许可以通过 PCR 从不同细胞中扩增 V 区基因来重建一个天然库。但是对于库(repertoire)的研究，从足够多的代表性细胞中扩增基因似乎并不是一个合理和有效的方法。因此，在许多免疫学研究中，包括免疫库及其在免疫应答中的表达类型，组合基因库技术尚不能完全取代杂交瘤技术。不过，组合基因库提供了一个有效的途径来制备针对特定抗原的抗体，特别是那些在自然条件下不能产生，因而也不能用其他方法来获得的抗体。

单克隆抗体的应用

实验室应用

自从可以简单地制备和大量扩增单克隆抗体以来，以前不可能或十分困难的实验就成为可能。单克隆抗体的优点在于可以避免不希望的交叉反应，也很容易获得高效价抗体。但是，必须牢记在心的是：即使是单克隆抗体也可能表现出1型交叉反应性(参见后面"特异性和交叉反应性"内容)。目前，不仅在免疫学中，而且在生物学和其他自然科学中，单克隆抗体都已广泛运用各种实验设计中。本节就这些应用作一个简要介绍。

基于单克隆抗体的亲和层析方法可用于分离蛋白质，特别是那些难以用化学方法纯化的蛋白质。对某些实验，只需一步纯化即可获得足够的富集程度。这一技术已成功运用于 MHC 抗原[125,126]。

某些受体，如某些激素、神经递质和淋巴因子受体，配体的来源有限，因而常规亲和层析方法难以奏效，基于单克隆抗体的亲和层析方法则显示了独特优势。

均一性抗体可以结晶，也能与抗原一起结晶，从而使得通过 X 射线衍射研究抗体或抗原抗体复合物的结构成为可能。最初使用骨髓瘤蛋白进行这类研究，但研究的抗原只能局限在那些已确定的抗原上。单克隆抗体使得这类研究可以扩展至其他感兴趣的抗原，如溶菌酶[127,128]和流感病毒唾液酸苷酶[129,130]。

均一性抗体对于研究抗体的多样性也十分有价值。通过对一个抗体应答过程中的多种成分进行分析，使我们对抗体应答的成熟过程有了更深入理解。例如对磷酸胆碱(phosphorylcholine)[131]、胂酸盐(arsonate)[110,132]、流感病毒血凝集[133]以及轭唑啉(oxazolone)[134]等多种抗原诱导的抗体应答中的可变区序列分析，揭示了体细胞突变的作用、亲和力的改变以及抗体应答中的克隆显性(clonal dominance)改变。

催化抗体(catalytic antibody)

105

在抗体应用方面，另一个感兴趣的领域是以抗体分子催化化学反应[135]。此时，抗体作为酶的替代品，而且在某种程度上比酶更易于定向设计和操作。当然，也可以通过对天然酶分子的点突变来进行定向设计，从中选择特性有所改变的酶。但是，抗体库庞大的多样性提供了各种各样的结构可能，而不需要在实验室中另外单独合成。

其实很早以前 D.W.Woolley 就提出过抗体作为催化剂的设想[135]。一些研究尝试制备具有酶活性的抗体。其中一个研究以还原的 Schiff 碱化合物作为反应中间产物的稳定类似物，制备其多克隆抗体。结果抗体可以结合相应底物，化学反应也可在结合位点继续进行，但是与溶液中的自发反应速率相比，抗体尚未起到加速的作用[136]。使用均一性抗体后，证实某些抗体确实具有显著的催化作用。MOPC167 可提高硝基苯基-磷酸胆碱的水解速度770倍[137]。也有研究发现，多克隆抗体也具有可检测到的酶活性。如自身免疫性血清中能够切割 DNA 的活性部分就存在于免疫球蛋白中，而且是 $F(ab)_2$，而非 Fc[138]。

随着杂交瘤技术的产生,有目的地筛选具有潜在酶活性的抗体成为可能。在过去几年中,已发现能够催化化学反应的多种抗体,其效率接近自发性反应的 10^8 倍[135]。在诱导此类抗体的多种策略中[140],最普遍的方法是以过渡状态的类似物(transition-state analogue)来免疫[139]。抗体以空间特异性(stereospecific)的方式[141]发挥催化剂的作用,这是一个很有用的特性。

为什么抗体与化合物结合可以催化共价键的改变?其中的原因可能与酶相似。为加速一个化学反应,抗体必须能够降低激活反应所需的能障(energy barrier),即通过稳定过渡状态来降低其能量。因为结合能量对过渡状态总能量的贡献,这是可以实现的。基于这一理由,识别过渡状态的抗体是有利的,而以过渡状态的类似物来免疫具有其优势。

抗体还可以作为熵阱(entropy trap)发挥作用[135]。与抗体结合后,限制了底物旋转和变形的自由度,从而在能量上更有利于化学反应的进行。抗体与化学基团相互作用,可中和电荷或埋藏疏水性基团,从而稳定限制性的过渡状态。同酶促反应一样,抗体介导的催化作用机制也是多种多样。抗体与底物的相互作用可以通过静电[140]或共价键[142]。已报道的抗体催化作用机制就有多种,包括 β 排除(β elimination)[140],以及 ping-pong bi-bi(底物与抗体反应产生一个中间体并释放一个反应产物,随即第两个底物与中间体反应,释放第两个产物)[142]。

催化抗体的发现为实际应用提供了便利:因为可以通过适当的选择条件来定制抗体,抗体也更容易纯化和相对更便宜地制备。催化抗体可用于那些没有合适酶催化的化学反应,例如,针对带有乙醇桥的构象限制性环已烷的抗体可以催化 Diels-Alder 反应[143]。催化抗体也可将中间产物与溶剂屏蔽,从而使原来不能在水溶液中发生的反应成为可能[144]。催化抗体还可以形成肽键[145],提示可以作为多肽合成的一种新方法。因此,催化抗体将广泛地运用于实际工作中。

双特异性抗体(bispecific antibody)

由单个 B 细胞自然产生的抗体只具有一种结合位点特异性。单克隆抗体出现后,通过将两种特异性的结合位点连接来制备作为交联试剂的人工抗体成为可能。已建立制备这种杂交或双特异性抗体的多种技术。在将来,繁琐的化学交联方法还可能被基因工程方法所取代[146]。

这种杂交抗体最大的用处在于将细胞毒性细胞重新定向到带有特定抗原的靶细胞。早先为验证这一想法[147],将针对 Fcγ 受体的单克隆抗体与针对半抗原 DNP 的单抗化学交联。结果发现,在这种杂交抗体存在的情况下,带有 Fcγ 受体的细胞可以特异性地溶破带有半抗原的靶细胞。其中 Fcγ 受体起着重要作用,针对细胞表面 MHC Ⅰ类抗原的抗体也不能取代。

针对 TCR 的抗体也被广泛运用于将 T 细胞重新定向于希望的靶细胞。例如,将抗 CD3 抗体与抗肿瘤抗体交联,再与效应细胞混合,可以抑制裸鼠体内人肿瘤细胞的生长[148]。

双特异性抗体也被运用于改变基因治疗病毒载体的靶向性[149]。αV 整合素与病毒潘通碱包被蛋白(penton base-coat protein)的相互作用对于腺病毒进入细胞是十分重要的,但是最初的黏附是通过另一机制来实现的,即病毒纤维包被蛋白(fiber-coat protein)与未知的细胞受体相互作用。将腺病毒载体进行基因工程改造,使其潘通碱包被蛋白上表达一种标记多肽。制备针对 αV 整合素和标记多肽的双特异性抗体。在该抗体的作用下,这种腺病毒可以有效地感染表达 αV 整合素但缺乏足够纤维受体的细胞。今后该技术可能运用于将病毒定向于特定的组织或细胞类型,从而极大地改进基因治疗技术。

临床应用

单克隆抗体可以运用于临床的很多方面。在体外,它们广泛运用于 RIA 和 ELISA,检测体液中从激素到毒素等多种抗原性物质。在流式细胞仪检测中,单克隆抗体也很有运用价值,如运用特异性针对细胞表面分化抗原的抗体进行细胞亚群分析。单克隆抗体加上补体或毒素偶联的单克隆抗体还被用于骨髓移植前清除 T 细胞[150]。

在体内，单克隆抗体也已得到应用或正在为各种目的尝试使用单克隆抗体[151,152]。针对人T淋巴细胞某种标记的单克隆抗体OKT3已被用于肾脏移植患者来治疗排斥反应[153]。其他单克隆抗体如[111]铟标记的CYT-103(也称为Oncoscint)[154]，已被作用肿瘤的影像诊断试剂。能否将单克隆抗体用于治疗目的还正处于试验中。如在肿瘤治疗中使用非偶联的单克隆抗体[151,155]、毒素[156]或放射性偶联[155,157]的单克隆抗体。其他治疗研究包括以抗LPS抗体治疗败血症，以抗IL-6受体的抗体治疗多发性骨髓瘤，以抗IgE抗体治疗超敏反应[152]。

对于B淋巴细胞瘤这种特殊情况，正在试验一种魔弹治疗方法(magic bullet therapy)[158]，即使用抗患者肿瘤细胞表达的独特型的抗体。激活患者对独特型免疫的好处在于似乎很少发生逃逸突变(escape mutant)[159]，因为可以识别多种独特型。正在实验的另一种方法不是以独特型蛋白质进行免疫，而是以编码患者独特型的DNA质粒来免疫[160]。这种方法的好处在于可以为每一个患者定制试剂。

制备人的或人源化的单克隆抗体

临床上使用单克隆抗体的许多副作用都由外源性免疫球蛋白的恒定区引起。对外源性表位的识别导致该个体的致敏，因而以后即使在同一个体使用不同的单克隆抗体也会被排斥。因此，如果单克隆抗体的全部或部分结构来自于人的免疫球蛋白是十分有利的。

已经试验多种方法，包括将人的细胞与不同种类的动物骨髓瘤细胞或人的肿瘤细胞融合[161,162]，使用EB病毒使抗体产生细胞永生化[163]。由于不能随意地免疫供者，如何制备融合用的致敏人细胞也是另一个棘手的问题。在一项研究中，通过体外抗原刺激，然后与小鼠骨髓瘤细胞融合，获得了一系列抗带状疱疹的抗体[164]。

制备人源化单克隆抗体的另一个方法是运用基因工程方法。当临床运用小鼠单克隆抗体时，许多并发症都源于将小鼠免疫球蛋白作为一个外源性蛋白，因此，如果能够将抗体结构中被人认为是外源性的部分减少或去除，那么就可以减少并发症的发生。可用分子遗传学技术将人恒定区与小鼠可变区[165,166]，或者甚至只是超变区部分相连[167]。在某些情况下，抗原结合的特异性仍然保留下来，人源性嵌合分子就具有了人杂交瘤的诸多优点。

现在多个实验室已经成功地运用转基因小鼠技术制备完全的人单克隆抗体。其基本策略是将人免疫球蛋白的V、D、J和C基因簇插入小鼠胚系以产生一个转基因系，靶向分解小鼠重链和κ链基因座制备另一个转基因系。然后从两个系中培育出只表达人抗体的小鼠。

为验证这一方法的可行性，以带有部分人重链基因座的黏粒制备转基因小鼠[168]。结果发现，小鼠可以重排人的基因，并产生大量的连接多样性，表明小鼠的酶系统可以作用于人的基因基因座。另一个小组以包含人重链或轻链基因簇的质粒制备转基因小鼠。结果再次发现基因的重排和多样性的产生[169]，只是观察到的池在使用V基因和N片段长度方面尚不正常。

最近，采用下述步骤来制备同时包含重链和轻链的小鼠来产生一个功能性人抗体池。几个研究小组采用不同的技术构建了重链的微型基因座(miniloci)，其中包括功能性V片段来代表数个个主要的V区家族、D和J片段、恒定区和转换区以及增强子。构建的κ链包括多个功能性的V_κ片段、J片段、C_κ以及增强子。一个研究小组(Lonberg等[170])将基因片段组装到质粒中。他们插入μ和$\gamma 1C_H$基因以研究类别转换。另一个研究小组(Green等[171])使用酵母人工染色体(yeast artificial chromosome，YAC)来引入人的免疫球蛋白基因座。重链基因座包括μ和δ恒定区。

带有人免疫球蛋白基因座的小鼠，如果仍然保留了完整的小鼠免疫球蛋白基因座，将只能低水平地表达人免疫球蛋白。因此必须培育转基因基因座为纯合子并小鼠的重链和κ轻链已被分解的小鼠。注意小鼠的λ基因座仍然保持完整。这种小鼠就可以表达更多的人免疫球蛋白。人的免疫球蛋白基因可在小鼠的基因组中重排，并表达人的免疫球蛋白。如果以破伤风毒素片段免疫这些小鼠，产生的抗体中部分是完全是人的抗体[171]。

在 Lonberg 的研究中,血清中包括人的 μ、$\gamma 1$ 和 κ 以及小鼠的 λ 和 γ。以不同的抗原免疫这样的小鼠可发生类别转换、体细胞突变并分泌亲和力高达 10^8 的人抗体。

通过这些小鼠的研究,也证实不同种属间在抗体基因重排和多样性形成方面是相容的。这些小鼠还可作为反应器提供针对临床重要抗原的完全的人抗体,其优势在于不会对人的抗原,如 Lonberg 等[170]使用的人 IgE 和人 CD4 分子发生免疫耐受。

特异性和交叉反应性

单克隆抗体的特异性

在一个单克隆抗体样品中,所有分子都具有相同的可变区结构,而不存在克隆后的变异体,因此它们具有相同的特异性。这种均一性使不同批次的单克隆抗体也具有相同的特异性,而多克隆抗血清却常常会发生特异性的改变。最典型的例子是,如果某一种单克隆抗体具有交叉反应,那么所有的这种单克隆抗体分子都将拥有该特性,而不能在保留所有活性的情况下通过吸收的方法来去除交叉反应性。只有一种情况除外,如果在样品中混有变性的单克隆抗体,那么就可能表现出交叉反应性,但可以通过结合的方法来去除。单克隆抗体的均一性还使得多克隆抗血清无法完成的精细特异性分析成为可能。下面是几个例子。

107

首先,可以运用单克隆抗体来区分十分相近的配体。此时,如果使用多克隆抗血清,可能大多数的抗体都会发生交叉反应,因而如果用一种血清进行吸收,会去除绝大多数的配体,而不能留下足够的活性用来确定新的特异性。临床上对相关激素的检测就利用了单克隆抗体的这一有用特性。这一特性还可用于确定复合抗原中新的抗原特异性。运用大量单克隆抗体对 MHC Ⅰ类和Ⅱ类抗原进行分析时,就确定了一些无法用已知多克隆抗血清来确定的特异性[172~174]。

另一方面,当需要证实两种抗原之间的相似性而非差异时,单克隆抗体也是一个有力的工具。在某些情况下,只有抗体应答中的一小部分可以发生交叉反应,因而多克隆的抗血清将无法检测。例如,小鼠 MHC Ⅱ类抗原中 I-A 和 I-E 的共同抗原决定簇就是使用单克隆抗体来证实的[174]。在此以前,采用多克隆抗血清的实验已怀疑这一点,但很难加以证实。

当需要应用竞争结合实验来区分不同的空间位点[表位簇(epitope cluster)]时,也许就只能利用单克隆抗体来进行这种精细特异性分析。在一些情况下,可能已经利用其他方法来区分这种代表不同特异性的表位簇。但在其他的一些情况下,可能运用任何血清学或遗传学的方法也不能区分表位簇。一个典型例子是以单克隆抗体的竞争性结合将经典的 Ia.7 特异性分成三个表位簇[174]。三个表位同时表达于所有的 Ia.7 阳性小鼠细胞上,因而不能通过遗传学的方法来分辨,也不能通过多克隆抗血清的吸收来揭示不同的特异性。只有利用单克隆抗体才能发现它们是各自独立的表位。

这类分析的重要性也可从另一个例子中体现出来,这就是确定 CD4 的表位簇。CD4 分子存在于某一亚类的人 T 细胞表面,同时 CD4 还是 HIV 的受体。根据竞争抑制实验,可将针对 CD4 的单克隆抗体分为几类[175]。OKT4A 识别的抗原决定簇与病毒感染直接相关,因为针对这一位点的抗体可以阻断合胞体的形成。但是,OKT4 识别的抗原决定簇与感染毫无关系,因而针对这一位点的抗体不能阻断合胞体形成[175],如果细胞表面表达缺乏 OKT4 表位的 CD4 变异体,该细胞仍然可被 HIV 感染[176]。这些位点信息对于了解病毒与其受体分子相互作用的机制十分重要,在疫苗设计方面也十分有用。

单克隆抗体的交叉反应

单克隆抗体表现出许多 1 型交叉反应,由此说明了抗体的交叉反应代表着不同抗原间的真实相似性,而不仅仅是不均一血清抗体的效应。即使两种抗原的大部分结构都不相同,也可能具有相同的抗原决定簇,识别这一位点的单克隆抗体就表现为 100% 的交叉反应。狼疮患者体内的自身抗体能够同时与 DNA 和心磷脂(cardiolipin)反应就是一个很好的例子[177]。

需要强调的是，能够与同一抗体反应并不表示两个抗原决定簇抗原拥有相同的化学结构，而是它们具有相同的化学相似处，如相同的表面电荷分布。能够与各种各样抗原反应的抗体也能与免疫球蛋白以独特型抗独特型的方式反应，表明抗体与蛋白质（抗独特型）、多糖、核酸、脂类以及半抗原之间的交叉反应性。

多克隆抗体还是单克隆抗体？

当最初发现单克隆抗体时，有人认为单克隆抗体具有很好的特异性，因而可能在以后所有的工作中取代多克隆抗血清。但是，进一步思考上述讨论过的问题，发现这一观点并不正确，选择单克隆抗体还是多克隆抗体取决于使用抗体的目的。单克隆抗体不仅确实可能发生交叉反应，而且一旦单克隆抗体发生交叉反应，就会很完全，也不能通过吸收的方法去除。当需要确定所研究反应性的精确范围时，研究者可能需要一大批各种各样的单克隆抗体。

而对于多克隆抗血清，虽然每一种不同的抗体都有不同反应范围，但只有共同针对免疫用抗原或测试抗原的抗体才能被检测到。因此，从总体上看，血清可能只对特定的其他抗原表现出低效价的交叉反应性，这种交叉反应性也能通过吸收的方法去除，而只保留针对免疫抗原的活性。在某些实验中，多克隆抗血清可能比其中的各个单克隆的特异性更高，也更为有用。这一观点是多重特异性理论的基础（见前文）。

在某些实验方面，多克隆抗血清也具有其优势。如在免疫沉淀实验中，多价性就很重要。许多抗原与单克隆抗体单价结合，但有不同的位点与多克隆抗血清中的不同成分结合，表现为多价。因此可以产生更多的交联。

最好的血清学试剂可能是根据交叉反应性，由多种单克隆抗体组成的混合物。这种混合物与多克隆抗血清相比，具有更确定的特异性和更好的重复性，同时具有交叠的特异性这一优势。

结论

抗体，无论是单克隆抗体还是多克隆抗体，都是一种很独特的试剂。对于任何一种有机或生物化学结构，几乎都可以制备其高度特异性的抗体，通常还具有很高的亲和力。它们可以是自然状态下的二价（如IgG）或多价（如IgM），也可被改造成单价，如Fab或重组Fv片段。它们既是宿主免疫系统的重要组成部分，在某些抗病毒免疫和所有的抗细菌免疫中发挥重要作用，同时也为研究和临床运用提供了多用途的工具。RIA和ELISA是对微量生物分子，如激素和细胞因子进行定量检测的革命性方法，已成为临床诊断和疾病监测以及基础和应用研究中不可或缺的工具。将这些方法移植到固相表面进行，不仅充分利用了抗体的内在亲和力和特异性，而且也发挥了固相表面固有的多价性和局部高浓度的优势。抗体的交叉反应性常常为揭示分子之间的关系提供了第一条线索，许多是其他方法所不能完成的。相反，通过抗原检测血清中的抗体则被广泛运用于检测病原体感染，如HIV。抗体还可作为一种特别有用的试剂应用于以亲和层析的方法快速分离纯化其他分子。在其他生物学分支中，抗体也是一种不可缺少的试剂。如组织配型，运用单克隆抗体发现的多种细胞表面标记进行细胞表型分析，以及通过流式细胞仪分选、生物淘选或色谱技术分离这些细胞。因此，抗体是一种最为多功能的和广泛使用的试剂之一，抗体的应用也一直在增长。理解抗原抗体相互作用的基本概念不仅有助于对免疫学的理解，而且对于将这种分子有效地运用于许多其他领域有重要意义。

108

致谢

感谢 Charles DeLisi、Elvin A. Kabat 以及 Henry Metzger 博士对本文的批评指正，我们之间进行了许多有益的讨论，感谢 Fred Karush 博士提供的建议。

（邹　强译）

参 考 文 献

1. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495–497.
2. Melchers F, Potter M, Warner NC. *Lymphocyte hybridomas.* Berlin: Springer-Verlag, 1978.
3. Kennett RH, McKearn TJ, Bechtol KB. *Monoclonal antibodies. Hybridomas: A new dimension in biological analyses.* New York and London: Plenum Press, 1980.
4. Moore WJ. *Physical chemistry,* 3rd ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1962.
5. DeLisi C. The biophysics of ligand-receptor interactions. *Q Rev Biophys* 1980;13:201–230.
6. Fersht A. *Enzyme structure and mechanisms.* New York: Freeman, 1977.
7. Eisen HN. *Immunology,* 2nd ed. Baltimore: Harper & Row, 1980.
8. Sachs DH, Schecter AN, Eastlake A, Anfinsen CB. Inactivation of staphylococcal nuclease by the binding of antibodies to a distinct antigenic determinant. *Biochemistry* 1972;11:4268–4273.
9. Hammes GG. Relaxation spectrometry of biological systems. *Adv Protein Chem* 1968;23:1–57.
10. Eisen HN, Karush F. The interaction of purified antibody with homologous hapten. Antibody valence and binding constant. *J Am Chem Soc* 1949;71: 363–364.
11. Pinckard RN. Equilibrium dialysis and preparation of hapten conjugates. In: Weir DM, ed. *Handbook of experimental immunology.* Oxford: Blackwells, 1978:17.1–17.23.
12. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 1949;51:660–672.
13. Berzofsky JA, Hicks G, Fedorko J, Minna J. Properties of monoclonal antibodies specific for determinants of a protein antigen, myoglobin. *J Biol Chem* 1980; 255:11188–11191.
14. Rodbard D, Munson PJ, Thakur AK. Quantitative characterization of hormone receptors. *Cancer* 1980;46:2907–2918.
15. Thakur AK, Jaffe ML, Rodbard D. Graphical analysis of ligand-binding systems: evaluation by Monte Carlo studies. *Anal Biochem* 1980;107:279–295.
16. Munson PJ, Rodbard D. LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 1980;107:220–239.
17. Bright DS. *On interpreting spectrophotometric measurements of two quinoline-DNA complexes.* Doctoral dissertation, Colorado State University, Fort Collins, CO 1974.
18. Berzofsky JA. The assessment of antibody affinity from radioimmunoassay. *Clin Chem* 1978;24:419–421.
19. Pauling L, Pressman D, Grossberg AL. Serological properties of simple substances. VII. A quantitative theory of the inhibition by haptens of the precipitation of heterogeneous antisera with antigens, and comparison with experimental results for polyhaptenic simple substances and for azoproteins. *J Am Chem Soc* 1944;66:784–792.
20. Karush F. The interaction of purified antibody with optically isomeric haptens. *J Am Chem Soc* 1956;78:5519–5526.
21. Thakur AK, DeLisi C. Theory of ligand binding to heterogeneous receptor populations: characterization of the free-energy distribution function. *Biopolymers* 1978;17:1075–1089.
22. DeLisi C. Characterization of receptor affinity heterogeneity by Scatchard plots. *Biopolymers* 1978;17:1385–1386.
23. Thakur AK, Munson PJ, Hunston DL, Rodbard D. Characterization of ligand-binding systems by continuous affinity distributions of arbitrary shape. *Anal Biochem* 1980;103:240–254.
24. Sips R. On the structure of a catalyst surface. *J Chem Phys* 1948;16:490–495.
25. Nisonoff A, Pressman D. Heterogeneity and average combining site constants of antibodies from individual rabbits. *J Immunol* 1958;80:417–428.
26. Karush F, Karush SS. Equilibrium dialysis. 3. Calculations. In: Williams CA, Chase MW, eds. *Methods in immunology and immunochemistry.* New York: Academic Press, 1971:389–393.
27. Klotz IM. Protein interactions. In: Neurath H, Bailey K, eds. *The proteins.* New York: Academic Press, 1953:727–806.
28. Karush F. The affinity of antibody: range, variability, and the role of multivalence. In: Litman GW, Good RA, eds. *Comprehensive immunology.* New York: Plenum Publishing, 1978:85–116.
29. Crothers DM, Metzger H. The influence of polyvalency on the binding properties of antibodies. *Immunochemistry* 1972;9:341–357.
30. Hornick CL, Karush F. Antibody affinity—III. The role of multivalence. *Immunochemistry* 1972;9:325–340.
31. DeLisi C, Metzger H. Some physical chemical aspects of receptor-ligand interactions. *Immunol Commun* 1976;5:417–436.
32. DeLisi C. The effect of cell size and receptor density on ligand-receptor reaction rate constants. *Mol Immunol* 1981;18:507–511.
33. DeLisi C, Wiegel FW. Effect of nonspecific forces and finite receptor number on rate constants of ligand-cell bound-receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:5569–5572.
34. Silhavy TJ, Szmelcman S, Boos W, Schwartz M. On the significance of the retention of ligand by protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:2120–2124.
35. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 1960;39:1157–1175.
36. Chard T. *An introduction to radioimmunoassay and related techniques.* Amsterdam: North-Holland, 1978.
37. Rodbard D. Mathematics and statistics of ligand assays: an illustrated guide. In: Langan J, Clapp JJ, eds. *Ligand assay: analysis of international developments on isotoopic and nonisotopic immunoassay.* New York: Masson, 1981:45–101.
38. Yalow R. Radioimmunoassay. *Rev Biophys Bioeng* 1980;9:327–345.
39. Farr RS. A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between I*BSA and antibody. *J Infect Dis* 1958;103:239–262.
40. Desbuquois B, Aurbach GD. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;33:732–738.
41. Zollinger WD, Dalrymple JM, Artenstein MS. Analysis of parameters affecting the solid phase radioimmunoassay quantitation of antibody to meningococcal antigens. *J Immunol* 1976;117:1788–1798.
42. Kessler SW. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein-A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J Immunol* 1975;115:1617–1624.
43. Friguet B, Chaffotte AF, Djavadi-Ohaniance L, Goldberg ME. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 1985;77:305–319.
44. Stevens FJ. Modification of an ELISA-based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody. *Mol Immunol* 1987;24: 1055–1060.
45. Seligman SJ. Influence of solid-phase antigen in competition enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) on calculated antigen-antibody dissociation constants. *J Immunol Methods* 1994;168:101–110.
46. Ekins RP. Basic principles and theory. *Br Med Bull* 1974;30:3–11.
47. Berzofsky JA, Curd JG, Schechter AN. Probability analysis of the interaction of antibodies with multideterminant antigens in radioimmunoassay: application to the amino terminus of the beta chain of hemoglobin S. *Biochemistry* 1976;15: 2113–2121.
48. von Krogh M. Colloidal chemistry and immunology. *J Infect Dis* 1916;19: 452–477.
49. Rodbard D, Lewald JE. Computer analysis of radioligand assay and radioimmunoassay data. *Acta Endocrinol* 1970;64:79–103.
50. Feldman H, Rodbard D. Mathematical theory of radioimmunoassay. In: Odell WD, Daughaday WH, eds. *Principles of competitive protein-binding assays.* Philadelphia: Lippincott, 1971:158–203.
51. Rodbard D, Ruder JH, Vaitukaitis J, Jacobs HS. Mathematical analysis of kinetics of radioligand assays: improved sensitivity obtained by delayed addition of labeled ligand. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;33:343–355.
52. Voller A, Bidwell D, Bartlett A. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: Rose NR, Friedman H, eds. *Manual of clinical immunology,* 2nd ed. Washington, DC: American Society of Microbiology, 1980:359–371.
53. Kohno Y, Berkower I, Minna J, Berzofsky JA. Idiotypes of anti-myoglobin antibodies: shared idiotypes among monoclonal antibodies to distinct determinants of sperm whale myoglobin. *J Immunol* 1982;128:1742–1748.
54. Yarchoan R, Murphy BR, Strober W, Schneider HS, Nelson DS. Specific anti-influenza virus antibody production in vitro by human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1981;127:2588–2594.
55. Darst SA, Robertson CR, Berzofsky JA. Adsorption of the protein antigen myoglobin affects the binding of conformation-specific monoclonal antibodies. *Biophys J* 1988;53:533–539.
56. Sedgwick JD, and Holt PG. A solid phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983;57: 301–309.
57. Czerkinsky CC, Nilsson LA. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983;65:109–121.
58. Bocher WO, Herzog-Hauff S. Regulation of the neutralizing anti-hepatitis B surface (HBs) antibody response in vitro in HBs vaccine recipients and patients with acute or chronic hepatitis virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol* 1996;105:52–58.
59. Ronnelid J, Huang YH. Short-term kinetics of the humoral anti-C1q response in SLE using the ELIspot method: fast decline in production in resonse to steroids. *Scand J Immunol* 1994;40:243–250.
60. Czerkinsky C, Moldoveanu Z. A novel two colour ELISPOT assay I. Simultaneous detection of distinct types of antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1988;115:31–37.
61. Krieg AM, Yi AK. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. *Nature* 1995;374:546
62. Ronnelid J, and Klareskog L. A comparison between ELISPOT methods for the detection of cytokine producing cells: *greater sensitivity and specificity using*

ELISA plates as compared to nitrocellulose membranes. *J Immunol Methods* 1997;200:17–26.
63. Mäkelä O, Karjalainen K. Inherited immunoglobulin idiotypes of the mouse. *Immunol Rev* 1977;34:119–138.
64. Jameson BA, McDonnell JM, Marini JC, Korngold R. A rationally designed CD4 analogue inhibits experimental allergic encephalomyelitis. *Nature* 1994; 368:744–746.
65. Brady L, Dodson G. Reflections on a peptide. *Nature* 1994;368:692–693.
66. Guichard G, Benkirane N, Zeder-Lutz G, Van Regenmortel MHV, Briand J-P, Muller S. Antigenic mimicry of natural L-peptides with retro-inverso-peptidomimetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9765–9769.
67. Benkirance N, Guichard G, Van Regenmortel MHV, Briand J-P, Muller S. Cross-reactivity of antibodies to retro-inverso peptidomimetics with the parent protein histone H3 and chromatin core particle. *J Biol Chem* 1995;270: 11921–11926.
68. Briand J-P, Guichard G, Dumortier H, Muller S. Retro-inverso peptidomimetics as new immunological probes. *J Biol Chem* 1995;270:20686–20691.
69. Häyry P, Myllärniemi M, Aavik E, et al. Stabile D-peptide analog of insulin-like growth factor-1 inhibits smooth muscle cell proliferation after carotid ballooning injury in the rat. *FASEB J* 1995;9:1336–1344.
70. Berzofsky JA, Schechter AN. The concepts of cross-reactivity and specificity in immunology. *Mol Immunol* 1981;18:751–763.
71. Young NS, Curd JG, Eastlake A, Furie B, Schechter AN. Isolation of antibodies specific to sickle hemoglobin by affinity chromatography using a synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:4759–4763.
72. Young NS, Eastlake A, Schecter AN. The amino terminal region of the sickle hemoglobin beta chain. II. Characterization of monospecific antibodies. *J Biol Chem* 1976;251:6431–6435.
73. Curd JG, Young N, Schecter AN. Antibodies to an amino terminal fragment of beta globin. II. Specificity and isolation of antibodies for the sickle mutation. *J Biol Chem* 1976;251:1290–1295.
74. Dean J, Schecter AN. Sickle-cell anemia: molecular and cellular bases of therapeutic approaches. *N Engl J Med* 1978;299:752–763.
75. Sharon J, Kabat EA, Morrison SL. Immunochemical characterization of binding sites of hybridoma antibodies specific for alpha(1 6) linked dextran. *Mol Immunol* 1982;19:375–388.
76. Cisar J, Kabat EA, Liao J, Potter M. Immunochemical studies on mouse myeloma proteins reactive with dextrans or with fructosans and on human antilevans. *J Exp Med* 1974;139:159–179.
77. Johnston MFM, Eisen HN. Cross-reactions between 2,4-dinitrophenyl and nemadione (vitamin K3) and the general problem of antibody specificity. *J Immunol* 1976;117:1189–1196.
78. Talmadge D. Immunological specificity. *Science* 1959;129:1643–1648.
79. Inman JK. Multispecificity of the antibody combining region and antibody diversity. In: Sercarz EE, Williamson AR, Fox CF, eds. *The immune system: genes, receptors, signals.* New York: Academic Press, 1974:37–52.
80. Inman JK. The antibody combining region: speculations on the hypothesis of general multispecificity. In: Bell GI, Perelson AS, Pimbley GH Jr, eds. *Theoretical immunology.* New York: Marcel Dekker Inc, 1978:243–278.
81. Richards FF, Konigsberg WH, Rosenstein RW, Varga JM. On the specificity of antibodies. *Science* 1975;187:130–137.
82. Parker CW. Spectrofluorometric methods. In: Weir DM, ed. *Handbook of experimental immunology,* 3rd ed. Oxford: Blackwell, 1978:18.1–18.25.
83. Haimovich J, Hurwitz E, Novik N, Sela M. Preparation of protein-bacteriophage conjugates and their use in detection of antiprotein antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1970;207:115–124.
84. Heidelberger M, Kendall FE. The precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody. *J Exp Med* 1935;61: 563–591.
85. Heidelberger M, Kendall FE. A quantitative theory of the precipitin reaction. II. A study of an azoprotein-antibody system. *J Exp Med* 1935;62:467–483.
86. Kabat EA. *Structural concepts in immunology and immunochemistry,* 2nd ed. New York: Holt, Rinehart & Winston, 1976.
87. Cisar J, Kabat EA, Dorner MM, Liao J. Binding properties of immunoglobulin containing sites specific for terminal or nonterminal antigenic determinants in dextran. *J Exp Med* 1975;142:435–459.
88. Ouchterlony O, Nilsson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir DM, ed. *Handbook of experimental immunology,* 3rd ed. Oxford: Blackwell, 1978:19.1–19.44.
89. Feinberg JG. Identification, discrimination and quantification in Ouchterlony gel plates. *Int Arch Allergy* 1957;11:;129–152.
90. Tomasi TBJ, Zigelbaum S. The selective occurrence of gamma1A globulins in certain body body fluids. *J Clin Invest* 1963;42:1552–1560.
91. Fahey JL, McKelvey EM. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J Immunol* 1965;94:84–90.
92. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965;2:235–254.
93. Laurell CB, McKay EJ. Electroimmunoassay. *Methods Enzymol* 1981;73:339–369.
94. Herbert WJ. Passive haemagglutination with special reference to the tanned cell technique. In: Weir DM, ed. *Handbook of experimental immunology.* Oxford: Blackwell, 1978:20.1–20.20.
95. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350–4354.
96. Schupbach J, Popovic M, Gilden RV, Gonda MA, Sarngadharan MG, Gallo RC. Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science* 1984;224:503–505.
97. Potter M. Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. *Physiol Rev* 1972;52:631–719.
98. Köhler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* 1976;6:511–519.
99. Margulies DH, Kuehl WM, Scharff MD. Somatic cell hybridization of mouse myeloma cells. *Cell* 1976;8:405–415.
100. de St.Groth SF, Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Methods* 1980;35:1–21.
101. French D, Fischberg E, Buhl S, Scharff MD. The production of more useful monoclonal antibodies. I. Modifications of the basic technology. *Immunol Today* 1986;7:344–346.
102. Langone JJ, Van Vunakis H. *Methods in enzymology,* vol 121. *Immunochemical techniques. Part I, Hybridoma technology and monoclonal antibodies.* Orlando: Academic Press, 1986.
103. Hämmerling GJ, Hämmerling U, Kearney JF. *Monoclonal antibodies and T-cell hybridomas. Perspectives and technical advances.* Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981.
104. Yokoyama WM. Production of monoclonal antibodies. In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, eds. *Current protocols in immunology.* New York: John Wiley and Sons, 1995:2.5.1–2.5.17.
105. Paslay J, Roozen K. The effect of B cell stimulation on hybridoma formation. In: Hämmerling GJ, Hämmerling U, Kearney JF, eds. *Monoclonal antibodies and T-cell hybridomas, perspectives and technical advances.* Amsterdam: Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, 1981:551–559.
106. Shulman M, Wilde CD, Köhler G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 1978;276:269–270.
107. Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J Immunol* 1979;123:1548–1550.
108. Gefter ML, Margulies DH, Scharff MD. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somatic Cell Genet* 1977; 3:231–236.
109. Lo MMS, Tsong TY, Conrad MK, Strittmatter SM, Hester LD, Snyder SH. Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion. *Nature* 1984;310:792–794.
110. Manser T, Huang S, Gefter ML. Influence of clonal selection on the expression of immunoglobulin variable region genes. *Science* 1984;226:1283–1288.
111. Unkeless JC. Characterization of monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med* 1979;150:580–596.
112. Leo O, Foo M, Sachs DH, Samelson LE, Bluestone JA. Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1374–1378.
113. Yarmush ML, Gates FT III, Weisfogel DR, Kindt TJ. Identification and characterization of rabbit-mouse hybridomas secreting rabbit immunoglobulin chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:2899–2903.
114. Bazin H. Production of rat monoclonal antibodies with the Lou rat non-secreting IR983F myeloma cell line. *Prot Biol Fluids* 1981;29:615–618.
115. Ward ES, Güssow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli. Nature* 1989;341:544–546.
116. Huse WD, Sastry L, Iverson SA, et al. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* 1989;246: 1275–1281.
117. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991;352:624–628.
118. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;348:552–554.
119. Kang AS, Barbas CF, Janda KD, Benkovic SJ, Lerner RA. Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4363–4366.
120. Zebedee SL, Barbas CFI, Hom Y-L, et al. Human combinatorial antibody libraries to hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 3175–3179.
121. Burton DR, Barbas CFI, Persson MAA, Koenig S, Chanock RM, Lerner RA. A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10134–10137.
122. Duchosal MA, Eming SA, Fischer P, et al. Immunization of hu-PBL-SCID mice and the rescue of human monoclonal Fab fragments through combinatorial libraries. *Nature* 1992;355:258–262.
123. Low NM, Holliger P, Winter G. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J Mol Biol* 1996;260:359–368.
124. Thompson J, Pope T, Tung J-S, et al. Affinity maturation of a high-affinity human monoclonal antibody against the third hypervariable loop of human

immunodeficiency virus: use of phage display to improve affinity and broaden strain reactivity. *J Mol Biol* 1996;256:77–88.
125. Mescher MF, Stallcup KC, Sullivan CP, Turkewitz AP, Herrmann SH. Purification of murine MHC antigens by monoclonal antibody affinity chromatography. *Methods Enzymol* 1983;92:86–109.
126. Parham P. Monoclonal antibodies against HLA products and their use in immunoaffinity purification. *Methods Enzymol* 1983;92:110–138.
127. Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SEV, Poljak RJ. Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 A° resolution. *Science* 1986;233: 747–753.
128. Sheriff S, Silverton EW, Padlan EA, et al. Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:8075–8079.
129. Colman PM, Laver WG, Varghese JN, et al. Three-dimensional structure of a complex of antibody with influenza virus neuraminidase. *Nature* 1987;326:358–363.
130. Davies DR, Padlan EA, Sheriff S. Antigen-antibody complexes. *Annu Rev Biochem* 1990;59:439–473.
131. Gearhart P, Johnson N, Douglas R, Hood L. IgG antibodies to phosphorylcholine exhibit more diversity than their IgM counterparts. *Nature* 1981;291:29–34.
132. Lamoyi E, Estess P, Capra JD, Nisonoff A. Heterogeneity of an intrastrain cross-reactive idiotype associated with anti-p-azophenylarsonate antibodies of A/J mice. *J Immunol* 1980;124:2834–2840.
133. Clarke SH, Huppi K, Ruezinsky D, Staudt L, Gerhard W, Weigert M. Inter- and intraclonal diversity in the antibody response to influenza hemagglutinin. *J Exp Med* 1985;161:687–704.
134. Berek C, Griffiths G, Milstein C. Molecular events during maturation of the immune response to oxazolone. *Nature* 1985;316:412–418.
135. Lerner RA, Benkovic SJ, Schultz PG. At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. *Science* 1991;252:659–667.
136. Raso V, Stollar BD. The antibody-enzyme analogy. Comparison of enzymes and antibodies specific for phosphopyridoxyltyrosine. *Biochemistry* 1975;14: 591–599.
137. Pollack SJ, Jacobs JW, Schultz PG. Selective chemical catalysis by an antibody. *Science* 1986;234:1570–1573.
138. Shuster AM, Gololobov GV, Kvashuk OA, Bogomolova AE, Smirnov IV, Gabibov AG. DNA hydrolyzing autoantibodies. *Science* 1992;256:665–667.
139. Tramontano A, Janda KD, Lerner RA. Catalytic antibodies. *Science* 1986;234: 1566–1570.
140. Shokat KM, Leumann CJ, Sugasawara R, Schultz PG. A new strategy for the generation of catalytic antibodies. *Nature* 1989;338:269–271.
141. Pollack SJ, Hsiun P, Schultz PG. Stereospecific hydrolysis of alkyl esters by antibodies. *J Am Chem Soc* 1989;111:5961–5962.
142. Wirsching P, Ashley JA, Benkovic SJ, Janda KD, Lerner RA. An unexpectedly efficient catalytic antibody operating by ping-pong and induced fit mechanisms. *Science* 1991;252:680–685.
143. Braisted A, Schultz PG. An antibody-catalyzed bimolecular Diels-Alder reaction. *J Am Chem Soc* 1990;112:7430–7431.
144. Shabat D, Itzhaky H, Reymond J-L, Keinan E. Antibody catalysis of a reaction otherwise strongly disfavoured in water. *Nature* 1995;374:143–146.
145. Hirschmann R, Smith AB III, Taylor CM, et al. Peptide synthesis catalyzed by an antibody containing a binding site for variable amino acids. *Science* 1994;265: 234–237.
146. Holliger P, Winter G. Engineering bispecific antibodies. *Curr Opin Biotechnol* 1993;4:446–449.
147. Karpovsky B, Titus JA, Stephany DA, Segal DM. Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc γ receptor antibodies. *J Exp Med* 1984;160:1686–1701.
148. Titus JA, Garrido MA, Hecht TT, Winkler DF, Wunderlich JR, Segal DM. Human T cells targeted with anti-T3 cross-linked to antitumor antibody prevent tumor growth in nude mice. *J Immunol* 1987;138:4018–4022.
149. Wickham TJ, Segal DM, Roelvink PW, et al. Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J Virol* 1996;70:6831–6838.
150. Vallera DA, Ash RC, Zanjani ED, et al. Anti-T-cell reagents for human bone marrow transplantation: ricin linked to three monoclonal antibodies. *Science* 1983; 222:512–515.
151. Waldmann TA. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science* 1991; 252:1657–1662.
152. Berkower I. The promise and pitfalls of monoclonal antibody therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* 1996;7:622–628.
153. Ortho Multicenter Transplant Study Group. A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. *N Engl J Med* 1988;313:337–342.
154. Collier BD, Abdel-Nabi H, Doerr RJ, et al. Immunoscintigraphy performed with In-111-labeled CYT-103 in the management of colorectal cancer: comparison with CT. *Radiology* 1992;185:179–186.
155. Sears HF, Herlyn D, Steplewski Z, Koprowski H. Effects of monoclonal antibody immunotherapy on patients with gastrointestinal adenocarcinoma. *J Biol Response Mod* 1984;3:138–150.
156. Frankel AE, Houston LL, Issell BF. Prospects for immunotoxin therapy in cancer. *Annu Rev Med* 1986;37:125–142.
157. Carrasquillo JA, Krohn JA, Beaumier P, et al. Diagnosis and therapy for solid tumors with radiolabeled antibodies and immune fragments. *Cancer Treat Rep* 1984;68:317–328.
158. Miller RA, Maloney DG, Warnke R, Levy R. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody. *N Engl J Med* 1982;306:517–522.
159. Meeker T, Lowder J, Cleary ML, et al. Emergence of idiotype variants during treatment of B-cell lymphoma with anti-idiotype antibodies. *N Engl J Med* 1985; 312:1658–1665.
160. Hakim I, Levy S, Levy R. A nine-amino acid peptide from IL-1b augments antitumor immune responses induced by protein and DNA vaccines. *J Immunol* 1996;157:5503–5511.
161. Cole RJ, Morrisey DM, Houghton AN, Beattie Jr, Oettgen HF, Old LJ. Generation of human monoclonal antibodies reactive with cellular antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2026–2030.
162. Olsson L, Kaplan HS. Human-human monoclonal antibody-producing hybridomas: technical aspects. *Methods Enzymol* 1983;92:3–16.
163. Seigneurin JM, Desgranges C, Seigneurin D, et al. Herpes simplex virus glycoprotein D: human monoclonal antibody produced by bone marrow cell line. *Science* 1983;221:173–175.
164. Sugano T, Matsumoto Y, Miyamoto C, Masuho Y. Hybridomas producing human monoclonal antibodies against varicella-zoster virus. *Eur J Immunol* 1987;17: 359–364.
165. Morrison SL. Transfectomas provide novel chimeric antibodies. *Science* 1985; 229:1202–1207.
166. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:6851–6855.
167. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986;321:522–525.
168. Brüggemann M, Spicer C, Buluwela L, et al. Human antibody production in transgenic mice: expression from 100 kb of the human IgH locus. *Eur J Immunol* 1991;21:1323–1326.
169. Taylor LD, Carmack CE, Schramm SR, et al. A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins. *Nucleic Acids Res* 1992;20:6287–6295.
170. Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 1994;368: 856–859.
171. Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, et al. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 1994;7:13–21.
172. Klein J, Huang H-JS, Lemke H, Hämmerling GJ, Hämmerling U. Serological analysis of H-2 and Ia molecules with monoclonal antibodies. *Immunogenetics* 1979;8:419–432.
173. Ozato K, Mayer N, Sachs DH. Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to mouse H-2 and Ia antigens. *J Immunol* 1980;124:533–540.
174. Pierres M, Devaux C, Dosseto M, Marchetto S. Clonal analysis of B- and T-cell responses to Ia antigens. I. Topology of epitope regions on I-A^k and I-E^k molecules analyzed with 35 monoclonal alloantibodies. *Immunogenetics* 1981;14:481–495.
175. Sattentau QJ, Dalgleish AG, Weiss RA, Beverley PCL. Epitopes of the CD4 antigen and HIV infection. *Science* 1986;234:1120–1123.
176. Hoxie JA, Flaherty LE, Haggarty BS, Rackowski JL. Infection of T4 lymphocytes by HTLV-III does not require expression of the OKT4 epitope. *J Immunol* 1986;136:361–363.
177. Koike T, Tomioka H, Kumagai A. Antibodies cross-reactive with DNA and cardiolipin in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1982;50:298–302.

第5章　免疫球蛋白:分子遗传学

Edward E. Max[①]

111　对免疫球蛋白(immanoglobulin, Ig)基因的分子生物学研究是重组 DNA 技术最重要的标志性成果之一。在基因克隆技术出现之前,只能间接地从氨基酸序列来对 Ig 基因进行推论性研究。当对基因自身进行直接检测成为可能后,许多复杂的问题都得到了解决。近来,克隆化基因已经不仅限于在单纯实验室研究得到应用,而且还作为多种应用性工程计划的工具。本章总结了在基础研究和应用方面取得的一些激动人心的进展。

抗体基因独特的神秘之处是其所编码蛋白质的多样性。这种多样性表现在几个水平上。

最惊人的是这些分子的抗原结合部位的多样性。Landsteiner 的经典研究提示抗体结合特异性的容量是无限的。结合特异性的多样性可从轻(L)链和重(H)链 N 端结构域[即可变(V)区]中氨基酸序列的多样性得到解释,每个 V 区含有三个高变区,这些高变区与结合抗原的蛋白环相对应,它们又称作互补决定区(CDR)(见第 3 章)。然而在 C 端,轻链的一个结构域及重链的三个或四个结构域(根据 Ig 类型的不同)是不变的;这些片段被称为恒定(C)区。已提出许多模型来解释在 Ig V 区中出现的不可估量的多样性。最流行的一个模型提示 V 区巨大的多样性直接编码于胚系基因组,推测可能是进化过程中基因重复和突变的结果。另外一个流行的模型(即体细胞突变模型)认为基因组中编码的 V 区序列很少,而在有机体的寿命中一种特殊的体细胞突变机制通过作用于这些序列而使多样性增加。不论是在种系发生中产生的序列多样性(胚系的多样性)中,还是在个体发育中产生的序列多样性(体细胞突变),都存在另外一个问题:即 Ig 基因的 C 区如何逃避这种变化? 1965 年,Dreyer 和 Bennett[1] 提出:针对每一类 Ig 基因可能只有一个单独的 C 区基因,它与多重 V 区基因在胚系中被分别编码;在抗体产生细胞的发育过程中,V 区序列之一可与 C 区序列相联系,从而

---

① E. E. Max: Laboratory of Cell and Viral Regulation, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20892.

形成一个完整(V+C)基因并在细胞中表达。这样,在独立的V区基因中增加多样性的机制可能在其远处留下不相连的C区。这个模型以及每个淋巴细胞中都能独立进行基因重排的假设对后来所接受的有机体所有细胞中的DNA都是相同的这一观点是一革命性挑战。很明显,要确认Dreyer和Bennett的假设和评价体细胞突变和胚系基因组观点在解释V区多样性方面的重要性,则需要对基因进行直接分析。另外还有两个谜点分别是:第一,假定每个B淋巴细胞的每个基因座都包含两个拷贝(即分别来自于父本和母本的染色体),那么为什么细胞仅仅表达单一轻链和重链呢?就好像在非表达染色体上的基因座是沉默的(这种现象称为"等位基因排斥")。第二,如何解释在抗原暴露几周后,血清中抗体对抗原的亲和力会增加?这种现象被称为"亲和力成熟"。 112

除了轻链和重链V区的多样性外,还需要用分子生物学来解释重链所表现出的多样性的不同类型:所有发育中的B淋巴细胞起初先合成IgM,在B细胞成熟后可使重链亚型从μ转换为γ、ε或α。当所表达的C区发生"转换"后,细胞继续表达相同的轻链和重链V区,所以抗原特异性不变。因此,除了需要弄清在不同细胞中单一C区如何与不同的V区相联系(V-C重组)外,我们还要考虑在淋巴细胞发育过程中单一V区依次与几个C区发生联系(即重链转换)的分子机制。

由Ig重链所表现出来的多样性的最后一个水平是:除了有血液和分泌性Ig外,还有嵌入到细胞膜中的Ig。细胞膜Ig的C端含有与膜脂质相联系的疏水性氨基酸,而分泌性Ig缺乏这种C端的氨基酸(除此以外,其他部分与膜Ig相同)。通过对Ig基因进行分析已显示出这两种形式的Ig是如何在基因组中被编码的。

本章内容依次如下。①简要讨论发生在重和轻链中的V基因组装,然后描述重链基因座(包括从分子水平上解释膜型Ig和类型转换),继而讨论κ和λ基因座;但关于每个胚系V基因座的详细讨论将放在本章的后面部分。②详细讨论V基因组装中的DNA重组事件以及该过程的调节,旨在维持等位排斥。③讨论V区多样性(包括胚系V区库、连接多样性以及体细胞突变)的产生机制。④讨论Ig基因表达的调节。⑤本章结尾部分讨论有关Ig基因在"应用科学"方面的若干话题。

本章从文献中所挑选的研究结果是为了能清楚地说明关于Ig基因的重要问题,而不是关于数据资料和参考文献的泛泛纲要。在这些描述中,许多讨论集中于小鼠和人类的Ig基因。因为降植烷诱导的BALB/c小鼠的骨髓瘤可方便地用于产生单克隆Ig(这种Ig用于早期的结构研究),所以对小鼠的Ig基因进行研究。相同骨髓瘤可提供用于分子生物学分析的mRNA和DNA,由于这些骨髓瘤都来自相同的遗传背景(近交系BALB/c小鼠),故可使上述分子生物学研究更加精细。后来,关于人类同源基因座的研究表明,小鼠和人类的Ig基因之间有许多基本的相似性;然而一些其他哺乳动物的Ig则显示出令人惊讶的不同。

在本书的第23、24章则分别更加详细地讨论Ig基因的亚型转换和体细胞突变。

免疫球蛋白V基因组装概述

20世纪70年代后期,关于轻链基因的试验证明了Dreyer-Bennett的假设基本上是正确的:即每一个淋巴细胞只表达由一个V_L和一个V_H基因编码的单一Ig分子,经重组激活后使得各V基因分别靠近各自的C区基因。通过比较来自B淋巴细胞(特别是来自小鼠骨髓瘤)的Ig基因以及来自"胚系"DNA的相应基因而支持了上述结论。(尽管真的胚系DNA只能实验性地从精子中获得,但任一非淋巴细胞的DNA都可假定代表胚系DNA,原因是Ig基因的重排只发生于淋巴细胞。当对来自精子的DNA与来自其他非淋巴细胞的DNA经Southern印迹进行比较时,结果是一致的。因此,尽管存在一些不精确的风险,但如果DNA来自精子、整个胚胎、肝脏、胎盘,或其他非淋巴组织,那么非淋巴细胞DNA样品则习惯上是指胚系DNA。)

来自Southern印迹和基因克隆的证据

最初,以来自骨髓瘤的互补DNA(cDNA)为杂交探针,经Southern印迹来比较骨髓瘤和胚系DNA样品。关于κ轻链基因的分析如图5.1所示,一个C_κ探针只能检测胚系DNA中一个单一条带,这与一个单一C_κ基

因是一致的。用代表一个表达性 V_κ 基因探针检测到了几个条带,就好像与由相关序列组成的一个家族杂交一样。而且,尽管图 5.1 中没有显示出来,但发现代表不同 V_κ 基因的探针可与一组不同的条带杂交,这些条带代表了相关 V_κ 基因的一个不同的家族。这些发现支持了多个 V 基因和单个 C 基因的假设。当这些探针与骨髓瘤 DNA(而不是胚系 DNA)进行杂交时,不同的观测结果支持了 Dreyer-Bennett 假说的一个新的重组原理。如图 5.1 所示,使一个 V 基因与一个 C 基因靠近的重组可导致 C_κ-杂交限制性片段大小的改变。根据位于 V 和 C 基因侧翼的限制性位点的位置不同,新重排条带与胚系条带相比可增大、可减小、或偶然大小不变。期望 V 区条带之一可在骨髓瘤中进行相似的重排,因此使之位于与 C_κ 探针杂交的一个不同大小的片段或相同片段中。针对 κ 和 λ 基因的类似结果极大地支持了 Dreyer-Bennett 假设,同时对机体中每个细胞都有相同基因的概念提出了严重挑战[2,3]。通过 Southern 印迹对一系列骨髓瘤中 C_κ 重排进行的研究发现,其中有许多在两条等位染色体上发生 DNA 重排的证据。这一结果不仅对等位排斥的可能性提出了争议(等位排斥可用重组仅发生于一条染色体上的机制来解释),同时对这些细胞中"第二个"基因重排的状态提出了疑问(这在本章后续部分讨论)。

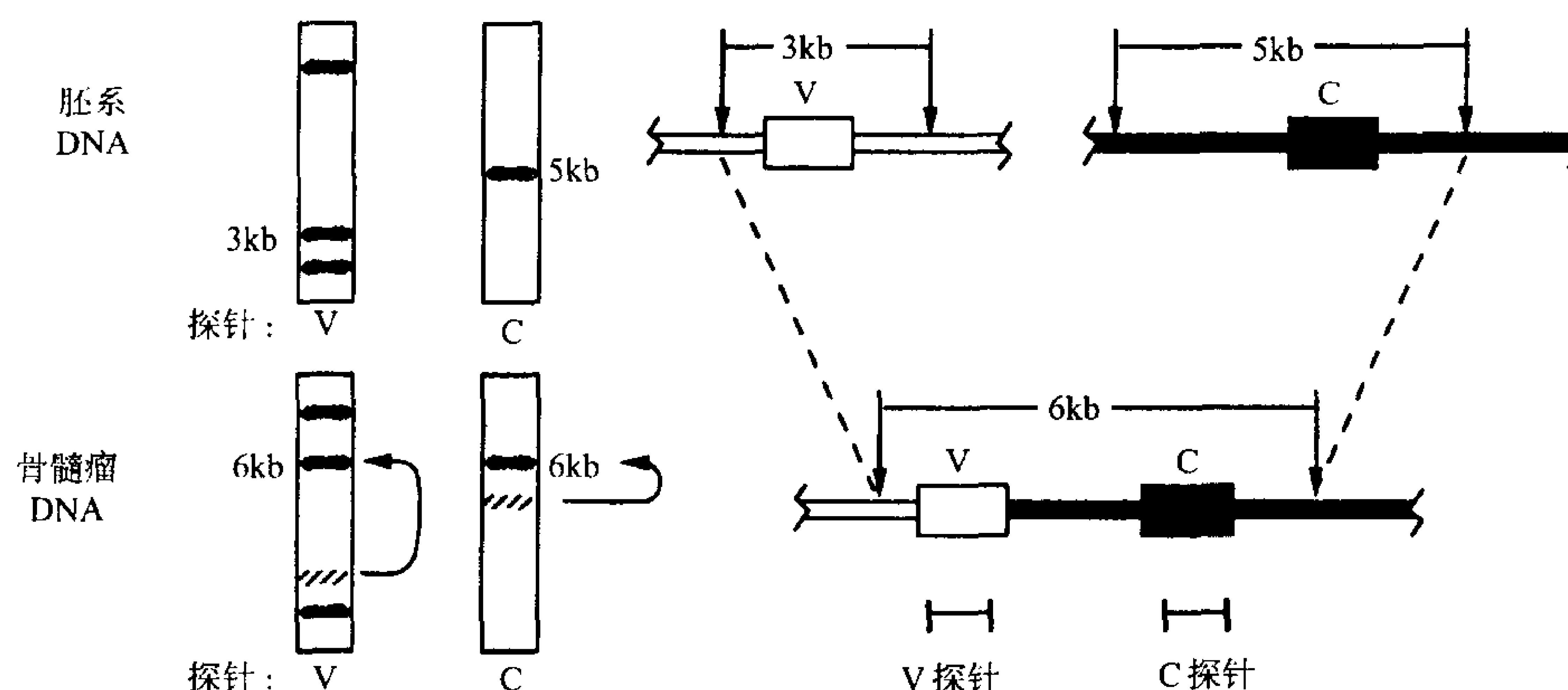


图 5.1 Southern 印迹证实 Ig V 区和 C 区基因的重排。在该假设的例子中,*Eco*R Ⅰ 酶切位点以箭头指示出来。在胚系 DNA(图的上部)中,V 和 C 的距离是未知的,经 Southern 印迹显示(见图的左侧)V 和 C 区分别位于 3kb 和 5kb 长的 *Eco*R Ⅰ 酶切片段上。V 区探针可与一相关基因家族印迹(见位于 3kb 条带之上和之下的条带)。在骨髓瘤 DNA 中(见图的下部),V 和 C 基因已变得紧密相邻,而且在该例子中,二者不再被 *Eco*R Ⅰ 酶切位点所分离;两基因位于同一个大小为 6kb 的酶切片段上,因此该片段可被两个探针中的任何一个所鉴定。在骨髓中能否见到这种胚系大小的片段(在 Southern 印迹中产生的片段)取决于非表达性同源染色体是否仍处于其胚系(未重组)状态。在许多骨髓瘤中,两条染色体均可出现,且两者均被重排。

通过对克隆的骨髓瘤 DNA 和胚系 DNA 进行序列分析可以更完全的理解 Ig 基因的重组。针对三个 Ig 基因座(重链、κ 和 λ)而言,其胚系 V 基因的基本结构是相似的。每个 V 基因的起始部都有一个编码由 22 个氨基酸组成的信号肽的序列(信号肽位于大多数分泌性或表达于细胞膜上的蛋白质的 N 端;当转运到内质网时,信号肽通常被特异性肽酶所切除。)在第 4 密码子内(从成熟蛋白质序列起始处倒数),编码序列中有一内含子插入,该内含子通常为 0.1~0.3kb 长。出乎意料的发现是:每个存在于胚系中的 V 基因都是不完整的,故需要经重组来装配成一个完整 V 基因[4]。例如,大多数小鼠的 κ 链有一个 108 个氨基酸长的 V 区,但小鼠的胚系 V_κ 基因仅编码其中的 95 个氨基酸。剩余的 13 个氨基酸由位于 C 区基因上游的 J(铰链)区编码[5,6]。经重组使许多胚系 V_κ 基因之一与五个 J_κ 基因片段之一连接在一起,从而组装成一个 V_κ 基因(图5.2A)。与此相似,也需要经重组才能从胚系 V_λ 和 J_λ 基因组装成一个完整的 V_λ 链序列[7]。对重链来说,经重组而由三种类型的胚系元件组装成一个 V 区;在胚系 V_H 和 J_H 元件编码的残基之间插入了数量不等的氨基酸(通常为 0~8 个氨基酸),这些氨基酸由一个 D(多样性)区编码。一条完整的重链 V 区的组装发生在两个独立的步

113

骤中：起初是几个胚系 D_H 区之一与 J_H 区之一相连；然后是一个胚系 V_H 区加入，从而完成 VDJ 重链基因的组装。

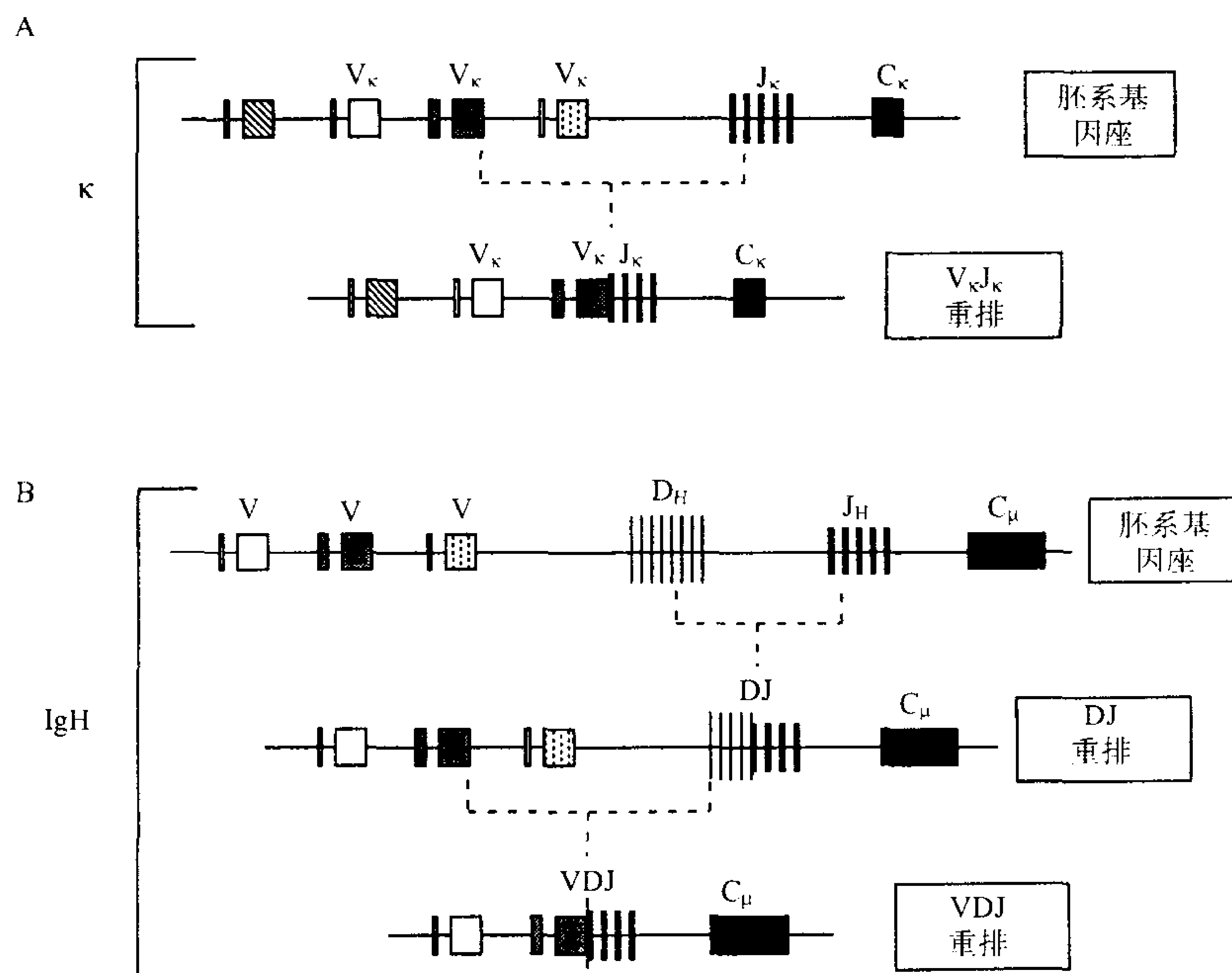


图 5.2　V 组装性重组。A：κ 基因座中，一胚系 V_κ 区与 J_κ 片段之一经一单个重组事件而连接到一起。B：在 Ig 重链基因座中，经一初始重组而将一 D 片段与一 J_H 片段连接在一起。经一个二次重组而使一 V_H 与 DJ_H 连接，从而完成 V 组装。

重组如何导致多样性

V 组装性重组以两种重要方式导致了抗原结合特异性的多样性。第一，由于存在多个胚系 V 区及多个 D 区和 J 区，所以 V_λ、J_λ、V_H、D_H 和 J_H 的可能组合数量是五种胚系元件各自数量的乘积。这个容量大大超过了相同总长度的 DNA 序列所能导致的预计组装性 V 区的数目。第二，增加多样性的第二个因素是通过对不同骨髓瘤基因的核苷酸序列与其胚系前体的核苷酸序列进行比较而获得的。例如，如图 5.3A 所示，通过比较小鼠骨髓瘤 MOPC41 细胞中表达的 V_κ 基因和相应的胚系 V_κ 及 J_κ 基因，表明该骨髓瘤基因通过第 95 个密码子的第二个核苷酸与胚系前体相匹配；VJ 重组连接明显发生在这一点上，原因是骨髓瘤基因上远离该位点的序列明显来自于 $J_\kappa 1$。对其他骨髓瘤进行的类似分析表明重组连接可发生于第 95 或第 96 密码子中的几个不同位点上。如图 5.3B 所示：重组连接位点的多变性增加了相关密码子的多样性。重链 V 区在 VD 和 DJ 连接中均表现出了这种多变性。此外，在许多重链 VDJ 连接（和较少数量的轻链 VJ 连接）中发现有在胚系前体中不存在的一些额外的核苷酸插入；这些插入的机制将在本章后续部分讨论。一个重要发现是：从 X 射线晶体衍射所得到的 Ig 的三维结构表明 V_λ-J_L 连接和 V_H-D_H-J_H 连接都形成可与抗原相接触的 CDR3 环；连接多样性与抗原结合多样性的形成有生理性相关。经突变分析已经证实了 D 连接性氨基酸在抗原结合中具有重要作用[8]。此外，在许多重链 VDJ 连接（和较少比例的轻链 VJ 连接）中，有在胚系前体中不出现的一些额外核苷酸插入；这些插入的机制（称为 N 区）将在本章后续部分讨论。

最初发现重组连接位点的多变性时，人们很难理解胚系元件如何变化多端地连接在一起，但同时又在 V 和 J 之间保持了正确的三重读框。（框外重组可导致全部 C 区以无义读框被阅读，所以这种基因将是无功能的。）然而，很快弄清了：如果一个组装性 V 区的亚组表达于骨髓瘤抗体中（该亚组选择性表达一个功能性重　*115*

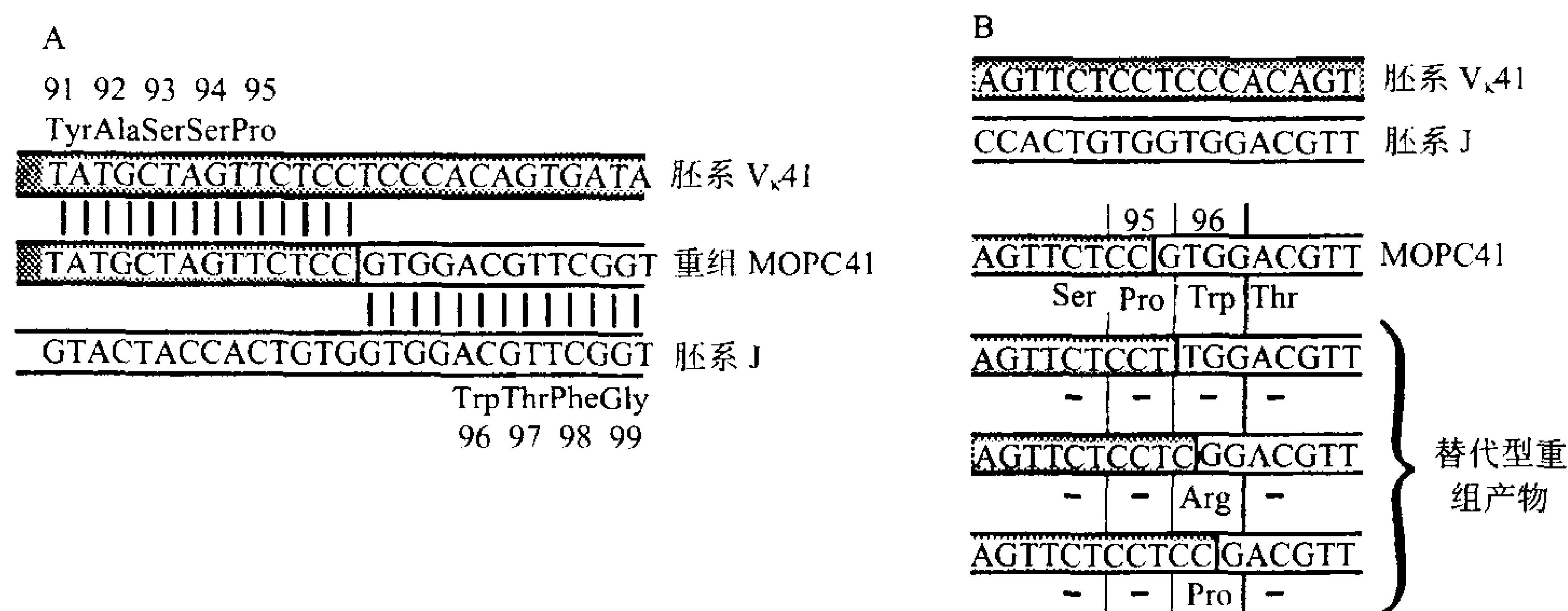


图 5.3 V_κ 和 J_κ 在一个独立的基础上重组。A:在图的中央部分显示了 VJ 连接周围的重组性 MOPC41κ 基因的序列,在图的上部和下部显示了两个胚系前体(V_κ41 和 J_κ1)的序列。在重组基因中,胚系来源的下列由垂直线指示,V 来源的序列在阴影部分显示出来。B:显示了在四个不同位点连接相同胚系序列(来自 A)的结果。在所描述的四种不同重组产物中,最上面的一个产物是真正在 MOPC41 中出现的产物。第二个有一个单一核苷酸的差异,但所编码的氨基酸序列没有改变。第三个和第四个产物分别在第 96 位点处产生了精氨酸或脯氨酸;已在测序的小鼠 κ 链的相应位置处发现了这两个氨基酸。

链和轻链),那么将会有许多带有框外重组连接的组装性 V 基因出现[9]。的确,在非选择性 VJ 重组中,框内连接频率大约占 1/3,这正如预料的对读框不敏感的重组机制所应产生的结果一样。在 Ig 基因座的两个等位拷贝都有重排的骨髓瘤中,不表达的重组通常是框外重组或"无效重组"。就重链 VDJ 重组来说,在 V 和 J 之间理论上可保持正确读框,同时允许所插入的 D 区片段以所有三种读框存在。然而,在鼠的重链中,只有单一 D 区读框经常出现,从而有几种机制阻止了带有 D 区其他两种读框的抗体的表达[10]。在人抗体中,没有发现这种精确选择读框的方式,从而允许其他序列多样性出现[11]。关于在 3 个 Ig 基因座(Ig 重链、κ 和 λ)产生 V 区多样性的更为详细的讨论参见后面一节。

重组信号元件

通过对 V、D、J 区序列侧翼的 DNA 序列进行分析,发现有两个保守的序列元件在重组事件中对转导 DNA 所应重排位置的信号发挥了一定作用。第一个信号元件是 7 碱基序列 CACTGTG,该序列以上述顺序出现于 J_κ 编码序列的 5′端,以(反向)互补序列 CACAGTG 出现于 V_κ 编码序列的 3′端。第二个元件是 9 碱基序列 GGTTTTTGT,该序列出现于距 J_κ7 碱基序列 5′端大约 23 个核苷酸处,其互补序列 ACAAAAACC 出现于距 V_κ7 碱基序列 3′端大约 12 个核苷酸处[5,6]。这些重组信号序列(recombination signal sequence, RSS)在重组中发挥重要作用的相似性被如下现象进一步证实;即在整个种系发生中,这些 RSS 在轻链和重链 Ig 基因以及 T 细胞受体(TCR)基因(见第 10 章)中出现的位置相似,这些基因进行相似的 V 组装性重组;进一步发现,在这些基因的侧翼没有其他保守性好的序列。在所有这些系统中,位于 7 碱基序列和 9 碱基序列之间的间隔可能很重要。重组仅发生于一个带有 12 个碱基间隔的编码序列和另一个带有 23 个碱基间隔的编码序列之间,所需要的这种间隔规则称为 12/23 规则。遵循这种规则的好处是防止发生无效重组(如在两个 V_κ 或两个 J_κ 基因片段之间的无效重组)。尽管用计算机排布的几百个间隔序列已经在特异性位置检测出了一些偏爱核苷酸[12],但在质粒重组底物的间隔序列中发生的突变对重组频率影响甚微。位于重链和轻链 V、D 及 J 元件侧翼的间隔序列的长度见图 5.4。

尽管 V_κ 和 J_κ 拷贝的 7 碱基和 9 信号元件的互补性最初引出了这样一种假说,即这些元件可能参与了重组反应中一种主干区-和-环中间物的形成,但是目前的证据更倾向支持"RSS 具有另外一个作用"的观点:即

RSS 作为识别序列参与 DNA 结合蛋白介导的重组。这一证据将在后续详细讨论 V(D)J 重组时被提及。

因为在 κ、λ、Ig 重链及 TCR 基因之间，RSS 元件是保守的，所以认为在所有系统中，从胚系前体组装成完整 V 基因的酶促性重组酶机构都是相同的。更多的其他证据也支持了这一观点，这些证据包括当胚系 TCR V 基因导入前 B 细胞时，该 V 基因可被正确重排，以及可发生杂合性 Ig-TCR 重排[尽管仅在异常细胞中才发生(参见后面一节)]。

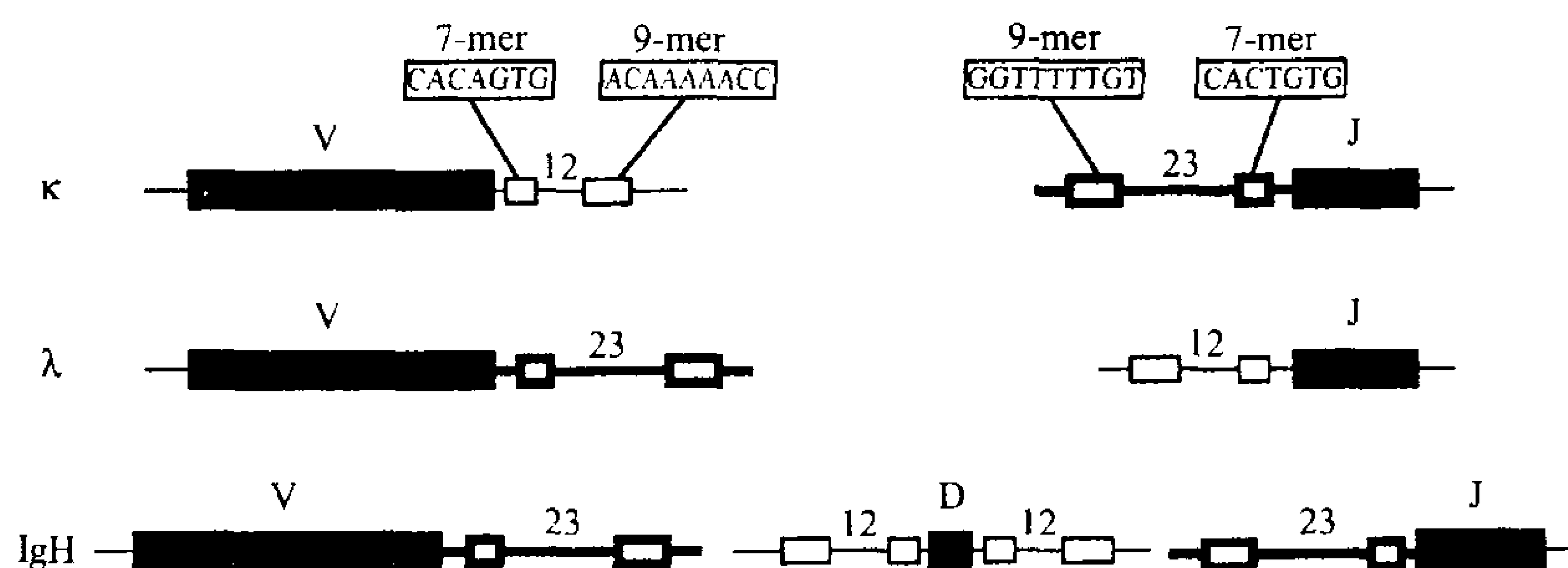


图 5.4　胚系 V、D 和 J 区基因侧翼的保守元件。保守性 7 碱基和 9 碱基 RSS 位于 V、D 和 J 编码序列附近，其对靶向性 V(D)J 重组有重要作用。7 碱基和 9 碱基元件被大约 12bp 的间隔区(图中以细线描绘)或大约 23bp 的间隔区(图中以粗线描绘)所分开。在不同的基因座中，V 区侧翼序列可以是 12bp 或 23bp RSS，同时针对 J 区也有类似的情况。但是在每一重组事件发生过程中，必须有各种类型的元件之一出现，该元件的出现对于避免无效重组事件(如 J 到 J 的重组)的发生是必需的。

三个免疫球蛋白基因座

本节对重链、κ 和 λ 三个 Ig 基因座进行了概述。这些基因座的 V 区将在后面关于胚系多样性一节中进行描述(关于小鼠 V_λ 的微小文库在本节中进行讨论)。

重链基因

在 B 淋巴细胞发育过程中，细胞最先合成有结合特异性的 IgM，这种特异性由功能性重排的 V_H 和 V_L 区所决定。随后，各个 B 细胞和及其后代细胞所产生的抗体带有相同的重链和轻链 V 区；但它们后来可发生重链的亚型转换。关于这种发育程序的早期证据包括(在其他发现中)：①在免疫应答过程中可有类型转换[13]；②B 细胞克隆(包括骨髓瘤[14,15]和脾中心[16])具有表达有相同 V_H 区的 IgM 和其他类型的能力；③在体分离实验提示产生 IgM 的细胞是产生 IgG 细胞的前体[17]。使蛋白质的一部分发生变化，而另一部分不发生改变的这种分子机制引起人们的浓厚兴趣。

116

几个小组已证实[18~20]：从表达各自重链的骨髓瘤分离的活化重排的 α、γ2b 和 γ1 基因在它们的 V 和 C 区之间含有的 DNA 序列(包括一个或多个 J_H 序列)来自胚系 C_μ 基因上游 DNA。这些发现引出了如下模型(如图 5.5)：即 V_H 区起初重排于 μ 基因 5′端的某个位置上(导致产生 IgM)；当一个细胞表达一个新的亚型时，C_μ 基因被表达新亚型的 C_H 区所替代。导致这种亚型转换的可能原因是：组装性 VDJ 和 C_H 基因之间的 C_H 基因的一个缺失所致，这些 VDJ 和 C_H 基因在发生类型转换后被表达。支持这一缺失模型的早期证据来自对已进行了不同转换重组的骨髓瘤中特异性 C_H 基因成分的分析。液相杂交动力学或用 cDNA 来源的探针进行的 Southern 印迹进一步证实类型转换的发生与 C_H 序列从细胞中丢失有关。从表达不同亚型的骨髓瘤中丢失特异性 C 区的现象提示，有可能对染色体上不同 C_H 基因的线形顺序进行预测[21,22]。

随着许多实验室对 C_H 基因的基因组克隆进行分离，一幅关于重链基因座的更加详细的图展现在人们

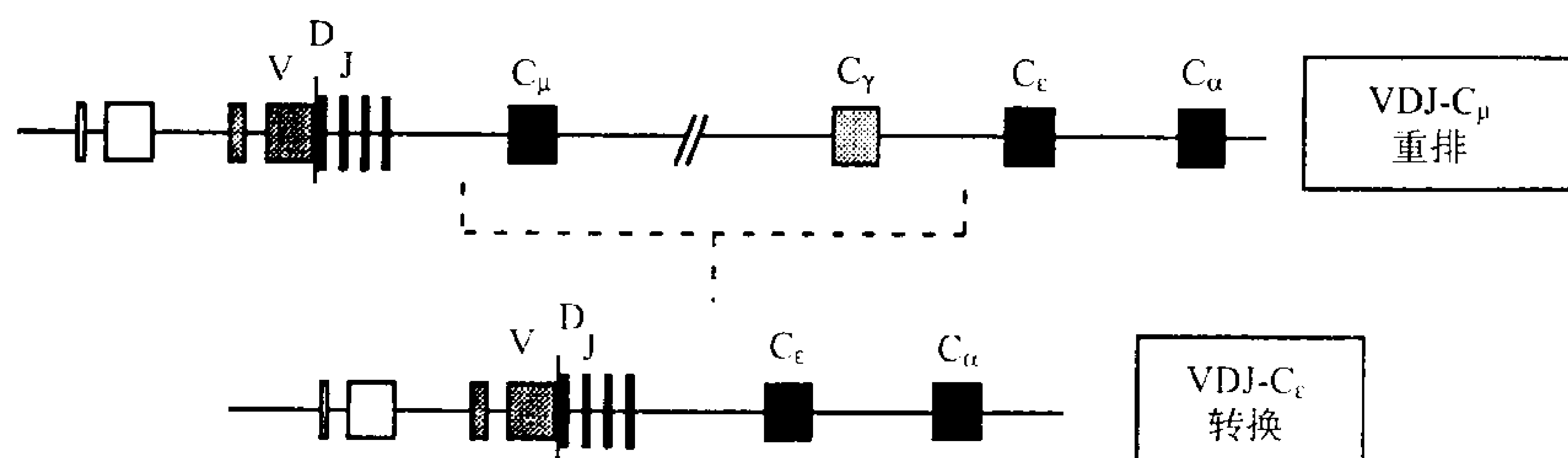


图 5.5 缺失性亚型转换重组。通过一个重组事件而使 C_μ 基因被适当的重链 C 基因所取代(此图中为 C_ε 基因),同时缺失掉重组断点之间的 DNA,最终完成下游重链基因的表达。

面前。总的来讲,在 20 世纪 80 年代早期获得的这些克隆是利用由骨髓瘤 mRNA 来源的 cDNA 作探针筛选基因组 DNA 文库而得到的。由于篇幅所限,我们只能在所获得的大量数据资料中,简要讨论一些令人感兴趣的结论。

C_H 基因一个重要特点是:100~110 个氨基酸组成的结构域以完整的外显子被编码,借助 0.1~0.3kb 的内含子与其他结构域片段相分离[23~25]。上述 100~110 个氨基酸结构域是经内在的氨基酸序列同源性分析和经 X 射线晶体衍射进行的三维结构分析而得到证实的。如此一来,例如小鼠 γ2b 蛋白有 3 个主要的结构域(C_H1、C_H2 和 C_H3),在 C_H1 和 C_H2 之间有一个小的铰链结构域。其基因结构可总结如下[23,26,27]:

C_H1——内含子——铰链域——内含子——C_H2——内含子——C_H3

(292) (314) (64) (106) (328) (119) (322)

括号内的数字代表每个片段中包含的核苷酸数目。与此相反,α 基因的铰链区与 C_H2 结构域连续编码,中间不存在内含子[25];然而,超长的人类 γ3 铰链由 3 或 4 个铰链外显子编码[28]。根据对基因组 C_H 基因的分析,可以推测:重链基因进化的历史可能包含了突变,这些突变能产生或破坏 RNA 剪接位点,因此可使内含子序列的一部分转变成外显子(反之亦然)。例如,位于小鼠 γ2b 基因铰链区 5′端的内含子序列与 C_H1 序列有惊人的相似性;根据这个观察结果可以推测[23]:铰链外显子可能源于一个完整 Ig 结构域,该结构域的缩短可能是由于结构域 5′末端的 RNA 剪接位点被破坏所致,也可能是由于在结构域中产生一个新的剪接位点所致。

在小鼠 C_μ 基因上游大约 7kb 处有 4 个 J_H 片段组成的簇(在人类中为 6 个 J_H 片段),这些片段参与了 VDJ 重组。再往上游是 13 个 D 片段(人类有 27 个),在这些 D 片段上游处是 V_H 区。V 和 D 区在本章关于 V 区多样性的一节中进行讨论。

膜型和分泌型免疫球蛋白

关于 Ig 重链基因和 cDNA 结构的研究可解释重链为什么有膜型和分泌型之分。如前所述,IgH 链的膜结合型比分泌型稍大一点,这是因为前者的 C 端有一个能固定蛋白到膜脂质的疏水片段[29]。就 μ 链而言,这两种类型分别是两种不同 mRNA(分别为 2.7kb 和 2.4kb)的产物,这两种 mRNA 可经凝胶电泳进行分离。几个实验室[30~33]通过比较一个基因组 μ 克隆和与两种 RNA 相对应的 μ cDNA 克隆的 DNA 序列,证实这两种 RNA 均为同一基因的转录物,只是这两个转录物在 3′末端或 C 端的剪接不同(如图 5.6)。编码分泌型(μs)C 端 20 个残基的核苷酸序列和来自与 μ 基因的 C_H4 结构域相连续的 DNA;然而在膜型 mRNA(μm)中,在 C_H4 之后的序列来自靠 3′端更下游大约 2kb 处的两个外显子。这些膜型外显子编码 41 个残基,其中有 26 个不带电荷的残基向膜延伸,从而将 Ig 固定于细胞表面。由于在其他 C_H 基因中也发现有与上述相同的基因结构[34~37],这就提示这种不同的剪接机制可能是导致所有亚型 Ig 产生两种不同形式的原因。

早期 B 细胞可同时产生大量的 μm 和 μs,然而随着向浆细胞阶段成熟,细胞则主要产生 μs,这和这些细

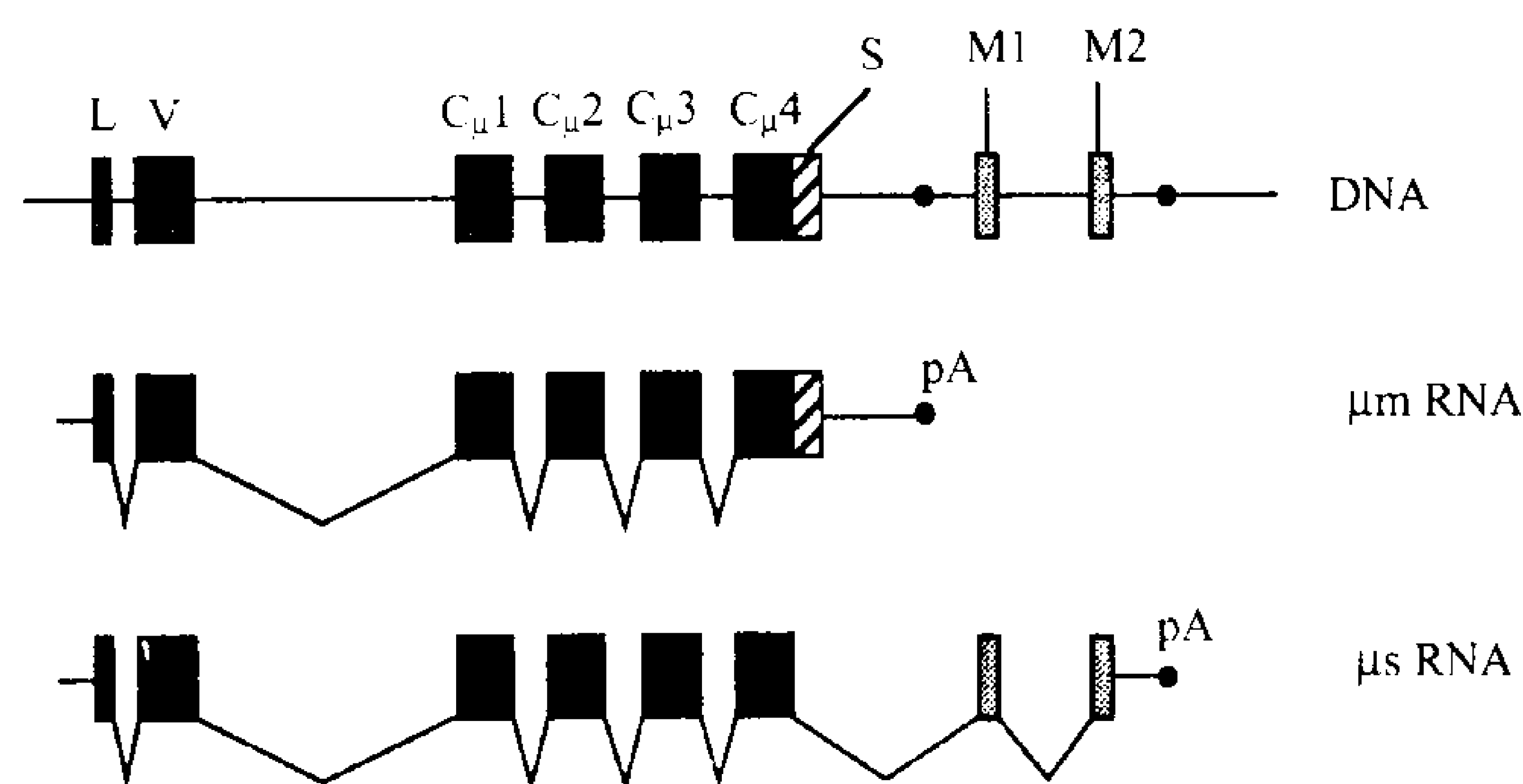


图5.6 经不同加工而从 μ 基因产生两种 RNA。在图的上部描述了在一表达性重排 μ 基因中的 μ 基因外显子(以黑色矩形表示)。包含在 DNA 中出现的所有外显子的一个初始转录产物可经加工而产生 μs RNA[包含一 C 端分泌性(S)序列]或 μm RNA[包含两个膜(M)外显子]。

胞产生循环 Ig 池的功能是相对应的。CH4-M1 剪接和在上游 μs poly(A)位点裂解/多聚腺嘌呤化之间的一种竞争机制导致了 μ 链的两种 RNA 剪接方式的平衡。用如下方法对影响这种平衡的因素进行了研究:即将 μ 基因或相应构建体中的剪接位点或裂解/多聚腺嘌呤化位点突变、或使它们之间的距离不同、或使它们以不同的顺序重排后,将它们转染于早期或晚期 B 细胞,继而观察对上述平衡的影响。在某些实验中,已将这些构建体注射到带有或不带有 B 细胞核的蛙卵母细胞中。当探讨影响 μm/μs 比值关键因素是剪接位点的不同[38]还是 poly(A)位点的选择不同[39,40]时,出现了矛盾之处。诚然,位于 C_H4 和 M1 之间的内含子的长度对二者比值有影响[41,42],位于 C_H4-M1 内含子 3′端的 RNA 的主干-环结构对比值也可能起一定作用[43];而且针对不同的亚型,调节这种比值的机制可能不同[44]。要确切解释细胞成熟如何导致膜型和分泌型 Ig 比值的适当改变,尚有必要进行其他研究。

117

膜型 Ig 可作为 B 细胞受体(BCR)的抗原特异性识别组分,它对于在与抗原接触后产生淋巴细胞激活信号是至关重要的(见第 7 章)。由于(所有亚型)膜型 Ig 进入胞质的片段太短,因而不能编码功能信号转导域。信号转导是由 B 细胞受体成分 Igα 和 Igβ 组成的一种相关蛋白二聚体所介导。在成熟 BCR 完成组装前,这种二聚体还在 B 细胞发育过程中发挥重要的信号转导作用(这将在本章后续部分进行讨论)。

C_H 基因座的组织形式

随着人和小鼠重链基因座 C 区基因的基因组克隆的获得,人们试图将它们"连接"起来,即:克隆连续的 DNA,这种连续的 DNA 包括 C_H 基因以及在基因组中位于 C_H 基因之间的所有 DNA。开展此项研究的一般策略是用 cDNA 克隆来获得 C_H 基因,用基因步移技术来填充这些 C_H 基因之间的非编码 DNA。据报道[45],1982 年,用覆盖小鼠基因组全部区域的克隆将小鼠基因座完整地连接在一起,小鼠基因组的完整区域有 8 个 C_H 基因,其在 12 号染色体 DNA 上延伸大约 200kb。利用这些克隆确定了该区域的基本结构(如图 5.7 所示),图中数字代表基因之间相距离的 kb 数。所有的 C_H 基因以相同的 5′→3′分布。近来序列分析表明在 γ 基因簇中存在几个 γ 假基因[46]。

人 C_H 基因也已被克隆并定位于染色体 14q32[47],但到本书编写时还尚未被完全连接起来。人和鼠 IgH 基因座之间的一个重要区别是:在人重链基因座的 3′端存在大量的重复序列,同时在人重链基因座中有两个拷贝的 γ-γ-ε-α 单位[48,49]。ε 重叠序列之一是一假基因,其中 C_H1 和 C_H2 结构域已被缺失[49,51]。此外,人基因组包含了一个第三种近乎同源的 ε 相关序列:即在 9 号染色体上发现的一个"被加工过的假基因"[50,51](这种假基因似乎由加工后的 RNA 中间物反转录而成,然后被插入到基因组上与原转录基因的初始基因座不相关的位置上)。在人 Ig 重链基因座的两个 γ-γ-ε-α 重复序列之间还发现了一个缺少转换区的 γ 相关假基因[52]。图 5.7 中所给出的图谱是基于部分相互交叠和脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis,PFGE)而得到的[53,54]。PFGE 可使非常大的片段(大至几个 Mb)得以电泳分离,而如此大的片段用传统的电泳法是无法分离的;这样的长片段对绘制长距离图谱是有益的,其可由具有稀少识别位点的限制性内切核酸酶切割而产生。图 5.7 中的人 Ig 重链基因座图谱与已知的重链基因座上的缺失是一致的[55](这种缺失也在同一图中给出)。

118

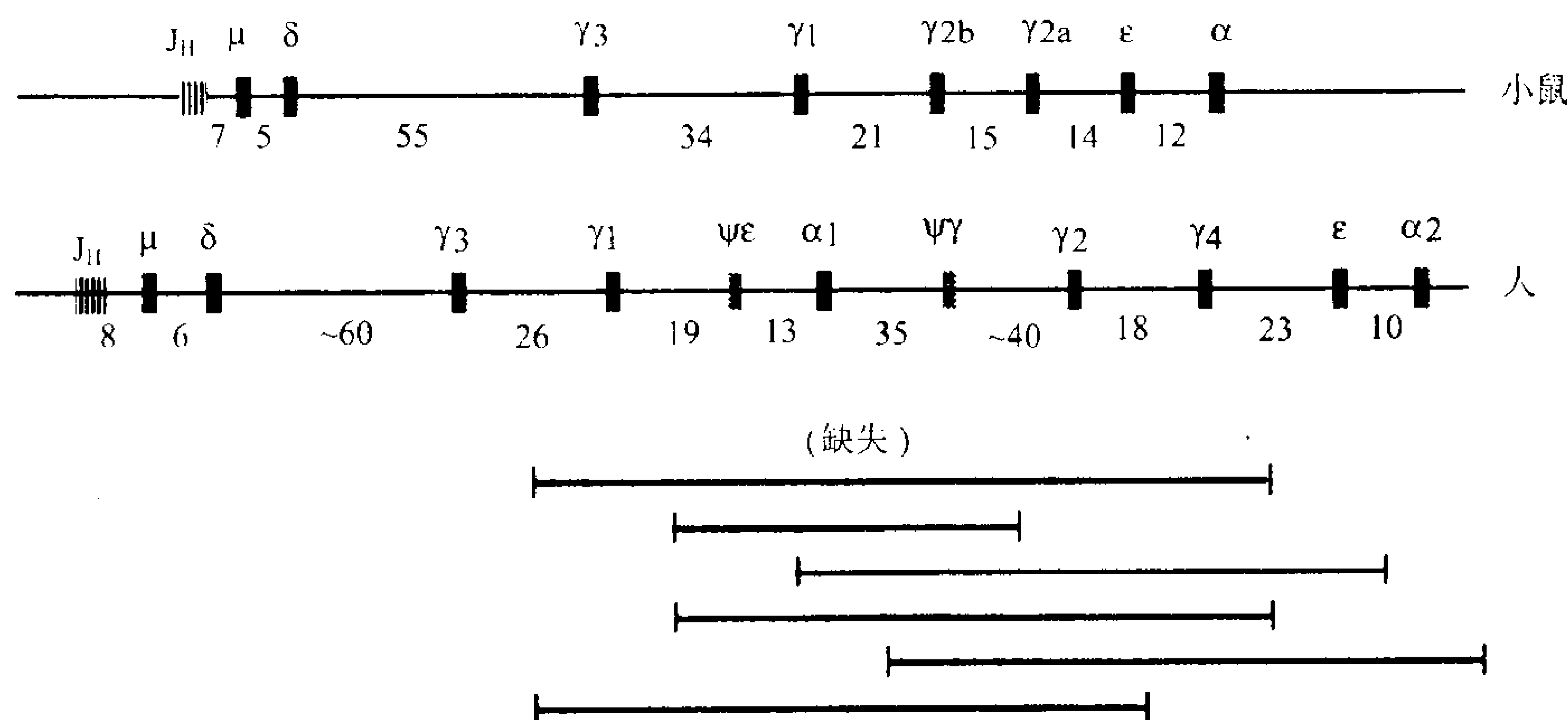


图 5.7 小鼠和人的重链恒定区基因座。小鼠的基因座已被完全克隆;图中描述了恒定区基因,并显示了间隔基因的大概距离(以 kb 表示)。人的基因座在其下游末端处显示了一个大的重复。尽管并非所有绘出的片段都已被相邻的克隆物理性连接起来,但在不同个体中所观察到的缺失以及经 PFGE 而进行的作图支持了所显示出的排序。

除了小鼠和人以外,还对几种其他种属的 IgH 基因座进行了检测,从中发现了几个令人关注的区别。例如,兔子有 13 个 C_α 序列和仅有一个单一 C_γ 基因[56];这种对黏膜免疫有益的不寻常的基因扩展可能与这些动物食粪的特异性习惯有关。与兔子 C_α 基因的复杂性相反,猪只有一个 C_α 基因和八个 C_γ 基因[57]。骆驼与众不同的是其具有在无轻链时发挥作用的重链[58]。大量其他种属的 Ig 重链基因(V_H 或 C_H)也已被克隆,这包括大鼠(它与小鼠有高度同源性[59])、奶牛[56]、鸡[60~63]、马[64]、鲨鱼[65]、多骨鱼[66,67]、鳄鱼[68]、青蛙[69]和美西螈[70]。

重链转换

转换区

可利用基因组 Ig 重链克隆进行缺失性转换重组的详细序列分析。对来源于几种骨髓瘤的活化转换基因与相应的胚系 C_H 基因及胚系 μ 基因进行了比较,其中对转换重组位点周围的序列给予了特别的关注。在每种情况下,重组均发生于位于 C_H 编码序列 5′端的内在重复性 DNA 序列内或其附近,这些序列被称为转换(S)序列[71~74]。

小鼠 μ 基因 S 区(S_μ)位于距 C_μ 编码序列 5′端 1~2kb 处,其由大量串联重复序列组成,重复序列的形式为$(GAGCT)_n(GGGGT)$,其中的 n 通常为 2~5,但也可高达 17[74]。在实验室构建和分离含有 S_μ 区克隆的过程中,这些重复序列可通过同源重组而明显促进在 S_μ 区内发生缺失。由于这种缺失使得大多数克隆化胚系 μ 基因的 *Eco*RⅠ酶切片段比在 BALB/c 鼠 DNA 基因组杂交中确定的 12.5kb 片段要短。经 Southern 印迹进行比较不同小鼠株系的 μ 基因座已经证实在体内也发生了相同区域的缺失[75],而且在正常 B 细胞的转换重组被活化过程中,这种缺失出现的频率特别高[76]。

在除 C_δ 外的所有其他 C_H 基因的 5′端,也已发现了延伸 1~10kb 的类似内在重复 S 区。所有的 S 区均包括偶尔出现的与 GAGCT 和 GGGGT 相似的五碱基序列(GAGCT 和 GGGGT 是 S_μ 区的基本重复元件)[77];在其他 S 区中,这些五碱基序列不像在 S_μ 区那样有精确地串联重复,而是镶嵌在更大的重复单位之中。在 10kb 的 $S_\gamma1$ 中有一额外的更高级顺序结构:即在两个 49bp 串联重复之一的侧翼有两个直接重复序列[78]。已发现人重链基因的 S 区与其小鼠的同源区非常类似[79~81]。的确,已经发现位于 C_H 基因 5′端的人和小鼠克隆之间的序列相似性被局限于 S 区,这一发现是支持这些区域生物学重要性的一个证据。

例如,发生于 μ 和 ε 基因之间的一个转换重组导致了一个 S_μ-S_ε 复合序列的产生(图 5.8)。通过对胚系

S_μ 和 S_ε 序列与来源于骨髓瘤或杂交瘤的 S_μ-S_ε 复合体 S 区进行比较性研究，有可能准确定位发生于不同细胞的 S_μ 和 S_ε 之间的重组位点；利用产生其他同种型的细胞也进行了类似分析。上述研究结果表明在总是发生重组的 S_μ 区或其他任何 S 区中都没有特异性重组位点。因而，与 VJ 重组的酶促性机构不同，这种转换机构能将位于广泛靶区域中的序列连接到一起；由于 VDJ 重组发生于编码序列，而转换重组因发生于内含子而很少受到约束，因此可通过这些对二者进行辨别。当与相应胚系转换序列进行比较时，发现许多复合性转换连接序列在重组断点处有突变的证据；这些突变可能是错误-倾向 DNA 合成步骤的反映，而该步骤可能是转换重组机制的一个组成部分[82]。

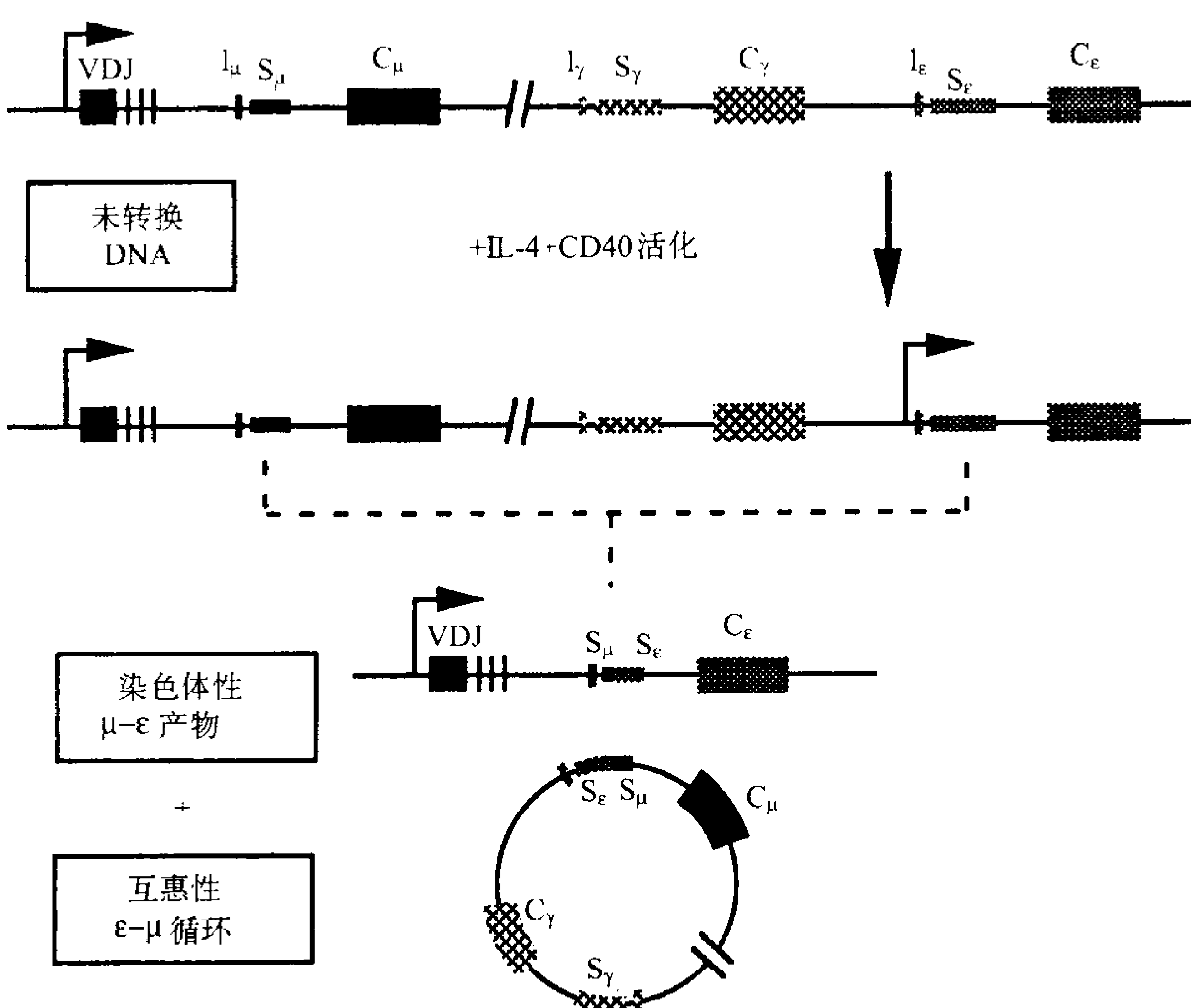


图 5.8　转换区和复合性转换连接。在同种型转换重组中，重组断裂点位于重复性 S 区内。激活转换重组的刺激（图中显示了经 IL-4 和 CD40 的活化）通常可以促进转录跨过目标 S 区，转录刚好起始于 I 外显子的上游。S_μ 和 S_ε 之间的重组可产生两种复合性转换连接：一个是保留于染色体 DNA 中的 S_μ-S_ε 连接，另一个是在环状 DNA 组分中发现的互惠性 S_ε-S_μ 连接。跨越任一复合性连接的 PCR 扩增可都用于研究转换重组。

通过对从正在活跃进行类型转换重组的细胞中分离的环状 DNA 组分进行克隆，可以检测经转换重组而删除的 DNA[83~85]。因此，至少有一些被删除的 DNA 片段能将其末端连接起来形成转换环；它们所包含的复合性转换连接与保留与染色体 DNA 上的复合性转换连接相互补（如图 5.8 所示）。例如，在由 μ 到 ε 的细胞转换中，复合性 S_μ-S_ε 连接出现于染色体 DNA，而 S_ε-S_μ 连接则作为代表转换环中的互补连接而出现。由于转换环不与着丝粒相连，且其中可能不含有复制起始位点，所以它们不能进行有效复制。故在转换后已发生多次分裂的细胞（如淋巴瘤和杂交瘤）中不能检测到转换环。

检测转换的方法

在稳定表达已转换同种型的杂交瘤和淋巴瘤中，转换重组的证据可通过基因克隆或 Southern 印迹来获得。然而，为了研究转换重组的调节和机制，则需要使用能够在微量培养细胞群体中检测到转换重组的分析方法。一些实验室通过简单检测培养上清中已转换同种型的 Ig 蛋白来评价转换。另外，反转录 PCR（RT-PCR）可用于检测与已转换同种型的成熟 VDJ-C RNA 转录物相对应的 mRNA。然而，由于适合同种型转换的培养条件也可以不依赖于转换重组的方式来影响转录或蛋白合成率，所以 RNA 或蛋白质检测有可能不能真实地反映 DNA 重组事件。而且，如果想探究引起同种型转换的非重组机制的几种模型之一，那么就不能将转换的 RNA 或蛋白质假设为反映了 DNA 重组事件。因此，发展了两种不同的在 DNA 水平评价转换重组的 PCR 策略。一种策略是：设计 PCR 引物使之能扩增跨越整个目的复合 S 区[86]。一种相关的策略是扩增环状 DNA 上的互补转换连接[87,88]；在假设每一环状 DNA 均为单个转换重组事件的副产物，且其不随细胞分裂而复制的前提下（当然，在重组事件发生后进行的连续分裂过程中，环状 DNA 则被随机分配到子代细胞中），那

么这些连接可被用于统计不依赖于细胞增殖的重组事件次数。由于扩增效率随复合转换连接的不同而不同(较少的模板扩增率较高,而最大量模板有可能根本就不能扩增),所以上述描述的 PCR 策略不容易用于转换重组的定量评价。针对这种情况,称为消化-环化 PCR(DC-PCR)的第二种策略应运而生[89]。在此方法中,先用一种限制性内切核酸酶消化转换细胞来源的 DNA,然后将这些限制片段(包括带有复合 S_μ-S_ε 连接的片段)连接成环。通过连接 S_μ-S_ε 片段末端可产生限制位点,利用所设计的引物来扩增跨越该酶切位点的 DNA,将会产生大小一致的产物,不同情况下产物的大小只依赖于引物和限制位点间的距离。由于两条引物不能同时与一条相同的 DNA 环杂交,故针对非转换的 DNA,没有扩增产物出现。因此,通过适当的校准[90],所形成的 DC-RCR 产物的数量可用于半定量测量 DNA 样品中复合转换连接的数量。这些方法已被用于以下描述的许多实验中。

同种型转换调节

在用 T 细胞依赖性抗原免疫动物大约一周后,体内可发生生理性同种型转换,该时间与 Ig 基因发生体细胞突变的时间大致相同。体细胞突变(见本章后续部分)明显发生于淋巴器官的生发中心(在该处 T 和 B 细胞间的相互作用得以加强),而且有证据表明生发中心也是同种型转换发生的主要部位。体外转换实验证实,T 细胞可通过分泌细胞因子(特别是 IL-4 和 TGF-β)及细胞与细胞接触而促进转换。细胞接触信号的主要部分由 B 细胞表面标志物 CD40 和表达于活化 T 细胞的相应配体(CD40L 或 gp39)间的相互作用而介导。不同的几个实验室发现,X 连锁的高 IgM 综合征是因编码 CD40L/gp39 的基因缺陷所致[91],该遗传性疾病有力地说明了转换依赖于 T 和 B 淋巴细胞间的相互作用。有该综合征的病人,其血浆中有高浓度的 IgM,但几乎没有其他同种型的 Ig。此外,病人的抗体不能进行亲和力成熟,且缺乏 B 细胞记忆性反应的证据。有 CD40 或 CD40L 工程性缺陷的小鼠虽然能对 T 细胞非依赖性抗原产生伴有正常同种型转换的应答[92],但小鼠的表现型类似上述综合征。关于这种 T 细胞非依赖性转换途径尚知之甚少。关于 CD40-CD40L 相互作用的重要性的发现促进了体外转换试验的研究,在这种试验中可用针对 CD40 的抗体或工程性表达表面 CD40L 的细胞所代替。CD40 刺激信号的作用之一是诱导 B 细胞增殖。的确,在无 T 细胞和 CD40 活化的情况下,其他增殖刺激信号(如 LPS,或 IgM 或 IgD 交联)可在体外支持细胞因子诱导的同种型转换;而且转换可能与细胞周期有关[93]。然而,CD40 还有其他作用,包括上调 IL-4 应答反应及 IL-4 受体数目[94];关于由 CD40 启动的信号通路是目前的研究热点之一[95]。

根据抗原、抗原接种途径及几种其他参数的不同,在不同免疫应答中所产生的占主导地位的同种型也不同。正如在第 23 章中所进行的更详细的讨论那样,这些不同的参数通过影响 B 细胞的细胞因子环境而发挥一定作用。例如,IL-4 可促进 IgE(在小鼠为 IgG1)的表达,而 TGF-β 可促进向 IgA 的转换。目前认为,这些淋巴因子的作用是使靶同种型的 C 区进入转换重组酶机构(该机构可能是非同种型特异性的)。这种可及性与一 RNA 转录物的表达相关联,相应的 RNA 转录物起于一目标 S 区的上游,并延伸通过靶 C 区(如图 5.8 所示)。这种类型的 RNA 被称为胚系转录物,原因是其在 Ig 重链基因座处于胚系结构时被转录;换句话说,这种转录物被叫作不育性或无效转录物(即其中缺少 V 区)。例如,在体外用 IL-4 处理细胞后,在发生朝向 C_ε 的转换重组之前,用含 C_ε(其上游有一名为 I_ε 的短外显子)的结构可检测到无效转录。I_ε 序列来源于 S_ε 上游的 DNA,在形成 S_μ-S_ε 复合性 S 区的过程中,S_ε 上游区域被缺失掉。在胚系转录物中,通过去除含有 S_ε 区的内含子而使 I_ε 区与 C_ε 剪接在一起。在人和小鼠系统中,针对各种同种型(包括 μ)均可检测到相似的转录物。在每种情况中,许多有利于从一特定同种型进行无效转录物富集的相同实验条件(包括细胞因子)也同样有利于涉及 S 区的转换重组。在某些情况中,已对由细胞因子受体转导的信号进行了阐明。例如,IL-4 可通过活化转录因子 STAT 6 而激活转录,其中 STAT 6 可与 Igε 和 Igλγ 上游启动子区域中几种核蛋白结合基序之一相结合(见本章后续部分)。除了受 I 区启动子调节外,无效转录和同种型转换还受到位于小鼠 C_α 基因下游的一个增强子的调节,此结果是由如下实验推断而来的:即当小鼠所有 B 细胞中该增强子被新霉素抗性基因取代后,小鼠表现出转换缺陷[96];主要表现为向 IgE 和几种 IgG 同种型的转换缺陷,但没有 IgG1 同种型转换缺陷。

120

以小鼠多种不同同种型I区作为同源重组靶的研究提示，无效转录是重组的必需但不充分条件[97~99]。I外显子序列的低度保守性和缺少一致性读框的事实提示这些转录不能编码功能性蛋白。那么它们的作用是什么呢？一个假设认为：通过跨越一种同种型基因座的转录可以造成引起该基因座进入转换重组酶机构的染色体关键性改变，而转录物自身不具有功能。第二种假设认为：转录物或许可通过形成一种RNA:DNA三螺旋而在某种程度上参与重组事件[100]。在一支持该设想的证据中：S区的无细胞转录可导致RNA与模板DNA形成一种联系[101]；更为重要的是，这种联系只发生于由S区DNA转录而来的RNA，并且只有当RNA沿生理方向被转录时才能发生上述联系。然而这两种关于无效转录作用的假设均不能很好地解释在所有无效转录物中存在的一个保守性特征，该特征是：存在一种RNA剪接，该剪接可从成熟I_xC_x转录物中去除S_x区。值得注意的是：从VDJ组装性重组的胚系组分而来的无效转录物也可恰恰在重组事件发生前被合成，而且在重排性酵母DNA序列中也发现有转录存在。这些发现提示刚好发生于重组前的DNA转录可能是许多生物系共有的重组事件的一个普遍特征。另一方面，细胞因子除了调节无效转录外，可能还调节转换机制的其他方面，原因是已有几个报道发现细胞因子在没有影响无效转录的情况下，也可上调或下调转换重组[102]。

转换重组机制

已经用诸多策略对同种型转换重组机制进行了探究，但至今仍收效甚微。一种阐述转换重排所需序列的策略是构建含有转换序列的质粒底物，当将该底物稳定[103]或瞬时[104]转染入B系细胞后，其可发生转换重组。例如，由Daniels和Lieber[105]制备的构建体含有多瘤复制起始点和T抗原基因（它们使复制能在小鼠细胞中进行）以及S_μ和S_γ基因区域的片段，在上述各基因的上游都有病毒启动子，在两基因之间有一个SupF转运RNA（tRNA）基因；当在适宜的工程菌中表达SupF tRNA基因后可使菌落在培养平板中呈蓝色。在真核细胞中进行了S_μ-$S_\gamma3$重组的质粒可从细胞中提取出来并经产白色菌落实验而得到鉴定。尽管多种非淋巴细胞在转染的头20小时内也可产生白色菌落（这可能是由于DNA修复酶作用于缺口质粒所致），在超过20小时后的白色菌落继续增加则呈现为B细胞特异性。缺失这些启动子仅对重组频率有微小影响，但当因启动子重排而使S区以非生理性方向进行转录时，白色菌落则明显减少。当S区被无关DNA取代时，转录方向对重组无影响。重组频率依赖于转换序列的转录方向的事实与上述所描述的涉及S区的RNA-DNA复合体呈现链依赖性的发现是一致的。

另一种阐明转换重组酶机制的策略是鉴定反应中的中间产物，该策略在研究VDJ重组中取得了极大的成功（见本章后续部分）。在使用该策略的一个研究中，经连接-介导的PCR（是一种与VDJ重组相关联系的技术）来检测培养的转换性B细胞中小鼠γ3区域内的平头双链断端[106]；这些断端可能由转换重组酶机构来产生。

可能的转换重组酶组分

为了鉴定转换重组酶机构的组分，几个实验室已对以序列特异性方式与S区序列结合的蛋白质进行了探寻。尽管本节讨论的组分中没有一种被证实参与了转换重组，但在下面还是描述了几个例子。LR1是一种从经LPS诱导的鼠脾B淋巴细胞的核提取物中发现的蛋白质，它可结合于$S_\gamma1$、$S_\gamma3$、S_α以及重链增强子[107]。该蛋白质已被纯化[108]，且一种组分已被鉴定为一种名为核仁素的核蛋白[109]。$S_\mu$bp-2是一种广泛存在的蛋白质，在小鼠脾B细胞中该蛋白质也可被LPS上调，其可与S_μ内串联重复序列中的一个片段相结合。发现小鼠的一个cDNA克隆与编码螺旋酶的基因有序列相似性；这种酶活性在转换重组中是至关重要的[110]。另一种蛋白质NF-S_μ可结合于S_μ串联重复序列，脾B细胞可经LPS诱导后而表达该蛋白质；其结合特异性与其他已知蛋白质稍有不同[111]。SNIP和SNAP是两种能够与S_γ区的亚序列相结合的蛋白质，这些亚序列与重组连接的高频率有关，这两种蛋白质明显分别与转录因子NF-κB/p50和E47相一致（这两种转录因子将在本章后续部分讨论）[112,113]。利用经同源重组而破坏p50基因的小鼠B细胞进行实验证实了NF-κB在转换中的一种作用。在这些p50基因敲除的小鼠中，向IgE和IgG3分泌的亚型转换明显减少；然而，相应胚系转录物的表达下降提示p50为增加可及性所需，而不是实际重组事件所需[114]。在这些实验中，向IgG1的转换表达几乎不受p50缺乏的影响，而且在胚系转录正常的情况下，α亚型是惟一的表达明显下降的亚型。

121

Id1 是转录因子 E2A 的一种拮抗剂,而 E47 是 E2A 转录因子中的一员,在小鼠细胞系 C_H12.LX2 中,Id1 的表达可部分地抑制自发性和诱导性向 IgA 的转换,这一结果是 E47 可能在同种型转换中发挥作用的一个证据[115]。

除了研究结合 S 区 DNA 的蛋白质外,还采用了鉴定转换重组酶组分的策略来寻找可能参与重组的酶活性。一种淋巴细胞特异性内切核酸酶活性已被初步纯化并被假定为转换重组的一个参与者,该酶活性优先裂解 S 区的 G 富含片段[116]。

已经针对几种蛋白质[这些蛋白质在 V(D)J 重组中的作用将在本章后续部分讨论]检测了转换重组依赖某些相同组分的可能性,已知这些相同组分参与了 V(D)J 重组。SCID 小鼠[是 DNA 依赖性蛋白激酶(DNA-PK)的自然突变体]和另一种小鼠[有重组活化基因-2(recombination activating gene-2, RAG-2)的纯合敲除]都有向成熟 B 细胞发育障碍,原因是它们不能有效地进行 V 基因组装。然而,当来自这些小鼠的早期 B 系细胞先在体外进行增殖,然后用 IL-4 和抗 CD40 处理后,在 RAG-2 敲除的细胞有转换重组发生,但在 SCID 细胞则未见转换重组[116a]。因此,DNA-PK 可能是转换重组所需,而 RAG-2 则是非必需的。DNA-PK 与 DNA 结合形成一个复合体的一部分,该复合体中还包含 Ku80 蛋白(该蛋白质也将在本章后续部分讨论)。近来,经实验表明 Ku80 也参与了转换重组。在这种实验中,将 Ku80 敲除小鼠和采用同源重组方法在各自座位分别"敲入"$V_\kappa J_\kappa$ 和 VDJ 基因的小鼠进行交配。然而带有完整 Ku80 基因的"敲入"小鼠可表达由工程化 V_κ 和 V_H 基因编码的 IgM,并能向下游同种型转换;而相应的 Ku80 缺陷小鼠虽也能制造 IgM,但不能进行亚型转换,这提示转换重组也需要 Ku80 的参与[116b]。

最近取得的一个增强人们鉴定重组酶蛋白信心的进展是创立了无细胞性核提取物系统,该系统可在体外完成 S 区序列间的重组[117,118]。该系统依赖于一个强有力的检测方法,其中将含有 S_γ 的氚标质粒分子和含有 S_μ 的地高辛标记质粒分子进行共孵育。发生于两质粒间的重组可利用抗地高辛抗体进行氚标分子免疫共沉淀的方法进行检测,重组 DNA 结构可利用跨越复合性转换连接的 PCR 扩增而进行验证。结果发现有效重组需要 ATP、S_γ 和 S_μ 以及来自 LPS 刺激的 B 细胞的核提取物。对核抽提物的部分组分进行分析,发现了一种蛋白复合体,其命名为转换激活蛋白(switch activation proteins, SWAP),它至少由四种蛋白质组成,即核酸磷酸素(具有 RecA 样 DNA D-环形成活性)、PARP[多聚(ADP)核糖体聚合酶,一种参与 DNA 修复的核蛋白]、核仁素(如上所述,为 S_μ-结合蛋白 LR1 的一个组分)和一个新的被称为 SWAP-70 的 70kDa 蛋白质(该蛋白质不与任何已知蛋白家族同源)。SWAP-70 仅高表达于已被激活进行转换重组的 B 细胞中,并能以高亲和力与复合体中的其他组分相结合。SWAP 复合体极有可能是一转换重组酶组分的候选蛋白,但是,直到写本书时,尚没能从敲除实验中得到确切的证据。

非标准转换重组

至此,我们已经知道转换重组涉及到两 S 区之间的一个单一性 DNA 缺失;尽管这是最为普遍的情形,但为了完整起见,还需考虑到其他三种情形。

顺序性转换 在一给定的染色体上,可以顺序性发生几种转换重组事件。研究最为深入的一个例子是:在小鼠 B 淋巴细胞中先发生向 γ1 的转换,然后发生向 ε 的转换。相同的细胞因子 IL-4 可以促进转换朝这两种形式发展。在产生一个复合性 S_μ-$S_\gamma1$ 连接的初始转换重组完成后(这种重组可导致 IgG1 的表达),这种复合性 S 区可与位于下游的 S_ε 发生一个继发转换重组。在表达 IgE 的细胞中,可由一个复合性 S_μ-$S_\gamma1$-S_ε 连接的存在[119]或经检测互补转换环产物 S_ε-$S_\gamma1$ 而证明初始转换重组的发生。为了定量评价该途径在 IgE 生成中的重要性,将静息 B 细胞以 IL-4 加 LPS 刺激后,在用抗 IgG1 抗体处理,从而从培养物中清除表达该亚型的细胞;结果发现 IgE 的分泌被抑制了大约 70%,提示大多数表达 IgE 的小鼠 B 细胞已经进入到表达 IgG1 的中间阶段[120]。然而,在因有 γ1 基因座的靶向缺失而导致向 γ1 转换受阻的突变小鼠中,发生 ε 转换的频率是正常的,这提示顺序性转换是由于 $S_\gamma1$ 和 S_ε 同时存在的可及性所致,而不是由一个强制性顺序转换程序所致[121]。经 IgG 向 IgE 表达的顺序转换也发生于人的 B 细胞[81,122],但关于该途径的量化意义还不清楚。

倒位重组 一些转换重组明显造成倒位,而不是有关两 S 区之间的缺失[123,124]。一条带有倒位转换重组

的染色体不能编码一功能性重链,原因是 VDJ 区下游的 C 区处于相反的方向,但是该条染色体可被向下游一恒定区的一个继发转换重组成所“挽救”。在人 B 淋巴细胞白血病(其 Ig 产生无选择性)中,发生倒位转换重组的频率约为 15%[125]。

跨越-转换　尽管大多数转换重组涉及单一一条染色体,但在兔类已发现发生于等位染色体之间的跨染色体转换频率约为 5%[126]。使用兔类 C 区和 V 区中的同种异型标志更有利于在该种属中进行跨越-转换的检测;关于跨越-转换在其他种属中的发生频率尚不清楚。

无转换重组的转换性同种型

一些实验室报道检测到 B 细胞能表达不止一种同种型的 Ig。这种双同种型生成细胞可能反映了一个正常的短暂过渡阶段,在该阶段,一个转换的同种型(在正常转换重组之后)可与 IgM 一起表达,其原因是 IgM 蛋白或其 mRNA 有较长的半衰期。然而,一些实验室报道,一个稳定生成双产物表型的细胞在表达 IgH 基因座时没有明显的转换重组现象。对于 μ-δ 双产物生成细胞,其解释是 δ 转录物可能是通过对一条较长的包含 μ 和 δ 的 RNA 剪接生成的[127]。然而,难以解释的是,表达 C_μ 的细胞系同时表达一种同种型,这种同种型的 C 区距离 C_μ 很远,所以一个长的转录物将可能有 100kb 或更长,这比通过现在的实验方法发现的任何一种转录物都长。对于无转换重组下游同种型表达的一种可能解释是,从 VDJ 和下游的 C_H 基因生成的转录物可能通过类似某些病毒中的反式剪接机制进行连接[128,129]。已经提出了一种关于双同种型生成的非生理机制,认为是染色体复制的后随事件[130]。对双同种型生成细胞系的研究仍在继续进行[131~133],目前我们还不能确切地说稳定表达这些表型的细胞是否代表 B 细胞正常的 B 细胞亚群。对一群鼠 B 细胞转换成 IgGl 的体外半定量研究提示 DNA 重组可解释所观察到的 IgG1 表达[90],表明多数观察到的 Ig 类别转换的形成机制是转换重组,从定量意义上讲,其他非重组转换模型好像并不是形成 Ig 的主要机制.

122

κ 轻链基因

与重链基因相比,κ 轻链基因座相对简单。在小鼠和人类都发现了带有单一外显子的一个单一 C_κ 基因,该基因仅有一种剪接产物。在小鼠 C_κ 基因上游有 5 个 J_κ 基因片段,彼此相距约 0.3kb[5,6]。在这些 J_κ 片段中,第三个片段编码一段从不在 κ 链中出现的氨基酸序列,从而认为该片段是无功能的,原因是连接相应 RNA 序列和 C_κ 剪接供体位点的缺失所致。人类的基因座与此相似,在 C_κ 基因上游有 5 个 J_κ 区;但是在人 J_κ 簇中没有缺陷性小鼠 $J_\kappa 3$ 的同源基因出现,而是在与小鼠 $J_\kappa 5$ 同源序列的下游有另外一个 J_κ 序列[134,135]。在这两个种属中,V_κ 基因均位于 J_κ 片段的上游(这将在本章后续部分进行讨论)。

除 V_κ-J_κ 重排外,在这一基因座还可发生另外一种重组事件,这种重组是 κ 基因所特有的,其由参与 V(D)J 重组的相同 7 碱基/9 碱基信号元件所介导。该事件涉及 C_κ 基因片段的缺失,最初在利用表达 λ 的淋巴细胞来源的 DNA 进行 Southern 印迹时,因通常检测不到 C_κ 基因,故而提出有上述事件的存在[136]。显然,在大多数 B 细胞中,在 λ 基因重排开始前,C_κ 基因就从两条染色体上缺失掉了。当在几种人和小鼠细胞株中进行 DNA 缺失片段的范围检测时,发现在下游分界处有一个共同的序列元件;在用小鼠进行的研究中,该元件被命名为重组序列(recombining sequence, RS)[137],在人类该元件被命名为 κ 缺失元件(κ-deleting element, κde)[138]。人胚系 DNA 中 κde 位于 C_κ 基因下游 24kb 处,其侧翼为一 7 碱基/9 碱基的 RSS,该 RSS 与 J_κ 区侧翼的 RSS 相似(即有一 23bp 的间隔序列)[139]。类似的小鼠 RS 位于 C_κ 基因下游约 25kb 处[140]。κde 元件可与一个 V_κ 基因重组(导致全部 J_κ-C_κ 基因座的缺失),也可与一分离的 7 碱基元件(该元件位于 J_κ-C_κ 内含子中)重组(导致 C_κ 缺失,但 J_κ 基因座保留)。J_κ-C_κ 内含子中的 7 碱基序列距离一保守性很差的 9 碱基样序列的 5′端 30bp,这种 30bp 的间隔似乎违反了通常的 12/23 规则。虽然这种非常规间隔的重要性还不清楚,但很有可能在这些重组中,在没有一个功能性 9 碱基序列的情况下,7 碱基序列也是活化的,就如同在继发 V_H 重组中的情况一样(这将在后续一节中进行讨论)。

对人 κde 和小鼠 RS 进行序列比较发现[138,139],重组信号是高度保守的,并且在这些元件下游的一个约

500bp 的区域也是部分保守的(约有 50%的一致性)。后一区域包含一个由 127 个密码子(在小鼠)或 102 个密码子(在人)组成的读框。尽管尚不清楚这些读框是否随着 RS/κde 重组的发生而被表达为蛋白质,但可与 $V_κ$ 区或内含子序列发生重组的事实提示,被该事件所连接的序列可能不如被缺失掉的序列重要。在细胞中 RS/κde 元件总被重排,其中 $C_κ$ 被缺失掉,同时可见 λ 重排;据此可引出如下推测:即通过缺失与 λ 基因重排有关的负性调节子编码的基因,使得 RS/κde 重组事件介导了从 κ 到 λ 基因重排的发展过程。然而,现有的证据与此观点有相悖之处。

λ 轻链基因

小鼠 λ 基因座

在实验性小鼠,λ 链仅占轻链的 5%,这种低丰度与 λ 链较少的多样性有关。与拥有多个 V 区家族的 κ 系统相比,在单克隆 λ 链的氨基酸序列中仅能检测到两个代表胚系 Vλ 区的序列。进一步发现,与小鼠单一 $C_κ$ 区相比,从分泌的 λ 链中得知了三种小鼠的非等位亚型;依丰度递减顺序依次称作 λ1、λ2 和 λ3。

第一个被克隆的 λ 基因是一胚系 $V_λ2$ 基因,该基因于 1977 年由 Tonegawa 的实验室发现[141](这是第一个被克隆的 Ig 基因)。该 $V_λ$ 基因的序列显示[7],其结构特征与后来发现的其他胚系 $V_λ$ 基因以及 $V_κ$ 和 V_H 基因的序列结构特征相似。$V_λ2$ 编码序列起始于一个 19 个氨基酸的信号肽序列,该序列在第 4 密码子内被一个内含子所间隔(该内含子是最早被证实的内含子之一)。在保留了信号肽密码子之后,DNA 序列与基于以化学方法从一个 λ2 骨髓瘤轻链所确定的氨基酸序列而推断出的序列非常匹配。然而,该胚系 $V_λ2$ 基因的序列在终末端断裂掉 13 个密码子,从而其比预期的 $V_λ2$ 区要短,这一发现使得对分别编码性 J 区有了最初认识。

经脉冲场凝胶电泳进行克隆和长距离作图研究[142,143],使得对小鼠 λ 基因座有了基本的认识(图 5.9)。$C_λ$ 基因有 4 个,每个都有自己的位于距 C 区 5′端的 $J_λ$ 区基因。J-$C_λ3$ 和 J-$C_λ1$ 基因排列于一个间距约为 3kb 的基因簇内,该簇上游 19kb 处为 $V_λ1$ 基因。位于 $C_λ3$-1 基因座上游约 130kb 处的第二个 $C_λ$ 基因簇含有 J-$C_λ2$ 和一个不表达的基因 J-$C_λ4$。这些基因上游侧翼有两个 $V_λ$ 基因,即 $V_λ2$ 和很少使用的 V_x,其中 V_x 在 3′端有一读框内终止密码子[144]。基因排列顺序(V2-V_x-JC2-JC4-V1-JC3-JC1)可以解释 $V_λ2$(或 V_x)与 $C_λ2$ 的共表达以及 $V_λ1$ 与 $C_λ1$ 或 $C_λ3$ 的共表达现象。虽然 $V_λ2$ 与相距 190kb 的 $C_λ1$ 基因座有少许联系,但尚未发现 $V_λ1$ 与 $C_λ2$ 的反向重组。四个 J-C 基因间的相似性提示这两个基因簇是因同一祖先单位 V-J-$C_{λx}$-J-$C_{λy}$ 的一次重复所引起的,反过来这一重复又是一事先发生的 J-$C_λ$ 重复事件的结果。关于 V_x 基因的祖先尚不清楚,原因是该基因与其他 $V_λ$ 基因非常不相似;的确,该基因类似 $V_κ$,也类似 $V_λ$。虽然在所有的实验性小鼠中,均可用抗 $V_{λx}$ 抗血清检测到该 $V_λ$ 的表达,但该 $V_λ$ 可能有一特殊的限制性功能。

为了寻找或许可以解释 λ 基因座中基因表达产物的相对丰富程度[即 λ1 > λ2λ3 > > > (λ4)]的线索[145],对这些基因的序列进行了检测。在 $C_λ4$ 的序列中,虽有几个氨基酸发生了替代性改变,但没有出现能使其失去功能的终止密码子;然而,在 $J_λ4$ 的 3′端,因一种突变破坏了几乎在所有已知供体剪接位点中出现的"GT…"结构,从而使得该基因的一种 mRNA 转录物不能被正确加工(这使人们联想起小鼠 $J_κ3$)。在 $J_λ$ 基因片段的 5′端都有与在 V_H 和 $V_κ$ 系统中发现的 9 碱基和 7 碱基信号元件相类似的侧翼序列。尽管在 κ 基因座中所讨论的信号元件间的间隔所遵循的 12/23 规则也适用于 λ 基因座,但在 λ 基因座中,针对 V 区,RSS 元件间隔大约 23bp;针对 J 区,RSS 元件间隔大约为 12bp,这种排列与在 κ 基因中的排列是相反的(图 5.4)。λ2 和 λ3 不如 λ1 丰富的原因可能与它们的同源性 9 碱基元件和一致性 9 碱基元件间的差异性有关。

对野生型小鼠的 λ 基因进行 Southern 印迹分析表明,其比典型的实验性小鼠的 λ 基因座更为复杂和多变[146]。已发现至少有一种在 BALB/c 小鼠中丢失的野生型 $V_λ$ 基因与人的一个 $V_λ$ 相似,这提示野生型和实验用小鼠间的某些不同肯定是由于在后者中发生了基因丢失所致;尽管如此,导致这些复杂性 λ 基因座的原因仍有可能是基因重复事件的结果(这些重复事件要比在实验性小鼠中发现的证据更为复杂)。

人类 λ 链基因座

λ 型轻链在人类大大多于小鼠(在人类,大约占轻链的 40%,在小鼠只占大约 5%)。据血清学反应特性,确定了四种同种异型的人类 λ 链,命名为 $Kern^- Oz^-$、$Kern^- Oz^+$、$Kern^+ Oz^-$ 和 Mcg。另外还确定了几种其他变异型,这些变异型可能代表了等位基因的多态性。

七个人类 $J_λ$-$C_λ$ 片段被划定在一个大约 33kb 的 DNA 区域内,该区域 DNA 序列已完全进行了测定[147~149]。如图 5.9 所示,编码四种主要表达型人类 λ 同种异型的基因群已被定位,它们分别相当于 $JC_λ1$、$JC_λ2$、$JC_λ3$ 和 $JC_λ7$。其他三个同源 J-C 片段明显是假基因,这些假基因要么在读框内出现终止密码型突变,要么发生读框移码突变。但是,在某些个体,$JC_λ6$ 可能具有功能[150];该共同等位基因由于有一个 4bp 的插入片段,导致了 C 端第三个 $C_λ$ 区域的一个缺失;该基因仍能进行 $V_λ$-$J_λ$ 重组,编码一个能与重链联系的截短型蛋白[151]。已检测到的大量人类 λ 基因座的多态性变异明显是基因重复的结果。如图 5.9 所示,在对人类 DNA 进行 Southern 印迹时检测到 1~3 个额外 λ 片段[152]。

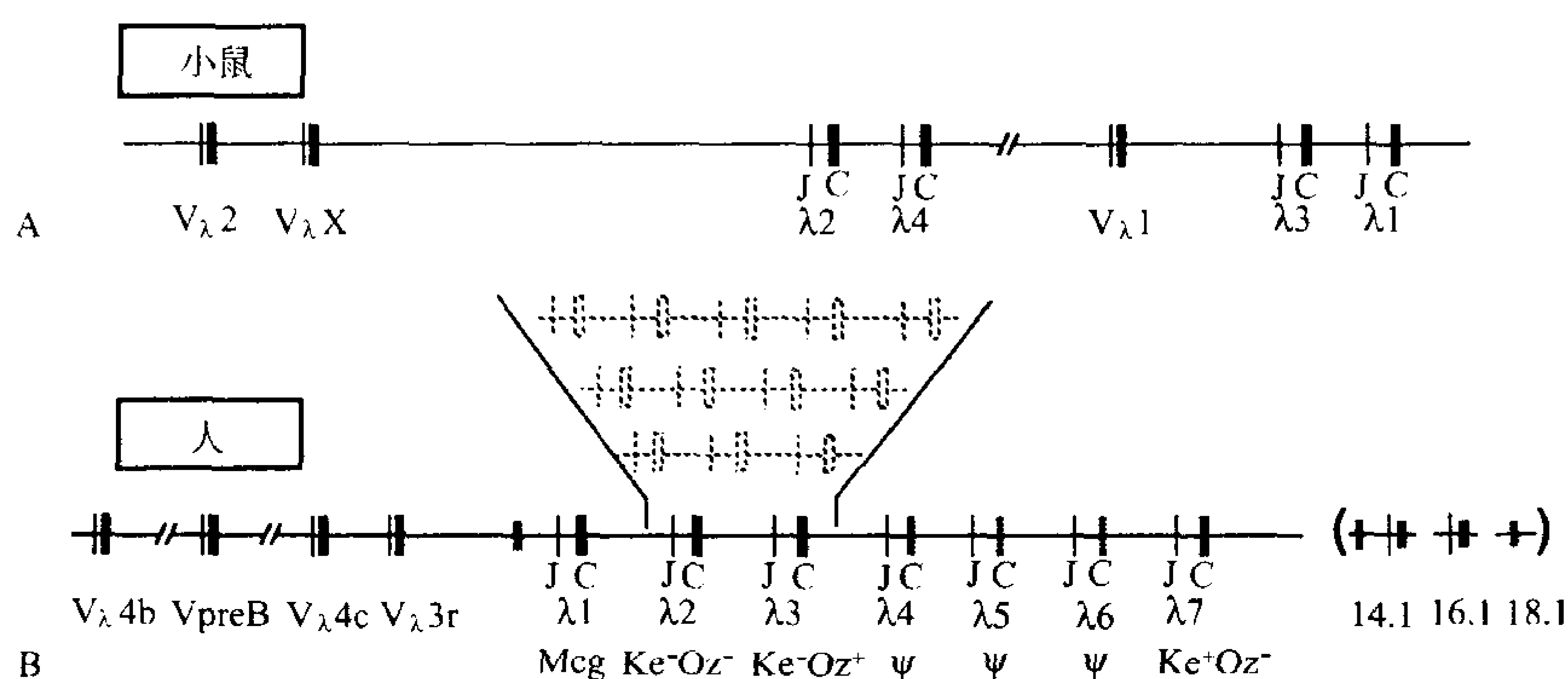


图 5.9 胚系 λ 基因。该图中的基因图谱是纲要性的(即非详细的)。A:鼠 λ 基因系统包括 4 个 JC 复合体和 3 个 V 基因,它们位于两个不相连的毗邻序列群(交叠克隆群)。B:通过全序列分析已经确定了人类 λ 基因座的特点。人 VpreB 替代型轻链基因位于 $V_λ$ 基因簇中。$C_λ$ 基因座包括一个含有 7 个 JC 复合体和 3 个其他不相连序列的片段。位于 7 个相连 λ 序列上面的被分离出的 JC 复合体代表多态性变异体,从 Southern 印迹结果可推断出变异体中含有 JC 单位的其他重复。14.1 序列(人类 λ5 替代轻链同源物)位于 JC 簇下游,但相对于其他轻链样序列而言,其位置是不清楚的。14.1 基因的外显子 1 与 $J_λ1$ 上游的一个外显子(以灰色矩形表示)是同源的。

在 JC-$C_λ$ 主要基因群附近发现了三个 $C_λ$ 相关序列。其中一个命名为 λ14.1 的序列代表了针对小鼠 λ5 轻链的人类同源基因。最后,另外一个位于相连基因群之外的弱杂交 DNA 片段被确定为一个被加工过的假基因[153]人类 λ 系统的 V 基因特征已被阐明(详见后面的一节)。

λ 相关的替代轻链

在不产生轻链的前 B 细胞表面可检测到免疫球蛋白 μ 重链。然而,在成熟 B 细胞,如果轻链的合成被阻断,那么 Ig 重链将不能到达细胞表面。那么是什么原因使缺少轻链的前 B 细胞表达表面型重链的呢? *124*

第一个线索无疑是去寻找在淋巴细胞发育过程中特异表达于前 B 细胞阶段的基因。Melchers 及其同事找到这样一个基因,其序列与 λ 基因座的 J 和 C 区相似,将其命名为 λ5,其原因在于已有四个鼠 $C_λ$ 基因是已知的[154,155]。基因组 λ5 基因包括三个外显子(图 5.10):外显子 1 可能编码一个信号肽;外显子 2 的 3'端与 $J_λ$ 同源;外显示 3 同 $C_λ$ 同源。当用针对前 B 细胞 mRNA 的探针进行检测基因组 λ5 克隆的侧翼区域时,发现了一

个距 λ5 5'端大约 4.7kb 的被转录片段[156](图 5.10)。序列分析表明,该片段同时类似于 V_λ 和 V_κ,鉴于此(以及其在前 B 细胞表达的原因),将该片段命名为 VpreB1。第二个在小鼠基因组中近乎相一致的序列被命名为 VpreB2[157],而且该序列很可能是有功能的[158]。另外一个有较小相似性的 VpreB3 片段也已被确定[159]。在 B 或前 B 细胞中,λ5 和 VpreB 基因均无基因重排的证据。两基因都有典型的保守拼接位点以及起始和终止密码,没有阻止它们表达为蛋白质的明显缺陷。在各种被检测的哺乳类种属中,同源序列的保守性提示这两个基因是被表达的,而且发挥重要作用。

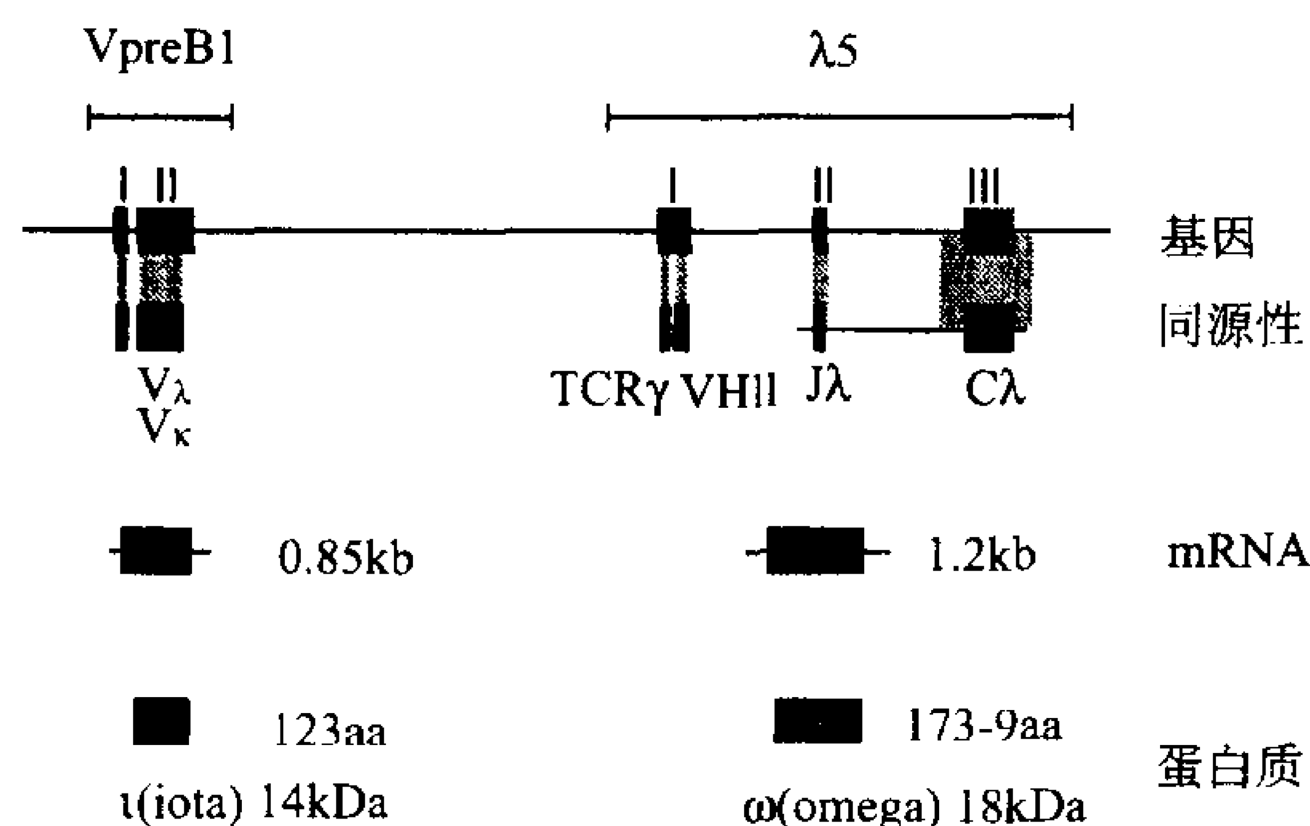


图 5.10 编码替代轻链的 λ 相关基因。图的第一排描述的是鼠 VpreB1 基因的外显子和 λ5 基因,图中显示出了它们的物理连接。第二排显示与其他已知 Ig 或 TCR 序列同源性关系。所检测到的来自这两类基因的 mRNA 和蛋白质被放于图的下方。

有证据明显支持如下设想:这些基因可编码替代轻链(surrogate L Chain,SLC),它们与 μ 重链联系后允许表面 μ 链在轻链可供利用前进行表达。如此一来,当一个 μ 重链基因被转染到一个 Ig 阴性骨髓瘤细胞系时,除非 λ5 和 VpreB 基因也被转染,否则不会有表面型 μ 链表达[160]。表面型 μ 链与 λ5 基因编码的 22kDa 蛋白共价连接,但与 16kDa 的 VpreB 产物为非共价连接,在前 B 细胞系和正常骨髓前 B 细胞中,均可见到相类似的复合物[161]。VpreB 基因编码的 V 区样产物(也称作 τ[162])与 $V_\lambda5$ 基因编码的 C_λ 样产物(也称作 ω)相联系形成一种轻链样异二聚体,该二聚体可行使真正轻链的某些功能。

观察发现,大多数 V_κ-J_κ 重组仅发生在表达一个功能性 μ 重链的细胞[更详细的情况见 V(D)J 重组的调节一节],这就提示 μ-SLC 复合物的一个可能功能就是:μ-SLC 复合物在细胞表面的表达可以启动 V_κ-J_κ 重组。其证据来源于如下实验:给一个不能正常重排其 κ 基因座的前 B 细胞系转染编码膜型 μ 重链的重组载体[163],当转染 μ 基因的表达产物与 VpreB 和 λ5 形成复合物时可诱导 V_κ 重排。相反,缺失性 μ 基因($\mu\triangle m$)(该基因缺少 V_H 和 C_H1 区,所表达产物不能与 SLC 相联系)的膜型表达产物则不能有效诱导 V_κ 重排,除非 $\mu\triangle m$蛋白与抗 μ 抗体交联。这些结果提示,SLC 可能在前 B 细胞中起促进膜型 μ 链交联的作用,而该交联作用是 B 细胞能够进行 V_κ 重排、轻链合成和成熟 Ig 产生前的一个必需步骤。关于支持此重要作用的证据将在本章的后续部分讨论。

λ5 和 VpreB 的人源性同源基因均已克隆。3 个 λ5 样序列被定位在 22 号染色体 C_λ 基因簇的下游[164],但仅有一个(命名为 14.1)可能具有功能,它有三个 λ5 的外显子结构[165~167]。有趣的是,位于 $J_\lambda1$ 上游的一个序列与 14.1/λ5 的外显子 1 是同源的,这提示 14.1 和 J_λ-$C_\lambda1$ 有一个共同祖先基因,而该基因可以如下两种方式进行表达:①通过其 J 样外显子 2 与一个 V 区基因重排后进行表达,这类似于进化后的 λ 基因的表达;②不经重排,而是使用外显子 1,即利用外显子 1 编码的蛋白质与一个非共价连接的 VpreB 样亚单位组装到一起。人类 VpreB 同源基因位于 V_λ 基因簇内[168],而小鼠 VpreB 基因则紧位于 λ5 上游。

V 基因组装性重组

自从发现 Ig 基因重组的事实之后,就开始探讨胚系可变区基因组分(V_L 和 J_L,或 V_H、D 和 J_H)在 DNA 中进行组装形成完整活性 V 基因的机制。本节中,我们重点讨论:①从"宏观"上来剖析基因重组;②重组酶机

构的组成成分(即从“微观”上看);③B 细胞发育过程的调节。

V 基因组装重组的拓扑学

缺失与倒位

最初的有关 V_κ-J_κ 重排的假设模型是:V 区段和 J 区段均按同一方向转录,介于重组的 V 和 J 区段之间的 DNA 只是简单地被切除和从细胞丢失(图 5.11A)。然后,对一组骨髓瘤和带有正常 κ 的淋巴细胞进行 Southern 印迹分析表明:某些细胞仍保留了紧靠 $J_\kappa1$ 上游的 DNA,该区域在已行缺失重组的所有染色体中应当是消失的[169]。尽管有几种复杂假设模型可解释这种结果,但目前被接受的解释是简单的:即某些 V_κ 基因的方向与 J_κ-C_κ 区的方向是相反的,这种位置关系允许通过位于 V 和 J 区段之间的 DNA 倒位而发生 VJ 重组(图 5.11B),结果使 $J_\kappa1$ 上游的 DNA 保留于染色体。依据基因序列的相对方向不同,推测相同的重组酶机构可能通过倒位或缺失而使胚系基因片段重排。之所以进行如此推测,是因为上述酶机构仅作用于紧邻重组位点的 DNA(在图 5.11 中圈出了重组位点),而该酶机构对远离重组位点的 DNA 链上的位置是不敏感的。该模型的含义之一是(图 5.11B):已进行了倒位性 V_κ-J_κ 重组的细胞,应当在其染色体上保留一个将两套信号序列联合到一起的重组结合序列。上述两套信号序列分别是位于 V_κ 下游的 RSS 和 J_κ 片段上游的 RSS。的确,已在几种细胞系中检测到这种信号连接部[170~172](也称侧翼产物和相互连接部)。与 VJ 区段(编码性连接部)中重组断裂位点的灵活性相比,信号连接部序列通常显示出:J 来源的 7 碱基序列与 V 来源的 7 碱基序列直接连接,两者之间甚至没有一个间隔核苷酸。奇怪的是,保留在表达性染色体上的信号连接部几乎总是源自 $J_\kappa1$。由于有另外证据表明在 V_κ-J_κ 重组时可发生倒位,故有几个实验室已相继报道了[173,174]:将含有反向 V_κ 和 J_κ 重组信号的工程化基因转染入 B 淋巴样细胞系后,可通过倒位而进行重组。

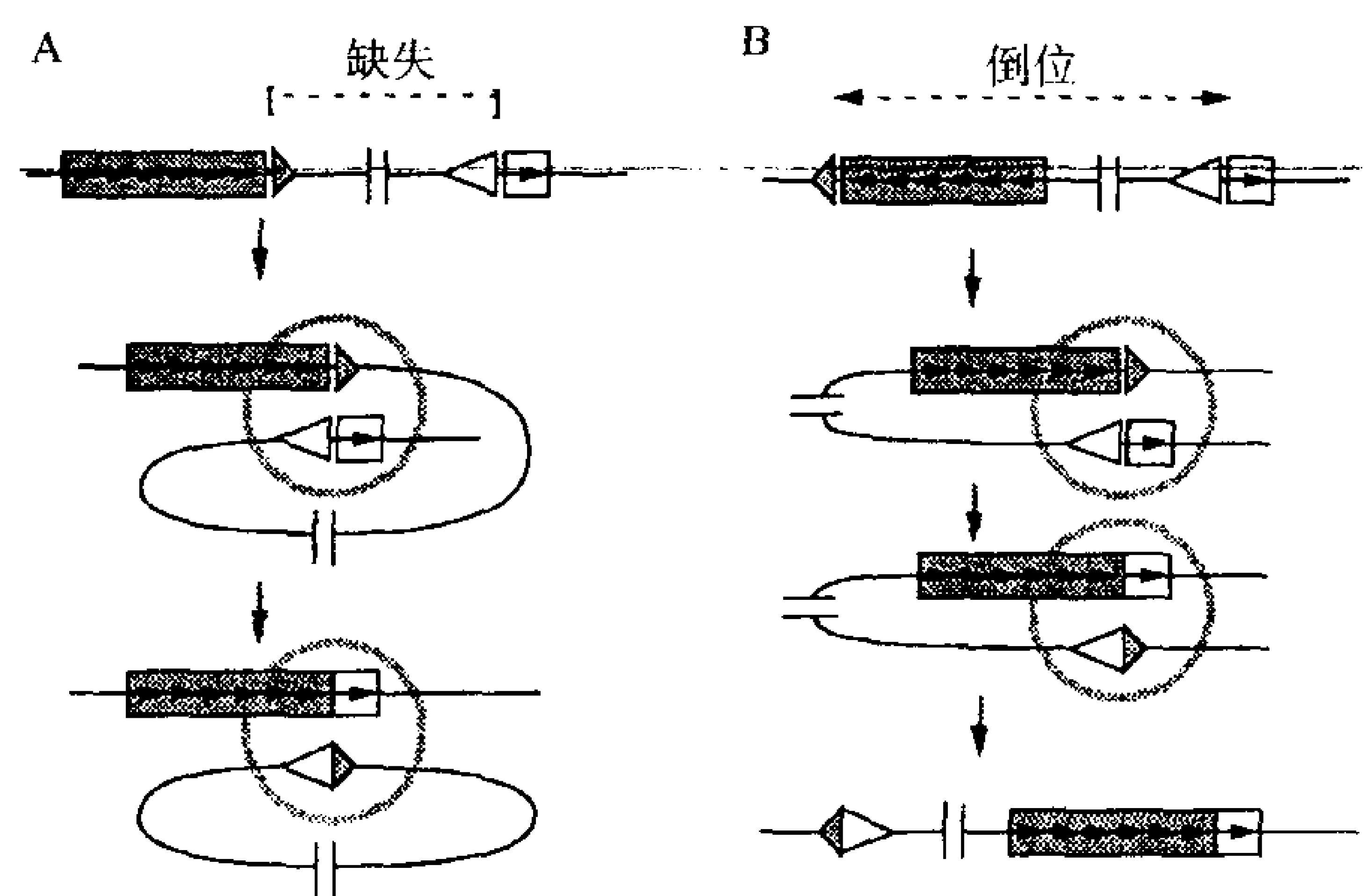


图 5.11 根据胚系 DNA 中 V_κ 前体和 J_κ 前体的相对方向不同,相同的微观重组机制可经缺失或倒位而使 V_κ 和 J_κ 连接。A:当 V 编码序列(带阴影的矩形)和 J 编码序列(白色矩形)在胚系 DNA 中都处于 5'→3'方向(内部箭头)时,重组将产生一个 VJ 编码连接加上一个含信号连接的 DNA 环(相对三角)。B:如 V 在胚系 DNA 中以相反的方向存在,那么在微观水平上的一个一致性重组反应(在阴影环内)将使得信号连接与重组的 VJ 编码连接相连。

正如后节所述,利用大多数 J 邻近的人类 V_κ 基因片段和人类 V_κ 基因座中两个大的重复序列之一,可以直接证明如下设想:即某些胚系 V_κ 基因与 J_κ-C_κ 基因座方向相反。就鼠的 V_κ 基因座而言,其 V 基因的方向虽知之甚少,但是信号连接部保留在鼠细胞染色体上的现象可以很容易地用鼠倒位的 V_κ 基因来解释[175]。另一方面,尚无证据表明在重链或 λ 基因座有倒位的 V 基因或保留的信号连接部,故这些基因座可能仅通过缺失而发生重组。

当通过缺失而发生重组时,图 5.11A 所示模型提示,在一个环状 DNA 分子上形成了一个信号连接部,其中所形成的 DNA 环不隶属于主染色体,缺少复制起点和着丝点,这样的 DNA 环希望在发生重组的子代细胞中被丢失。借助从正在进行 V_κ-J_κ 重排的细胞中分离环状 DNA 的策略,已可检测到带有信号连接部的预期分子[176],这就支持了上述模型。

继发重组

最近的研究从宏观的 V 基因拓扑学组装上研究 V 基因的继发重组。上一节已讲述到 VJ 或 VDJ 连接的灵活性，导致高频率的无效读框外重组。一个在双亲染色体都有无效重排 κ 基因的 B 淋巴细胞被认为不能生成一个功能性轻链；但 V 基因的上游和 J 片段下游的可利用性，允许另一个继发重组的发生（图 5.12A）。更复杂的结果可能是一些 V_κ 基因的倒位所产生的。实际上，这种发生在 κ 基因的继发重组已被报道[172]，并被染色体信号连接的回复所暗示；此连接在同一个细胞中与编码连接并不是相互的。骨髓瘤细胞中观察到的来源于 $J_\kappa 1$ 的非互惠性侧翼产物的优势性，可能源于最初的 J 片段和倒位 V 基因之间的无效重组；接着进行涉及下游更多 J 片段的连续重组；在有效重排发生前，许多骨髓瘤都将携带涉及 $J_\kappa 1$ 的早期重组的信号连接残留物[177]。除了带有无效 $V_\kappa J_\kappa$ 连接的染色体的淋巴细胞外，如果所产生的 V_H-V_L 配对识别了自身抗原，那么已组成有效 $V_\kappa J_\kappa$ 连接的细胞可进行继发重组；这种类型的继发重组，被称为受体编辑（这将在本章后续部分详述）。

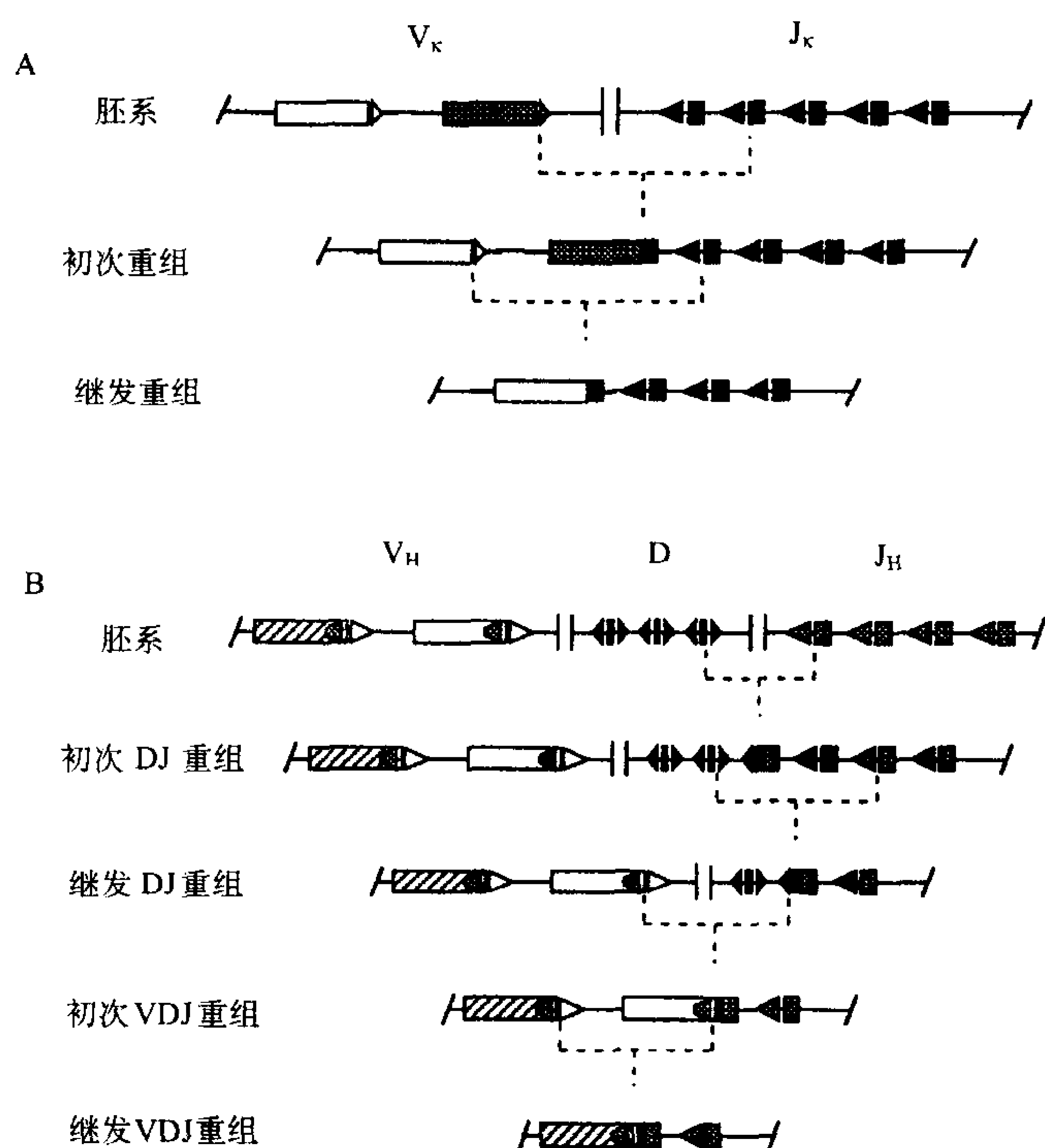


图 5.12 继发重组。A：在 κ 轻链系统中，初次重组发生于一个上游 V 和一个下游 J 之间。B：同源继发重组可发生于重链系统的上游 D 和下游 J 片段之间。经 VDJ 重组而删除染色体上的所有短间隔信号元件后，在 V_H（长间隔信号）和位于 VDJ 单位的 V_H 编码序列中的内在 7 碱基序列之间仍可发生继发重组。

就重链基因而言，如下事实或许可排除继发重组的可能性：即 VDJ 重排必须清除 V_H 基因座上的所有 12bp 的间隔信号元件，原因是在保留于重组 VDJ 单位 D 区的两端都缺失这些信号元件；同时在经 VD 和 DJ 重组而被删除的胚系 D 片段中，也需去除上述间隔信号元件（图 5.12B）。在因 V_HD 重组而删除未重排的上游 D_H 片段这一事件发生之前（图 5.12B），发生继发 DJ 重组也应当是有可能的，而且已确实有这种事件发生[178]。意义较为重大的结果是证实了[179]：上游的 V_H 基因能与已有的 VDJ 单位重组，从而置换最初的已组装好的 V 基因。这一类型的重组很明显被一序列介导，该序列与一致性 7 碱基信号序列相匹配，并出现在大约 70% V_H 基因编码区的近 3′端（图 5.12B）[179,180]。在大多数轻链基因中未发现内在的 7 碱基序列。V_H 被替代后，保留于最初组装的 V_H 中的极少数核苷酸对多样性有潜在贡献；这样的核苷酸很难与 N 区的核苷酸相区分。因此，继发重组代表了在两条重链染色体上有无效重排细胞的一种逃逸机制，或者如上所述，代表了能编码抗自身抗原抗体的细胞的一种逃逸机制[181]；然而，目前尚不清楚在这些条件发生这种逃逸的频率是

126

多少,这种逃逸与细胞死亡的其他途径相对立。尽管有提示认为内在7碱基序列上游的另外一个一致性序列也可能在 V_H 替代性重组中有作用,但独立的7碱基序列明显能在 V_H 替代性重组(不再有9碱基序列)中发挥功能的事实提示7碱基序列[181]是更为至关重要的重组信号。

V 组装性重组酶机构作用机制的微观分析

如前所述,相同的重组酶机构能介导 Ig 基因系统中四种类型(κ、λ、V_H-D 和 D-J_H)的 V 基因组装性重组,以及在四个 TCR 基因座上发生的相似事件。这种观点基于如下发现:即所有这些系统都有相同的7碱基/9碱基 RSS,并在重组中都遵循相同的12/23间隔规则。进一步发现,当将用于测试 TCR 基因片段体外重组的基因构建体转染于 B 细胞后,该构建体能被准确地重组。已经发现,重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficient, SCID)的小鼠在 Ig 和 TCR 基因重组方面均有缺陷,这提示这两个系统都受一个单基因缺陷的影响[182]。最后,已发现两种重组活化基因 RAG-1 和 RAG-2 是 Ig 和 TCR 基因重组的关键介导分子。相同酶机构在这两个基因家族发挥作用的假说,促使研究者把在对这两个系统的研究中获得的关于重组机制的知识进行汇总。另一方面,共用同一重组酶的假设也引发了这样一个问题:即在两种细胞系中,当两基因系统借助共同重组酶进行重排时,B 细胞如何优先重排 Ig 基因(和 T 细胞如何优先重排 TCR 基因)? 该问题将在本节后续部分进行重点论述。已有几种不同的研究 V 基因组装机制策略:包括对正常底物和产物(胚系和重组 DNA)的序列分析、使用在转染入淋巴细胞后能够进行重组的质粒底物构建体(为了评价底物序列改变所造成的影响)、研究酶促反应中假定的中间产物、纯化结合 RSS 基序的蛋白质或者纯化在假定重组过程中起酶促功能的蛋白质、研究影响 VDJ 重组效率和忠实性的突变、利用细胞提取物或重组机构的假定组分进行体外无细胞性研究。

127

重组模型

详细的重组机制模型必须能说明重组产物(编码和信号连接体)的特性以及其胚系前体的特性。有适当间隔(12和23bp)的7碱基和9碱基 RSS 是胚系前体中进行重组的充要特性;虽然用于替换编码区的序列特性可影响重组效率,但包含这些元件的模型底物仍可进行重组(甚至在缺乏正常 V、D 或 J 编码区的情况下)。就产物而言,信号连接的特性相对较简单:7碱基序列进行"背对背"连接,几乎没有增加或缺失。如前所述,由于连接的灵活性,使得编码连接部的特性更为复杂,如下所述。

① 编码区末端缺失的碱基数目是可变的(与胚系前体中的"完整"序列相比)。

② 与胚系前体序列无关的非胚系核苷酸(N 区)被加于某些编码连接中;非胚系核苷酸通常是富含 G 和 C 的核苷酸。

③ 极低频率发生的事件是:一种被解释为 P 核苷酸的额外碱基的加入事件;这些核苷酸被添加于非缺失编码序列的末端,从而形成带有这些核苷酸序列末端的回文结构(P)[183,184]。P 核苷酸通常只有1或2碱基对,但它们可以更长(尤其在有 SCID 小鼠)[185]。

适用于诸多发现的重组模型是由 Alt 和 Baltimore 首先提出[186],并经过最近的一些修改,该模型可作为了解重组机制的一个框架(图5.13)。该模型认为重组开始于酶促性重组酶机构的组成成分与两待重组片段相邻的7碱基和(或)9碱基 RSS 相结合。然后两个 DNA 片段在 两个7碱基序列的边界处被切断(现在认为该反应被 RAG 基因催化)。两个7碱基末端不经修饰地连接在一起,但是形成编码连接的末端(现在知道这种连接以"发夹环"的形式短暂存在)被外切酶活性以不同程度地进行消化。通过末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)作用而将不同数量的核苷酸加到3端。然后5端被 DNA 聚合酶填充,所形成的大量末端被连接起来,这样就完成了重组过程。

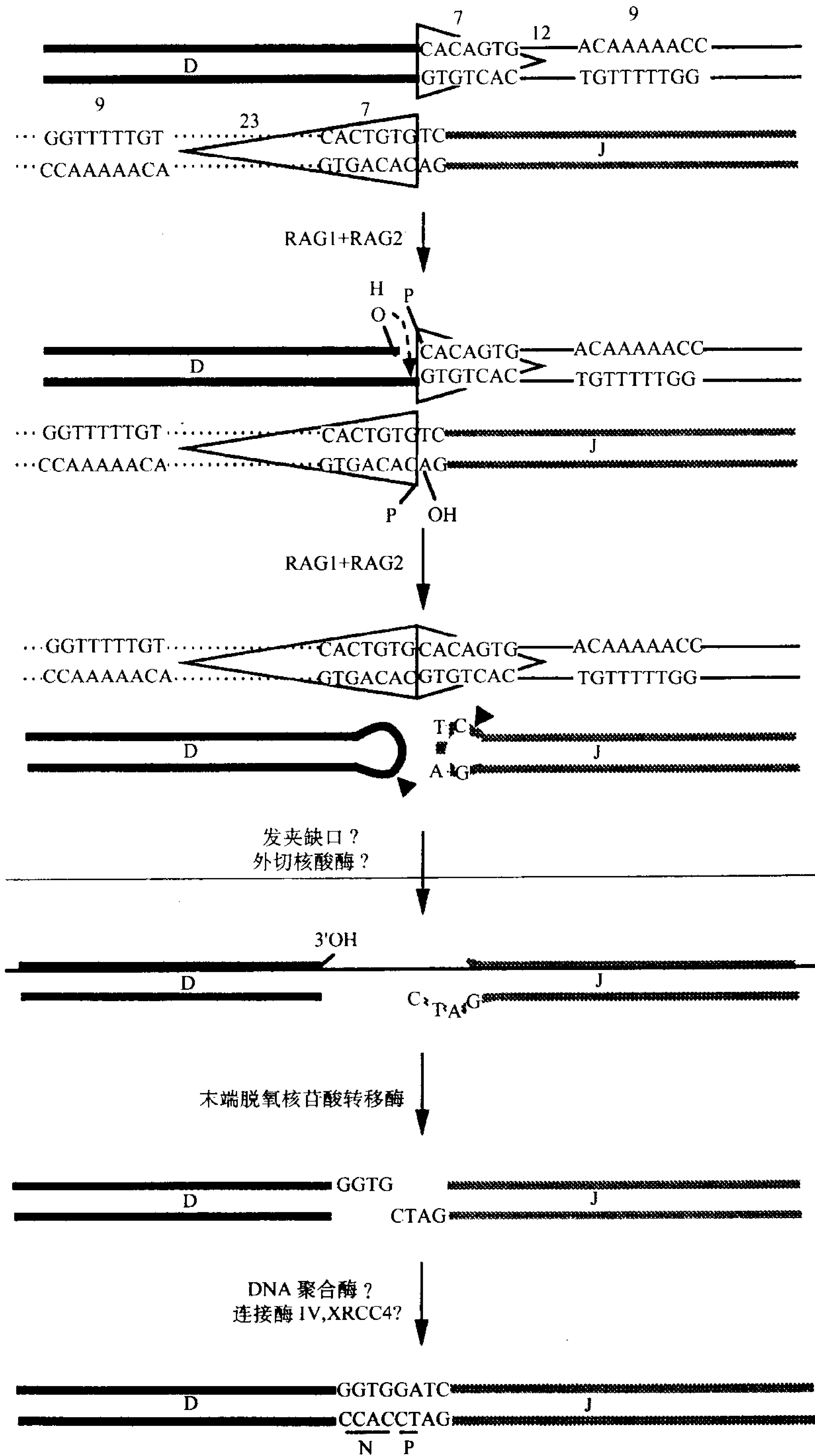


图 5.13 V 组装重组模型。所有 V 组装重组反应(在 Ig 和 TCR 基因中)可能借助一个共同机制进行,在此借助 D-J 重组来说明。在三角形中描述的 RSS 7 碱基序列是惯用的 RSS 图。在编码末端产生发夹环依赖于 RAG-1 和 RAG-2 的反应。这一反应也产生两个连接在一起信号末端。在显示的此例子中,当编码末端上的发夹环打开后,D 编码序列则被外切核酸酶蚕食,而 J 编码序列则剩余,并由于发夹的不对称裂解而产生 P 核苷酸。在该例子中,N 区添加只被描述发生于 D 区末端,但实际上,外切核酸酶消化和 N 核苷酸添加可发生于任一(两个)编码末端。在文中讨论了所假设机制的各个步骤。

研究底物和产物的体外实验

随着用于体外研究重组的实验方法的进步,对重组机制的研究取得了进展。一些实验利用了 Abelson 鼠白血病病毒(AMuLV)的如下能力:即能选择性地转化前 B 细胞,但不消除此发育阶段的活化 V 基因组装特性。几个 AMuLV 细胞系已被克隆,进而进行反复亚克隆以便跟随重组事件的进程[187~189]。以能进行 V(D)J 重组的人工基因构建体转染 AMuLV 细胞系以及其他淋巴和非淋巴细胞进行研究,获得了特别有价值的信

息。几种带有选择性标志的构建体已设计成功，这些标志的表达依赖于重组事件。例如，Lewis 等人[190]使用了反转录病毒构建体，其中抗药基因置于 $J_κ$ 和 $V_κ$ 序列之间，从而使抗药基因只有在发生了倒位性 VJ 重组后才能表达。在另一个策略中，Lieber 等人[191]用含有一个氨苄青霉素抗性基因（Amp^r）和一个氯霉素抗性基因（Cam^r）的质粒转染多种不同的细胞系，Cam^r 基因的表达被一终止密码子所阻断，该密码子两侧翼各有一个 V(D)J 重组信号序列。在 B 细胞中，两个信号序列之间的重组可使终止密码子缺失，进而使 Cam^r 基因表达。当染色体外的环状 DNA 从细胞中提取并转化于细菌时，重组程度可由转化的 Amp^r 菌（这种细菌为 Cam^r）所占比例而确定。依据初始构建体中信号序列的方向不同，重组产物可表现为编码或信号连接。这些连接可有效地从 Cam^r 菌落中重新获得而用于分析；这些连接的序列具有天然重组产物的所有特性。从这种实验中得出的一个令人感兴趣的结果是：SCID 小鼠的前 B 细胞和前 T 细胞能够进行重组而形成信号连接，但在使编码末端连接形成编码连接的能力方面有明显的缺陷[192]。

的确，通过重组的工程化底物使某些非标准连接也被回复，尽管这种回复对生理性 V 基因组装无贡献，但它反映了重组机制的特征[193]。这些非标准连接可经如下方法进行理解：即评价三种拓扑学，其中的 DNA 因两次被切割而产生四个末端后可被重新连接。如果四个末端是编码(V)、信号(V)、信号(J)和编码(J)，那么通过考察连接到编码(V)末端（假定其余两末端必须相互连接）的三种不同就可确定三种可能性。这三种可能性如下所述。

① 编码(V)-编码(J)加信号(V)-信号(J)。这是标准反应产物，其中编码(V)-编码(J)产物编码组装性 VJ 基因，信号(V)-信号(J)代表信号连接。
② 编码(V)-信号(V)加信号(J)-编码(J)。这些产物（开放和关闭的连接）看起来像起始 DNA，但如果核苷酸因在连接部增加或缺失以致于它们不再与编码/信号连接特异性寡核苷酸探针相杂交时，又能将之与起始 DNA 区别开来。
③ 编码(V)-信号(J)加信号(V)-编码(J)。这些是杂交连接，其中在信号连接末端有转换的空间。

所有这些重组容易发生于转染构建体 DNA（其中除了有紧位于 V 和 J 侧翼的 DNA 外，还有少量 Ig 基因序列）的事实，提示特异的染色体位置和广泛的侧翼序列均非重组所必需。

利用带有多种不同突变的转染构建体进行实验，发现了信号序列的至关重要的特征[194,195]。这些实验证明了 7 碱基/9 碱基序列的重要性，也表明了只要能保持间隔区长度（12 或 23bp），那么具体间隔序列是什么就不重要了。7 碱基是尤其重要的，其中离编码序列最近的 3bp 对信号重组来说最为重要。在大量祖 B 细胞和前 B 细胞以及前 T 系细胞中可检测到重组活性，但在成熟 B 和 T 细胞以及非淋巴系细胞中检测不到[191]。

129

P 区和发夹样中间产物

为了研究 V(D)J 重组中间产物，Roth 等人[196,197]设计了一个 Southern 印迹策略以检测位于 D 和 J 之间的 TCRδ 基因座上的双链断裂，同时这种策略也用于了能主动重排 TCRδ 基因座的新生鼠胸腺细胞 DNA。与成熟肝 DNA 相比，在新生鼠胸腺细胞 DNA 有另外的电泳条带出现，这些另外的条带代表从位于一端的 D 来源的 7 碱基序列延伸到另一端 J 来源的 7 碱基序列的 DNA 片段。为了详细确定信号末端序列的特性，几个实验室使用了连接介导 RCR（ligation-mediated PCR，LM-PCR）。该技术涉及将钝化的基因组信号末端与一双链寡核苷酸连接，然后扩增延长从一靠近基因组信号末端的引物序列到被加入寡核苷酸序列之间的序列；继而将扩增产物克隆并行序列鉴定。通过对 TCR 和 Ig 基因进行 LM-RCR 分析，已确定了信号末端为平端切口，确切的切点通常位于 7 碱基序列边界处，切割的结果是在 5′端产生磷酸基团，在 3′端产生羟基[198,199]。

Roth 等人在起初的 Southern 印迹实验中，从代表大约 2% 的胸腺 DNA 水平的切割中检测到了信号末端；但编码末端却根本看不见，这可能是因为这些末端进入编码连接的过程太快所致。基于已知的 SCID 淋巴细胞在形成编码连接方面的缺失，Roth 等人推断[196]：SCID 可能有切割性编码末端的积聚，而这种积聚的编码末端在正常胸腺细胞中是看不到的。的确，已在 SCID 胸腺细胞 DNA 中检测到编码末端，而且发现这些末端具有发夹样结构的几个特点。首先，SCID 胸腺细胞 DNA 的编码末端能抵抗外切核酸酶的处理。其次，在一

端带有这种体内产生末端的限制性片段在变性电泳凝胶上好像是在变性前所预测双链片段大小的两倍长。最后，LM-PCR 试验不能检测到编码末端(除非这些末端用一单链特异性限制酶预处理)，这与不具有与发夹连接的可能性是一致的(除非其是首次打开)。用内切核酸酶处理后所获得的 LM-PCR 产物的序列，提示发夹结构包含编码元件的全部序列，其不丢失或获得一个单核苷酸[200]。

一种解释认为 SCID DNA 中的发夹末端代表了正常 V(D)J 重组中间物，在野生型细胞中，由于一种内切核酸酶活性而使这种中间物在发夹环的不同位置打开，内切核酸酶活性依赖于 SCID 基因的正常等位基因。继而由于在不对称位置上打开环而产生了 P 核苷酸(图 5.13)；这一模型能解释为什么编码末端无 P 核苷酸存在(编码末端在发夹打开后被蚕食)。在 SCID 鼠中罕见的组装性编码连接中，发现有异常长的 P 核苷酸片段，这一发现可能是由于非特异性缺口酶切割发夹结构所致，这种缺口酶与依赖 SCID 基因的正常等位基因的限制性内切核酸酶活性不同，它的切点不集中于发夹环，而是在双链发夹结构主干上的多个不同位置进行切割[196]。

为了支持发夹编码末端是正常 VJ 重组中间物的观点，Ramsden 和 Gellert[201]用 LM-PCR 方法可以在正常(非 SCID)B 淋巴细胞系(经工程化使得保留了高水平的 κ 基因重组)中检测到这种发夹编码末端。在这一细胞系中，可检测到的断裂 $J_{\kappa}1$ 信号末端的数量与所出现的 κ 基因座的 30% ~ 40% 相对应。带有发夹和开放末端的编码末端的丰度低 10 ~ 100 倍。所观察到的动力学结果与信号末端和发夹编码末端的同时产生相一致，同时也与发夹从打开编码末端到进入编码连接的快速过程相一致，但信号末端连接较慢。如下发现进一步支持了这一模型：两端带有发夹的线状 DNA 分子在转染入 B 细胞系后，能被重新回复成环状分子，其中常产生 P 插入[202]。有趣的是，在这一分析中，SCID B 细胞与正常 B 细胞大致相同，提示 SCID 细胞中丢失的蛋白质并非发夹缺口酶本身，而是一种活性使得天然内源性发夹编码末端被酶利用；这些内源性末端可能需要这一活性，因为它们与重组酶或其他染色体蛋白相关联，而转染的没有附着蛋白质的发夹可能不依赖 SCID 中丢失的蛋白质。SCID 的缺陷的分子基础将在下面进行更加详细地讨论。

体外非细胞性 VDJ 重组酶活性

从淋巴组织获取选择性切割大约 7 个碱基元件附近 DNA 的限制性内切核酸酶并研究其活性以试图找到参与 VDJ 重组机制的成员[203~205]，实验并没有取得突破，现在看来这些活性中没有一个代表重组酶组分。

RAG 基因

一个不可思议的实验带来了巨大的突破：即发现了两个新的基因，它们所编码的产物在 B 细胞谱系及 T 细胞谱系 VDJ 重组中起到关键作用。Schatz 和 Baltimove[206]将一含有依赖于 VDJ 重组而表达的选择性标记稳定转染成纤维细胞，正如所料，在这些非淋巴细胞不能发生可检测的重组，然而，当人或鼠基因组 DNA 转染成纤维细胞时，受体细胞的一个小片段稳定表达了重组酶的活性，激活了选择性标记，这表明仅仅转染基因组 DNA 片段能够在成纤维细胞内赋予其重组酶活性。对重组酶连续几次转染并进行活性筛选后，得到了关键性的基因组片段，这个片段包括两个基因，RAG-1 和 RAG-2。这两个基因并不具有同源性，不同于以往我们已知的基因，但 RAG-1 和一种拓扑异构酶之间存在微弱的联系。重组酶活性的发挥需要这两个基因存在，在基因组序列中它们的位置很靠近。在大多数物种中这两个基因以其不含有内含子(一些鱼类除外)，并具有密切联系和相反的转录起始方向为显著特征，从这两种基因功能的相似性而非序列的相似推测它们可能来源于一种更原始的病毒或真菌重组系统[207]，这些将在以后的章节进行讨论。

130

从人类到鲨鱼这些能产 Ig 的有脊椎物种中[208]，RAG 基因均呈现保守性，这说明 RAG 基因在 V 区组装重组中起着决定性作用；而在没有进行 IgV 区装配重组的物种中没有发现 RAG 的类似物。RAG-1 和 RAG-2 共同表达于前 B 和前 T 细胞，特别是表达在 VDJ 重组酶发挥活性阶段。而且，通过同源重组(基因敲除)去掉任何一个基因的小鼠，均会导致无成熟 B 或 T 细胞生成，这是去除 VDJ 重组的显而易见的结果[209,210]。近来，在一组有 SCID 综合征和无 B 淋巴细胞的病人中，均发现了 RAG 基因的突变[211]。

尽管试图在体外证实不溶的 RAG 蛋白可障碍其自身活性对重组底物的作用，但对突变 RAG 基因进行

功能分析发现(研究策略是:将 RAG 表达载体与重组底物质粒共转染于成纤维细胞):两蛋白大段缺失并不丧失其重组酶活性[212];某些缺失蛋白是可溶的,且作为融合蛋白能相对容易被处理。这个工作可证实:在体外非细胞系统中,两种 RAG 蛋白一起共同完成了对底物 DNA 的切割,同时在编码区末端形成了发夹状结构[213]。这个反应包括两个步骤:首先在毗邻七个碱基的一条链上出现一个切口(图 5.13 顶链),接着位于切口的 3′羟基通过亲核性攻击靠近底链上 7 碱基的磷酸二酯键而引起转酯化作用(图 5.13),从而使编码区末端形成一个发夹结构,使底链 7 碱基的 3′端生成一个新的 3′羟基端[214]。这种转酯化机制与发夹结构在缺乏外源性能量来源(如 ATP 等)时有新磷酸二酯键的生成是一致的。很显然它利用了在进行亲核性攻击时磷酸二酯键本身断裂所产生的能量。反应中所形成的立体化学结构表明,没有在蛋白质之间形成磷酸二酯键来作为媒介(例如发生在 λ 噬菌体中的整合)。代替这种直接转酯化机制的是 μ 转位和反转录病毒的整合,二者在一定的实验条件下都能形成发夹结构[214]。

RAG 蛋白的活性依赖于培养基中两价离子的存在[215,216]。在 Mn^{2+} 存在的条件下,RAG 蛋白与单一 RSS 一道催化底物裂解;但在 Mg^{2+} 存在的条件下,对底物的裂解则需要两个 RSS,并且如果在 7 和 9 碱基元件之间的间隔遵循 12/23 规则时,裂解最为有效;这就是说,这种规则可能是 RAG 蛋白特异性的结果(尽管其他蛋白质看来对这种规则特异性形成起一定作用,作用原理可能是促进一个最适分子构象形成)[217];而 Ca^{2+} 存在条件下, RAG 蛋白和一种放射性标记的包含 RSS 的 DNA 底物形成一种稳定复合体,这在电泳泳动度迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)明显可见,并能同未标记的底物进行稳定性竞争,但是底物不能形成切口或被裂解。然而当 Mg^{2+} 加入到这种稳定复合体中时,底物被切割(有趣的是,在 Ca^{2+} 离子存在时,HIV 病毒整合酶与 μ 转位酶也可形成类似的稳定复合体,DNA 虽可连接到此复合体上,但却不被裂解)。从 Rss 中去掉 9 碱基后,Ca^{2+} 介导的 RAG 蛋白与 DNA 底物的结合能力下降了 10 倍,因此 RAG 蛋白必须识别 RSS 中的两个成分。作为对照,发生于 7 碱基的突变改变了编码区附近的核苷酸(已知对切割起关键作用的残基),但突变对结合仅有很微弱的影响[218,219];表明这些核苷酸以及编码区毗邻的核苷酸对 DNA 螺旋结构的改变起一定作用,而这种结构对 DNA 的切割是很重要的。近年来,体外实验报道,RAG 蛋白与几种细胞的提取物混合后能够产生铰链[220]和编码铰链[221,222]。在一系统中检测到,RAG-1 和 RAG-2 存在于一种稳定复合物中,这种复合物中含有两种信号终止子、一种高泳动组(high-mobility group, HMG)蛋白质,也许还有别的蛋白质[223]。这些体外 VDJ 重组实验应当可用以说明参与反应的必需组分以及作用机制。

如果 DNA 断裂发生在 DNA 合成或其有丝分裂期,那么被 RAG 蛋白催化的双链 DNA 的断裂作用可能发生缺失,但是在细胞周期中通过严紧的 RAG-2 蛋白的转录后水平调节可阻止这种缺失的发生。尽管 RAG-1 蛋白和两个 RAG 基因的 mRNA 转录物在整个细胞周期中变化很小,但一种磷酸化依赖性的降解信号介导了 RAG-2 蛋白的损坏[224,225],因此在重链 J_H 基因座阻止了双链 DNA 在 M 期、G_2 期和 S 期发生断裂后的降解[199]。位于第 490 位的 Thr 这一磷酸化位点存在于各种属都高度保守序列的一个区域中,该区域包含一个能被周期素依赖性激酶作用的靶序列相一致的序列。这个调节区对酶活性是非必需的。在 RAG-2 基因敲除小鼠中转入含有以 Ala 替换磷酸化 Thr 的转基因 RAG-2,结果在整个细胞周期中都有可以发现 RAG-2 蛋白和双链 DNA 的断裂,这证实了 RAG-2 降解信号在细胞周期中控制 VDJ 重组的重要性[226]。

尽管至今所讨论的 RAG 蛋白质所有的结合活性以及其酶活性需要 RAG-1 和 2 共同参与,但近来报道证实在缺乏 RAG-2 的条件下,RAG-1 可与 RSS 的 9 碱基进行微弱结合,此结合反应由 RAG-1 的一个片段介导,该片段与细菌颠换酶的 DNA 结合域的序列一致[227,228]。在两种情况下,只有两种 RAG 基因中的一种得到表达。据报道,无 RAG-2 存在时,在中枢神经系统形成期 RAG-1 以低水平进行表达[229](虽然 RAG-1 缺失无明显的中枢神经系统缺陷)。相反,无 RAG-1 时,RAG-2 表达在鸡的法氏囊中[230],此囊中含有处于发育阶段的 B 细胞系,此时其基因已经完成了 VDJ 重排,并正在通过基因转换产生多样性。现在尚不清楚该发现的重要性,因为 RAG-2 对其基因的转换并非必需[231]。

在了解了 RAG 蛋白在 VDJ 重排起始步骤中具有明显调节作用的同时,基于对这些蛋白质及其基因的知识,发展了两项技术,为其他实验开辟了道路。一是 RAG-1 和 RAG-2 基因敲除小鼠的应用。这些小鼠无功

131 能性的 B 细胞或 T 细胞，但不像 SCID 小鼠那样缺陷严重，这些小鼠能生成功能性 T、B 淋巴细胞（尤其是随着动物年龄的增长）。RAG 敲除可用来研究天然免疫系统在特定免疫应答中的重要性。敲除鼠可用作不同淋巴细胞亚群的受体来探讨不同细胞类型的功能。用特异性功能重组 Ig 基因转染后，观察发育而来的淋巴细胞的表型特征，进而研究 B 细胞发育的信号。最后，它们可用于 RAG 补充实验，用以评价不同的其他基因敲除后对淋巴细胞表型的影响[232]。在 RAG 补充实验中，通过同源重组在胚胎干（embryonic stem，ES）细胞中敲除目的基因后，注入纯合 RAG 敲除的胚胎细胞（$RAG^{-/-}$）；经这种处理所获得的嵌合小鼠的 T、B 细胞均来自工程化 ES 细胞，这些嵌合细胞是产生 RAG 基因并维持淋巴细胞发育的惟一源泉。这样的动物比基因敲除小鼠更容易获得，并可用来研究在淋巴细胞中基因缺失所造成的影响，同时不干扰其他细胞中这些缺失所造成的影响。尤其是当基因敲除后，因对非淋巴细胞的影响而引起胚胎死亡时，RAG 补充实验可用于研究在淋巴细胞中进行选择性敲除所造成的影响。

基于 RAG 基因的第二项主要技术是研究非淋巴细胞系中的 VDJ 重组，在这些细胞中，控制 DNA 修复的基因有特征性突变；当这些细胞系转染了 RAG 基因后，便可进行基因突变对 VDJ 重组影响的评价。

参与 VDJ 重组晚期步骤的成分

很清楚 RAG 基因在 VDJ 重组第一步（RSS 的识别、裂解、发夹结构形成）中发挥了关键作用，但还需其他成分的参与才能完成反应；这些成分中至少有两种不仅在 VDJ 重组中起作用，而且参与了 DNA 修复途径。首先认识这种成员的一个例子是上面所描写的鼠 SCID 突变。这种突变首先在免疫缺陷鼠中得到确认，这种缺陷是 Ig 和 TCR 基因在 VDJ 重组中明显受损的结果；SCID 淋巴细胞能够执行 RAG 介导的裂解反应和发夹结构的形成，能形成信号铰链，但在编码连接形成方面有缺陷。随后发现，SCID 突变还在淋巴和非淋巴细胞中阻断了修复双链 DNA 裂口（如离子辐射造成的断裂）的酶机制。这提示在 RAG 介导 DNA 裂解后，淋巴细胞借酶的作用而完成结合反应（这种酶功能在 DNA 修复中广泛存在）。为了检验这个假设，Taccioli 等筛选了在 DNA 修复方面有特征性缺陷的中国仓鼠卵巢（Chinese hamster ovary，CHO）细胞系，观察这些细胞是否在转染 RAG 基因后有 VDJ 重组受损[233]。通过评价两种突变的细胞系形成体细胞杂交体的结果，将这些细胞分为不同的 X 射线交叉互补（x-ray cross complementation，XRCC）组。如果杂交体显示无 DNA 修复缺陷的话，表明这两种原始细胞系携带不同的突变以致于杂交体最终携带每个基因中的一个正常拷贝（即两突变细胞系交叉互补）。若结果相反，则在同一个交叉互补组的细胞不能交叉互补。在 8 组对离子射线敏感的啮齿类细胞系中，已知有三组在修复 DNA 双链裂口方面有缺陷（XRCC4、5 和 7 组），并发现所有这三组细胞在 RAG 转染后均有 VDJ 重组功能受损。

在 XRCC5 和 XRCC7 组中发生突变的基因可编码一种叫做 Ku 复合体（一种由三个肽组成的复合体）中的两个成分。最初是借助病人抗血清而将其描述为具有自身抗原的特征。Ku 是由大约 70kDa 的蛋白质（Ku70）和大约 86kDa 的蛋白质（Ku86，通常叫做 Ku80）所组成，当二者形成异二聚体后便可结合到 DNA 上[234]。接着 DNA-Ku 异二聚体复合体可募集第三个成分员（大约为 450kDa 的一种具有蛋白激酶活性的蛋白，其活性发挥依赖于与 DNA 的结合）[234,234a]。一些证据提示，DNA-PK 即使在 Ku 缺失条件下也可结合到 DNA 上[234b]。果蝇和酵母 Ku 基因的保守性提示，远在 VDJ 进行重排之前，此复合体就进行了进化。大量证据提示，在 XRCC5 组缺陷的基因编码 Ku80[235,236]；而在 XRCC7 组中缺陷的基因（该基因与鼠 SCID 中缺陷的基因相一致）编码 450kDa 的 DNA-PK[237]。尽管鼠的 SCID 突变主要是损害了编码和信号铰链的功能，但造成这种区别的原因可能是 SCID 细胞中有残余 DNA-PK 蛋白存在所致，因为一个更加完全的马科动物的 DNA-PK 突变同时损害编码铰链和信号铰链[238]。Ku80 突变细胞系在信号铰链和编码铰链形成方面发生缺失，正如 Ku80 基因敲除的小鼠一样。在一系列发生 XRCC 突变的小鼠中，没有检测到 Ku70 突变，但近来的证据显示 Ku70 基因纯合性破坏的细胞，也在 RAG 基因转染所诱导的 VDJ 重组中发生了缺陷[239]。

先前研究过的 Ku 复合体有不寻常的 DNA 结合特异性，它不是识别 DNA 中特异的核苷酸序列，而是识别特异的 DNA 拓扑结构，包括双链 DNA 末端（可由 X 射线或重组酶作用引起双链 DNA 断裂产生）。一旦结

合到 DNA 末端，它能使 DNA 长度缩短[240]。Ku 异源二聚体具有 ATP-依赖性螺旋酶（DNA 解链）活性[241]。已建立了几个模型来观察这个复合体在 VDJ 重组中的作用：该复合体可结合到发夹结构的编码末端，从而调节发夹的开放和 DNA 被限制性内切核酸酶降解；它可能通过螺旋酶作用参与 DNA 双螺旋的去稳定；它可能通过 DNA-PK 蛋白激酶的活性来磷酸化其他蛋白质而影响重组。要证实哪个作用在 VDJ 重组中重要，还需进一步研究。

在 XRCC4 组发生的突变的基因也已被克隆[242]。它编码一个大约 38kDa 的普遍表达的蛋白质，它不与任何已知蛋白质同源。此蛋白质能结合活化 DNA 连接酶Ⅳ，提示该酶对 VDJ 重组中连接信号和编码铰链有重要作用[243,244]。另外，XRCC4 蛋白产物可与 DNA-PK 相互作用，并被此激酶磷酸化[244a]。

可能参加 V(D)J 重组的其他蛋白质

RAG 蛋白，Ku-DNA-PK 复合体，XRCC4 蛋白在 VDJ 重组中发挥作用，因为发生在这些蛋白质的突变损害了 VDJ 重组。推测还有多种其他蛋白参与了 VDJ 重组；下面介绍一些可能参与 VDJ 重组的其他蛋白质，但它们是否真正参与了 VDJ 重组尚不是十分清楚。

132

已有几个实验室通过寻找如下蛋白质而发现了参与重组酶机制的成分：①这些蛋白质存在于正在发生 VDJ 重组的早期 B 细胞核提取物中；②这些蛋白质以序列特异性方式结合 7 碱基或 9 碱基信号序列。尽管该策略看起来合理，但是能结合 RSS 序列并不说明其在重组酶反应中具有生理作用。RAG 蛋白结合 RSS 序列似乎是启动 VDJ 重组的充要条件，因此对重组酶而言很可能不再需要其他的 RSS 特异性成分。针对 J_κ 的 RSS 结合蛋白（RSS-binding protein for J_κ，RBP-J_κ）就是这样一个例子。在体外基于与一 J_κ7 碱基进行序列特异性结合这一特性，将 RBP-J_κ 从小鼠前 B 细胞系中纯化出来，它存在于淋巴细胞系中，但不存在于非淋巴细胞系中，其与细菌整合酶具序列一致性，这更证实了其在 DNA 重组中的作用角色，但最近研究表明 RBP-J_κ 还具有与 VDJ 重组无关的其他功能[245]。

下面介绍几个其他参与 VDJ 重组的成员。一个是能够结合含有 7 碱基信号元件探针的蛋白质，经 EMSA 检测，该蛋白质存在于几种前 B 细胞系，但不存在于骨髓瘤、成熟 T 细胞、单核细胞或成纤维细胞系中，该蛋白质与具有重组能力细胞中的蛋白质相一致[246]。通过 Southwestern 分析鉴定了另一种 RSS 结合蛋白。Southwestern 的做法是：将蛋白提取物进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后转移到硝酸纤维膜上，用含 RSS 的放射性寡核苷酸探针进行检测。通过这种方法在未成熟的 B 和 T 细胞中发现了 115kDa 蛋白，但该蛋白质不存在于骨髓瘤。当 7 碱基探针或 9 碱基探针发生突变时，这种蛋白质的结合显著减少[247]。另一种蛋白质是 T160，从蛋白表达文库筛选获得其 cDNA，筛选文库时使用了含有一个 12bp 间隔的 RSS 探针[248]。T160 基因产物以融合蛋白形式表达，能与原始的检测探针结合，但不能结合 7 碱基有突变的探针或有 23bp 间隔的探针。另一种蛋白质被证实能结合 9 碱基 RSS 元件，但不能结合有突变的该 9 碱基元件[249]。无名结合蛋白（nonamer binding protein, NBP）为 63kD，从小牛胸腺中进行了 20 000 倍纯化。VDJP 蛋白是用一种 J_κ RSS 探针从淋巴细胞 cDNA 表达文库筛选获得[250]，所获得的全长 cDNA 是一种淋巴组织特异性的普遍存在的复制因子 C（replication factor C, RF-C）mRNA 的不同拼接体，两个序列都含有细菌连接酶的同源区。体外表达的 VDJP蛋白催化 DNA 连接反应，该反应依赖于被连接 DNA 片段中的与之结合的 RSS 序列[251]。然而连接反应的底物和产物在不同 Ig 基因中有许多重要方面不同，故这种蛋白与 VDJ 重组关系尚不明确。一种名为识别组分（recognition component, Rc）的蛋白质从以鼠胸腺 RNA 建立的 cDNA 表达文库中分离得到，筛选过程中使用了放射性标记的 RSS 探针[252]。体外表达的蛋白质以多聚体形式结合 DNA，提示该蛋白质在通过 VDJ 重组酶机制把这些成员聚在一起过程中具有作用[253]。被 RSS 中 7 碱基和 9 碱基识别的 30kDa 的蛋白质在未成熟的胸腺中检测到，此胸腺中富集有正在进行 VDJ 重组的前 T 细胞[254]。一种从胚胎胸腺中克隆的可能有关的 cDNA 与 DNA 螺旋酶同源，其被命名为淋巴特异性螺旋酶（lymphoid-specific helicase, lsh）[255]。

外切核酸酶

在许多重组 V 区发现，与胚系 V、D 或 J 前体中编码序列相比，在重组连接位点处有不同数量的核苷酸

丢失。推测这个发现可能是由于在靠近 7 碱基 RSS 进行切割和连接被切断的 DNA 末端时,外切核酸酶诱导了对切断 DNA 末端的蚕食。尽管已发现了有关的外切核酸酶[256],并且已熟知几种存在于哺乳动物细胞中的核酸外切酶,但蚕食(切割)V、D、J 末端片段的特异酶尚未被确定。

N 区和 TdT

末端脱氧核酸转移酶是存在于胸腺和骨髓的一种酶,也是淋巴细胞和髓样白血病之间进行区别的显著特征。它催化核苷酸添加到 DNA 链的 3′端。虽然没有特异的模板指导核苷酸的加入,但酶偏向先添加 dG。这与该酶在 V-D 和 D-J 连接区中 N 区来源中的作用是一致的,因为这些 N 端核苷酸在上游编码链和下游非编码链的 3′端的 N 核苷酸倾向于富含 G。在胚胎淋巴细胞中既无 N 区填加,也无 TdT[257]。N 区添加在重链基因常见,但少见于鼠轻链基因,可能在人类更少见[258]。

N 区源自 TdT 作用的推测得到了大量的实验支持。基因工程造成的 TdT 基因缺陷淋巴细胞产生的重排 IgV 区中,几乎都不存在 N 端添加[259,260]。与此相反,当 TdT 表达于正在进行 κ 或 λ 轻链重排的细胞时,细胞正常情况下低水平的 N 区插入会有显著提高[261~263]。这个结果说明正常 κ 或 λ 链重组时,N 区序列低频率出现的原因并不是由于这些编码序列不能接受 N 区核苷酸。换句话说,重链比轻链基因 N 区发生的优先性(至少在鼠如此),反映出在正在进行重链重排早期 B 系细胞中 TdT 水平高于轻链重组的晚期阶段。的确,有一允许在进行未成熟 V_{κ}-J_{κ} 连接的工程化突变的小鼠,表明在它们重组的 V_{λ} 基因中 N 区核苷酸频率增加[264]。在正常小鼠中表达 μH 链可以下调 TdT 表达[265],从而导致轻链重组阶段 TdT 水平下降。

在 TCR 基因中也可见 N 区,根据在 TCR 基因系统中 V 区基因多样性水平较低和缺乏体细胞突变来看,TCR 基因中出现的 N 区在作为序列多样性的来源方面尤为重要。尽管已清楚 N 端增强了 Ig 和 TCR V 区的多样性,但缺乏 TdT 的小鼠在免疫应答方面无显著缺陷[266]。这种小鼠的正常表型(除了 N 区的缺失外)和 TdT 在正常小鼠的淋巴组织特异性表达都支持这种酶的惟一功能是使 V 区基因多样化。在 TdT 突变小鼠以

133 及低 TdT 活性的正常胚胎淋巴细胞中,N 区填加的缺失与重组连接频率的升高有关,其中短片段的核苷酸可来自于各胚系元件,原因是编码区末端的一致序列有一交叠。这些连接提示一种重组媒介可介导两条互补的单链 DNA 的编码区末端相互杂交,这非常像限制性内切核酸酶切割所造成的黏性末端便于 DNA 片段的连接一样。这种同源性介导的重组限制了胎胚抗体的多样性。所产生的抗体对常接触的病原体的特异性可以富集,或扩大特异性范围,这些已在缺乏 N 区的 TCR 中报道了[267]。

V(D)J 重组的调节

Ig 基因的重组是标志 B 细胞克隆发育的重要事件。基因组中的区域不可逆转的缺失后,将注定哪一种轻链亚型和哪一种 V_L-V_H 配对会在随后的后代细胞中表达。据估计这些重要事件受到细致的调节。实际上,每个 B 细胞系一般只表达一种轻链亚型(亚型排斥)和仅使用两个同源染色体位点中其中之一作为重链和轻链基因的位点(等位排斥),这提示了某些调节方式的存在。亚型排斥和等位排斥确保每个淋巴细胞表达一个单一的 H2L2 联合体,因而只有一种单一的抗原结合特异性,这是免疫应答克隆选择模型的关键特征。进一步讲,如果同样的重组酶机制介导所有 Ig 和 TCR 基因系统的 V 基因装配反应,那么一些机制必定调节了基因系统,使之易于在 B 细胞发育中发生重组(与在 T 细胞发育中发生的重组相比)。现在的证据提示,VDJ 重组在两个水平受到控制:即 RAG 蛋白水平的调节和对重组酶机制对重排的胚系底物的可及性进行调节。由于 RAG 蛋白的表达和基因座的可及性又反过来依赖于 B 细胞发育阶段而受到调节,这种发育的简况作为背景知识在下面进行论述,详细讨论参见第 6 章。

B 淋巴细胞的发育

图 5.14 为演示了 B 淋巴细胞发育的草图,其解释如下。

① 分析淋巴恶性肿瘤或代表不同发育阶段的病毒感染的永生细胞。

134 ② 流式细胞仪从淋巴器官分离纯化正常细胞群,然后对不同亚群进行分析。

③ 对有不同基因突变的缺陷鼠表型进行分析，这些基因对从一个发育阶段到下一阶段具有至关重要的作用。

④ 采用允许发育进行的系统进行体外 B 细胞前体细胞的培养。

这张草图试图把两个重要实验室的结果一致化[268,269]。一些已知的人和鼠 B 细胞发育和表面标志[270]的不同没能在这个简图中反映出来。

B 和 T 细胞的分化来源于胚胎和骨髓造血干细胞，原始淋巴细胞的祖先具有分化为 B 或 T 淋细胞及 NK 细胞(natural killer cell)的潜能。表现 B 谱系特异性的最早标志是前 B 细胞受体的非 Ig 组分：Igα、Igβ 和 λ5[271]。CD19 在信号转导中充当辅助受体，其首先发现于大量增殖状态的前 B 细胞，此前 B 细胞也表达几个其他明显的表面标志，包括 C-kit[一种针对干细胞(生长)因子(stem cell (growth) factor, SCF)的受体]、B220C(B 细胞系型磷酸化酶 CD45)、TdT 和 CD43(一种唾液糖蛋白，称为白细胞唾液素)。在无重链蛋白时，SLC 与一种糖蛋白复合体共同呈现在细胞膜表面(在图 5.14 中以钩状结构表示)，这种 SLC 有时被称为替代型重链[272]。下一阶段，即前 B 细胞阶段，以 RAG 基因表达和重链重排以及 C-kit 表达丢失和随后的 CD43 表达丢失为标志。起初 DJ 在两个染色体基因座发生重排，产生前 BⅠ细胞；接着胚系 V 区连接完整的 VDJ 基因(前 BⅡ细胞)。由此产生的 μ 蛋白呈现在 B 细胞表面，同时 SLC 出现在前 B 细胞受体(pre-BCR)或 μ-SLC 复合体内(复合体中也包括 Igα 和 Igβ)。所产生的大量前 B 细胞发生增殖，并伴随 RAG 基因表达的下调。接着细胞变小，停止分裂，再次开放 RAG 基因的表达，轻链重排，表面 IgM 表达(未成熟 B 细胞)。当它们最终表达了表面 IgD 时，就成为成熟 B 细胞，然后迁移到外周以备接受抗原刺激。

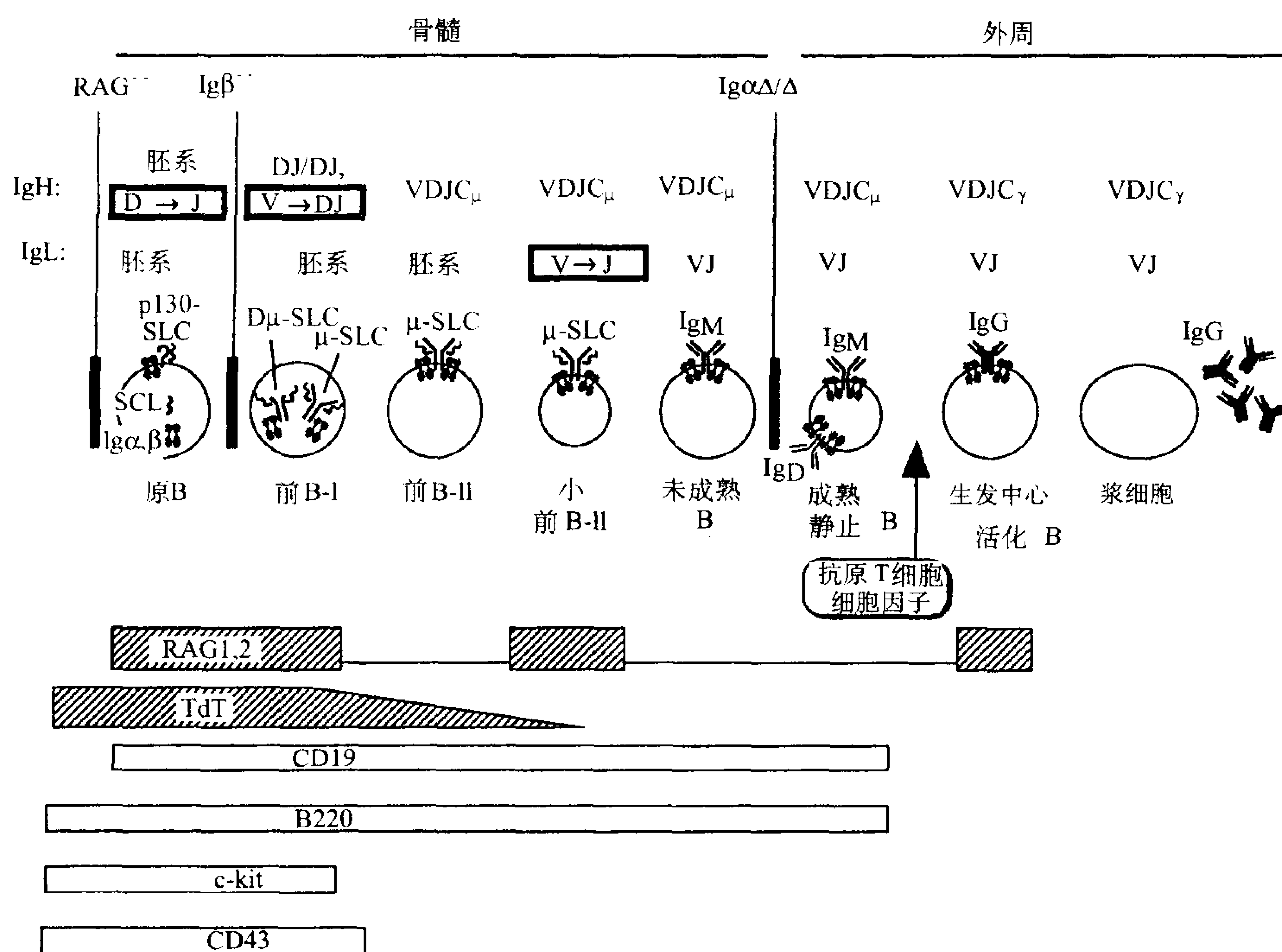


图 5.14 B 细胞发育过程中的 Ig 基因重组。此处给出的 B 细胞发育简图可作为讨论 Ig 基因重组的基础。图中显示了在骨髓中与在外周(如淋巴结、脾)阶段的 B 细胞，以及在每一阶段中 IgH 和 IgL 基因的状态。图中描述了在每一阶段中呈现于 B 细胞表面的 Ig 相关蛋白。在图的底部，简要描述了阶段依赖性表达的 RAG 基因和 TdT[两者均在 V(D)J 重组中有重要作用]。在图的底部同时描述了其他几种标志蛋白的表达。

重组可及性和转录

是什么维持 VDJ 重排的基因座特异性，即为什么 Ig 基因重组仅限于 B 细胞并有重链重排先于轻链重排，以及为什么 TCR 基因重组仅发生于 T 细胞？一个可能的线索是如下的发现：对重组的敏感性似乎与胚系基因元件的转录活性有关。例如，Reth 和 Alt 报道[273]被 AmuLV 转化的前 B 细胞系(一反映了能将 V_H 重排成 DJ_H 的发育阶段)可合成一种包括 DJ 和 C_μ 序列的 RNA 转录物(命名为 D_μ RNA)。进而，许多胚系 V_H 基因在前 B 细胞阶段被转录，此时这些基因已成为重组的靶基因[274]；这些转录物被命名为无功能转录物，因为它们不能编码有功能的 Ig 链，这种无功能转录物不存在于更加成熟的 B 细胞中(在这些 B 细胞中，重链重组已结束)[275]。类似的无功能转录物在其他的胚系 Ig 基因元件被激活重排的过程中也有报道。一个 DNA 片段对转录和重组都具敏感性可能反映了一个普遍的对两个反应发生都需要的染色体状态(可及性)，或者说转录本身可能是重组的预准备(也许是通过部分解旋 DNA)。有意思的是，针对轻链基因类型转换和酵母配型基因重组而言，类似的转录和重组之间的相关性也已有报道。

为了进一步探讨转录和重组的关系，几个研究小组将具有激活鼠 κ 或重链基因座转录的增强子缺失后，发现相应基因座的重组随即下降。在 κ 基因座，一个增强子(iE_κ)位于 J_κ 和 C_κ 之间的内含子中，第二个增强子($3'E_\kappa$)位于 C_κ 下游 9kb 处。当 ES 细胞内因同源重组而以新霉素抗性基因(neo^r)替代 E_κ 时，发现纯合突变鼠无 κ 基因重排[276]。值得注意的是另有报道提示 neo^r 替换对 κ 基因造成的损害比单一缺失更大[277]。与 E_κ 缺失造成的影响相比，$3'E_\kappa$ 的缺失导致了 κ 基因重排更为轻微的下降[278]。基因增强子支持重组的重要性这一结论可通过如下方法获得，即使用有 V(D)J 重组能力的转基因性微小基因座[279]和能稳定整合到能够进行 VDJ 重组的细胞系中的类似构建体[280]。然而，转录和重组的关系并不简单。有一报道提示，在转基因构建体中，$3'E_\kappa$ 增强子真正下调了重组[264]。在有另一个 E_κ 微小基因座转基因鼠中，当与一兔 iE_κ 连接后便可增加重组(即便这个增强子在鼠细胞中对上调转录是无活性的)[281]。最后，KⅠ 和 KⅡ 两个元件定位于 $J_\kappa 1$ 上游并无已知内含子功能，二者很明显在 V_κ-J_κ 重组中有重要作用，因为在有这两个元件被破坏的 B 细胞中重组被明显抑制(至少在某些条件下会有这一结果)[282]。很明显，进一步研究对于澄清基因重组如何由转录和染色体的变化来控制是很有必要的。关于这些参数如何被调节将在下面进行论述，并在本章后续部分进行详述。

等位排斥模型

已提出两个通用模型用于解释等位排斥和亚型排斥现象。随机模型解释了所观察到的有缺陷的重排基因的高频率出现是功能重排减少的结果；同一细胞中两个稀有事件同时发生的低可能性导致了等位排斥的发生[283]。在这个模型中，小鼠产 λ 细胞的低频率出现是可被用来重排的 λV 区库较小的一个随机结果。与随机模型相比，另一模型可被称为调节模型，它首先由 Alt 及其同事提出[284]，并已经得到了许多实验的支持。根据这个模型，在一特定 B 细胞中，一个轻链或重链基因的功能性重排将抑制同一细胞中其他轻链或重链的重排。如果第一次功能重排后就出现抑制作用，那么同一细胞中将不再会产生两种功能性 Ig。最初的无产物性重排无抑制效应，重组可继续进行直至有一种功能性产物产生或直至细胞用完了所有的胚系前体。

调节重组模型

135

作为一个可更详细讨论该模型的框架图，图 5.15 描述了四种调节影响因素，这些因素可能是一种等位排斥控制机制的组成部分。如图的左上角所示，发生在 B 系细胞的第一个 Ig 基因重排是将 D 连接到 J_H 片段上。产生的 DJ 连接在由 AmuLV 转化的胎肝或者骨髓早期 B 系细胞的两条染色体上都可见到，而且在经流式细胞仪分离得到的正常骨髓前 B 细胞中也可见到[285]。对该早期阶段细胞的分析同样显示了胚系结构中的 κ 和 λ 基因。下一个重组步骤为 V→DJ。预测从 V 到 J 保持了正确三联密码读框的 VDJ 连接的频率大

约为 1/3,因此大多数 VDJ 连接是无功能的。另外,某些 VDJ 连接尽管发生在读框内[286],但其重排的重链基因也可能是无功能的,这是由于胚系 V_H 序列缺陷所造成的。根据该模型,如果由于某种原因开始形成无功能的 VDJ 连接,那么在没有活化 μ 蛋白存在时,重链基因重排可在另一条染色体上进行。当第二条染色体上的 VDJ 重排也无功能时,细胞可能会达死亡终点,引起细胞凋亡性死亡(图 5.15 中的灰色阴影)。这种无产物细胞凋亡的命运得到以下观察的支持:具有凋亡抑制基因 bcl-x_L 的转基因小鼠有一可增殖的骨髓前 B 细胞群,这些细胞几乎有所有无产物性 VDJ 连接[9]。尽管二次重排能够挽救一些具两种无效重组的细胞,但这种二次重排发生的频率如何仍不清楚。

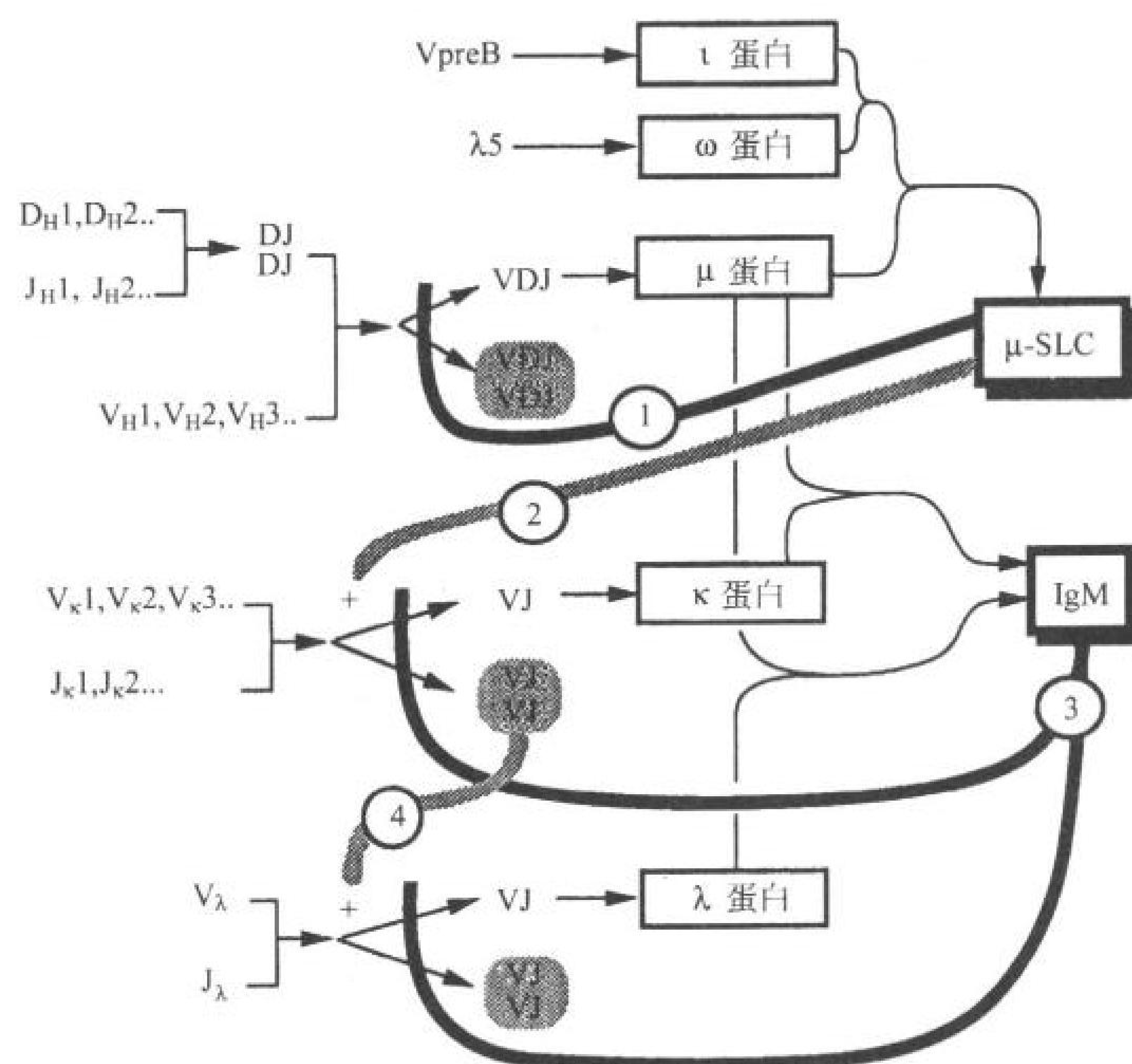


图 5.15 V 基因组装重组的调节。图中显示了可用于解释等位和同型排斥的四种调节效应。在一早期事件导致一种功能性蛋白产物产生以后,负调节效应(黑粗线)可阻止重链或轻链的继发重组。正调节效应(终止于"+"处的灰粗线)仅在功能性 μ 蛋白生成以后才开启 κ 重组,其仅在两条染色体上都发生无效 κ 重组后才开启 λ 重组(有阴影的椭圆区)。图中没能明确说明后来的效应;另外,一种功能性 μ 蛋白或许可在 κ 和 λ 基因座激活重组。

与此相反,如果在前 B 细胞中的第一次 V→DJ 重组产生了一个有功能的 VDJ 基因,那么其表达会导致 μ 重链的合成。μ 重链以前 B 细胞受体形式表达在前 B 细胞表面,并与前 B 细胞 SLC VpreB 和 λ5 相联系,而且在成熟 B 细胞中,同样的 Igα 和 Igβ 异二聚体转入细胞,其中的活化信号由抗原诱导的表面 IgM 的交联而引起(见第 7 章)。这种前 B 细胞受体复合体有两种调节功能:一是阻止了重链进一步重组(见图 5.15①),二是激活了 κ 基因重排(图 5.15②)。μ 链诱导性阻断进一步重链重排的假设最初基于骨髓瘤的统计学分析而提出(即作为所观察到的等位排斥的解释),但是近来已得到对 Ig 基因进行操作实验的直接支持。当一种功能性重排 μ 转基因插入鼠基因组时,能显著抑制 B 淋巴细胞内源性重链基因的重排[287],这提示表达于前 B 细胞的 μ 转基因蛋白产物能在内源性 IgH 基因座关闭胚系元件的 V(D)J 重组。一种编码膜型 μ(μm)的转基因能抑制内源性 VDJ 重组,但一种仅编码分泌型的 μ(μs)转基因无此抑制功能[288~290],这说明膜型 μ 蛋白对介导等位排斥是必需的。这个结论得到以下现象的支持:在经基因打靶而使等位排斥丢失的小鼠中,不能表达膜型 μ 外显子[291]或功能性 λ5 蛋白[292](这些蛋白质是表面 Ig 表达所必需的);在这些动物,每个 B 细胞都带有两个功能性 V(D)J 连接,因为经来自一个等位基因的初始重组而产生的任一 μ 蛋白均不能以前 B 细胞受体形式装配在膜上来关闭其他等位基因的 V→DJ 重排。抑制 VDJ 重组的信号显然是由 Igα-Igβ 异二聚体介导;在一个 μm 转基因中,将介导 μ 重链和此二聚体联系的关键残基突变后,便不能抑制内源性 VDJ 重组;但当这个转基因通过基因工程改造使之表达 Igα 或 Igβ 的胞质结构域时,所产生的嵌合型转基因能够关闭内源性 VDJ 重组[293,294]。正常前 B 细胞受体诱导的关闭部分由 RAG 基因表达下调所介导[295]。这个现象与在骨髓细胞检测到的 RAG 基因表达水平相一致,其中的细胞是经流式细胞仪分群以代表 B 细胞发育中的不同

阶段：RAG-1 和 RAG-2 mRNA 可在原 B 细胞和早期前 B 细胞检测到（分别相当于正在进行 D→J 和 V→DJ 重组的细胞），但在表达 μ-SLC 的大量增殖期的前 BⅡ细胞中未能检测到。然后，在正在进行轻链 V→J 重组的小前 BⅡ细胞中又可检测到 RAG 基因的表达。除了对 RAG 活性的影响外，前 B 细胞受体还可通过降低重链基因座的可及性而下调进一步的 VDJ 重组，就如同在体外进行孵育时通过降低无功能 V_H 基因转录[296]及降低 RAG 蛋白在核中产生断裂信号的能力所导致的进一步 VDJ 重组下调一样（这些结果经 LMPCR 确定）[297]。在 RAG 蛋白上调以激活轻链 VJ 重组后续阶段中，IgH 基因座的可及性下降可阻止进一步 V→DJ 重组。

有趣的是，由前 B 细胞受体（μ-SLC）及成熟 B 细胞受体（IgM）介导的信号不仅对调节 VDJ 重组至关重要，而且还可作为控制 B 淋巴细胞分化的其他特征的枢纽。因此，在 RAG 敲除[298]或 J_H 敲除鼠[299]的骨髓中，B 淋巴细胞生成受阻于最早期的原 B 细胞阶段：①大细胞对 B220、CD43 及 C-Kit 染色阳性；②外周血中没有成熟 B 细胞典型表面标志的细胞。当一个重组 VDJ-C_μ 重链转基因导入 RAG-$1^{-/-}$ 或 RAG-$2^{-/-}$ 小鼠后[300,301]，产生的 μ 蛋白可令 B 系细胞发育到小前 BⅡ细胞阶段，此时轻链重组可正常发生。这些细胞不能在缺乏 RAG 蛋白时进行 V_L→J_L 重组，但可上调无功能 κ 转录，即明显反映了图 5.15②所示的调节效应。如果除 μ 基因外，在 RAG 敲除鼠的基因组中转入一完整的重组轻链转基因后，可恢复 B 细胞发育，此时外周 B 细胞数量正常，能表达成熟 B 细胞表面标志，能分泌转基因编码的抗体。（单独的轻链转基因不能挽救 B 细胞分化功能。）RAG 敲除所导致的发育阻滞与 λ5 敲除所导致的发育阻滞相似，后者缺乏前 B 细胞受体的 SLC 成分。因缺乏前 B 细胞受体信号，这些鼠也在前 B 细胞成熟方面受阻。相似的免疫缺陷综合征最近已见于人类有 λ5 纯合缺陷的病例[301a]。有趣的是，能在前 B 细胞表达的重组 κ 转基因可用以挽救 λ5 缺陷鼠的发育阻滞，这提示 κ 链在介导成熟信号方面可代替 SLC[302]；的确，在 λ5 敲除鼠中即使无 κ 转基因，也会出现一些成熟表现，因此有这样一个假设：即在 V_DJ_H 重组前就有少量 V_κ-J_κ 重组发生，进而提供一条 κ 链使表面 IgM 表达及信号转导得以进行。正如前面所描述的[293,294]，基于用突变或嵌合 μ 转基因连于 Igα 或 Igβ 的胞质结构域所导致的结果，表明前 B 细胞受体在发育进程中的容许效应是由 Igα-Igβ 异二聚体介导的。

μ 蛋白可激活 κ 链重组的假设（图 5.15 中的效应②）最初源自对各种 B 淋巴细胞系的统计学比较：只有 μ 基因重排和表达的细胞是常见的（前 B 细胞系），但没有重链基因重排及表达的 κ 表达细胞是少见的（尽管重链表达为 κ 链表达的一个前提）。此观点得到了在体外培养的 AMuLV-转化细胞及正常 B 细胞前体中所进行观察的支持[187]：发现在这些细胞系中，重链基因的重排总是先于 κ 基因。在一更为直接的证据中，μ 蛋白能刺激 κ 重排，一个不能表达内源性重链的 AMuLV 转化细胞（因其两个重链基因座的 VDJ 重排均缺陷）能在稳定保持 κ 基因座为胚系构象直到有一个功能性 μ 基因导入为止；该 μ 基因可激活 κ 基因重排及表达[189,303]。在激活 κ 重排时，只有一个编码 μm 的基因是有效的，而 μs 基因无效，这再次提示发生此信号转导需要有表面前 B 细胞受体表达。相似结论可由重组 VDJ-C_μ 转基因挽救 RAG 敲除动物的实验结果中推断出来，如上所述，这种挽救可导致 preB-Ⅱ细胞中无功能 κ 转录的上调。还发现在胚肝中[296]，一种人类 μ 转基因可令 B 淋巴细胞前体的 κ 基因（无功能）转录及 V_κ-J_κ 重排上调。为直接检测 Ig 基因座对 RAG 蛋白的可及性，Constantinescu 等[297]将来自不同发育阶段 B 细胞的 $RAG^{-/-}$ 胞核在体外与 RAG 蛋白孵育，经 LM-PCR 检测断裂的信号末端；使用该方法，他们发现在用前 B 细胞核与 RAG 蛋白孵育时，将 VDJ-C_μ 转基因导入 $RAG^{-/-}$ 背景中，可使发生在 J_κ1 的断裂频率升高 30 倍。有趣的是，δ 转基因也能抑制内源性 VDJ 重排，并能激活 κ 重排[304]，因此这些效应一定是由 δ 和 μH 链共有的特性所介导。前 B 细胞受体复合体的交联为 κ 重组所需[163]，提示有一配体可在前 B 细胞环境中生理性出现，该配体可能结合到前 B 细胞受体，进而转导在 κ 基因座发生重排的活化信号及产生抑制在重链基因座发生重排的信号，然而，目前尚无候选配体被鉴定。

尽管有了以上所有引用的证据，但很清楚，在缺乏含 μm 的前 B 细胞受体时，一些无功能 κ 基因转录及 V_κ-J_κ 重组也可发生[291,305~307]。这可能是在早期 B 细胞形成过程中发生了轻链重组控制的某些“遗漏”所造成的，或者反映在一个不同的发育细胞系中 V_κ-J_κ 重组被较早地激活；但这种未成熟 V_κ-J_κ 重组的低发生率保证了轻链双型制造者的可能，从而违背了等位排斥低于 1% 的规则[299]。

当 κ 重组开始后，功能性和非功能性 VJ 重排的可能性与上述论及的重链相像。根据调节模型，若细胞最初在一条染色体上无功能性 κ 基因座重排，那么其还可在同源染色体的同一基因座进行重排。一旦功能性 κ 基因重排表达了能与 μ 相联系的功能性 κ 链，并形成表面 IgM 分子（即成熟 BCR）时，进一步 κ 重排将被抑制（图 5.15③）。此调节效应可解释在表达 κ 的骨髓中发生的等位排斥现象，而且其已得到了如下发现的支持：即功能性重排的 VJ-$C_κ$ 转基因可抑制内源性 κ 基因的重排[308]。进一步发现，在一表达 RAG 蛋白的鼠 B 淋巴瘤细胞中，以抗 μ 抗体与表面 IgM 交联后可很快抑制 RAG 基因表达[309]。尽管在生理状态下，一种配体可能传递了相应信号，但这并不十分清楚，特别是因为在某些条件下，前 B 细胞 BCR 的交联（可发生于结合了一个自身抗原时）可实际上调 RAG 基因表达以激活“受体编辑”。BCR 介导的信号对小前 B-Ⅱ细胞发展到未成熟 B 表现型及移至外周的过程可能是必需的，因如上所述，RAG 敲除的动物仅有一个 μ 转基因时不能跨越前 B 细胞阶段，而联合的 μ 和 κ 转基因可导致正常 B 细胞增殖、表达表面标志及迁移到外周等结果。Igα 对介导 BCR 的一些分化信号亦很关键，因为在 Igα 胞质结构域有工程性缺乏的小鼠仅有正常循环 B 细胞正常数量的 1%[310]。

137

图 5.15④中的调节效应带有相当的推测性，这是因为对 λ 基因重排知之甚少。λ 重组可被染色体上非功能性 κ 重排所激发的想法源自如下现象：多数 B 细胞有亚型排斥（即仅表达 κ 或 λ，而不能同时表达二者），而且 κ 重排似乎发生在 λ 重排之前。因此，在正常及恶性人类 B 淋巴细胞的研究中[136,311]，若为 κ 表达细胞，则 λ 基因处于胚系构象；若为 λ 表达细胞，则 κ 基因要么重排（少见），要么缺失（多见）。κ 缺失反映了在本章前面部分讨论的 RS 重组事件。这些结果提示，在 κ 基因进行非功能重排或被缺失之前，λ 基因一直保持非重排状态。由 κ 基因座调节 λ 基因的机制尚不明确。早已提示：在 $C_κ$ 及 RS 位点之间的 24kb 范围内的某处有一抑制 λ 重排的序列，但在 κRS 重组事件该序列被缺失以减轻此抑制作用。然而，与此假设相反的是，有 $C_κ$ 或内含性 κ 增强子靶向性缺失的小鼠有近乎正常数目的 B 细胞，更为重要的是即使在 $C_κ$ 和 RS 间的 DNA 无丢失的情况下，上述所有小鼠都可表达 λ[276,306,312]。

假设 μ-λIgM 的膜性表达会以类似在 κ 基因座的机制（图 5.15③）关闭所有进一步的轻链基因重组，在转基因鼠中 κ 基因表达受抑是一推测性支持证据[313]。然而这种抑制存在某种程度的“遗漏”，特别是较老龄的小鼠[314~317]，甚至在有一小群细胞表达两种亚型的正常脾细胞中[318]。这些现象促使人们去了解是否某些 B 淋巴细胞并不遵守严格的亚型排斥规则。也有这样一种可能性，即在某些同时表达 κ 和 λ 的细胞中，一种亚型的轻链蛋白对所表达的重链蛋白有较高的亲和力（基于 V_H-V_L 的相容性）以致其他亚型无助于表面 Ig 的形成，因而形成蛋白水平上的等位排斥。目前已有了与轻链严格顺序重排模型（κ 先于 λ）相反的一些证据[285~319]，这提示在 κ 和 λ 基因座同时激活了 VJ 重组。在此模型中，淋巴细胞表达 κ 的优势（至少在鼠中如此）源自一个随机过程，其中较大的 $V_κ$ 库偏爱 κ 重组，同时该优势的形成也与 κ 基因座的其他特性（如有更多的活化重组信号序列）有关[320]。另外，κ 表达优势或许可用一个模型来解释，其中 κ 及 λ 重排独立发生，但在 B 细胞发育过程中 κ 重排起始较早[321]。在后两个轻链重排的模型中的任何一个中，一个表面 IgM 分子（H2κ2 或 H2λ2）将传递轻链重组的反馈抑制信号，因此等位排斥及亚型排斥都可以用这一相同机制来解释（那么图 5.15 的调节效应④将不存在）。

继成熟 BCR 表达后的 RAG 蛋白产生

尽管可通过未成熟 B 细胞上出现的 IgM 介导的信号而明显下调 RAG 基因，但至少在 B 细胞发育的两个较晚期阶段中，有 RAG 基因表达的证据，这两个阶段是：骨髓中自身反应 B 细胞的受体编辑过程期及在生发中心的 B 细胞成熟期。

一项早期观察提示：经 κ 轻链基因的二次重排而产生受体编辑的可能性来自一个对代表 VJ 重组中缺失片段的环状 DNA 的分析[322]。结果观察到：除含预期的信号连接外，这些环中的诸多成员都含许多 VJ 连接；这些可能是在初始的颠换重组中形成，然后发生二次缺失性重排，从而产生所观察到的环状 DNA。很重要

的，所分析的大约 1/3 的 VJ 连接，显示无明显缺陷，提示其可产生一种被继发重组改变的功能性抗体。从此研究起，几个实验室在 B 细胞瘤及 AMuLV 转化的前 B 细胞系中直接观察到二次 κ 重排[188,323]。如前节所述，在许多 V_H 编码区 3′端包含的一个 7 碱基区的介导下，重链 V 基因替代也可发生。至于 κ 基因，此种替代甚至可发生在功能性 VDJ 重组之后[180,324]。发生功能性重排轻链或重链替代的一个潜在原因是自身反应抗体的产生夭折。因此，受体编辑可能是阻止自身抗体产生的其他两个机制（无反应化及经凋亡使细胞缺失的机制）的补充。

几个应用带有表达自身反应抗体的转基因鼠的研究支持此种解释[325,326]。在一个研究中，通过与 3H9 重组的 VDJ 基因进行同源重组而使 J_H 基因座被靶向性替代，3H9 重组的 VDJ 基因编码一条能与多数（非全部）κ 轻链组合的重链，该链能结合一种作为自身抗原的 DNA[181]。在这种鼠中，多数 B 细胞的 3H9 基因被一个上游的 V_H 基因所替代，连接区显示出典型 N 区及核酸外切酶蚕食的特点。当作为正常转基因插入时，3H9 也刺激轻链编辑。$J_κ5$ 被使用的频率的增加及呈现 3H9 重链的 B 细胞表达的 $V_κ$ 基因的多样性减少都证实了这一发现[325]。这些结果与下面说法一致：即产生支持 DNA 结合的 $V_κ$ 蛋白的初级重排被涉及与 DNA 连接不相容的下游的 $J_κ$ 和 $V_κ$ 区的二次重排所编辑。受体编辑发生于骨髓中的未成熟 B 细胞群[327,328]，并与 RAG 基因表达增加相关。事实上，人类 B 细胞系的 BCR 交联，可上调 RAG 基因表达[329]。如前如述，BCR 交联也可终止介导等位排斥的表面 IgM^+ 的未成熟 B 细胞的 RAG 基因表达[309]。关于一个细胞如何区分 BCR 介导的使能介导等位排斥的 RAG 基因表达下调的信号和 BCR 介导的使 RAG 表达上调以起始受体编辑的信号，目前还不清楚；但在受体亲和力、发育的准确阶段或共刺激信号等方面是有区别的。有趣的是，受体编辑失败可能有助于介导系统性红斑狼疮形成的自身抗体的产生[330]。

晚期 RAG 表达的第二个例子见于生发中心（germinal center, GC）[331,332]。经 RT-PCR 检测到了来自免疫鼠经 FACS 纯化的 GC 细胞的 RAG-1 及 RAG-2 的 mRNA 转录物，通过免疫荧光法检测到了 GC 细胞中的 RAG 蛋白，在 GC 细胞中找到了正在进行 V(D)J 重组的证据[332a, 332b]。RAG 也表达于派尔集合淋巴结中的 GC（该淋巴结在缺乏计划免疫的情况下由食物抗原维持）和与 IL-4 及 LPS 共培养的脾 B 细胞中（已知该条件可诱导另一 GC 细胞的典型过程，即亚型转换）。GC 细胞重演了早期 B 系细胞几个特征性表面标志的表达，这些标志包括热稳定抗原（CD24）及 λ5；因此 RAG 基因表达可能仅为 GC 诱导的向原始表型返祖的一个方面。在 GC 中 RAG 蛋白有何功能呢？尽管在 GC 中影响 Ig 表达的基本过程是体细胞突变及亚型转换，但在 GC 中表达的 RAG 蛋白似乎对这两个过程并无作用，因为两过程在 $RAG^{-/-}$ 鼠的 B 细胞中都可发生[116a,331]。一个可能性为：RAG 依赖性受体编辑可能取决于 V 区的替代，该区可因 GC 诱导的体细胞突变而变得有自身反应性；当然还有必要进一步实验以评价此解释。

多样性的产生

关于 Ig 的一个最有趣的问题是：导致抗体结合特异性变化多端的源泉是什么。如本章开始所述，关于此问题的早期推测性争论集中在多样性胚系库及体细胞突变在产生多样性中的相对贡献。一个在 DNA 重组出现前无法期望的多样性的来源（体细胞重组多样性）已于本章在一定程度上进行了详细论述。现在我们将集中讨论胚系库，然后讨论体细胞突变的作用。

胚系多样性

对 V 基因片段的胚系库进行综合评估需要检测全部胚系 V 区的序列，这是一项繁重的工作。但现代分子生物学技术（包括允许长基因组片段插入的克隆载体及使用荧光染料和自动制备样品的大规模测序）已帮助我们在人类 κ、λ 及重链基因座实现了此目标；且关于鼠 κ 及重链基因座已经取得了可喜的进展。（关于鼠 λ 基因座的微小 V 区库已在有关 λ 基因的一节中论及。）

网络资源为获得Ig胚系基因序列提供了方便时新的途径。IMGT(international ImMunoGeneTics)数据库(http://imgt.cnusc.fr:8104/home.html,由Marie-paule Lefranc协办)包含Ig及TCR序列的数据库及一个单独的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)序列数据库[333]。在Ig/TCR数据库中,含有所有物种可供使用的数据;序列以标准方式注解,以图的形式提供图谱信息。V Base Gold (http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html)为人类V基因片段及等位基因在线分类目录(由Ian M. Tomlinson协办)。

小鼠Ig重链基因座的胚系多样性

在基因克隆时代前,就开始以研究鼠骨髓瘤的V_H氨基酸序列的方法尝试分析鼠V_H库。将所发现的V_H划分到相关组的初步尝试建立于有限的氨基酸序列分析基础上,主要是基于骨髓瘤蛋白的N端序列。现行标准是:如果两个V基因序列有超过80%核酸序列相同,则将二者划入同一组或家族;若二者序列的一致性少于70%,则认为二者属不同家族(根据经验,极少的V_H比较后序列的一致率在70%~80%)。序列相似性的这些标准与相似性程度相一致,基于相似性,使得在适当的严格条件下V探针与同一家族的成员杂交。建立于此标准基础上的最初分类鉴定了7个V_H家族[334,335]。从那时起,对新序列的继续分析已确定了另外8个家族[336~338]。已知这些家族对免疫应答的强度有影响:当分析了与C_μ和J_H探针杂交的2000个cDNA克隆后,根据杂交和序列分析结果,发现全部克隆都有来自15个家族的V区(除2%的克隆代表截短型或异常的cDNA合成外)。根据骨架区I(framework I region)(FR1:6~24密码子)及FR3(67~85密码子)的序列保守性,将这些家族进一步分为三组(骨架氨基酸为IgV区的非CDR部分,其可维持CDR环与抗原接触)[339~341]。这些家族在人、鼠和蛙之间的保守性提示胚系V_H多样化的几个基础步骤先于两栖爬行类的多样化[342]。

将V_H基因分为几个家族带来了两个问题:①每一家族有多少基因对Ig多样性产生影响? ②这些家族在染色体上如何排布? 一个较直接的解决基因数目的方法是计数在Southern印迹上的可见带。但该法仅能达到基因数目的粗略估计,原因是解释结果时有几种复杂情况。带数可能低于V_H区数的原因主要有以下两个:①给定的DNA片段可含一个以上与V相关的序列;②一些看到的带可能实际上代表几个共迁移的混杂DNA片段,每一个都含不同V_H基因。另一方面,带数可因以下两个原因而在理论上超过不同V_H基因数。第一,某些混杂序列可能对序列多样性无有效贡献。特别是一些非等位基因配对非常相似,以致第二个拷贝对氨基酸序列多样性无益。其他V序列是非功能性的,因其即使位于一条不同染色体上,其也已从C区基因座分离。还有其他基于与V探针杂交而被分离的胚系克隆已被证明有多种缺陷,这些缺陷基因即使在有重排的情况下,其表达也受阻(即这些缺陷基因为假基因);相信这些假基因在体细胞水平通过基因转换而有利于多样性形成,正如后面所述,已知这种转换是在鸡和兔中起作用的机制。第二,一些条带有两种不同家族的探针与之杂交而被计数二次。若一个特异性DNA片段带有来自两个不同家族的胚系V序列或如果因一簇残基与探针序列相同而导致组间交叉杂交时,则可发生一些带被计数二次。

基于这些说明,Kofler等[343]经修饰后汇编成表5.1,从而对不同V_H组广泛变化的复杂性给了一个总体概括。有几组仅有几个成员。如V_H S107家族产生4个Southern印迹带,且用探针对此家 族进行广泛克隆时实际只检测到4个胚系成员(其中之一明显为假基因)。另一极端为V_H J558家族,其显示出极大的Southern印迹复杂性,其在BALB/c小鼠可能含有1000多个成员。此统计[344]基于应用过量的单股J558探针的杂交定量动力学而获得,而60个基因的低估是基于计数Southern印迹带而获得的。若较大数目的估计正确,那么在以V_H-J558探针所进行的Southern印迹上所见到的多个条带一定含多个共迁移DNA片段;这可能代表V_H基因座的近期重复,并预期编码变化最小的V_H序列。除BALB/c小鼠外,其他品系小鼠似乎也有较小的J558家族[345],这与在BALB/c小鼠中观察到的J558 V_H基因的近期扩展相一致。

139

关于胚系V_H基因在染色体上如何排列的问题已经用几种不同技术进行了研究。已有一种直接的方法用于经V_H探针筛选胚系DNA噬菌体文库并用于检查含一个以上V_H区的克隆。此法用于鼠的V_H基因座得

到了三条重要规律：邻近的 V_H 基因常为同一族成员；它们的方向都为 5'→3'；它们大约 7～15kb 距离[346～348]。第一条发现提示一个给定的 V_H 家族在染色体上簇集在一起。这样的簇集代表了一个简单的原则：鼠的 V_H 基因图可用于建立簇集于染色体上的家族顺序，而后是用于每一簇中的 V_H 基因顺序。

表 5.1　小鼠和人的 V_H 区家族

小鼠					人	
家族号	家族名称	复杂度[a]	族[b]	群[c]	家族号	复杂度[d]
V_H2	Q52	15				
V_H3	36-60	5-8	II	I	V_H2	4
V_H8	3609	7-10			V_H4	9
V_H12	C_H27	1			V_H6	1
V_H1	J558	6-1000				
V_H9	VGAM3-8	5-7	I	II	V_H1	14
V_H14	SM7	3-4			V_H7	5
V_H15	V_H15	2			V_H7	5
V_H4	X-24	2				
V_H5	7183	12				
V_H6	J606	10-12	III	III	V_H3	46
V_H7	S107	3				
V_H11	CP3	1-6				
V_H13	3609N	1				

该表基于 Kofler 等人[343]对小鼠 V_H 区的收集汇编，基于 Pascual 和 Capra 关于人 V_H 区的一篇综述[822]及 Mainville 等人的一篇论文[338]。可在原始文献中找到这些数据。

[a]复杂度：每一家族中所估计的 V_H 序列数。

[b]由 Schroeder 等人确定的 V_H 序列族[340]。

[c]群：基于 Tutter 和 Riblet 等人的分类[339]。

[d]复杂度：基于 Cook 和 Tomlinson 提供的原型单体型[381]。

一种 V_H 家族排序的方法是检测(经 Southern 印迹)在多种骨髓瘤或杂交瘤中缺失的 V_H 条带。可按如下方法推断 V_H 家族的顺序：如果非表达染色体被缺失，则所有在 Southern 印迹中观察到的 V_H 片段可看作源于相同的(即表达性的)染色体，并位于重排 V_H 基因的上游[349～351]。一种改良的有效缺失方法是用了一组 Abelson 病毒转化的 B 细胞系，该细胞系来自在 Ig 重链基因座为同种异型的 F_1 代杂合动物。在大多数这样的细胞系中，有可能区分出两条亲本染色体上的缺失，并为每一细胞系建立一个独立 V_H 基因顺序[338,352]。

另一种方法是通过使用黏粒文库产生大量重叠克隆，然后进行染色体步移；该方法虽已在一些实验室中应用，但由于近期复制的发生而使得近乎一致的 DNA 片段在图上不易区分或排序，从而使该方法变得困难。这个问题通过应用酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC)克隆可望得到解决，YAC 可容纳 1～2Mb 的基因组 DNA 片段。YAC 的应用有利于人类 V 基因座的大范围制图。脉冲场凝胶电泳也已用于分离大段基因组 DNA 以便经 Southern 印迹而进行基因绘图。

应用这些技术所进行的研究已对小鼠的某些 V_H 家族进行了大致排序，但目前尚无可供使用的包含各种制图法所得全部数据的完整图谱。从几个实验室的材料可清楚地看到家族间发生了某些交错[351,353]，这给解释结果带来了困难。基于 Brodeur 及其同事的研究工作，绘制了 15 个鼠 V_H 家族的代表性图谱(图 5.16)[352,354]。

在不同技术所得的 V_H 图谱中，一致性最大的是距 C_μ 最近的家族。这些家族的定位排序为：S107-Q52-7183-D-J-C_μ，其中在三个家族之间有某些重叠(如图 5.16 所示)。该排序具有特殊意义，因为最临近的家族簇(名为 7183)，特别是其最临近的成员(名为 V_H81X)，是胎肝前 B 细胞发生 VDJ 重排中明显过度表达的 V

区[355]。此现象很早就作为支持 V 基因重排示踪模型的证据(即重组酶将使 DNA 靠近 J 区并滑过 5′端找到 V 区并与之重组[356]);但目前已提出另一种基于更近期材料的解释[339,340,357,358]。

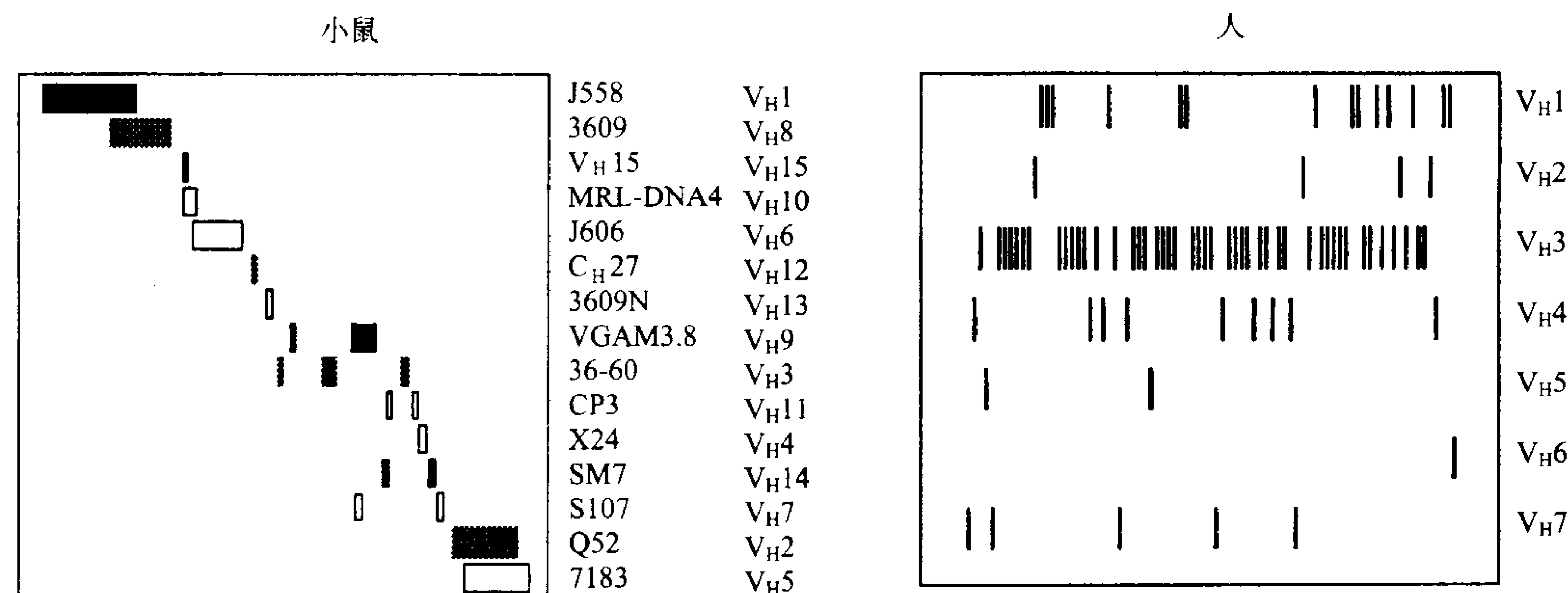


图 5.16 小鼠和人类的 V_H 基因座图谱。在图中相应的位置上显示出了已知的 15 个小鼠 V_H 基因家族。每一个矩形代表所指出家族的 V_H 基因的一个簇;V_H 家族中的族由不同颜色的矩形表示:黑色表示Ⅰ族,灰色代表Ⅱ族,白色代表Ⅲ族。虽然交叠家族(如 Q52 和 7183 家族)显示出了一些交叉,但家族主要呈簇性分布。与此相对照,一个原始单体型的所有人 V_H 基因(垂直直线)被显示于右图中,这种排布基于 Cook 和 Tomlinson 的数据资料;其中家族间的广泛交叉是显而易见的。

小鼠胚系 D_H 和 J_H 区

基于骨髓瘤蛋白质的高度多样性的氨基酸序列,D 区最初被假定存在于 V 和 J 区之间(正如同本章前面已讨论的那样)。因为 V_H 和 J_H 侧翼都有长间隔型信号元件(23bp),故可以预见胚系 D 区两端都将有短信号元件侧翼序列,从而使 V-D 及 D-J 重组都将遵守 12/23 间隔规则[359]。 140

用探针寻找与来自一个克隆化重组基因的 D 区序列相对应的胚系 D 基因是有技术难度的,因为编码 D 区少数氨基酸的 DNA 片段太短以至不足以形成有效的杂交信号。为得到更有效的探针,已从尚未与 V_H 基因重组的 DJ_H 中间体中分离出 DNA 片段,从而保持了来自胚系 D 的 5′侧翼序列以供用作较长的探针[360]。用骨髓瘤 QUPC 52 克隆而来的 DJ_H 中间体确定了其胚系 D 前体(名为 DQ52),其距离 J_H1 5′端 0.7kb。其结构与设想的非常相似:一个 10 个核苷酸编码序列的两侧翼均有 RSS 元件,其间隔为 12bp。将一个源于 T 细胞系(SP2)的重排 DJ_H 的相似克隆用作第二个探针来克隆簇集于 60kb 区域内的 9 个相关 D 区,结果都有 17 个核苷酸编码片段及信号元件的短间隔[361,362]。使用来源相似的第三个探针 FL16 鉴定了 FL16 家族,其仅由 2 个胚系 D 基因组成,但在已测序的重排 Ig 重链基因中表达较好。通过识别重组 VDJ 区中 V 和 J 之间的一个重复核苷酸序列而确定了最后一个 D 区 D_{ST4},该序列与前述已知 D 序列不同[363]。13 个鼠 D 区跨越 4 个 J_H 片段上游的大约 80kb,而这 4 个 J_H 片段又位于 C_μ 上游。

除了因胚系 D 元件库而导致的组合多样性外,在 D 区两端还具有重组位点的灵活性。进一步讲,在 VD 连接处发生的一个读框外重组可被 DJ 连接的读框所代偿,因此一个特定的 D 元件理论上可在不同 VDJ 重组中以三种读框来阅读。如前所述,该额外多样性来源可被人类重链利用[11],但小鼠系统使用已进化的强力支持 RF1 读框的机制[10]。由于内部频繁出现的终止密码子,使得在 RF3 中的 DJ 重排被逆向选择。当在 RF2 内发生 DJ 重组时,所产生的转录物可编码一 DJ-C_μ 蛋白(命名为 D_μ 蛋白),该蛋白可被表达于前 B 细胞表面,并与 VpreB 及 λ5 基因相联系[364~366]。表达 D_μ 蛋白的鼠细胞不能进一步产生正常 Ig 产物,这可能是因为 D_μ 蛋白在 V 装配完成前便激发了 VDJ 重组关闭信号;因此,表达的重链 V 区很少包括有 RF2 内的 DJ 连接[10]。下列观察结果支持此奇特的模型:即在 λ5 敲除小鼠(其不能在细胞表面表达 D_μ 蛋白)[367]未能观察到

RF2 抑制，而且经 PCR 对单细胞中的重组进行分析也未检测到含有在 RF2 内的 DJ 连接和功能性 VDJ 连接的细胞[368]。此机制在人类无效，因为 ATG 起始密码子通常不出现在 D 区 5′端，从而不能编码 D_μ 蛋白。某些重排的 VDJ 序列似乎可解释为 V-D-D-J 的产物（即使在 D-D 重组违背 12/23 规则的情况下）[369]。

小鼠胚系 V_κ 区

尽管鼠轻链基因是用分子生物学技术研究的首批 Ig 基因，但鼠胚系 V_κ 基因座的结构不如人类的清楚。基于 N 端氨基酸序列资料，Potter 及同事将鼠 V_κ 序列分为 24 组[370]。基于上述核苷酸序列标准，目前分为 20 个家族[371]。然而，不同的分类方案将产生不同的计数结果，这可能是因为 V_κ 基因有相关程度的不同，这种相关并非分散步骤，而是一个连续的阶段[372]，正如所期望的那样，若基因重复在一连续时段内发生，则序列的多样化率也将改变。如同上面所讨论的 V_H 基因，某些 V_κ 家族为人类与小鼠共有，提示家族分裂先于灵长类和啮齿类种属间的分离[373,374]。含大约 140 个 V_κ 序列（基因及假基因）的小鼠基因座已在一系列的有重叠的细菌人工染色体（bacterial artifical chromosome, BAC）及 YAC 克隆上被克隆，该基因座占 6 号染色体 C_κ 基因上游约 3.5Mb 的范围[375~377]。另外，少数 V_κ 序列已定位于其他染色体（16、19 号染色体），在这两条染色体上，这些 V_κ 序列对多样化形成无贡献，因此被称为“孤儿”。在 6 号染色体的功能性 V_κ 基因座，发现许多相关的 V_κ 序列簇聚在一起，尽管其间还点缀着其他家族成员。在本书中，通过序列分析还不能完全确定基因总数。

141

人类胚系 V_H 基因座

人类骨髓瘤 V_H 区蛋白质的氨基酸序列最初被 Kabat 分为三组。它们分别与三个家族有很好的相关性。最近又用分子遗传学方法发现了另外四个 V_H 家族。几个人类 V_H 家族显示了与小鼠特定 V_H 家族的序列相似性[378]，且都可归类于鼠、人及蟾蜍所共有的三个大的鼠 V_H 基因家族；如上所述，这些发现提示重要的胚系 V_H 多样化先于两栖类与爬行类的种间差异。

与具有鼠基因座特征的家族簇相比，人类 V_H 基因的早期噬菌体及黏粒克隆证实人 V_H 家族有广泛的交错。通过分析 B 细胞系中 V_H 缺失及以 PFGE 为基础的图谱数据资料而进行基因定位研究，从而确定此交错结构[354,379]；最后，通过对覆盖整个 V_H 基因座的重叠 YAC 克隆进行分析而获得对人 V_H 区的完整描述[380~382]。V_H 基因座在 14 号染色体的端粒末端 1.1Mb 范围内，其含有 95 个 V_H 序列；其中 51 个为功能性的，大多数剩余序列为假基因（尽管确切数目的多少依单体型而有不同，且少数 V 序列特征还未完全清楚）。每一 V_H 区可用一个两位数的数字确定：第一个数字代表 V_H 家族，第二个数字表示在标准图上 V_H 的序列号（从 J_H 近端开始），如附有 P 字母则表示假基因。针对一个特定的 V_H 基因座，若在编码序列上无明显缺陷且已在重排 VDJ 基因中被检测到（表明重组信号完整），那么则判定其为功能性的。另外的多态性 V 区可参照 J_H 附近的标准 V_H 而被确定（使用一个小数点）；如果一个来自 V_H7 家族的多态性 V 区位于 4-4 及 2-5 间，那么就将其确定为 7-4.1。因此整个 V_H 区从 V6-1（其定位于距 J_H1 5′端 77kb 处）开始[383]，直到 V7-81（其位于标志 14 号染色体长臂末端的端粒重序列的几 kb 内）。24 个另外的胚系 V_H 序列已定位于 15 号和 16 号染色体，其代表重复于 14 号染色体功能基因座的非功能性“孤儿”[384,385]；这些序列导致了对功能性人类 V_H 基因座长度的早期高计数。所有已确定转录方向的 V_H 区与 J_H 区的方向特点相同，与缺失重组一致而不与倒位一致。该基因座的几个区显示出远古重复的证据：即这样一些区域，其中对来自邻近 DNA 区不同探针的一种杂交模式可在该基因座的其他地方重复。因此，完整基因座图或可提供进化的线索，同时也可提供线索以确定可用于免疫系统的胚系 V_H 多样性库。

人类 J_H 和 D_H 区

人类 C_μ 基因上游有一系列 J_H 区基因，包括 6 个明显的功能性 J_H 区[386]。点缀于活性人类 J_H 基因间的

为 3 个 J 假基因，这些假基因编码的氨基酸序列从不出现于人类重链中，且这些基因缺乏在所有活性 J_H 基因 3′端存在的 RNA 连接信号。所有 J_H 基因及假基因都有 23bp 的 RSS 间隔（与在鼠中的一样）。

对跨越人类 D 区的一段 92kb 区域进行完整序列分析已确定了该区的大体结构，该结构先前由部分序列分析及 Southern 印迹推论而得。人类的一个胚系 D 基因存在的位置与鼠 DQ52 的相应位置大致同源，其在 J_H1 的 5′端。该人类 D 基因最初命名为 DHQ52，它与鼠的相应基因有高度的同源性，但也是惟一的显示这种人/鼠同源性的人类 D 片段。其他所有的人类 D 区可分为 6 个家族，其位于 J_H1 上游的大约 22kb 的一串重复区。有 27 个 D 区；其中的 24 个区含有一个 9.5kb 片段的 4 次前后发生重复，在这个 9.5kb 片段中含有 6 个 D 家族之一。除了这 24 个区，另外 3 个区源于：①一种额外的 2.8kb 片段的部分重复（包含一个 D 区）；②一种内部重复，产生一个 D 区；③DHQ52，它属于它自身的一个家族，它与这 6 个重复型家族不同。已使用与 V_H 基因相似的方式将 D 区重新命名：第一个数字代表家族，第二个数字代表其在基因座中的序列位置。该基因座始于 D 区 5′最末端 D1-1，止于 D7-27(DHQ52)。因在 RSS 的 7 碱基序列突变导致 3 个 D 区明显无功能，且有两对 D 区的编码序列是一致的（包含一个有 7 碱基序列突变的 D 片段）；因此有 23 个 D 区可致人类 Ig 多样性。对已发表的人类 V_H 序列的数据库进行综合计算机分析显示：数据库中有全部的序列，其中许多有所有三种读框。一般说来，一个读框主要编码亲水残基，一个读框编码疏水残基，一个读框有频繁出现的终止密码子（针对某些含有终止密码子的 D 区，若在 VDJ 装配完成前用核酸酶去除这些终止子，那么这些 D 区也可被利用）。

除了这些都带有典型 12bp 间隔的信号元件侧翼的 D 区外，一个可能的新家族被命名为 DIR（有不规则间隔的 D 区），该新家族的 RSS 元件可带有 12 或 23bp 间隔；理论上讲，在不违背 12/23 规则的情况下，DIR 区能以 V-D-DIR-J 或 V-DIR-D-J 重排的方式产生更多的多样性[387]。然而，对已公布的 893 个 V_H 区数据库的系统评估未能检测到 DIR 区的表达[11]，用敏感的 PCR 检测进一步证实了无 DIR 区的表达[388]。尽管已用高敏的 PCR 技术[388,389]得到了反转 D 区及先前假定的 D-D 重排（其违返了 12/23 规则）以低频率发生的证据，但在该 V_H 数据库中却未找到这两种情况。还有，直接和反转 DIR 重排都已在含有人类 IgH 微基因座转基因小鼠中找到[389a]。最初认为位于主簇上游的人类 D 区片段很明显位于 15 号染色体的重复“孤儿簇”，因而其是非功能性的[385,390]。

142

人类胚系 V_κ 基因座

人类 V_κ 基因座位于 2 号染色体短臂(2p11-2)，其上大多数基因分为 4 个已知的 V 基因家族 V_κ Ⅰ 到 V_κ Ⅳ。5 个克隆的 V_κ 序列被分为 3 个另外的家族（V_κ Ⅴ ~ Ⅶ），但这些序列不能产生已知的蛋白质，因此可能为假基因。Zachau 及其同事通过克隆、PFGE 及序列分析方法对人类基因 V_κ 基因座进行了广泛研究[391,392]。他们已确定了位于人类 V_κ 基因座的 76 个 V_κ 序列，这些序列位于两个相毗邻的 0.4Mb 的区域内，这两个区域以无 V_κ 序列的 0.8Mb 的间隔区分开。J_κ 远端（上游）片段含 36 个 V_κ 序列，该片段显然是一个大的重复所致。在每一重复片段中，所有 V 区都有相同的 5′→3′方向。显然，远离 J_κ-C_κ 区的区段与距其较近的区段及 J_κ-C_κ 区的方向相反。经 PFGE 事先分离两基因座，然后用 Southern 印迹法探究重复区段的限制性图谱间的细微不同，经过这些方法将大多数重复 V_κ 序列定位于近端或远端区段。另外，由缺乏远端重复的稀有个体 DNA 的 Southern 印迹带的缺失而推出分布情况。在全部受检 B 淋巴细胞中，那些带有涉及远端反转 V_κ 片段重组的细胞中含有保守的信号连接，而且没有下游 V_κ 和 5′端 J 侧翼 DNA 的缺失，这与因反转而导致的 V_κ-J_κ 重组相一致。除两个插入/缺失性差异导致的一个不配对近端 V_κ 和一个不配对远端 V_κ 外，该基因座其他近端及远端部分的 V_κ 序列与其同源物有 95% ~ 99%序列相同。这一高度的相似性提示了该重复的一个近期来源，支持该推测的依据是这种重复在黑猩猩及大猩猩中都不存在的事实[393]，黑猩猩及大猩猩从人类谱系的分离仅在 6 百万到 8 百万年前。在近端重复及 J_κ 区间为另外的 6 个未配对的 V_κ 序列，其中两个最靠近 J_κ

的序列的方向相反。大多数 J 近端的 V_κ 序列(即 V_κⅣ家族的单个基因)为 $J_\kappa1$ 上游的仅仅 23kb。V_κⅠ、V_κⅡ、V_κⅢ家族的成员呈广泛分布。此基因座的 76 个 V_κ 序列中,有 33 个无明显缺陷(尽管某些在重复区段的序列与其对应部分非常相似,以致其对该基因座的多样性无明显贡献,另外也尽管有些会因未知原因而不表达)。对人类脾文库中的 70 个 cDNA 及 170 个已知 cDNA 进行检测,发现只有 21 个 V_κ 基因和 5 个来自重复性一致的基因被表达,这样就组成了一个有 27 个 V_κ 基因的表达 cDNA 文库[394]。胚系 V_κ 基因座的其余 V_κ 序列中,有 25 个无疑为假基因,表明有几个蛇型缺陷存在;另外,有 16 个序列有一个或两个较小的缺陷,这些序列可能在某些单体型是有功能的。

除了在靠近 J_κ-C_κ 基因座的序列簇中 V_κ 序列外,Zachau 及其同事已鉴定了至少 25 个"孤儿"序列。一个"孤儿"序列簇位于 2 号染色体长臂;通过一个中心旁反转,将其与位于该染色体短臂上的主要基因座分离(该反转肯定是在进化过程中距今非常近的年代发生的,因为其在黑猩猩及大猩猩是不存在的[395])。其他"孤儿"序列位于 1 号和 22 号染色体;且至少有一个可能为非功能性的 V_κ 位于 C_κ 下游约 1.5Mb 处[396]。

人类胚系 V_λ 基因座

多年以来,在人及小鼠的 V 基因座中,关于人 V_λ 系统的特性知道的最少,但近年来关于 V_λ 区深入细致的克隆、测序及作图[168,397]以及最终对覆盖整个基因座的 1 025 415bp 长的区域进行的全序列分析,使该基因座相对不清楚的问题大为改观[149]。该基因座含大约 36 个可能有功能的 V_λ 基因(在 10 个家族中)、33 个假基因、34 个残缺体(含因插入或缺失而被严重破坏的 V_λ 样序列)。(与在其他基因座发现的情况一样,确切数目可因单体型和分析方法不同而不同。)在可能有功能的基因中,通过与 cDNA 序列相比,发现仅有约 30 个是表达性的。在人类簇集性 V_λ 中有 VpreB 基因,也有几个与 λ 系统无关的基因和假基因。全部 V_λ 序列的转录方向相同(像在 J-C 簇中的一样)。对 1Mb 序列的分析发现了几个内部重复的片段(其中有些含 V_λ 区)。最大的和表达频率最高的 V_λ 基因家族距 J-C 簇相对较近,大多在近端 400kb 以内。有趣的是,这些家族在序列上与鸡、马、绵羊等种系的主要表达轻链亚型的 V_λ 基因的序列最为相似,而 BALB/c 鼠的 V_λ 基因与表达频率最低的人类家族最为相似。

联合多样性评估

在 DNA 重组技术时代以前,抗体多样性的来源很神秘,以至提出了多样性产生(generation of diversity, GOD)的问题。过去 20 年所获得的对抗体基因的认识已阐明了胚系 V 区库的遗传多样性及前述重组机制而导致的多样性(重组机制有联合倍增、重组点的灵活性、N 和 P 核甘酸)。所有这些多样性元件提供了一个巨大的潜在库,以致某些研究者认为没有必要再去设想经体细胞突变来进一步增加多样性。作为一个评估胚系和重组多样性作用的草案,假定有 39 个功能性 V_H 基因、27 个 V_κ 基因和 30 个 V_λ 基因来形成不同抗体的数目。对 κ 序列而言,有 27 个(V_κ 基因)× 5 个(J_κ 区)× 2(一个反映因灵活重组而导致的残数为 96 的变化性的保守乘数)种变化,产生 270 种产物。对 λ 序列而言,有 30 个(V_λ 基因)× 4 个(J_λ 区)× 2(灵活性乘数)种变化,产生 480 种产物。所以,总的 V_L 可能性为 270 + 480 = 750 种。针对 V_H 序列,有 39 个(功能性基因)× 23 个(D_H 片段)× 4 个(J_H)× 4(D 片段两端的灵活性乘数)× 3(D 区可能的读框)= 43 056 种变化。若轻和重链随机连接形成 L_2H_2 抗体分子,那么不同组合数目为 $750 \times 43\ 056 = 3.2292 \times 10^7$。此估算忽略了实际存在但难于定量的致多样性因素(如 N 和 P 核苷酸插入)。即使忽略了这些因素,该计算方法也能说明正常状态下,如何使用有限数量的核苷酸总数通过在不同序列元件间进行灵活重组而大大增加潜在序列的多样性。

143

尽管上述机制提示可形成巨大的文库,但也还要考虑倾向于使实际组合多样性减少的一些限定因素,特别是在个体发育早期。例如,并非轻链和重链的每一个可能的组合都产生一个功能性抗体分子,因为在体外重链和轻链重联系实验表明,某些杂交分子(由来自不同抗体的重链和轻链形成)相对不稳定。与之相似,

V、J(或 V、D 和 J)间的连接并非完全随机。关于胎儿前 B 细胞杂交瘤的 V_H 基因选择上有明显倾向的证据已经提及。在鼠类,这些杂交瘤倾向于使用来自 V_H7183 和 VQ52 家族的基因。另外,胎儿或新生儿 VDJ 连接缺乏 N 核苷酸,并倾向于在重组序列间形成穿越序列一致性延伸短的 VDJ 连接。这些效应降低了重组连接的多样性,从而可能反映了一种保证年轻个体一定抗体产生优势的机制。新生儿偏向性使用 V_H7183 和 VQ52 家族的现象不存在于成年 B 细胞中,但此偏向性提示有这样的可能性存在:即其他少见的明显重组偏向存在于成年个体,这些偏向令实际多样性少于简单假设基础上的计算结果。例如,已有报道,鼠 J_κ 重排优先使用 $J_\kappa1$,$J_\kappa2$[398,399],而人 B 细胞优先使用 J_H4[400],因此,如果全部可使用 J 区都以相同频率被使用,则这些 V 区对多样性形成的联合贡献可能会小于它们应当发挥的作用。

体细胞突变

早期的争论提示,在抗体基因中有体细胞突变的存在,其依据是联合多样性(按上述方法计算)的估算量虽然很大,但这种估算数量依然太小以至不能说明所观察到的不同抗体的实际数目。实际数目可通过结合一种特定抗原的 B 细胞百分率及有结合特异性的不同抗体的数目而估算出来,区分不同抗体的方法有等电聚焦、独特型特征鉴定或分析对抗原结合精细特异性。建立在对多样性总体评估基础上的此类争议被对具有限制性多样性系统的研究所取代,其中胚系及表达库可被更可靠地进行比较;此类研究提供了体细胞突变的可信证据。以下简要说明体细胞突变的一些主要特性(此内容将在第 24 章详述)。

体细胞突变的早期证据

甚至在重组 DNA 分析出现前,对来自骨髓瘤抗体的鼠系 λ1 链的氨基酸序列分析就提供了体细胞突变的第一个有力支持证据。因此当分析 21 个不同来源的骨髓瘤产生的 λ1 链的氨基酸序列时[401,402],发现有 12 个是相同的,它们代表 $V_\lambda1$ 序列的一个原型。其余的各种变异体都各不相同,通常表现为因单个氨基酸取代而与原型不同,这种取代可用单碱基变化来说明。重要的是,除了一种氨基酸取代外,其他各种氨基酸取代都是变异体序列特有的。研究得出如下结论:原型序列与一单独胚系基因相对应,而变异型由该基因的体细胞突变引起。此解释似乎与每一变异型序列只出现一次的发现是一致的;然而若有几个胚系 $V_\lambda1$ 基因,则期望相同序列出现几次。现在,基因克隆技术已证实仅有一个单独 $V_\lambda1$ 基因,证明了变异体确实为体细胞的突变产物。

通过进一步研究,在涉及小 V 家族的鼠 V_κ 或 V_H 系统得出了相似的结论,这些小 V 家族的胚系成员易于克隆。此系统的一个例证为针对磷酸胆碱(phosphoryl-choline, PC)的相对限制性鼠抗体应答。对一组表达相似 V_H 序列的 PC-结合性杂交瘤和骨髓瘤的序列分析,显示所有 IgM 抗体共有一种单独的原型序列[403]。与此不同,一些 IgA 及大多数 IgG 的 V_H 区相对于原型序列有散在的氨基酸替代。所有序列变异都是单一细胞系所独有的。与上面论及的 V_λ 系统相似,这些比较性研究提示原型序列反映的是一胚系基因,而变异体则为多种体细胞突变的产物。对与原型表达 V_H 基因同源的四种胚系 V_H 区基因的研究,表明只有一个基因可作为 PC-结合性 V_H 区的前体;而且该基因与原型序列完全匹配[404]。变异 V_H 序列仅见于 IgA 和 IgG 而不见于 IgM 的事实与 IgM 特异性产生与免疫应答早期的事实相一致,而体细胞突变发生在免疫应答晚期,该期与类型转换阶段相交叠;其他研究表明在 IgM 可见低频率发生的体细胞突变。

免疫应答中高突变的作用

为了了解在抗体应答中体细胞突变的作用,几组人员研究了小鼠免疫后不同时间的突变程度。对 p-偶氮苯砷(p-azophenylarsonate, Ars)、磷酸胆碱(PC)、流感血凝素、噁唑酮(oxazalone)及其他几种抗原应答的研究都提示初次免疫后的初始应答反应由无体细胞突变的抗体而引起。免疫一周后,突变序列开始出现,并在下一周内增多。加强免疫可产生有其他突变的序列。

在免疫应答晚期制备的许多杂交瘤可产生突变型抗体,这种抗体较免疫应答早期制备的杂交瘤产生的

未突变抗体(有时可泛称胚系抗体)的抗原亲和力高。向高亲和力转换是一个在(多克隆)抗血清水平上被认识已久的现象,称之为"亲和力成熟"。现在可将此现象解释为在随机突变的 V 序列池中选择性向高亲和力抗体发展的进化机制的结果。根据此模型,在动物初次接触抗原时,动物有一群 B 淋巴细胞可表达胚系(非突变)Ig 序列,这些序列来源于发生在免疫前的基因重排。由于可供使用的 V_H、D、J_H、V_L 和 J_L 序列的多样性以及广泛的重组可能性,一些 B 细胞将表达能以较小亲和力结合抗原的 Ig 分子。这些细胞因与抗原结合而被刺激增殖并分泌抗体。位于淋巴滤泡的活化 B 细胞也可结合抗原,并接受 T 细胞辅助;在应答的某一时间点,在这些细胞中,体细胞高突变机制被激活,从而使 GC 中的受刺激细胞的 Ig 基因产生随机突变。这些突变中有许多可降低相应抗体与抗原亲和力;的确,关于这些可明显降低亲和力的突变性抗体已有报道[405],这些突变抗体已获得了自体抗体的特异性[406]。随着抗原的清除,淋巴细胞所能接触的抗原浓度降低,此时只有呈现高亲和力抗体的细胞才可被抗原有效刺激;呈现低亲和力抗体或对自身抗原有亲和力抗体的细胞将注定发生程序化死亡(凋亡)[407~409]。高亲和力细胞的优先增殖并成熟为分泌性浆细胞将由血清中抗体平均亲和力的增加反应出来。当不与抗原接触后,这些高亲和力细胞将以优势群体被保留下来而作为记忆细胞;在继发接触抗原时,这些细胞可诱导快速高亲和力应答反应。在此模型中,亲和力成熟的动力(类似于种系进化的自然选择)是在低抗原浓度下选择高抗体亲和力。反复注射抗原可抑制亲和力成熟(可能是通过取消对高亲和力的选择压力)的现象提示了这种选择压力的重要性[410]。

144

体细胞突变的细胞变化情况

体细胞突变主要发生于淋巴组织 GC 中的 B 细胞[411,412],特别是在一个叫做中央母细胞的 B 细胞亚群中。这些细胞在 GC 的"暗区"增殖并产生特征性表面标志,这些标志包括 IgD、CD38 及花生凝集素受体[413,414]。每个 GC 都有少量抗原特异性奠基 B 细胞群集[412],并有一个少见的抗原特异性 Thy-1 阴性 T 细胞群[415]。GC 环境可促进 B 细胞与滤泡树突细胞(follicular dendritic cell, FDC)和 T 淋巴细胞间的接触。其中 FDC 可贮存、加工及呈递抗原,T 细胞可通过 CD40-CD40L 间相互作用而部分激活体细胞突变[416]。增殖 GC 的中央母细胞可使中央细胞增多,如果不被 FD 呈递的抗原或经 CD40 处理而导致的 T 细胞活化所挽救,那么这些中央细胞将按程序发生凋亡[409,417]。在此阶段,通过表达低亲和力抗体细胞的凋亡而实现对高亲和力抗体的阳性选择,但相反的凋亡也可被可溶性抗原所促进,后者的功能可能是选择性对抗自身抗体[408,418,419]。如前所述,受体"编辑"可能是 GC 中产自身抗体细胞的另一结局。选择存活或凋亡或"编辑"抗原信号特征尚未被完全弄清楚。GC 细胞群对凋亡的易感性与其表达有促凋亡作用的 Fas、Bax、p53 及 c-myc 等有关,同时还与凋亡抑制因子 Bcl-2 的下调有关。工程性上调 Bcl-2 表达的鼠 B 细胞可逃避抗自身反应性的选择[419a]。

生发中心的 B 细胞可能经历了几次连续的突变接选择的周期性过程。这样的设想得到了如下现象的提示:从 GC 组织分离单个细胞,经 PCR 扩增突变的 Ig 基因并行序列分析[420];分析结果可被组织成与体细胞突变的几个阶段相一致的家系树。关于连续突变的其他证据已在纯化记忆 B 细胞中有报道[421]。计算机模拟已肯定了体细胞突变和无突变选择的交替时段的高效性,故其可作为一种产生高亲和力抗体的策略[422]。尽管有体细胞突变正常发生于 GC 的证据,但在因缺乏淋巴细胞毒素 α 而导致无组织学上可见 GC 的小鼠仍发生亲和力成熟及体细胞高突变[422a]。

突变的分布及靶向

为探究体细胞的高突变机制,几组人员通过比较体细胞突变的重排基因及其胚系前体的序列而检测了 Ig 基因周围突变的分布。突变并不仅限于源于胚系 V 编码的序列,而且发生于 J 区及附近的源于 C 区基因上游的侧翼内含子序列。体细胞突变似乎簇集在 V(D)J 区,该区向上游延伸不超过 RNA 起始位点(少数例外),向下游直至一个约 1.5kb 的靶区。因此,针对涉及 3′ J_H4 片段的 VDJ 单位,突变向下游延伸要长于涉及 J_H1 的单位[423,424]。突变的中心特征提示一种特异性高突变机制可识别位于 VDJ 序列内或其附近 DNA 的一

些特征，并将这些特征作为突变靶点。

关于靶向高突变的V(D)J基因座的准确特性还尚未弄清。未重排的V_κ、V_H及DJ区通常不突变，这提示功能性靶区可能包括来自V和J的元件[425~427]；但未重排的μλ区可发生突变[428]。这种差异可能与未重排V_λ基因在B细胞中转录[429]，而未重排的V_κ基因却不转录[275]的事实有关。因此，支持V_κ和V_H高突变的V(D)J重组所提供的元件可能是V区启动子的附近到C区附近的增强子序列，这些元件可增强转录。Ig基因的特异性染色体定位对高突变来说可能并非必要，因为带有重排的可表达Ig基因(假定为在基因组中随机插入)的转基因鼠可在从杂交瘤克隆的转基因拷贝上发生体细胞突变[430]。

转移基因出现高突变的现象使得如下研究成为可能，即通过研究转基因结构改变对突变率的影响而探讨突变所需的序列。靶向高突变中转录的重要性可通过研究有或无两种与κ基因座有关的转录增强子之任一种的转基因构建体而得到证实，两种增强子分别是位于J_κ与C_κ之间的"内含性"增强子及位于C_κ 3′端的下游增强子。包括下游κ增强子和其他下游元件的重排κ转基因比无这些区域的相似构建体有更高的转录，同时也是更佳的体细胞突变靶[431,432,432a,432b]，然而去除内含性增强子可明显消除高突变[432]。进而发现，一个$V_\kappa J_\kappa$-C_κ转移基因(其中V_κ启动子的重复拷贝置于C_κ区的上游)可导致在两个增强子下游的1.5kb结构域上发生突变；该额外的启动子形成一个延至C_κ区内的新的突变结构域[433]。但是，高突变的启动看来并不是Ig启动子特异的，因为当用β珠蛋白启动子替代V_κ启动子后并不能取消高突变的发生[432]；非免疫球蛋白增强子也可促进高突变发生[434]。进一步研究发现，V_κ编码序列被人β珠蛋白基因或原核neo或gpt基因代替后，并不影响启动子下游的高突变发生率[435]。与此相对照，在一个类似的转基因构建体中，V_κ基因被CD72基因所代替后，尽管发生了高水平的转录[436]，但并没有靶向高突变，甚至一个高表达的V_λ-C_λ转基因没有发生突变[437]。总之，转录是靶向高突变的必要但不充分的条件，有关其他的需要因素还尚未确定。近来，一些可供利用的数据资料表明有如下可能性存在：即针对体细胞突变的V基因靶向并不十分特异，一些可在GC的B细胞中发生转录的非Ig基因也可发生突变[438]。在bcl6基因发生的体细胞突变是这种现象的一个代表性例子[438a]。

因为突变并非局限于高变(CDR)区，有时甚至会发生于内含子，所以高突变机制并不能区分编码区和非编区，也不能区分高变区和骨架区。在测序的Ig的CDR中出现的突变簇集可能部分源于细胞选择性重点表达CDR突变，这可能或者是因为骨架区的改变干扰了蛋白质的基本折叠；或者是因为CDR突变可导致对抗原的高亲合力，从而更加强烈地激活基因扩增(如上所论)。然而，在不能进行功能选择的Ig基因(如非功能性重排的VDJ等位基因或因加入终止密码子而阻止蛋白质表达的过路转基因)中，其突变热点和冷点已被识别，热点或冷点的产生显然是源于局部DNA的特征，这种特征可能会在靶向高突变的DNA结构域中发挥促进或抑制体细胞突变的作用。有可能是进化选择了可在CDR区产生突变热点的序列，目的是针对某些对抗原结合起至关重要作用的蛋白质而增强多样性产生的可能性[439,440]。

高突变的分子机制

关于高突变的分子机制目前尚不详。所观察到的突变很少可显示其突变的原因。所有四种核苷酸均可作为突变靶，且都有产物。关于转换(嘌呤-嘌呤及嘧啶-嘧啶的互换)和颠换(嘌呤-嘧啶互换)都已有发现，这种改变易发生于G-C碱基对[441]。小的插入和缺失较少发生。有意义是，在一非选择性过路V_κ转基因中，A和G核苷酸在编码链上较在非编码链上更易发生突变[442]；这种链极性现象(在人类V_H区也可见到)[443]，提示基因突变机制可能受一个可区分两条链的过程(如通过V的转录)所影响。

有一报道证明，在小鼠表达的V_H基因中的体细胞突变源于基因转换，即簇集性改变以一附近的相关V_H区为模板，该V_H区的序列与表达基因中所观察到的序列相一致[444]。在携带有一转基因构建体的小鼠中也可观察到明显的基因转换，相应构建体的设计是用来优化转换事件发生的可能性[445]。很明显，基因转换在鸡、兔的V基因[446,447](可能还有猪V基因[448])的体细胞多样化形成方面扮演了主要角色，而且其在胚系库

145

进化多样化中也发挥了作用[449,450]；但是目前还没有进一步证据支持基因转换在鼠或人 Ig 基因的体细胞多样化形成中的作用(甚至在基因转换可轻易被检测的情况下)[451]。的确，基因转换不能解释体细胞突变的许多例子(如在 $V_\lambda 1$ 基因和 J 区及其相关内含子中的突变)，原因是在胚系 DNA 中未发现密切相关但又有不同的序列(在重排基因的这些区域中，这种序列结构有助于核苷酸突变)。这种观点同样适用于上述实验中靶向高突变的原核生物转基因。

发现在 Ig 基因中，靠近体细胞突变核苷酸的序列包括直接重复序列和回文序列，这一发现提示这些序列在体细胞突变中有一定作用[452]。同时这一发现进一步提示在对 DNA 缺口或裂隙进行修复的过程中，有错误倾向的多聚酶也可能导致突变[453]。因为有几种 DNA 修复缺陷的病人或小鼠似乎也能够发生 Ig 体细胞高突变，说明受影响的基因并非依赖于此过程[454,454a]。

最近的一个研究模型推测，与转录相伴随的修复过程是基因突变的原因之一[433]。在一种模型中认为，GC B 细胞特异的突变子蛋白可在启动子处加入转录复合体，导致复合体在不同位置发生转录暂停。这种暂停将诱发无故的与转录相伴随的修复过程，这一过程偶尔会产生错误。在一个细胞中的多轮转录可反复提供经这种机制而诱发突变的机会。在每一轮转录过程中，突变子蛋白会在较后期阶段随机加入到转录复合体，这可以用来解释为什么在与启动子的距离增加时，突变频率会不规则下降。这一模型与转录起始位点和突变的 5′边界区具有的明显相关性是一致的[454b,454c]。

最近的一个实验提示，在体细胞突变中有错配修复基因 Pms2(大肠杆菌 mutL 的同源物)的产物出现。在该实验中发现，在一个 Pms2 敲除的等位基因植入一种小鼠[即准单克隆(quasimonoclonal)鼠，简称 QM 鼠]中，将工程化重排 $V_\kappa J_\kappa$ 和 VDJ 基因经同源重组而敲入相应的胚系基因座[454d]。尽管 Pms2 突变通常可在大多数组织导致突变率增加[454e]，但 B 细胞中免疫球蛋白基因的体细胞突变却无明显增加(与带有正常 Psm2 的 QM 鼠相比)[454d]，这提示 Psm2 活性对 Ig 基因高突变有作用。通过转换校正新合成链的常规参照系(代之以经校正相反链而使突变保存于该链上)，使得错配修复机制在理论上参与了 Ig 基因的高突变。

下述发现提示了 IgD 在体细胞突变中的一重要但尚未阐明的作用，该发现是：带有纯合 C_δ 基因靶向破坏的小鼠，在亲和力成熟方面有缺陷(尽管是不完全缺陷)[455]。相反，来自人类扁桃体 GC B 细胞的一个 $IgM^- IgD^+$ 亚群的体细胞突变增加[456]。

近期在体外观察初级 B 细胞[454f,457](或细胞系[441,458])突变过程的系统和快速检测体细胞突变手段的发展将有助于对体细胞突变的研究[459]。

146

免疫球蛋白基因进化：对 V 基因组装的不同作用

免疫球蛋白超家族的进化及 V 装配性重组

Ig 基因的三个家族(κ、λ 和重链)及与之密切相关的 TCR 基因的四个家族(α、β、γ 及 δ)构成了一个功能强大而灵活的分子防御机制，这种机制使机体能够对抗环境中大量存在的多种多样的病原性微生物，并使自身得以生存。如此复杂而精细的防御系统是如何进化的呢？一个阐明 Ig 基因进化的途径是；通过比较不同现代生物物种的 Ig 基因系统而了解遗传史。关于这些基因更古老的历史可通过检测非 Ig 基因的同源性而进行了解。由于越来越多的非 Ig 基因被证实在序列上与 Ig 基因有相似性(因而推断它们具有同源性)，故这些基因就组成了 Ig 超家族[460,461]。这一家族名反映了这样一个事实：即 Ig 基因是第一个待进行序列分析的成员，但它不能体现超家族与 Ig 和免疫系统之间的功能关系。Ig 超家族的明显标志是 Ig 的结构域：其大约为 100 个氨基酸，通常由一个单独外显子编码，包括一个内部二硫键环，该环延伸大约 60～70 个氨基酸。尽管一级结构序列并不十分相似，但所有 Ig 结构域都有大致相同的三维结构(最初发现于 Ig 中)，该三维结构包含七条大致平行的链，这些链可形成两个 β 片层折叠。这种假设已在超家族的几个成员中得到证实，这些成员包括 β_2 微球蛋白、CD4、TCR-α 和 β 链及 MHC Ⅰ 分子的 α3 结构域。

几乎免疫球蛋白超家族中的所有成员都属膜蛋白，通过与其他膜蛋白接触而进行细胞间相互作用，从而

执行其功能。由于介导这种相互作用的 Ig 超家族成员可在甚至是最原始的后生动物中也有发现(如存在于黏菌中的黏附分子[462]),所以 I g 结构域可能确实是很古老的,它明显早于超家族成员防御微生物入侵功能的形成。另一方面,无脊椎动物免疫球蛋白超家族的几个成员在防御微生物方面确实有一定作用(如软体动物的防御分子[463]和昆虫的溶血素[464]),这些成员甚至有 Ig 基因的某些经 Rel 家族转录因子进行基因调节的特性[465]。这些例子提示,该超家族的某些成员可能在一原始免疫系统中发挥作用,而该原始系统可能存在于软体动物、昆虫和脊椎动物的共同祖先。

尽管现在已知的大多数超家族成员的 Ig 结构域由一个单独外显子编码,但是也有几个成员(如 CD4、N-CAM 及蟾蜍 CTX 蛋白)由两个不同的外显子编码[466,467]。尚不清楚这种结构是否表明 Ig 结构域来源于两个原始半结构域经相互联系而形成,这种联系包括外显子置换(结果在现在的大多数超家族基因中发生后者丢失内含子)或将一个内含子导入事先存在的单个外显子性的 Ig 结构域。几个相互关系较远的超家族成员似乎更像 C 样或 V 样,这提示它们在原始 C 结构域和 V 结构域分离后才出现。然而,这种事件所形成的序列尚不能被确定,而且已知 C 样和 V 样基因的例子显示出分开的半结构域结构。

在现代 Ig(和 TCR)基因中发现的分离 V 区元件(V、D_H 和 J)是否反映了在一个祖先基因中处于连续状态的起初不相关的序列或元件的片段化这样一个联系呢?关于此问题的提示性发现来源于对 CD8 基因的分析。CD8 抗原和 κIg 之间的一种谱系联系不仅体现在序列的相似性,而且体现在位于鼠 6 号染色体和人 2 号染色体上的这些基因的连锁性方面。已发现 CD8 基因含有一个 J 样序列片段(该序列与 V 样序列相连[468]),这提示 V 和 J 序列在一原始祖先基因中可能是连续的。现在所观察到的 V 和 J 的分离可能是由于在一类似转位的事件中使一 DNA 插入二者之间所造成的(图 5.17)(正如最初 Sakano 等[6]所假设的一样)。第二种类似插入可能导致 D 序列与胚系 V 区分离(如图 5.17 中所示)(尽管还提出了另外一种涉及单个插入的假设[469])。在经转位事件而使 V、(D)和 J 分离后,为了使它们重新组装,就需要证明有一种针对 V(D)J 重组的包括事先或同时发生事件的机制(假设基于 RAG 蛋白)。由于在无 V(D)J 重组的原始物种中没有发现 RAG 样蛋白存在的证据,所以同时获得 RAG 基因和分离胚系 V、(D)和 J 的插入可能是合理的解释,从而促使去思考这样一个问题:即 RAG 基因被携带于转座子样元件(两端为 7 碱基和 9 碱基的 RSS 重复序列侧翼),该转座子元件可插入到原始 V 区中。这种转座子可能来源于一个原核元件的旁转移。由于在现代鲨鱼和所有高等脊椎动物中不仅发现有 RAG 基因[208],而且有 Ig 和 TCR 基因的 V(D)J 重组[470~472],所以推测在大约 400 万年前,这些序列插入到原始鱼类的基因组中;但在稍微更原始的七鳃鳗和八目鳗鱼类中未发现任何上述基因插入现象。有趣的是,鲨鱼 RAG-1 基因与 λ 噬菌体的整合酶(integrase, INT)基因(以及酵母 DNA 修复蛋白 RAD16 和 18 及人类乳腺癌易感基因 BRCA1)有序列的相似性,而 RAG-2 与细菌整合宿主因子基因有序列的相似性。与具有重组相关功能的现代原核基因的相似性支持了 RAG 基因源自原核的假设。还有,如前所述,经 RAG 催化的 DNA 进行重排的机制(形成一个发夹结构中间体)与原核 DNA 重组机制有某些相似性。

V(D)J 重组可能使原始 Ig 超家族具有了发生体细胞多样化的最初潜能,即重组位置的灵活性导致了多种不同的连接。据推测一旦多样性在识别外来抗原中具有了功能意义,那么克隆激活机制将得以进行,等位排斥将变得重要并集中于应答的特异性上。可以相信,在 Ig 和 TCR 基因分离之前,这些特征就已经出现。

多样性的不同进化机制

鲨鱼、鸡及兔的 Ig 基因为研究小鼠和人类所采用的更为人们所熟知的进化途径提供了有趣的对照。鲨鱼的重链基因座由以 10kb 为单位的多重重复组成,而 10kb 单位包括分离的 V、D、J 和 C_H 元件[65,473]。V、D 和 J 元件与重组信号元件相联系(重组信号元件与哺乳类同源物相似)。通过比较复制单位间的序列证明,不仅在胚系 V 基因间存在差异,而且在 C_H 基因间也存在不同。如果 VDJ 重组像假设的那样只发生在这些重复单位之一,那么多样性将来源于连接的灵活性,而不来源于联合重复;鲨鱼也将缺少由类型转换而提供的多样性,因为一个特定的 V 区总是与一特异性 C_H 区相联系。这种有限的系统允许鲨鱼产生特异性抗体

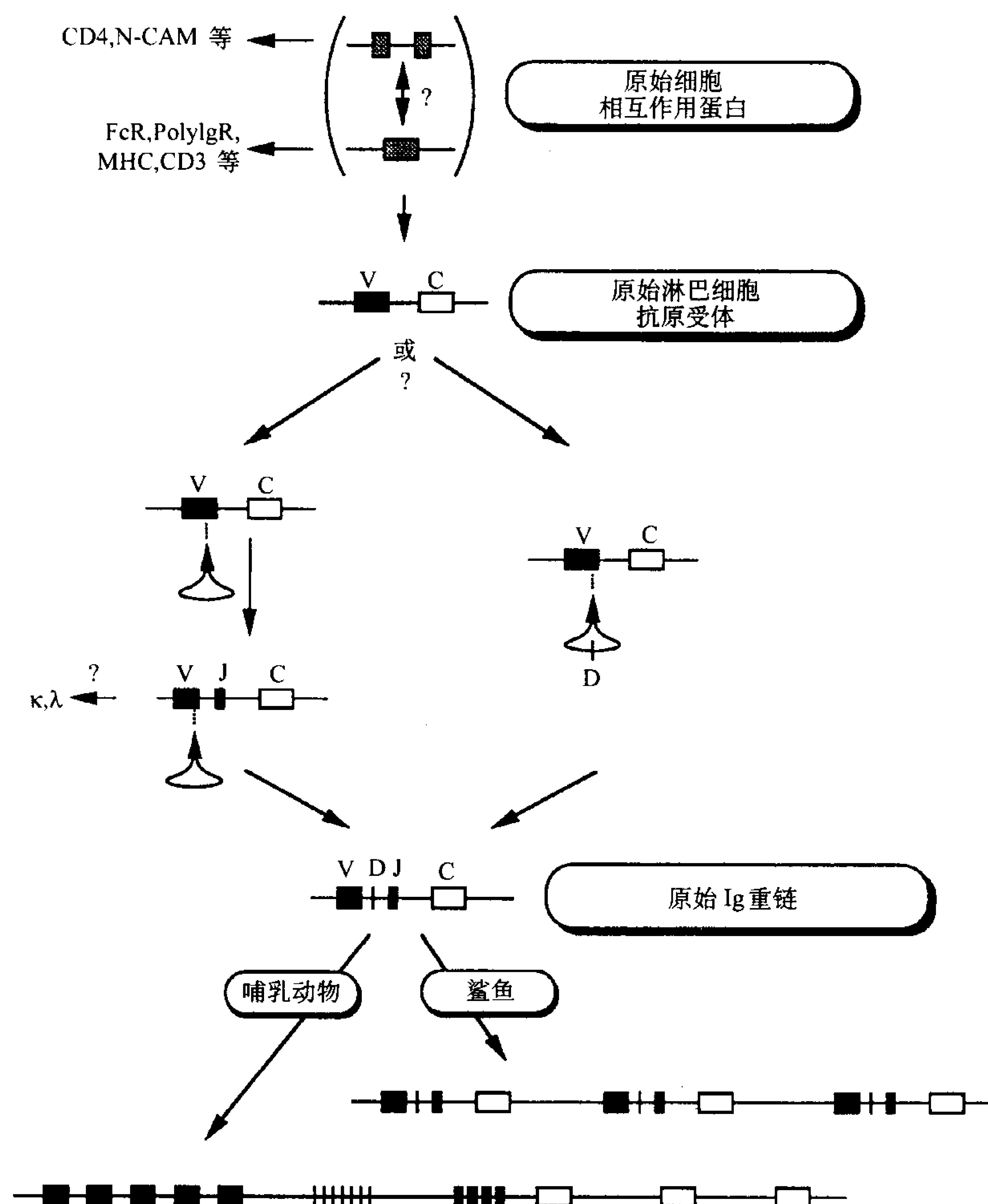


图 5.17 Ig 基因的进化。推测 Ig 基因超家族从原始细胞相互作用结构域进化而来,这些结构域先行多轮重复,然后借助不同的重复性拷贝而进行个体突变和特异化。因为 Ig 和 TCR 系统共享特异的 V 和 C 结构域以及 V 组装重组,所以这些特性可能在这两个抗原受体系统分离之前就已行进化。断裂 V 区的进化(需要将 V、D 和 J 进行组装形成一个功能结构域)可能是由于一个单独的插入事件或两个分别的插入事件所导致的,在一个单独插入事件中,在原始的 V 区的 V 和 J 之间插入了一个 D 序列和侧翼 DNA(右侧途径),两个分别的插入事件见左侧途径。在鲨鱼和哺乳种系,经不同的重复途径而使原始重链基因进化。鲨类显示出完整 VDJC 单位的重复,而在哺乳类中表现为每个元件的分别重复。

应答,但是这些应答在不同个体间没有什么差异(尽管也有体细胞突变发生)。推测克隆选择机制在鲨鱼中起作用。

在鸡类中多样性产生的机制又有不同。对 λ 系统已进行了专门研究[474,475],胚系 λ 由距离典型 J_λ-C_λ 单位上游 1.7kb 的一个 $V_\lambda1$ 基因组成。所有表达的 λ 蛋白很明显是来源于涉及该 $V_\lambda1$ 的 VJ 重组。$V_\lambda1$ 上游有 25 个 V_λ 假基因。这些假基因自身不能编码可变 V 区,也不能与 J_λ 片段重排。但是它们可通过体细胞基因转换过程而使得它们的序列延伸到重排的 $V_\lambda1$ 之中,从而有利于多样性的产生;表达性 V_λ 序列显示出多种序列“补丁”,这种序列与 $V_\lambda1$ 有别,但与特异性假基因有精确的匹配性。因此,与在小鼠和人类中发现的体细胞高突变相比,表达鸡 λ 基因的个体未显示出随机突变的证据,而且在重排 VJ 单位的侧翼内含子序列中也无序列改变。尽管在此系统中完全没有组合连接多样性,但鸡类仍具有较高水平的异源性 λ 应答,原因是

148

在 V 片段的不同区域上发生了多轮基因转换事件。一种相似的基因转换机制对于在鸡类重链系统中产生的多样性也起了重要作用。

兔子的 Ig 也希望能像两类研究最多的哺乳类(小鼠和人)同源基因座的结构特点一样,但实际情况却更加有趣。兔 Ig 的一个特别令人疑惑的特点与 V_H 同种异型表达有关。70% ~ 90% 的兔抗体表现为经血清学确定的三种同种异型之一,三种血清型分别为 a1、a2 或 a3。表达一种优势同种异型的小鼠可将此特性传给其后代,就像有三种等位基因的一个单独基因按孟德尔共显性规则被传递;然而,兔基因组 DNA 的 Southern 杂交显示有几百条 V_H 杂交带。在有大量 V_H 基因的前提下如何解释同种异型表达的简单遗传性呢? 正如最早由 Knight 及其同事证明的那样,其答案是:大多数 D 近端 V_H 区(称为 V_H1)的重排可说明大多数重链在兔中表达的原因,这种 V_H 基因可编码特异性氨基酸(被确定为 V_Ha 同种异型)[476]。其他 V_H 区片段主要通过可改变 V_H 序列的基因转换事件而促使多样性发生[447];另外,体细胞性点突变也可明显发生[476a]。这些上游的 V_H 区可以偶尔地发生功能性重排,这或许可说明在正常兔中有 10% ~ 30% V_Ha 同种异型-阴性抗体产生的原因。这种重组的可能性可从用一种有 V_H1 基因缺失的兔子(名为 Alicia)进行的实验中得到提示;这种兔子不再产生正常数量的抗体,所产生的抗体中大多数为 V_Ha 同种异型阴性。基因转换也有利于牛 Ig 多样性的产生[477]。

毋庸置疑,通过检测其他有机体的 Ig 基因将会提供其他更为详细的有关这些重要座位进化的资料,而且将能够更好地理解多样性产生的不同策略。这种研究还将有助于阐明 Ig 基因、同源 TCR 基因和其他不参与免疫防御的 Ig 超家族成员之间的进化关系。

免疫球蛋白(Ig)基因表达调节

基因调节的一般原理

近几年来,对 Ig 基因表达调节机制的研究非常热门,该研究是从分子水平上了解发育和分化过程的一个重要部分。Ig 仅由 B 淋巴细胞合成;即使在同一细胞系中,这些 Ig 也在不同发育时期有不同的表达量。虽然蛋白质合效成率在 mRNA 的转录、加工、运送、固定和翻译水平上均可受到调节,但在转录水平上的调节更为引人关注,因为在已研究的大多数系统中,转录均为限速步骤(尽管 mRNA 稳定性的改变也对蛋白质合成效率具有明显而重要的影响[478])。编码淋巴细胞抗原受体(Ig 和 TCR)的基因座是很独特的,在淋巴细胞成熟的最早阶段,其完整基因是不存在的,而仅有胚系前体存在。因此,Ig 基因表达调控必然涉及 Ig 基因重排过程。正如本章其他部分所述,这些过程是相互联系的,故就 Ig 基因重排而言[无论是 V(D)J 聚合,还是类型转换重组],转录过程都是必不可少的。鉴于此,对非重排基因座的转录调节也需进行清楚地分析。

顺式调节

基因转录一方面受到顺式作用调节——即受到基因侧翼的遗传元件中 DNA 序列的调节;另一方面也受到反式作用调节——即受到基因环境的调节。就大部分基因而言,有关表达调节的研究一开始都集中在顺式作用元件对基因表达的调节上。一些关于基因表达调节的认识是通过在细胞或动物中研究调控序列的自发突变或缺失如何影响基因表达而获得的。然而,大部分进展是通过如下方法取得的:即将一个新的调节序列插入含有一报告基因的 DNA 结构中(报告基因的表达可很容易地检测),然后将此重组结构重新转染于真核细胞,继而通过检测报告基因的表达而了解新调节序列的功能。在某些实验中,检测实验仅在转染后 2 ~ 3 天就进行,时间如此之短以至大部分转染 DNA 还处于不稳定的附加体状态,这种转染实验称为瞬时转染。与瞬时转染相反,在另外一些实验中,则通过设计使产生稳定的转化子,在这种转化子中,工程化 DNA 插入到细胞染色体中,这种转染称为稳定转染。除了细胞转染外,还可通过将类似 DNA 重组结构导入小鼠基因组,从而产生转基因小鼠。通过在转基因动物各种组织中检测插入的基因表达来评价候选调节序列是否可

像在所在原基因中一样具有控制基因进行组织特异性表达的功能。

通过这些转染和转基因实验，已有三种主要类型的真核细胞顺式调节元件被确定。启动子是定位于转录起始点附近的一段DNA序列，它能启动RNA的转录沿特定方向（如沿基因的编码序列方向）进行。增强子也是一段DNA序列，其可增强转录，其与转录起始位点的距离是可变的，且其方向可正可反。沉默子下调转录，它像增强子一样，方向可正可反，且与转录起始位点的距离更加不定，关于其作用机制目前尚未完全弄清。所有这三类元件通常只在特定类型细胞中激活，从而参与相关基因的组织特异性表达的调节。另外两种顺式作用元件在真核细胞染色体中的作用特征也已经被确认，因而也应引起重视。基质附着区（Matrix attachment region，MAR）负责将DNA附着于染色体支架蛋白上，可能具有引发DNA链局部不配性的功能[479,480]。基因座控制区（Locus control region，LCR）最初发现于β珠蛋白基因座[481]，其是由更小的各自具有增强子功能的元件组成的复杂调节区。LCR在比增强子作用更远的距离水平上影响染色体结构和基因的活性。在实际操作中（如在转基因重组结构功能的测试中），根据它们控制相关报告基因表达的情况（这种表达不受外来基因在染色体DNA中整合位置的影响）来进行定义。与此相对应，总的来说，不含LCR的结构在不同的转基因小鼠中，据整合位点的不同，其表达水平有很大差异。

149

图5.18展示了目前已知的小鼠Ig基因座中调控序列的概略图（大部分人类基因座类似区域也已报道）。在所有三个基因座中，即κ、λ和重链基因座中，启动子位于紧靠每一个V基因上游的侧翼DNA中。在浆细胞瘤中，仅有重排V区的启动子活化，而上游非重排$V_κ$或V_H区中相似的启动子则处于失活状态。这一发现引发了对J区下游其他可能具有激活毗邻重排V区启动子功能的调节序列的研究。对κ和重链基因座的J-C区中调控区进行了筛查，结果发现在两个基因座的J-C区内含子中均有增强子存在。（λ基因座的J-C区内含子中显然没有增强子存在。）在κ、重链基因座的近内含子的增强子处，发现了沉默子的存在，其功能可能是抑制非B细胞中相关增强子的活性。在发现内含子增强子后，有两项观察使人们期待在C区基因3′远端发现其他的增强子。第一，发现几种骨髓瘤由于发生了自发性缺失而导致表达性重链基因的J-C区内含子性增强子丢失后，骨髓瘤仍然能够以正常水平表达这一基因。这一发现与在未缺失的DNA中还有一额外增强子存在的观点是一致的。第二，在TCR相关基因家族中，于C区基因的下游发现了增强子。接下来的研究揭示了κ和λC区基因3′侧翼区内增强子的存在，同时在$C_α$基因的3′侧翼区也有一增强子存在（$C_α$基因是重链基因座中最多见的下游恒定基因）。

这些增强子、沉默子和V区启动子也许足以解释完整且组装好的Ig基因的转录；但其他来自Ig C区基因的起初无活性的转录物可在V区组装或类型转换重排时被激活。这些转录物也受启动子控制，已经发现在某些情况下，这些转录物在相关DNA重排的调节中具有重要作用。

启动子、增强子和沉默子均由包含几个短序列基序（motif）的序列簇组成，每个基序都能被某一（或某一些）特定核蛋白所识别。有些基序可出现于一个以上的增强子中，甚至可被增强子和启动子所共享。在如下讨论中，几种重要的鼠类调节区以及它们的功能基序与有关核蛋白家族一起描述，这些核蛋白家族能够通过与这些基序结合而调节Ig基因的表达。每个鼠类调节区都可在人类中找到明显的同源区，这些同源区常常有很多相同的保守性核结合基序。在一特定的增强子中，多基序的存在使对单一基序作用的分析变得复杂。在某个特定基序中进行的人工突变通常很少影响整个增强子的活性，而且有时含单一功能基序的人工重组体经常对它自身不显示增强子活性。现有两种描述这些基序功能的策略。在一个含有部分基序缺失增强子的重组体中，各剩余元件的作用可通过变异效应进行检测。另一描述策略是，包含几个多拷贝化单一基序的人工增强子可能有增强子活性，而只含单一拷贝的增强子却没有活性。结合增强子基序的蛋白通过促进（沉默子时则抑制）启动子转录机器的组装而介导调节功能。蛋白结合性增强子与启动子之间的相互作用提示间隔DNA形成了一个巨大的环。许多调节蛋白只存在于特定组织或特定类型的细胞核中，这一事实可从理论上解释特定基因为什么能在某些类型的细胞中特异性转录。典型情况下，上调或下调Ig基因表达的外界刺激信号（如细胞因子或抗原结合）通过改变DNA结合蛋白质的量或活性而发挥作用。

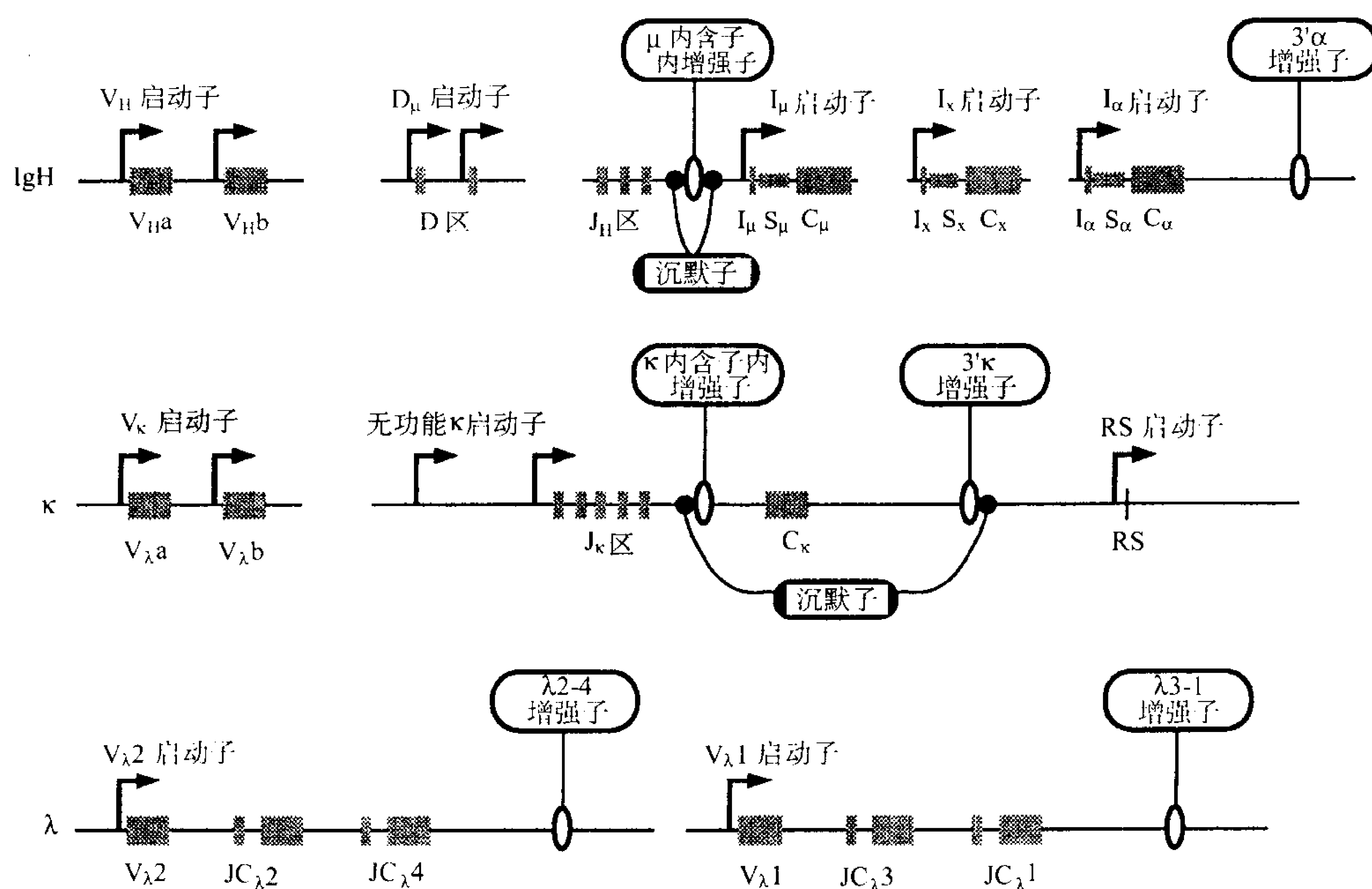


图 5.18 鼠 Ig 基因座上的增强子和启动子。图中显示了三个鼠 Ig 基因座的简略图谱,这三个基因座是:IgH(顶部)、κ(中部)和 λ(底部)基因座。图中以垂直椭圆形显示了 6 个已知 Ig 增强子,以黑圈显示了 4 个沉默子区,以指示转录方向的箭头表示不同的启动子。图中未显示已报道的位于鼠 DQ52 上游的增强子。

反式效应类型

研究较深入的基因表达反式调节机制是:通过改变细胞核中能与顺式调节元件相作用的 DNA 结合蛋白的含量而进行调节。然而其他研究反式调节的方法也不应忽视。一种正式归为反式效应的基因激活方式是在表达基因中改变 DNA 染色质的环境,这种改变通常通过核酸敏感实验进行检测。在这些实验中,首先将分离出来的胞核用不同浓度 DNase I(或包括限制性内切核酸酶在内的其他核酸酶)处理,然后将 DNA 进行纯化,用限制酶消化,继而用 Southern 印迹进行分析,在杂交中使用针对被检测基因的探针。通常情况下,当胞核来自表达特定基因的细胞时,该表达基因对 DNase I 的敏感性明显高于不表达基因。此即,经低浓度 DNase I 处理后,带有表达基因的 Southern 印迹带消失,而不表达基因(或它们的 Southern 印迹带)则相对不受影响。此外,适宜的 Southern 印迹还能显示出表达基因的 DNA 中某些片段对 DNase I 高度敏感;这些片段很可能与基因的调节区位置相一致,原因是调节蛋白与这些调节区序列的特异性结合位阻了这些 DNA 区域与核小体的接触,从而使它们易与核酸酶接触而水解。

另一个染色质相关的基因活化方式是 DNA 甲基化程度。哺乳动物 DNA 中大多数 CpG 双核苷酸中的胞嘧啶残基是甲基化的,但特定细胞中表达的基因通常在该类型细胞中相对来说低甲基化[482]。CpG 甲基化程度可很方便地通过 CCGG 序列中 CpG 双核苷酸的数量进行评价,CCGG 序列有两种限制性内切核酸酶的识别位点:其中 *Msp* Ⅰ在该位点不管内源性胞嘧啶是否甲基化均可进行切割,而 *Hpa* Ⅱ则仅切割完全非甲基化位点。Southern 印迹策略能检测这种差别,从而用于比较活化基因与非活化基因的甲基化。μ 和 κ 链 C 区基因都对 DNase Ⅰ敏感,且在前 B 细胞、B 细胞和浆细胞中这些基因低甲基化,但在非淋巴细胞中这些基因对 DNase Ⅰ抵抗[483~487]。进行类型转换的细胞,作为转换重组靶的 C 区基因低甲基化[483,488]。低甲基化与 C_H 基因转录形成无活性转录物有关。在 B 细胞 V 区基因中,仅有重排和转录的 V 基因通常显示低甲基化和活化基因对 DNase 敏感的特点[484,489]。在 Ig 重链因座,已发现 DNase Ⅰ高敏位点与内含子性增强子及下游增强

子有交叠[486,490,491]。在 κ 基因中,高敏位点位于启动子和增强子以及增强子 5′侧翼区的一个位点[492,493]。

研究反式作用蛋白结合顺式调节基序的方法

近来有关反式作用蛋白研究是通过确定这些蛋白质与已知顺式作用启动子和增强子之间的相互作用来实现的。在体外,已有几种技术可用于检测核蛋白与特定调节序列的结合,其中一些方法甚至可用以评价粗蛋白混合物状态下序列的特异性结合。最简单的技术是 EMSA。该方法中,需一段短的(典型的为 30~300bp)同位素标记的双链 DNA 片段与用盐溶液提取的胞核蛋白混合物相互作用;然后将 DNA 于丙烯酸凝胶上电泳,蛋白质与 DNA 的结合情况可通过与游离 DNA 探针的移动度进行比较而判断,在胶中蛋白质-DNA 混合物的移动度较游离 DNA 探针下降。减速条带上的序列特异性通过如下方法证实:①其结合强度会因在作用混合物中加入与标记探针序列相同的未标记寡核苷酸而竞争性消减;②类似的无关序列寡核苷酸则无此消减效应。移动度减慢的混合物中即含有结合性蛋白质,如果有已知抗体与相应蛋白结合,则可使条带移动度进一步降低,据此可确定相应蛋白质是一已知蛋白质。另一种有效方法是 DNA 足迹法,其可使与蛋白质结合的特定 DNA 序列可视化。该方法中,所制备的蛋白质与链一端用同位素标记的 DNA 相结合。然后 DNA-蛋白质复合物用 DNase 温和处理以使其每条链仅被酶切割一次;然后将 DNA 从复合物中提纯,置于变性丙烯酸凝胶上电泳(同时有 DNA 标准),从而检测出放射性标记链上 DNase 作用过的位点。在起始 DNase 温育步骤中,由于核蛋白能同放射性 DNA 片段紧密结合,从而保护 DNA 不被核酸酶水解,由此可推测出结合蛋白的位置在不被核酸酶切割的位置。

一旦检测到一种蛋白质能与 DNA 中重要调节元件结合,对相应蛋白质的进一步的研究则需克隆其基因。克隆基因的方法主要有两种。第一,用经典分组分方法将蛋白质提纯。在继分组分纯化结合蛋白后,用 EMSA 或 DNA 足迹法进行检测。典型的纯化过程是过亲和层析柱,作为结合靶的 DNA 序列被固定于柱介质中;与 DNA 序列特异性作用的蛋白质亲和力高,据此可使之从混合物中分离出来。当蛋白质提纯后,其氨基酸序列可通过酶解片段法获得。这些序列可用以设计 DNA 探针来从 cDNA 库中钓取目的克隆。另一个克隆方法[494]则绕过了蛋白质提纯这一步。以表达结合蛋白的细胞为材料,以 λgt11 为载体构建 cDNA 文库,所获工程化噬菌体可在宿主菌中转录和翻译所插入的 cDNA 序列。将库性病毒噬斑转印于膜支持物,然后通过与放射物标记的目标 DNA 结合序列相作用而筛选结合蛋白。表达 cDNA 编码结合蛋白的噬斑由于相应蛋白质与标记探针的结合而在放射自显影后的膜支持物显示出斑点。最后分离与噬斑相对应的克隆加以研究。

提纯的核蛋白通过序列特异性方式结合 DNA 调控序列这一事实并不能证明这些蛋白质一定介导了 DNA 序列的调节功能。然而,如果一个编码蛋白质克隆的转染可诱导与增强子/启动子基序(该基序能与克隆蛋白结合)相连的共转染报告基因的转录,那么就可据此推断相应增强子结合蛋白发挥了调节功能。经上述实验已证实了几种 Ig 启动子和增强子结合蛋白的功能,这些结合蛋白也因此被认为是转录因子。某些蛋白质仅见于 B 细胞,因而可能决定了 Ig 基因表达的 B 细胞特异性。另外一些蛋白质则广泛存在。诸多 Ig 基因的调节子与哺乳类原癌基因及果蝇和酵母的基因同源,这提示它们可能有相同的远古进化祖先以及这些蛋白质在调控细胞代谢上具有十分重要的作用。

下面将讨论几种与顺式调节元件相作用的蛋白质,其中大部分讨论基于对鼠类 Ig 基因的分析,因为对鼠类 Ig 基因已有广泛的研究。

V 区启动子中的顺式作用元件

八聚体基序

组装后 Ig 基因的转录起始于 V 区基因序列的上游。从它们在上游的位置来看,调节起始的启动子存在于每个胚系的 V 区基因,甚至存在于 V 区装配重组之前的 V 区基因。与很多真核基因一样,大多数 V 基因

启动子在其起始位点5′侧翼约25bp距离处有一TATA序列位点。TATA位点是转录因子TFⅡD和相关蛋白的结合位点，因此其在保证RNA转录起始精确位置的特异性方面扮演了重要角色。在所有类型的IgV启动子中另一个保守特征是与V_κ和V_λ基因相联系的ATTTGCAT八聚体的存在。然而在V_H基因的5′侧翼发现有反转互补序列ATGCAAAT的存在[495,496]（相同序列有时被鉴定为十聚体TNATTTGCAT或互补ATGCAAATNA）。V_κ启动子通常仅含有八聚体基序和TATA盒，而V_H和V_λ除有这些基序，还有其他特性的调节元件。IgV启动子中八聚体基序的保守性提示其在Ig基因的功能中起了很重要的作用。的确，在对含这个基序的构建体进行转染分析时，清楚地表明八聚体在启动子赋予B细胞特异性方面是十分重要的。无论是在Ig基因构建体中还是在异源基因中，在转染给B细胞后，如果八聚体发生缺失或突变，则会显著降低B细胞特异的启动子活性[497~501]。在体外B细胞核提取物转录实验时，八聚体也是需要的，然而对HeLa细胞提取物的转录无任何影响[502]。除了Ig基因外，八聚体还存在于几种其他B细胞特异性基因[包括B29(Igβ)[503]、CD21[504]、和CD20[505]基因]的增强子中。一个多聚化八聚体可充当B细胞特异的增强子[506]。

八聚体参与转录调控，一个令人不解的特点是：该序列同时也是几种其他基因启动子的功能组分，而这些基因的转录不是B细胞特异性的。这些基因包括疱疹病毒胸苷激酶基因、H2B组蛋白基因和U1、U2小核RNA基因。为了解Ig和非Ig启动子中八聚体作用疑点联系，已有几个实验室对与这些元件结合的反式作用核蛋白进行了分析。两种这样的蛋白质(分别命名为OCT-1和OCT-2)已被广泛研究，研究方法是先用EMSA实验，再用基因克隆[507~510]。这两种蛋白质有不同的组织分布。大多数细胞可产生OCT-1(又称OTF-1，NFA-1)，但只有B细胞和几种其他细胞类型(特别是活化的T细胞)产生OCT-2(又称OTF-2，NFA-2)。另有几种其他组织(如神经细胞、胚胎干细胞)特异的八聚体结合蛋白也已被报道。OCT蛋白均有一段相似的160个氨基酸的DNA结合域，这解释了它们在结合的特异性方面是一致的。在几种其他的结合类似八聚体的核蛋白中也发现了与OCT蛋白中DNA结合域相似的氨基酸序列。基于这一结合域便形成了一个核因子家族，该家族被命名为POU家族，POU的命名源于三个因子，在这三个因子中上述保守结构域最初发现时命名为：PIT-2、OCT1/2和线虫基因unc86。这种结构域包括一段75~80残基的POU特异的结构域(POU)，一个短的柔性连接子和一个与同源盒结构域同源的60个氨基酸片段(POU_H)(同源盒最早发现于调节果蝇发育的基因中，但近来发现其存在于所有动物甚至植物基因中)。POU结构域与ATGCAAAT序列中的ATGC相联系，而POU_H结构域与AAAT片段相联系[511]。

OCT蛋白已证明是转录因子，所用实验是用含八聚体启动子驱动的报告基因与有关基因一起转染成纤维细胞或HeLa细胞。依据在OCT的不同位置发生缺失或突变[512]后产生的效应及在OCT-1和OCT-2以及其他POU蛋白之间[513~515]进行不同结构域的交换(通过基因工程的方法进行)后产生的效应，已推断出OCT蛋白刺激转录所需的关键激活区。在POU结构域的N端，OCT-1和OCT-2都有一个富含谷氨酰胺的活化区，而在C端上，OCT-2有一个OCT-1不具有的特征：即有一个富含丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸的活化区。很明显，C端的这种差异对功能的影响是很重要的，因为交换OCT-1和OCT-2的N端造成的影响很小，而将OCT-1的C端结构域用OCT-2的N端相应部分替换后则赋予OCT-1明显不同的性质：即无论作为启动子还是增强子，均具有通过多重八聚体基序而激活转录的能力[506]。

OCT-2的B细胞特异性提示，此因子可能对V基因启动子中八聚体的活性十分重要，而且有一些证据支持此推断。然而，在B细胞系中[516]靶向破坏OCT-2基因既不对内源Ig基因的表达产生明显影响，也不对由含八聚体启动子驱动的转染基因的表达产生明显影响。进一步发现，虽然纯合的OCT-2基因敲除小鼠[517]会在出生后几小时之内无明显病理变化的死亡，但小鼠体内B细胞数量却大致正常，且B细胞在T细胞克隆激活下，能发生近乎正常的细胞增殖和Ig分泌[518]。这些结果提示，无论在早期B细胞发育，还是在T细胞活化的Ig分泌过程中，OCT-2对V区启动子活性都是不必需的，这可能是因为OCT-1在这些过程中的作用绰绰有余之故。另一方面，来自纯合的OCT-2基因敲除动物的B细胞在培养时，显示出明显的LPS与细胞因子联合诱导的Ig分泌缺陷及抗IgM诱导的增殖缺陷，这提示在这些信号通路中OCT-2依赖蛋白发挥了作用。

B细胞特异的OCT蛋白因其与其他蛋白质相互作用而变得十分复杂。一种来自B细胞的被称为八聚体

辅活化子的蛋白(OCA-B)最初作为基于 V_κ 启动子的体外转录的必需因子,而在 OCT-1 或 OCT-2 的亲和纯化产物中被检测到[519]。这种提纯蛋白已被几家实验室克隆,因此它有几个不同名字:OCA-B[520]、OBF-1[521]和 Bob-1[522]。OCA-B 与八聚体/OCT 蛋白复合物结合后,通过 OCA-B 的转录激活域而明显刺激转录[523]。OCA-B 蛋白不仅可与 OCT-1 或 OCT-2 的 POU 结构域结合,而且可能还与 DNA 中 ATGCAAAT 序列上第五个碱基相联系。在寡核苷酸的该位点发生改变后,虽能正常结合 OCT 蛋白,但却不能和 OCA-B 形成复合物,而且该位点发生改变的报告性构建体也丧失了 OCA-B 诱导的转录激活功能[523,524]。用基因打靶技术破坏 OCA-B 后产生的效应提示,该蛋白质在体内对 Ig 产生的调节具有重要作用[525,526];OCA-B 敲除鼠外表健康且具有繁殖能力,但其在 B 细胞成熟和 Ig 产生方面有缺陷。脾脏中成熟 B 细胞数量下降,对免疫的应答能力明显降低,B 细胞增殖能力下降,IgG、IgA、IgE 水平严重下降,这显然是因为已发生类型转换重组的 B 细胞中 Ig 基因转录下调所致。这些小鼠中不再形成 GC。这些效应中一部分明显是因为 Ig 基因转录下降所致,而另外一部分则可能是因干扰了其他基因的 OCA-B 依赖性表达所致。与 OCT-2 相比,提纯 OCA-B 似乎易与 OCT-1 结合[527];推测另外一种辅活化因子介导了 OCT-2 依赖的反式激活[528]。

当 H2B 启动子中八聚体基序明显活化时,那么在负责 B 细胞特异性方面 Ig 启动子中八聚体基序的关键特征是什么呢? 虽然目前还没有答案,但有一种可能性是与 TATA 盒有关,Ig 启动子中的八聚体基序与别的可能引起普遍表达基因广泛表达的其他重要启动子没有关系。与此观点相一致的是,向其他淋巴细胞特异性启动子中插入一段 CCAAT 启动子基序后,会使启动子在非淋巴细胞中活化[529]。针对其他几种 OCT-1 辅活化子(包括 VP16[530,531]和 PTF[532])存在的情况下,也有如下可能性存在,即八聚体之外的序列在 Ig 与其他启动子中发挥明显不同的作用。OCA-B 可能参与介导了这种作用上的不同,因为将 OCA-B 加入 He La 来源的体外转录系统中或当其在 He La 细胞中共表达时,OCA-B 可辅助激活由 V_κ 启动子控制的构建体,这种激活比 H2B 启动子控制的相似构建体的激活作用强(尽管上述两个启动子序列都可与 OCA-B 形成复合物[520,521])。导致 V_κ 启动子的 B 细胞特异性的可能的候选基序包括了转录起点下游的序列[532a]。

八聚体除了在 V 启动子中发挥作用外,其也出现于重链增强子中,虽然在转基因小鼠中八聚体未表现出重要的增强子功能[534],但它能使构建体转染不同细胞系后呈现出 B 细胞特异性[533]。这种八聚体可能会在特定细胞刺激条件下激活增强子[535],并在该区域作为启动子导致 C_μ 基因无效转录方面明显起了重要作用[536]。与八聚体序列相似而非完全一致的其他 DNA 片段已在几个 Ig 基因的调节区中发现(如位于小鼠 κ 基因内含子区增强子上游的序列[537])。然而,大多数这类八聚体样序列的功能的重要性还尚未阐明。OCT 蛋白调控机制远比本文提到的复杂得多,因为存在由于选择性 RNA 剪切而导致的几种异构体[538~540],对蛋白质功能至关重要的几种磷酸化状态[513,541],以及 OCA-B 和 OCT 蛋白与其他调控因子相互作用的能力存在不同[520,542,543]。

IgV 启动子的其他元件

虽然有报道少见的缺乏有效八聚体基序的 V_κ 启动子能通过一段名为 κY 富含嘧啶序列获得启动子活性[544],而且一个结合早期 B 细胞因子的序列有助于一些 V_κ 启动子发挥作用[545],但是,典型的 V_κ 启动子一般仅由八聚体加 TATA 盒组成。与此相反,V_λ 和 V_H 启动子则有除八聚体和 TATA 盒之外的其他功能元件,其中一些将在下文简要介绍。在 V_H 启动子中七聚体 CTCATGA 通常位于八聚体的 5′侧翼 2~22bp 处,该七聚体是一启动子活化所需的保守序列[546]。令人惊奇的是,这个序列虽与保守的八聚体 ATGCAAAT 几乎无相似性,但却可在体外结合 OCT-1 和 OCT-2[547~551]。七聚体与蛋白结合力很低,但却能与邻近八聚体位点相互作用。这种合作性也能通过体外转录试验在功能水平上显示[551]。另一种 V_H 启动子中作为启动子功能所需的保守性序列是多嘧啶区,其位于七聚体上游 0~46 bp 不等的距离处[546]。一个包括多嘧啶区(GGAACCTCCCCC)的序列已作为 MOPC141 V_H 启动子发挥功能所需的成分被确定[552]。该基序被称为 N 元件,它可结合于一个广泛分布的新的转录因子上。目前还不知道 N 元件同多嘧啶 κY 序列的关系。存在于

许多 V_H 区中的一个保守序列(TTANGTAA)可结合于 C/EBP 因子,而开始时则认为其结合于 μ 增强子的 E 序列上。这个序列是体内 V_H 启动子诱导转染构建体转录功能和体外纯化结合蛋白通过这些启动子刺激转录所必要的[553]。最后一个 V_H 元件也应提及。在使用淋巴因子 IL-5 加抗原上调 Ig 重链 mRNA 表达的机制研究中,Webb 等人[554]发现 VHS107 起始位点 5′侧翼 125 ~ 250 bp 处有一段富含 A/T 的序列,它可能参与上调转录活性。在一 EMSA 试验中,该序列因上调用 IL-5 加抗原处理的细胞提取物而产生了一条带。在其 A/T 富含区中,该元件类似 MARs,一种克隆化蛋白显示与之结合活性,该蛋白被命名为 B 细胞 IgH 转录调节子(B-cell regulator of IgH transcription, Bright)[555],其部分地与不溶性染色质基质分隔。Bright 的 V_H 功能性结合位点的重要性还无法确定,这是因为就其序列而言,大多数 V_H 区在 5′侧翼区缺乏类似序列;而且,缺失 Bright 结合位点的相关 V_H 启动子驱动的转基因构建体依然能以淋巴细胞特异性方式表达[556]。在研究其他调节物(如淋巴因子)诱导的 Ig 转录反应机制中或许还可发现其他的反应元件。进一步推测认为,几种不同于 V_L 启动子元件的 V_H 启动子元件可能参与了胚系 V_H 基因的早期转录,致使当 V_L 基因转录失活时发生 VDJ 重组,然而,还要更多证据来支持这一假说。还有可能是不同 V_H 启动子的组成不同或不同元件间的间隔而导致对 V 基因转录调节作用有差异,因而影响 Ig 库中特定 V 区的重排和利用频率[557~559]。

153

对 V_λ 启动子研究少于对 V_κ 和 V_H 启动子的研究。在研究两种主要小鼠的 V_λ 基因时,发现 $V_\lambda2$ 启动子包含有八聚体和 TATA 以及另一个定位于八聚体上游的并不精确保守的存在于 $V_\lambda1$ 的功能性元件。该元件(CACGTGAC)同 USF(upstream stimulatory factor)蛋白(一种上游刺激因子[560])所识别的序列相一致。USF 是一种广泛分布的转录因子,最初因其具有调控腺病毒主要晚期启动子的功能而被分离出来,但后来发现其可调控许多类型细胞基因。它属于 HLH 转录因子家族,后文将详细介绍 HLH 转录因子。在体外用 B 细胞核提取物研究 $V_\lambda2$ 启动子活性时,发现提取物过抗 USF 抗体柱后,其转录能力降低,而加入纯化 USF 后重新恢复转录能力[561]。因而表明 $V_\lambda2$ 启动子包括一段功能性 USF 序列。除了知道大部分人 V_λ 启动子和鼠类其他 V_λ 启动子包含了八聚体样序列和 TATA 盒外,目前对这些启动子的功能性组分还知之甚少。

无功能转录物的启动子

如本章前面所讨论的,在 V(D)J 和类型转换重排之前,Ig RNA 转录物是无功能的(即不编码完整 Ig 蛋白)。通过改变 DNA 可及性,无功能转录物可成为调控相应基因重排的组成部分。起初发现的无功能转录物包括未重排的 V 区[274,562,563]、C_κ[305,564,565]或 C_μ[566,567]区,近来则在鼠和人的存在于下游的 C_H 基因发现了许多无功能转录物。下面将讨论这些转录物调控的最突出特征。

无功能 V 区转录物

无论产生无功能或成熟的转录物[如 V(D)JC]时,特定 V 区的启动子都被假定为是一致的。因而,较早期对 V 区启动子的探讨可能运用了无功能转录物,然而,尚需探讨的是:什么机制使在 V(D)J 重组开始后的发展阶段允许无功能 V 转录物随意转录,而在后来却只留下重组 V 区启动子转录,其他所有启动子均关闭[274,275]。

无功能 C_μ 转录物

现已描述了两类无功能 μ 转录物。第一类,其转录起始于 J_H-C_μ 内含子内增强子(E_μ)的 5′端附近的异源性位置上。当 RNA 转录物被拼接成 C_μ 外显子时,一种 $I\mu$ 外显子(内含子来源的)仍连于编码 C_μ 的 RNA 上。发现尽管 I_μ-C_μ 转录物的启动子和 E_μ 增强子相重合,但正如上述所说的,八聚体基序作为启动子的作用比作为增强子的作用更强大[536]。在鼠[536]和人[568]基因座上,该启动子均缺少 TATA 盒。因为 TATA 盒通常与确立精确转录起始点有关,所以在 I_μ 启动子中缺少该 TATA 盒可能是导致这些转录物 5′端异源性的原因。I_μ 外显子的明显特征是在其所有三个读框内均含有多重终止密码子。推测[567]这一特征阻止了 I_μ-C_μ 转录物翻译成一种提供不成熟终止 V(D)J 重排信号的蛋白质,而这种信号正常情况下由完整重链蛋白产生(参见

本章关于等位基因排斥的讨论）。在转换重组产生一种复合转换连接（如 S_μ-S_γ）后，I_μ 启动子仍然保留且具活性，从而导致杂合转录物（如 I_μ-C_γ）的产生[569]。

第二类无功能 C_μ 转录物来源于发生 DJ 重排的基因座[273]，这些转录物在剪切掉 J_H-C_μ 内含子后，便具有了 DJ-C_μ 结构。这些转录物起始于位于胚系 D_H 元件上游的启动子[570]，但其特性尚未完全阐明。在鼠的大多数 J_H 邻近的 D 区内，已报道了一种上游启动子和增强子 DQ52[571,572]。如前所述，在小鼠第二读框（RF2）内的 DJ-C_μ 转录物负责编码 D_μ 蛋白，该蛋白能抑制表达性重链 V 区的 RF2。

无功能 C_κ 转录物

无功能 C_κ 转录物亦有两种：一种是 8.4kb 的初级转录物[564,573]，其起始于 J_κ1 上游大约 3.5kb 处（然后被加工成 1.1kb RNA）；另一种是 4.7kb 初级转录物，其起始于 J_κ1 上游（被加工成 0.8kb RNA）[573]。这两种转录物均存在于前 B 细胞且可被 LPS 诱导而上调表达。两者起始点 5′侧翼序列均有八聚体样序列（7/8 碱基匹配），这段序列能特异地结合核蛋白，这种结合可被八聚体寡核苷酸竞争抑制[573]。靠近 J_κ1 起始点附近，还有两个可供一种 B 细胞特异性的名为 KLP 蛋白结合的位点[574]。需要进一步试验来充分阐明这些启动子的功能元件，来了解这些元件如何对前 B 细胞中 μ 蛋白的出现作出应答，进而激活 κ 转录和随后的 κ 重排。现已报道，一种无功能 JC_κ 转录物能编码一种类似 D_μ 蛋白的 V-less κ 蛋白，这种现象可能与在前 B 细胞表面以 μ_H 链替代 Vpre B-λ5 SLC 复合体有关[575]。V-less κ 蛋白可能具有的功能目前还不清楚；当然，λ5 敲除小鼠鲜明的表现型说明 JC_κ 蛋白与 SLC 作用并非多余。

为完整起见，κ 基因座的最后一种转录物也应介绍。为检测基因重排与重组靶位转录有关这一原理的普遍性，需验证与 C_κ 基因缺失（如本章中前面所述）有关的 RS 元件是否具有转录活性。在某些前 B 细胞中发现有源于该区域的转录物[576]。关于该转录物的表达调控尚待进一步研究。

无功能 I-C_H 转录物

关于 C_H 区下游无功能转录物调控的研究十分火热，这是因为该调控对理解大量因子影响特定免疫应答中特异性同种型表达选择性的影响机制可能十分重要。在这种观点中，希望一个给定同种型无功能转录物的启动子包含一个独特的介导抗原、多种细胞因子和其他 T 细胞影响的基序组合，已知这些影响与亚型转换的调节有关。IgE 反应得以深入研究的原因是其与临床过敏反应有关。这可能是一个有说服力的例子。

154

B 细胞从产生 μ 重链转换为产生 ε 链高度依赖细胞因子 IL-4，这已被 IL-4 敲除小鼠不能合成 IgE 的实验所证实[577]。体外实验表明，特异性脾 B 细胞转换为产 ε 链除了需要几种丝裂原（如 LPS、CD-40、T 细胞膜等）提供的信号外，IL-4 是不可缺少的。要在体外产生 ε 重链，应先有无功能 I_ε-C_ε RNA 转录物［亦称胚系 ε(G_ε) 转录物］的合成，由于在启动子中缺少 TATA，转录起始于多重起始位点[578]。重要的是，I_ε 启动子可将 IL-4 诱导性转给含报告基因的构建体。有此能力的最小序列包括了两种已知核蛋白的结合位点[579]。其中之一是 STAT6，它是信号转导子和转录活化子家族的一个成员，能将许多细胞因子受体信号转换为介导转录调节的信号。STAT6 激活需要 IL-4 受体与配基结合，其对 IL-4 诱导的 I_ε 转录和 C_ε 转换是必需的，这一点已被在缺乏 STAT6 的细胞和 STAT6 敲除小鼠中进行的实验所证实[580~582]。所需的另一个存在于 I_ε 启动子中的最小 IL-4 反应元件是能被转录因子 CAAT/增强子结合蛋白（CAAT/enhancer binding protein，C/EBP）家族结合的位点。该家族包括了组成型表达于肝细胞的 C/EBPα、介导 LPS 和炎症因子（如 IL-1、TNF-α、IL-6）功能的 NF-IL6（C/EBPβ）。该家族另一成员是广泛表达的 C/EBPγ（又称 Ig/EBP），它虽缺乏转录活化子结构域，但却可通过与其他 C/EBP 家族成员形成异二聚体而成为其他成员的反式阴性的抑制物[583]。在 B 细胞发育过程中改变该家族不同成员的比例有利于调控 V_H 启动子及 κ 和 Ig 重链基因座中内含子内增强子的调节性表达[584]。

除了 STST6 和 C/EBP 结合位点外，还有两个靠近 I_ε 起始位点的邻近基序有利于启动子的 IL-4 诱导性，而且介导了因结合 CD40 而导致的启动子的协同应答[585]；这些位点能与复杂的 NF-κB 家族的蛋白结合。从启动子中去除两个 NF-κB 结合位点能抑制 IL-4 的诱导性，这与在小鼠中靶向去除 NF-κB 组分 P50 后造成 I_ε

无功能转录物缺失和不能进行 C_ε 表达转换是一致的[586]。

IL-4 控制启动子的另一区域是与某些 I_ε 转录起始点有交叠的富含 A/T 序列。该序列能使启动子受抑，显然是由于结合了染色体蛋白 HMG-I(Y)所致[587]。IL-4 可使这种蛋白磷酸化，可能因此而降低了结合亲和力和解除了转录抑制[588]。另一个鼠的 I_ε 启动子组分是 B 细胞特异的激活蛋白(B cell-specific activator protein, BSAP)的结合位点[585,589]，它对维持 IL-4 的基础活性有作用，但无助于 IL-4 的诱导活性。在人 I_ε 启动子中，BSAP 明显增强了 IL-4 和 CD-40 介导的启动子活性[589a]。除启动子外，无功能 I_ε 转录和亚型转换也能被鼠 C_α 基因下游的增强子调控，这点可从所有 B 细胞中增强子被新霉素抗性基因取代后的小鼠发生的异常推断出来[96]：表现为 IgE 和几种 IgG(除外 IgG1)的转换缺陷，同时受影响亚型的无功能转录物也下降。

对其他 C_H 基因的无功能转录物的调控研究提示有同样复杂的启动子存在。一般来讲，这些启动子包括能作为信号反应元件的基序，相应信号能够促进各自亚型的转换。进一步讨论见第 23 章。

Ig 基因增强子的顺式元件

如上所述，增强子是能刺激附近基因转录的调节元件，但同启动子相比，它能以不同方向影响几千碱基以外基因的转录。增强子可位于基因上下游，且就 Ig 基因而言，其还可位于基因内含子中。虽然由于它们的位置和方向的不同引出了很多理论模型去解释这些序列如何刺激转录，但是，目前流行的观点是，正如启动子一样，结合于核蛋白的增强子易于转录起始复合物的组装。如已提到的，一条 DNA 链上直线距离达数千碱基的增强子也可通过构成一个大的 DNA 环来使自己接近启动子。这种环可在几种模型系统中通过电镜观测到。

下面的讨论集中在已详细研究过的鼠增强子上。人同源物则在本节最后简述一下。

重链内含子内的增强子

E 盒子和它们的结合蛋白

位于 J_H-C_μ 内含子中的增强子是首批发现的细胞性(非病毒性)增强子之一，因其引人注意的复杂性而继续成为深入研究的目标。人和鼠基因座中这种增强子通常命名为 E_μ，其位于大多数 J_H 区 3′端下游 0.5kb 处，并延伸约 0.3kb。该片段位于 μS 区 5′侧翼，因而通常在亚型转换重组后仍保留在表达基因上。主要研究是通过分析功能基序和它们的介导增强子活性的结合蛋白来分析这种增强子活动机制。

早期工作集中在辨明作为核蛋白结合位点的鼠 E_μ 位置上，Church、Ephrussi 和他们的同事们[590,591]使用前述的体内 DNA 足迹法，检查对比 B 细胞和非淋巴细胞中增强子区对致甲基化制剂硫酸二甲酯(dimethylsul fate, DMS)的可及性。这些实验定位了四个在 DMS 反应中证实有 B 细胞特异性改变的核苷酸簇。这些核苷酸簇都有 CAGGTGGC 八聚体序列，该序列不仅出现于 μ 内含子内的增强子的上述四个位置(这些增强子分别命名为 μE1、μE2、μE3、μE4)，而且还出现于在足迹法中无明显表现的第五个位置(μE5)以及鼠 κ 增强子三个位置(κE1、κE2、κE3)。这些基序被称作 E 盒或 E 基序。

155

μ 增强子上 E 基序的功能通过含一个或多个有突变或缺失基序的 DNA 构建体转染进行检测。大部分 E 基序在单个 E 基序甚至多个 E 基序发生突变的构建体中仍能保持基本的增强子活性[533,592]，但在 μE1、μE3 和 μE4 发生突变的构建体则丧失了其正常增强子活性的 98%。EMSA 实验证明，核蛋白在体外能特异结合 E 基序。尽管这些序列很相似，但它们不能都结合于同一蛋白上。进一步发现，虽然 E 基序最早发现于体内 B 细胞特异的 DMS 反应中，但用核酸提取物的 EMSA 实验证实，非常多的非淋巴细胞也含有大量结合这些基序的蛋白质。

E 基序结合蛋白的鉴定和特征反映出涉及远古序列进化的机制是很复杂的。其中发挥关键作用的是 E2A 基因的产物，产物因 RNA 拼接方式不同而有两种，分别命名为 E12 和 E47[593]。这些蛋白质及相关基因 E2-2 和 HEB 的产物可结合于 μE2、μE4、μE5 序列及类似的来自 κ 内含子内增强子的 κE2 序列。上述所有这

些蛋白质都是 HLH 转录因子家族的成员。该家族目前包括如果蝇、酵母和植物等多种物种中的 200 多种蛋白质，它们都共用一段一致的公共结合序列 CANNTG 和 HLH 结构域：该结构域包括被一段间隔环分开的两个由 13 个氨基酸组成的 α 螺旋。该结构介导这个家族成员的同源或异源二聚体的形成。这种二聚化作用对结合 DNA 是必要条件（但非充分条件）；而且对特定 E 盒来讲，结合的特异性和亲和力取决于参与聚合的两个成员。举例来说，与 MyoD（或相关肌肉因子）相关的 E2A 基因产生的蛋白质能形成异源二聚体，进而以高亲和力结合于肌肉特异性基因启动子中的 E 盒样序列[594~596]。很明显，E2A 编码的蛋白质实际上广泛表达，它可能参与了通过结合只有少数组织分布的 HLH 而进行的组织特异性基因调节。然而，B 细胞特异性 E2A 因子（即 BCF-1）是 E47 亚单位的同源二聚物，虽然 E47 广泛分布于很多组织中，但由于不明显原因，其仅形成于 B 细胞中[597,598]。与 HLH 二聚化结构一样，大多数 HLH 蛋白（包括 E2A 产物）含有另外一个 DNA 结合必需的序列：邻近 HLH N 端的一段碱性氨基酸片段，因此有这种碱性区域的蛋白质亚类被命名为 bHLH。实际上，缺少此碱性片段的 HLH 蛋白（如 HLH 蛋白中的 Id 群[599,600]）明显作为 E 基序功能的生理性抑制因子，它通过与 HLH 蛋白形成二聚体而阻止后者结合 DNA。一些 HLH 蛋白的另一组分是亮氨酸拉链，其为一 α 螺旋结构，其中含有几个亮氨酸，各亮氨酸之间有七个氨基酸残基组成的间隔区。含亮氨酸拉链的 HLH 蛋白（bHLH 拉链蛋白）能相互之间通过亮氨酸疏水作用形成二聚体，但不能同不含拉链组分的 HLH 蛋白形成二聚体（如不能同Ⅰd 形成二聚体）。bHLH 拉链蛋白有 Myc 蛋白（及与之能形成异二聚体的 Max）以及其他 B 细胞核中能结合 μE3 和 κE3：USF、TFE、TFEB 的三种蛋白。

有了 HLH 蛋白的这些背景知识，它们在 B 细胞中发挥调节作用的特征即可推断出来。B 细胞发育中 E2A 蛋白的重要性可通过经同源重组而使该蛋白质破坏的小鼠表型反应出来[601,602]。纯合突变小鼠能发育成熟，但大多数在出生后几天内死亡。尽管 T 细胞群和其他组织（如肌肉）大体正常（其中的 E2A 蛋白为二聚体形式），但惊人的是这些小鼠不能产生任何 B 细胞。这可能是因为相应 E2-2 基因产物能在肌肉中弥补 E2A 之不足，而在 B 细胞系中却不能。当将表达 E-12 或 E47 转录物的基因转到 E2A 敲除小鼠中时，可明显看出这两种转录物对 B 细胞发育的协同作用[603]。虽然 Ig 中 E 盒依赖性增强子的功能损害能造成 E2A 敲除表型（包括胎肝中 I_μ 转录和 DJ_H 重组明显受抑），但这种模型难以建立，原因在于包括 RAG-1、mb-1、CD19 和 λ5 在内的对 B 细胞发育十分重要的转录物的显著减少。后两种基因转录现已知受转录因子 BSAP 调控，并且针对 BSAP 的基因的表达也显著降低。因此，E2A 蛋白和 E_μ 中 E 盒基序之间的不匹配相互作用可能对敲除表型无明显影响。E2A 产物具有调控 Ig 基因的另一证据来自 E47 表达载体转染 T 细胞系的实验[604]；实验结果导致 I_μ 转录作用和 DJ_H 重组的上调（尽管某些间接效应可能在该系统中发挥了一定作用，因为观察到 OCT-2 和两个 RAG 基因表达增强）。E47 过表达也可导致在被转染的成纤维细胞系中 I_μ 发生转录[605]。在非 B 细胞中，E47 的调节可通过磷酸化来实现，这样可能会降低这种蛋白质以 B 细胞特异性同源二聚体的方式来结合 DNA 的能力[606]。

E2-2 和 HEB 在结构上以及在它们表达于许多不同类型细胞这一点上类似于 E2A，但关于它们在 Ig 表达中的作用研究甚少。B 细胞系发育早期，E2-2 比 E2A 表达高许多，这可能主要是由于与 E 盒结合之故[607]。E2-2 或 HEB 的纯合性敲除[608]导致难以解释的类似 E2A 敲除的围产期致死率，但其仅有前 B 细胞数目上的中度下降，所以这些基因对 B 细胞发育重要性不如 E2A。

μ 增强子中 E 盒功能的复杂性可通过研究仅含 μE5、μE2 和 μE3 的增强子的一个小片段的功能来阐明[609,610]。这个片段中的四聚体足以诱导转染入 B 细胞的构建体中增强子的活性。在该增强子片段中，μE3 介导了该增强子功能的重要部分，而最能产生这种效应的蛋白是 μE3 结合蛋白 TFE3[611]。的确，缺乏 TFE3 活性的 B 细胞分泌 Ig 的活性下降[612]。与 B 细胞中四聚化 μE5-μE2-μE3 片段活性相对照，该构建体在成纤维细胞中无活性；但是一个类似的缺少 μE5 的四聚体却能在 B 细胞和成纤维细胞中均表现出活性，提示 μE5 会对非 B 细胞产生抑制作用。这种抑制作用明显是由结合于 μE5 位点（该位点允许 TFE3 的抑制）的名为 ZEB 的非 HLH 蛋白所介导的。由 ZEB 介导的抑制能部分地被 E47 样蛋白 ITF-1 过度表达所逆转，因为 ITF-1 能结合 μE5 而取代 ZEB。E2A 产物同 ZEB 之间竞争可能有利于 B 细胞发育过程中 E_μ 在 B 细胞中的特异性。

HLH 蛋白介导 E_μ 活性的另一个机制可能是通过 Id 蛋白(Id1、Id2、Id3 和 Id4)调控的。如上所述,Id 蛋白是 bHLH 蛋白的显性负调节子,因为它们能与这些转录因子进行异源二聚化,并阻止它们与 DNA 上的同源基序相结合[613]。当 E2A 表达时,Id1 和 Id2 在前 B 细胞中同时表达,但其与 E 盒子的结合未能检测到。随后,这些 Id 蛋白表达下调,从而容许其靶调控区的 bHLH 活化[599,600]。转染 Id1 基因的小鼠的表型支持这种因 Id 表达而抑制 bHLH 活性的模型,其中 Id1 被设计为在晚期 B 细胞中表达,表达使用了 mb-1 启动子和 E_μ 增强子[614]。这些小鼠显示出了同前所述的 E2A 敲除相类似的 B 细胞发育障碍。

E2A 蛋白在临床上的重要性是相应基因参与了因转座而发生的癌基因转化作用,转座是指这些基因的一部分与来自不同染色体的非己遗传物质相融合。人染色体 19p13 上的 E2A 基因座至少在急性淋巴细胞性白血病时是两类转位[t(1;19)(q23;p13)和 t(17;19)(q22;p13)]发生的位点,这就导致了癌基因性 E2A 融合基因[615,616]。

157

ETS 家族成员和它们在 E_μ 中的作用

另一类参与 E_μ 调节的转录因子大家族成员是 ETS 蛋白,这些蛋白质能以单体形式与 E_μ 中称作 μA(又叫 π)和 μB[617] 的位点相结合(图 5.19),并且能和其他 Ig 增强子中相类似的位点结合。ETS 家族成员均有一段 85 个氨基酸的保守性 DNA 结合域,该结合域通常能识别包括一段中心为 GGAA 序列的 DNA。采用 μA 位点突变的报告性构建体转染,提示 μA 位点的完整性对前 B 细胞中 $E\mu$ 活性至关重要,而对 B 细胞晚期发育则不太重要[618]。虽然有证据显示 Elf-1 在此位点有生理性作用,但几种广泛表达的 ETS 蛋白(包括 Ets-1、

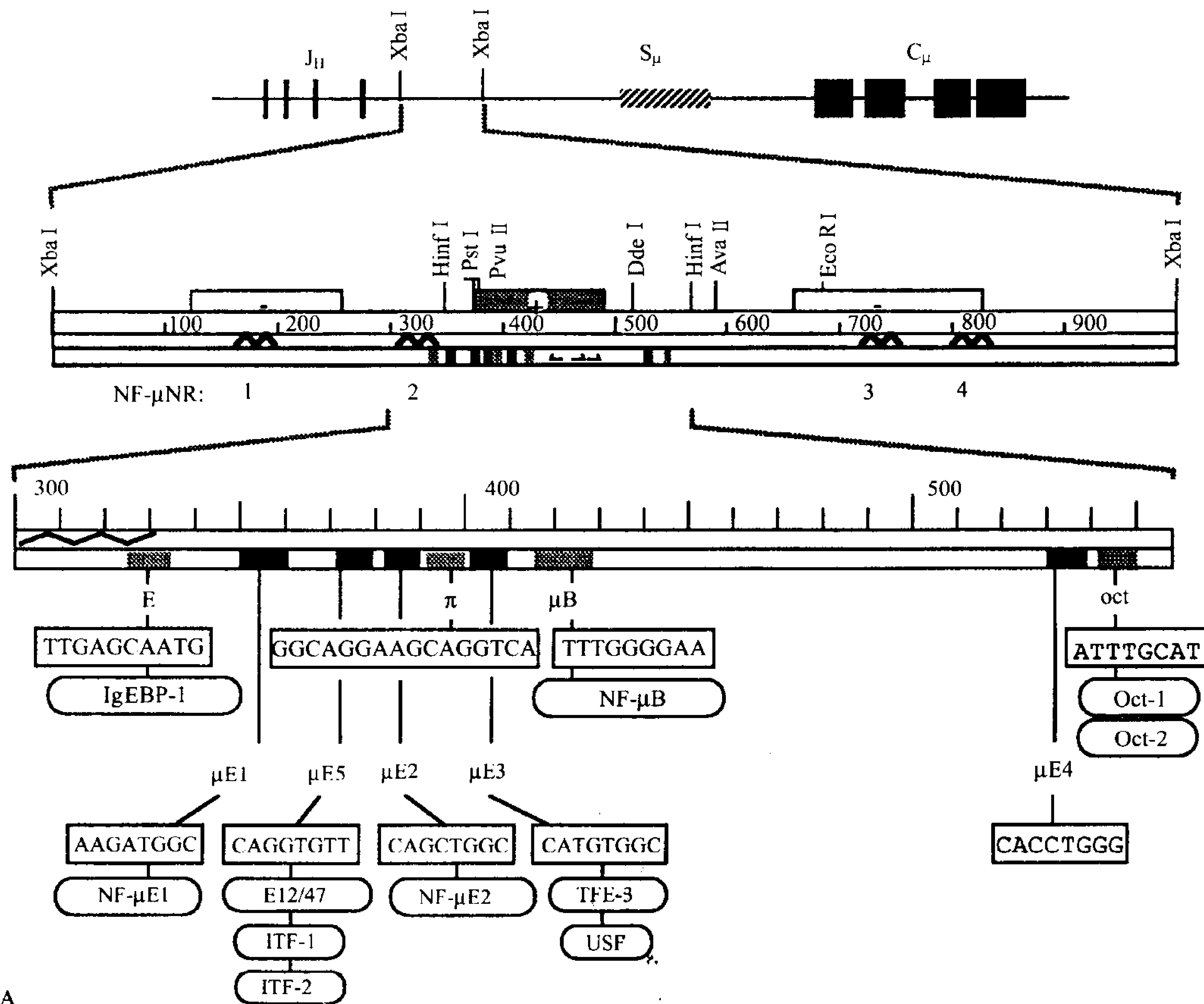


图 5.19 四种鼠 Ig 基因增强子。A:重链增强子位于 J_H-C_μ 内含子中的两个 *Xba* I 位点之间。在放大的图中,从 5′*Xba* I 位点起进行标号;图中还显示了不同研究者使用的其他限制性位点。位于数字标记图上方的大矩形表示由 Imler 等人[631]鉴定的正性或负性调节区的位置。图中显示了 E 基序(黑矩形)和其他基序(带阴影的矩形),它们是负性调节蛋白 NF-μNR 的 4 个结合位点(锯齿线)。在底部放大的图中显示带有自身名称的中心基序、DNA 序列(矩形)和已知的相关结合蛋白(桶形)。

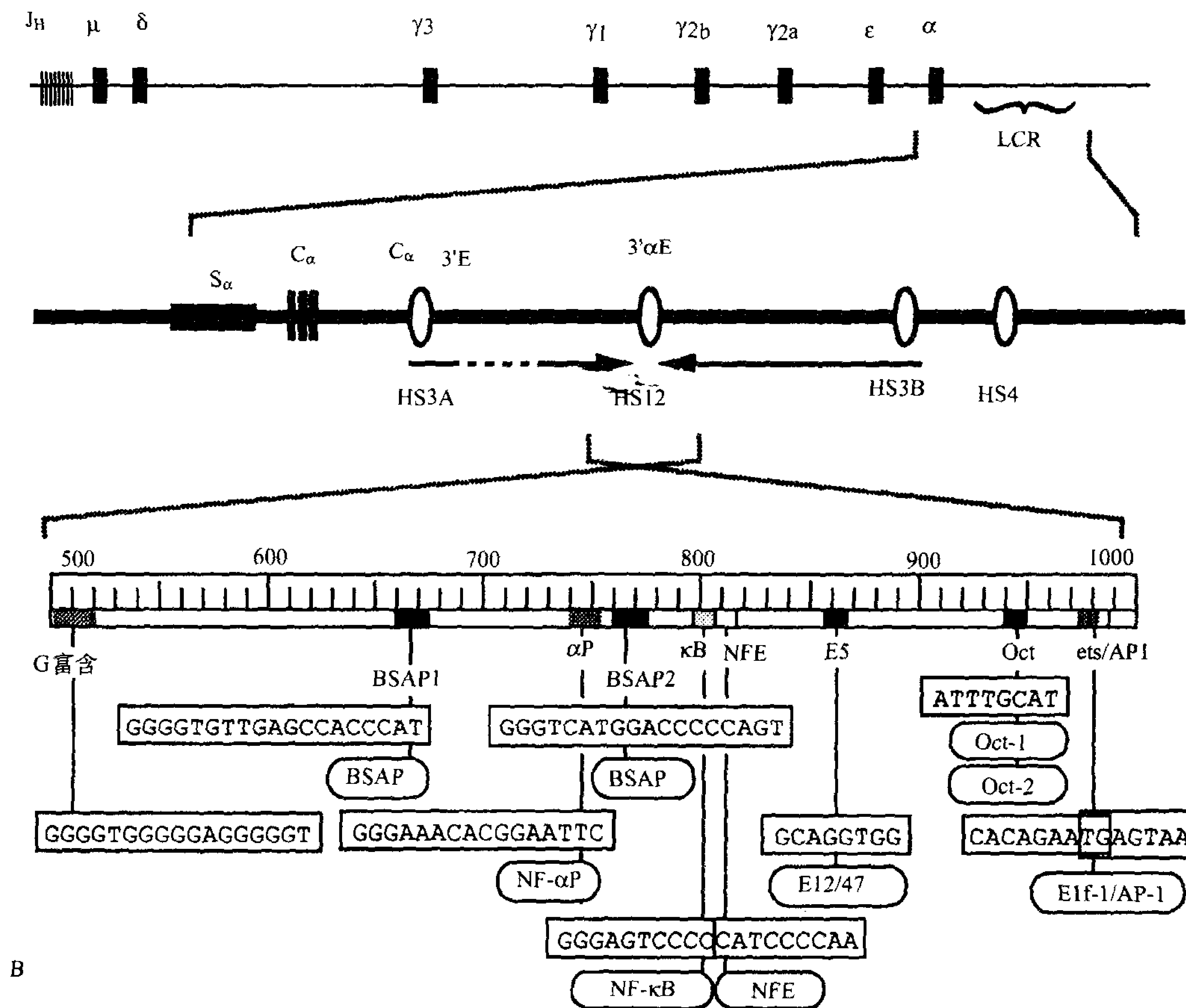


图 5.19(续) B:鼠 C_α3端的调节区。顶部线图显示了 C_α 下游的一个 LCR 的位置;在下方放大的线图中显示了已报道的 LCR 组分:HS3A(C_α3'E)、HS12(3'αE)、HS3B 和 HS4。箭头所示为 HS12(此基因座中的主要增强子)周围的回文结构。图底部显示了 HS12 增强子内的组成性基序,其中所使用的序列号来源于 Dariavach 等人的资料[648]。这虽然是大多数研究者所用的数字图,但需要说明的是该序列的方向是 3'→5';因此,图中第三条线的方向与其上面一条线的方向相反,所有圈出的序列都来自反义链。

Ets-2、Erp 和 NERF)能结合 μA[619]。与此相对照,μB 位点主要结合仅表达于 B 细胞和巨噬细胞的 PU.1[620]。PU.1 对所有三种 Ig 基因座和几种非 Ig 基因(如 mb-1、J 链基因)的调控均有很重要的作用。该蛋白质对淋巴系统发育的重要性可用 PU.1 敲除小鼠证实;这些小鼠出生前即死亡,虽然其红系和巨核细胞正常,但淋巴系和骨髓系严重缺陷[621]。虽然 μA、μB 和间隔性 μE3 在其本身多聚化时都不表现出明显的增强子活性,但包括这三个彼此相邻基序的片段却能在 B 细胞中表现出增强子活性[617],并且 μA 与 μB 元件之间的距离对活性十分重要[622]。这些发现和在体内、外对结合 μA、μE3、μB 的蛋白质间相互作用的系统研究,提示这种最小增强子的活性依赖于这些蛋白与 Eμ DNA 之间复杂的相互作用[623,624]。这种最小的增强子在巨噬细胞和 B 细胞中显示了活性,但来自侧翼 E 盒的抑制性影响使巨噬细胞中的增强子失活,并能精细调节增强子的细胞类型特异性。类似地复杂相互作用还见于 μE2、μA 和 μE3 基序与其结合蛋白之间的相互作用[624a]。

159

E_μ 中其他基序

μ 增强子中称作 E(与 E 盒无关)的位点也是增强子活性发挥所必需的[624b,624c]。该位点可结合 C/EBP 家族成员,C/EBP 在 B 细胞中的代表是 Ig/EBP(C/EBP)和 NF-IL6,后者在 B 细胞发育过程中水平增加[584]。已知 IL-6 能上调 B 细胞系 Ig 分泌[625],因此 E 位点很可能通过激活 NF-IL6 来参与此调控过程(虽然尚未见报道)。

尽管 μE1 最初被确定为 E 盒,但就此名来使用它目前还缺少关键标准,即标准 CANNTG 基序似乎对

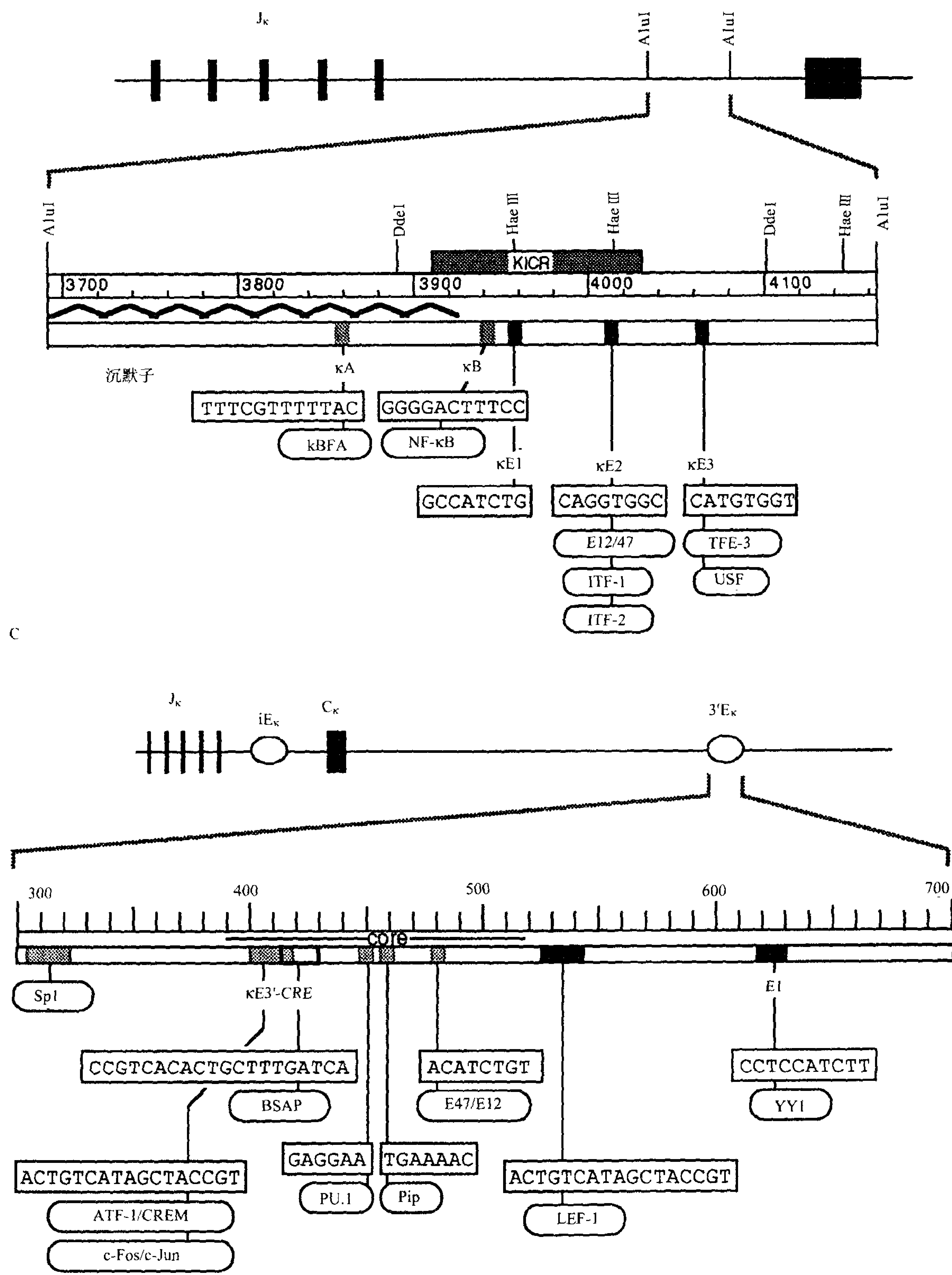


图 5.19(续) C:内含子中 κ 增强子。鼠 κ 增强子位于 J_κ-C_κ 内含子中的两个 Alu I 位点之间。在放大的图中,根据该区域已发表的序列进行了数字标号[824]。图中显示出了 E 基序(黑矩形)及 κA 和 κB 基序(带阴影的矩形)。图上方带阴影的矩形表示 KICR 的位置[671],KICR 是通过在人、鼠和兔 J_κ-C_κ 内含子之间进行对比而观察到的保守序列岛。D.3'κ 增强子。图中显示基序及相应的结合蛋白,带有数字的图以 Muller 等人的结果为依据[140]。

HLH 蛋白结合是必需的。另外，μE1 位点明显能结合一种叫做 YY1(Yin Yang 1)的蛋白质[626]，如此称呼它是因为 YY1 能依环境不同而介导基因表达的正性或负性效应。该蛋白质还能结合 3′κ 增强子上相似位点，并参与许多组织中诸多基因的调控。YY1 含有四个锌指结构(在一系列 DNA 结合蛋白中发现的锌螯合结构域)及正性和负性调节结构域[627,628]。Eμ 中该蛋白质的功能尚未完全阐明；该位点的突变能在浆细胞瘤细胞中降低增强子活性[533]，但在其他条件下无此效应[629]。

E_μ 侧翼的基质附着区

几种因子明显有利于 μ 增强子的 B 细胞特异性。如上所述，结合 B 细胞特异性核因子增强子中的两个基序(μB 和八聚体)和一种基序(μE5)能抑制成纤维细胞中 μ 增强子片段构建体的功能。然而，几个报道已提示 B 细胞特异性还与增强子的侧翼序列有关，该序列能在非淋巴细胞中抑制中心序列的活性[630~632]。这些抑制序列与位于核心增强子侧翼的 A/T 富含区序列相交叠，且具有 MAR 的特性[633]。如前所述，MAR 被认为代表了 DNA 与核基质中不溶性蛋白支架相连的位点，且 MAR 还在几个增强子(包括 κ 内含子内增强子)的附近被发现，并和某种 V_H 基因有关。在几种不表达 Ig 的细胞系检测到的一种名为 NF-μNR(核因子-μ 负性调节子)的核蛋白能与四个富含 A/T 的 μNR 元件结合，在核心增强子区侧翼的每个 MAR 中各有一对富含 A/T 的 μNR 元件。在瞬时转染实验中，从增强子构建体中缺失掉 μNR 元件对不表达 NF-μNR 的 B 细胞中的转录影响甚微。但在巨噬细胞和 T 细胞等确切表达 NF-μNR 和不具有完整增强子活性的细胞中，去除 μNR 元件会激活增强子，这显然是其从 NF-μNR 介导的抑制中释放了出来[634]。这提示 MAR 结合于基质可能对增强子功能的发挥是必需的，且 NF-μNR 可能抑制非 B 细胞中这种相互作用。为支持这种模型，一种可能介导此种相互作用的名为 MAR-BP1 的基质蛋白已从尿素溶解的基质中纯化出来，其显示出 E_μ 相关性的 MAR 结合的能力。与此相一致的是，这种相互作用能被纯化的 NF-μNR 所抑制[635]。

虽然位于 E_μ 侧翼的 MAR 对转染入 B 细胞的构建体中的增强子之活性作用不大，但其对转基因构建体中 E_μ 驱动的转录作用很重要[636]。当侧翼有 MAR 时，E_μ 显示出一种 LCR 特性：它能赋予可整合于基因组不同位置的转基因构建体以位置非依赖性进行转录作用。据报道，另一些 MAR 亦有此特性[637]，但 MAR 和 LCR 之间的确切联系仍不知道。一种可能性是 MAR 通过超螺旋链解旋而发挥作用，因为它与那些能变得不配对和松解的序列有关[479]。

一个强有力的证据是：通过增强子结合蛋白接近启动子结合蛋白及通过成环而去除间隔 DNA，从而形成三维转录因子复合体，这种复合体有利于转录起始复合物的形成，此时增强子便可刺激转录。为判断增强子是否以不依赖启动子-增强子相互作用机制的方式而在染色质结构中介导了这种变化，以一系列未连接真核启动子的转基因 E_μ 构建体转染的小鼠的 B 细胞核进行实验，测试它们对 DNA 酶和原核细胞 T3 或 T7 聚合酶的反应[638,639]；包含启动子的构建体和一些含有来自 E_μ 侧翼区 MAR 的构建体也同时进行针对相同聚合酶的反应。发现一种最小的 E_μ 增强子尽管可介导局部因子的可及性，但需要 MAR 才能将这种可及性扩展到距离 E_μ 1kb 以外的启动子上，这表明 MAR 能与一增强子协同来产生一个染色质可及性结构域，这种协同甚至不需特异性增强子结合蛋白和启动子结合蛋白间的相互作用。

MAR 功能的另一深入了解是通过研究几种除了 NF-μNR 以外的其他几种能结合 MAR 的蛋白质所获得的，这些蛋白质是上面已提到的 SATB1[640]、核素[641]和 Bright。然而，要想真正弄清这些基序如何起作用，仍需进行大量工作。

3′α 增强子和 LCR

增强子复合体的发现

据报道，一种复杂调控基因座位于鼠 Ig 重链 C_α 基因下游，该位置上这种调控区的存在最初是在浆细胞瘤中发现的，这种浆细胞瘤发生自发 E_μ 缺失后却仍保留高 Ig 分泌能力[642~645]。相反，含有内含子内增强子但缺失鼠 C_α 基因下游 DNA 片段的骨髓瘤亚克隆的重链基因表达明显减少[646]。对大鼠重链基因座同源区

的系统研究表明,一种小鼠同源性的增强子 3′αE[647~649]很快被发现位于 C_α 基因下游 16kb 处。小鼠和大鼠 3′αE片段的方向相反,且侧翼有反转重复序列[648]。对于 3′αE,Matthiao 和 Balimore 也报道了小鼠中存在的位于 C_α 基因下游仅 4kb 处的一种弱增强子[650]。

最近,Madisen 和 Groudine[490]分析 B 细胞特异的 C_α 下游 DNA 酶超敏区时,发现四个超敏位点:HS1 和 HS2 与前述 3′αE 区交叠,而 HS3 和 HS4 则位于下游更远处,且通过瞬时转染实验鉴定出了具有弱增强子活性的两个新区域。HS3 序列虽几乎同 Matthias 和 Baltimore 描述的增强子完全一致,但方向相反。这反映出一个事实:在小鼠中,HS12-3′αE 以长反转重复方式存在[651,652](图 5.19B)。含有连接于报告基因的 HS3、HS12 和 HS4 的构建体转染入 B 细胞系后,分离的稳定转染细胞能以位置特异性方式来表达报告基因。这表明这三种增强子序列(HS12、HS3 和 HS4)一起作为一个 LCR 而起作用。

160

增强子复合体的组成基序

对鼠 C_α 基因下游调控区分析发现,几种能结合特异转录因子的基序能介导不同的增强子调控功能。3′αE能在浆细胞瘤中强烈激活转录作用,但在早期 B 细胞中则仅有微弱的作用。这种发育变化部分归因于名为 E5 的基序,它有与 E 盒一致的结合位点 CANNTG,该结合位点反映了作为转录因子中 bHLH 家族成员的特点。在 B 细胞发育的早期阶段,E5 位点对增强子活性的作用被显性负核调节子 Id3 所抑制,Id3 表达于早期 B 细胞,而在浆细胞中的表达下调[653]。3′αE 中至少还有其他 4 种基序能增强浆细胞瘤中增强子活性,而对 B 细胞无作用。一个位点是 αP,它能结合 TS 转录因子家族成员的名为 NF-αP 的转录因子[654];另一位点是针对 IgV 区启动子和几种 Ig 增强子中都很普遍存在的八聚体(ATGCAAAT)[655];第三个位点是能结合前述 NF-κB/Rel 转录因子家族成员的 κB 样位点[653];第四个位点是一段 G 富含序列,经突变已分析了其功能,但未发现其结合蛋白[656]。所有四个位点的活性都由前述的 Pax-5 基因的产物 BSAP 来调节。BSAP 蛋白结合3′αE 的两个基序,能在早期 B 细胞中表达,并能抑制其中的增强子活性;但其在浆细胞瘤中因其丢失而解除抑制。在多数场合下,BSAP 作为转录激动因子而发挥作用,但在 3′αE 中其能通过至少两条途径来抑制增强子活性。第一条途径是,它阻止转录激动因子 NF-αP 结合于 αP 位点;第二条途径是,它使八聚体、G 富含区和 κB 样基序对转录施加激活性抑制作用[654,656]。3′αE 中 κB 位点的良好活性需要有 NF-κB 和结合于邻近名为 NFE 基序的蛋白质之间的相互作用[657]。

除了在浆细胞成熟过程中存在于 3′αE 中介导上调的基序外,还发现了可被 BCR 交联而诱导活化的增强子中的反应元件,该元件与 ETS 家族成员 Elf-1 和 AP-1 转录因子家族成员的结合位点相交叠[658]。同样的 DNA 位点代表了 CD40 的反应元件,虽然其可能由略有不同的 AP-1/ETS 家族的成员所介导[659]。另外两种增强子中的基序虽也能促进其调节,但研究得尚不透彻,这两种基序是 μE1 和 μB,二者最早发现于大鼠 3′αE 并在小鼠中有部分保守性。尽管关于小鼠 HS3 和 HS4 增强子区的研究尚不彻底,但 HS4 增强子显然包含了功能性 Oct-1 和 BSAP 的结合位点[660,661]。

3′αE 在类型转换的作用可用同源重组的方法在 ES 细胞中将该区用新霉素抗性基因替代的实验而加以证实,这种 ES 细胞可在 RAG-2 敲除小鼠中用于重建 B 细胞群。由此得到的 B 细胞虽能发生正常 VDJ 重组,但在体外进行 IgG2a、IgG2b、IgG3 和 IgE 的类型转换方面有明显缺陷,而 IgM 和 IgG1 却表达正常[96]。这个结果提示增强子可在转化重组中通过影响不同亚型胚系转录程度而发挥亚型特异性作用。对这个结果应注意的是,在经新霉素抗性基因替代试验检测 κ 增强子作用时,新霉素抗性基因明显影响 κ 的表达远不是增强子缺失那样简单[277,278];新霉素抗性基因的一个类似效应可能影响了在 3′αE 替代小鼠中观察到的表型。

B 细胞发育中两个 IgH 增强子的作用

从分析 E_μ 和 3′αE 的实验中可发现,E_μ 对早期 B 细胞发育有重要作用,而 3′αE 则作用于晚期发育。因此,以新霉素抗性基因替代了 E_μ 增强子(存在于嵌合 RAG 互补的小鼠中)的 B 细胞,显示出对胚系转录和 VDJ 重组的顺式抑制作用[662,663],然而前面讨论过的以新霉素抗性基因替代 3′αE 后却显示了正常 VDJ 重组。后一构建体能影响亚型转换和晚期 B 细胞成熟。而且如上所述,浆细胞瘤中 E_μ 增强子缺失对 Ig 分泌无明

显影响，而自发[646]或人为[664]缺失 3′αE 则能抑制 Ig 分泌(在后一研究中 E_μ 也缺失了)。由 3′αE 驱动的转染和转基因构建体提示这种增强子的活性对晚期活化的 B 细胞是特异性的[665~667]，可能的部分原因一方面是其在早期 B 细胞系中能被 BSAP 和 Id3 所抑制(如前所述)，另一方面可能是增强子基序的激活，这种基序对抗原结合、T 细胞刺激和(或)丝裂原(如 LPS)的反应是特异的。

κ 内含子内的增强子和 NF-κB

通过转染有缺失的 κ 基因和包括连接有报告基因的来自鼠 J_κ-C_κ 内含子片段的构建体，已有几个研究小组得到了一个位于距 C_κ 区基因 5′方向 0.7kb 处的增强子[668,669]。该基因座与 B 细胞特异性 DNase I 超敏位点相当[492,493,670]，同时也与内含子的一个片段相当，该内含子片段在小鼠、人和兔之间有高度的序列保守性[671]。内含子性 κ 增强子(有时也称 iE_κ)已通过缺失、突变和蛋白结合等细致的研究而被搞得很清楚了(图 5.17C)。如上所述，该增强子中有三个可被识别的 E 盒，并且它们可能还结合了针对 E_μ 基序的蛋白质：κE1 结合 YY1，κE2 结合 E2A 蛋白，κE3 结合 TFE3 及相关蛋白质。降低增强子功能的 E 盒突变将使这些蛋白质与该基序结合的能力丧失[533]。

NF-κB

161 iE_κ 中具有重要性的另一基序是 κB 基序 GGGATTTCC。该基序最初在 EMSA 实验中，作为 B 细胞核提取物中核蛋白的结合位点而被发现，因而它被命名为 NF-κB(核因子 κB)[672]。在能支持 κ 增强子功能的相同细胞中，该蛋白质的存在提供了 NF-κB 可能对介导增强子活性有重要作用的线索。进一步的相关关系由前 B 细胞系 70Z/3 提供，在该细胞中有已发生重排但功能尚处于静止状态的 κ 基因。LPS 处理 70Z/3 细胞导致 κ 转录活化的作用与 70Z/3 核提取物中有 NF-κB 活性相联系[673]。κB 基序突变剧烈降低 κ 增强子活性的现象[533]，表明其在增强子功能中的地位是十分重要的。的确，从 E 盒基序中分离出的这种基序显示出了其有增强子活性，尤其是在含有该基序的串联拷贝构建体中[674]。这些构建体的增强子活性在转染的 B 细胞中比在成纤维细胞中大得多，这与其对 κ 基因在 B 细胞特异性表达的重要性是一致的。NF-κB 在介导由抗原识别诱发的 B 细胞活化方面的重要生理作用可用表面 IgM 交联上调 NF-κB 活性的作用来说明[675]。自从在 iE_κ 中发现 κB 基序以来，还发现类似基序能作为重要功能元件来调节 Ig 基因座以外的众多基因。这些基因包括编码 MHCⅠ、Ⅱ类蛋白和 β_2 微球蛋白，尿激酶、IL-2 和 IL-2Rα 链、IL-6、单核巨噬细胞集落刺激因子、β 干扰素、诱导性 NO 合成酶和 TNF-α、β 的基因；该基序还以串联重复拷贝方式存在于 HIV 长末端重复序列。这些基因中有许多表达于 B 细胞系以外的细胞中；而且，的确在 T 细胞和 HeLa 细胞中 NF-κB 可被佛波酯诱导表达[673]，在其他类型细胞中则通过如 LPS、佛波酯、TNF-α 和 IL-1 等众多制剂而诱导表达。因此，NF-κB 并非是 B 细胞特异的，而是可在许多类型细胞中发挥作用的一种蛋白质，它经常受到与炎症有关制剂的调节，并能调节炎症相关的应答。在 B 细胞中该蛋白质不仅调节 iE_κ，而且也调控 3′αE 和几种重链亚型的Ⅰ区启动子中的位点(如上所述)。正是 NF-κB 复杂性和它在多种免疫过程的临床相关性，使得大家对它进行了大量研究，而且基于 NF-κB 作用的分子基础已获得了大量研究成果。

通常，NF-κB 活性的诱导不能被蛋白合成抑制剂所阻断，提示其活化过程肯定是因为对一种早已存在的蛋白质分子进行修饰所致。的确，在大多数核中缺乏 NF-κB 活性的细胞，细胞质中有非活化形式的不能结合 κB 位点的 NF-κB，但在体外向胞质提取物中加入脱氧胆酸(deoxycholate，DOC)钠后，其可被激活[676]。DOC 通过去除名为 IκB 的 NF-κB 抑制因子的亚单位与 NF-κB 的结合而起作用[677]。最初的研究表明 NF-κB 的活化形式是由两种名为 p50、p65(分子质量为 50kDa 和 60kDa)的不同亚单位构成的复合物。因此，起初的实验提示了如下模型的存在，胞质中非活化的 NF-κB 以 p50、p65 和 IκB 复合物的形式存在；NF-κB 生理性激动剂可去除 IκB 活性，从而释放出 p50-p65 异型二聚体，该二聚体进入核中结合 κB 位点，从而激活转录过程。

对编码 NF-κB 蛋白基因的克隆提供了更加复杂而有趣的作用图谱[678]。p50 亚单位和紧密相关的 p52 蛋白被编码为前体蛋白，分别命名为 NF-κB1(p105/p50)和 NF-κB2(p100/p52)。两种蛋白质 N 端都有一段约 300

个氨基酸的DNA结合域。该结构域属于进化保守蛋白的古老家族,它在果蝇中有功能性同源成员。该家族和该结构域命名为Rel,发现于鸟类网状内皮病毒v-rel癌基因之后,v-rel是一早已被认识的家族成员[679]。NF-κB1和NF-κB2的C端处包括7个33个氨基酸序列的重复片段,名为钩素(ankyrin)重复序列;从细菌到哺乳动物的多种蛋白质中均发现有这些重复序列的存在,这些序列通常介导了蛋白质与蛋白质间的相互作用。NF-κB1和NF-κB2的前体形式是无活性的,且被局限于胞质中,因为一个核定向序列(nuclear localization sequence, NLS)被C端结构域封闭;当起封闭作用的结构域被切除后该蛋白即被活化,此时暴露出p50(或p52)中的NLS。目前所知的Rel家族中其他成员都包含Rel同源结构域,而不含抑制性结构域;取代抑制性结构域的是转录激活结构域。这些蛋白质包括Rel A(编码P65)、c-rel(v-rel癌基因的细胞同源物)、Rel B和两种果蝇蛋白Dorsal和Dif。通过其Rel结构域的相互作用,Rel家族中不同成员能形成异源或同源二聚体,其中一些在结合DNA基序方面显示出轻微不同。不同成员主要在B细胞发育的不同阶段发挥作用;在前B细胞(和非B细胞中),有p50和p65存在;在成熟B细胞和LPS处理的B细胞中有p50和c-rel;在浆细胞瘤中有p52和Rel B存在[657,680~682]。尽管p50亚单位在B细胞发育中有十分重要的作用,但P50敲除小鼠都有大致正常的κIg表达且κ和λ轻链的比例正常,这可能是因为其他Rel家族成员的代偿所致。然而,这些小鼠在产生活性Ig[586]和表达某些已转换亚型(如IgG1、IgA和IgE[114])方面有缺陷。

IκB基因克隆[683~685]揭示了另一个蛋白家族的存在,该家族所有成员都具有NF-κB1、NF-κB2前体蛋白C端的钩素(ankyrin)重复序列。该家族包括IκBα、IκBβ、bcl3和果蝇蛋白cactus。当Bcl3结合p50或p52同源二聚体时,其在促进核定位[686]和通过激活结构域激活转录中的作用是少见的[687,688];该蛋白并不直接参与Igκ增强子中的NF-κB功能。IκBα或IαBβ能结合Rel家族二聚体,在胞质中以非活化形式存在。许多同样的刺激物也可通过蛋白水解去除Rel前体蛋白中包含钩素重复序列的C端而以相似的机制激活Rel二聚体-IκB复合物。IκB磷酸化这一关键步骤[689]显然是通过IκB特异性激酶完成的[690,691,691a]。该磷酸化蛋白是小蛋白泛素的作用靶,通过相互作用相当于给磷酸化蛋白加上易被蛋白酶体破坏标志[692]。IκBα和IκBβ在与特异性Rel二聚体作用时显示出某种不同的偏爱性,同时两者在组织分布和参与调节方面也显示出不同。IκBα启动子包括多个κB位点,这些位点能在因IκB破坏而释放出NF-κB时被激活,允许这种蛋白质移入核中并刺激IκBα合成,从而导致NF-κB受抑。因此,在IκBα占优势的细胞中,NF-κB激活是短暂的[693]。相比之下,IκB则不以此方式进行调节,所以在它占优势的细胞中,NF-κB激活可能持续更长时间[685]。NF-κB对κ表达的重要性可通过用能抑制Rel A和C-Rel的工程化IκB转染AMuLV前B细胞系的实验加以证实;这种双重阻断能明显抑制胚系κ转录和重排[694]。

162

iE$_κ$上游的一个MAR和沉默子元件

在iE$_κ$上游存在一个A/T富含区,称作MAR[695]。将κ基因构建体作为转基因插入小鼠基因组或稳定整合入B细胞的实验证实这种MAR利于相关基因的转录[696,697]和相关的去甲基化作用[698]。(这种去甲基作用也能通过NF-κB调控[699]。)据报道,在MAR中有一个AP1结合位点[700]。这种位点在转染入LPS处理过的前B细胞和成熟B细胞时,表明该位点是增强子发挥活性所必需的,并在EMSA实验中显示出LPS诱导结合能力。在转染HeLa和T细胞时,一个κB序列5′端的长为232碱基的片段能抑制相连基因的表达,而该片段在B细胞中不影响表达[701]。因此,该片段可能包含有一个基因沉默子,其在非B细胞中活化且利于形成增强子的B细胞特异性。一个名为κNE的短元件(负性元件)紧位于κB上游(该位置在人和兔中是保守的),它能抑制增强子活性[702];这种抑制作用可被其上游(距离仅为几个碱基对)另一元件以B细胞特异方式而逆转。

3′κ增强子

增强子组分

像在重链系统中一样,寻找C$_κ$基因下游第二种增强子的研究十分火热,因为内源性κ基因表达的细胞系似乎很难用已知内含子内增强子机制解释。因而发现在骨髓瘤S107,由κ内含子内增强子驱动的转染构

建体不能转录，因为该细胞系缺乏 NF-κB 活性，但其内源性 κ 基因可以转录[703]。对 C_κ 基因 3′端的研究表明第二种增强子位于 C_κ 下游 9kb 处[704]。该增强子比 κ 内含子内增强子的活性高七倍，并经转染实验证实其为 B 细胞特异性。包含 3′增强子的转基因构建体，其转染基因的表达能力比不含此增强子的构建体高 20 多倍[705]。正如 iE_κ 一样，在前 B 细胞中 $3'E_\kappa$ 也能被 LPS 激活。对鼠增强子的功能元件业已研究清楚，证明一套复杂基序大部分集中在一段 132bp 的核心增强子上(图 5.19D)。经缺失和使用包含序列 CATVTGTT 的多聚化构建体鉴定出一个重要基序，该基序与 HLH 结合基序 CANNTG 相一致；的确，由于该基序多聚化形式的活性和完整增强子的活性，使该基序能结合这样一个蛋白质，同时该基序也能被前述的 HLH 蛋白 Id 所抑制[706]。第二个基本基序可结合 PU.1(一种前面已提到的转录因子 ETS 家族成员之一)。PU.1 结合于增强子可产生第二个 B 细胞特异性蛋白——名为 PU.1 相互作用蛋白或 Pip(正式名称为 NF-EM5)，该蛋白可结合邻近的 DNA 片段，相应片段完整性对全增强子功能是必需的[707,708]。Pip 同转录因子中干扰素调节因子(IRF)家族成员同源，其结合 PU.1 对下面将提到的鼠 λ 增强子也很重要。Pip-PU.1 相互作用需要 PU.1 特定丝氨酸残基磷酸化，这表明磷酸化程度可能利于增强子活性的生理性调节。

位于这两个基序上游的一个序列，经突变分析证实其对增强子发挥最大活性是必需的，通过 λgt11 文库筛选发现该序列能结合活化转录因子(activating transcription factor, ATF-1)和 cAMP 反应元件调节子(cyclic AMP response element modulator, CREM)][709]。这两种蛋白质能在体外结合 PU.1。CREM 在增强子发挥功能中的作用可被 cAMP 二丁基酯增强 $3'E_\kappa$ 活性的试验结果所支持。这些因子的 DNA 结合基序也同 AP-1 位点相一致，且 AP-1、C-Fos 和 C-Jun 的组分也能通过此基序来激活增强子[710]。的确，这两种 AP-1 亚单位能参与由 PU.1 和 Pip 组成的更高级复合体，这一点可经 EMSA 的生化方法检测以及在成纤维细胞中表达时，通过两种蛋白质协作活化增强子的功能检测出来。在成纤维细胞中通常情况下这个增强子是沉默的。体外足迹法测出一个位点存在于前 B 细胞和 B 细胞，但不存在于浆细胞，EMSA 实验证实该位点可结合一种具有 BSAP 特征的蛋白质[711]。在核心增强子上游约 90bp 处有一个结合转录因子 SP1 的位点，该位点在某些构建体中对发挥最大增强子活性是必需的[712]。

紧邻鼠 3′κ 增强子下游是一负调节区，该区能抑制前 B 细胞中增强子活性[626]。该区一个组分可作为锌指蛋白 YY1 或 NFE1 的结合位点。另一个组分可能作为淋巴细胞增强子因子-1(lymphocyte enhancer factor-1, LEF-1)的结合位点，LEF-1 是一 HMG 相关蛋白，它可结合于 DNA 浅槽从而使 DNA 卷曲；该蛋白还是一已知 TCR-α 增强子调节的组分。在这种推断的 LEF-1 位点的结合活性可被 LPS 处理所抑制，这提示这种效应可能解释了 $3'E_\kappa$ 增强子活性如何在缺失 NF-κB 结合位点的情况下被 LPS 上调[713]。

B 细胞发育中两种 κ 增强子的作用

内含子性 κ 增强子似乎对 V_κ-J_κ 重组的发生至关重要，因为人为将增强子替换为新霉素抗性基因会严重影响重组，甚至使这种重组不能发生[277,714]。基于转染实验提示，该增强子在 B 细胞中可有节制地活化，但其活性能为活化剂如 LPS 和佛波酯上调，这些活化剂通过活化 NF-κB 而发挥作用。虽然增强子在浆细胞瘤细胞中活化，但其完整性似乎在该阶段对 κ 基因表达并不至关重要，此时 $3'E_\kappa$ 活性更高；然而，一些转染实验提示这两种增强子可能协同作用于成熟 B 细胞和浆细胞阶段[715,716]。甚至在前 B 细胞阶段，$3'E_\kappa$ 也具有活性并能使缺乏 iE_κ 的转染 κ 基因以细胞特异性表达[717]。这两种增强子似乎在体细胞突变时对维持 κ 转基因表达是必需的[432]，尽管该效应的某些部分可能通过影响转录而介导。在有 $3'E_\kappa$ 靶向破坏的小鼠中，表达 κ 的 B 细胞数目减少。虽然转染有能使 V_κ-J_κ 连接的构建体的动物中，该增强子似乎有利于 V_κ-J_κ 重组[278]，但 $3'E_\kappa$ 的主要功能可能是抑制重组。在缺乏该增强子的动物中，重组发生于 T 细胞或未成熟前 B 细胞[264]。

163

体内足迹法研究显示，B 细胞系发育过程中，这两种增强子的活性改变可伴随核结合蛋白占据特异性基序的改变而变化[711,718]。

λ 增强子

多年来，λ 基因座使在 J_λ-C_λ 内含子中寻找增强子的努力失败，但随着对 C 基区下游增强子的认识，注意

力便转向这些区域并鉴定出了 λ 增强子[719]。高度同源 B 细胞特异性增强子位于鼠 C_λ4(E_λ2-4 增强子)下游 15.5kb 处和 C_λ1 下游 35kb 处(E_λ3-1 增强子)。每个增强子有四个功能基序[720]。其中两个(λA、λB)对增强子功能是至关重要的(特别是其中之一发生失活性突变时),虽然它们以多聚体形式存在时均不具有活性。λB 基序可结合 PU.1 和 Pip[721,722],它们在 3′E_κ 中也可结合到一起(如上所述)。λA、λB 元件位于 E 盒样基序侧翼,它们或许可与在其他 Ig 增强子中活化的 HLH 蛋白结合。

人 Ig 增强子

上面提到的三种 Ig 基因座中的几种调节区集中在鼠基因上,这是因为这些区域在其他种属同源区被发现之前已被发现,且对它们的功能已进行了较详细的研究。人同源区序列研究显示出高度保守性,特别是包含功能性转录因子结合基序的核心增强子。其他增强子特性(如 DNase 超敏性、体外蛋白结合和功能性增强子活性)也已在人 Ig 增强子中得以描述。因此,同两种鼠增强子相比,人 λ 基因座包括 C_λ7 下游的一个单一增强子[723~725]。相反,人 Ig 重链基因座的两个 γ-γ-ε-α 片段的重复导致了人 C_α 基因下游重复增强子复合体的出现[491,726]。对人 iE_κ[493,671,727~729]、人 3′E_κ[140,730]和人 E_μ[486,731~734]也进行了分析。

关于 Ig 转录调节概括总结

三个 Ig 基因座中每一基因片段都受编码外显子区外的邻近 DNA 的调控。调控区由几种基序组成,这些基序通过结合激活或抑制转录起始的特异性核因子来调控转录。其中一些基序被不同增强子或启动子共有,而另一些则是某些区域独有的。不同类型细胞中核因子的存在(或活性)通常与相关基因片段的表达相关联。通过研究数据似乎已鉴定出一个复杂调节机制中的许多组分,但离真正弄清仍有很大距离。关于调控核因子的是什么以及已知组分在细胞成熟过程中和对外部信号(如抗原、细胞因子和 T 细胞)作出反应时如何变化,我们都知之甚少;同时,我们也不知道这些核因子作用如何同染色体的其他变化(如组蛋白乙酰化、DNA 甲基化、基质黏附和核小体重定位等)相协同。

免疫球蛋白基因的应用科学

提到这点,本章讨论我们如何用现有 Ig 知识解释抗体反应。在这部分,我们主要阐明几个其他领域的例子来看一看这些知识应用的有趣结果。

淋巴恶性肿瘤中 Ig 基因

许多恶性淋巴瘤都来源于单一转化细胞,这种细胞经历了丧失正常细胞调控的克隆扩增。B 细胞恶性淋巴瘤是典型克隆扩增的例子,因为这些肿瘤的起源细胞有独特的遗传物质(重排的 Ig 基因),这些遗传物质不同于来自同一机体的大多数 DNA。相似地,对 TCR 基因的分析也有利于阐明 T 细胞恶性淋巴瘤的形成。两种基因系统的检查对确立缺乏特异性表型标记的肿瘤系和检测恶性肿瘤克隆重组标记非常有用;目前已积累了大量临床资料[735~738]。

分析失控性克隆增殖的第一个策略是从同一病人的肿瘤组织和正常组织中分离出基因组 DNA,然后用 Southern 印迹法检查其中 Ig 或 TCR 基因重组情况。B 细胞非克隆群包含非常多的重排物,以致用限制性酶消化和 Southern 法分析后,带有 J_H 序列的重排片段在整个凝胶电泳泳道上分布,所以特异性重排带被检测到。相反,一个特异重排的克隆扩增(如在恶性淋巴瘤中)则会产生一条清晰的重排带,甚至当肿瘤细胞在细胞总数中占很少比例时也能检测到。混合实验显示,重排带能在恶性克隆细胞只占全部细胞 1%时被检测出(尽管更典型的检测下限是 5%)。Southern 印迹技术不仅能应用于外周淋巴细胞,也能应用于实体瘤活体标本。最近,能扩增痕量 DNA 的 PCR 方法使得评价很小的组织切片中的克隆重排或检测 10^5 个正常细胞中

极少白血病细胞成为可能;这种评价对临床判断十分重要[739]。Ig 基因重排存在于急性淋巴母细胞性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)、慢性白细胞性白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)、多发性骨髓瘤、B 细胞滤泡状和分散性淋巴瘤、毛细胞样白血病、B 细胞性前淋巴细胞白血病、霍奇金病、伯基特淋巴瘤和再生障碍性慢性骨髓性白血病[738]。

经 DNA 分析,部分揭示了缺乏 B 和 T 表型标记物的 ALL 细胞中重排情况(在 DNA 分析应用前,通常不能确定来源的细胞系为 80%)。这些裸 ALL 样本大多数包括了重排 Ig 重链基因,且大约 40%还有轻链基因(尽管没检测到表面 Ig)。因而这些细胞具有淋巴发育中前 B 细胞阶段的特点。ALL 病程中,某些 ALL 细胞表现出其他 Ig 基因重排的克隆进化特征,因而更加类似前 B 细胞表型。当用 Southern 印迹法检测前 B 细胞性 ALL 病人的系列外周血样本中 DNA 时,克隆重排带可作为白血病缓解与复发的标志[740,741]。Ig 基因重排还可发生在 T 细胞性 ALL 中;在这些恶性肿瘤中不仅 Ig 重链基因重排少见,而且也无轻链重排。相反,半数前 B 细胞性 ALL 则有 TCR 基因重组,尤其在 TCR-γ 基因座[740]。这些细胞系失真性的例子反应出在确定向 B 或 T 细胞分化前的发育阶段,基因系统对重组酶机制敏感。

164

涉及 Ig 基因座的染色体易位

前面讨论的发生在肿瘤中的重排代表了发生于恶性前祖细胞的生理性重组事件,与此相反,一类完全不同的 Ig 基因重排可发生于几种淋巴瘤;这种重排在肿瘤自身恶性转化中发挥作用。最近发现的所有病例(有两例除外),均涉及了在 B 细胞系中正常表达的基因。

伯基特淋巴瘤中的 c-myc 易位

第一个需阐明的例子(也是代表其原型的例子)是伯基特淋巴瘤,它与染色体易位模式相一致,涉及了 8 号染色体与 14 号、2 号染色体或 22 号染色体中的一个发生相互交换。后三条染色体包含了三种人 Ig 基因座(重链、κ 链、λ 链)[47,742],其中 Ig 基因通过原位杂交被定位于 8 号染色体涉及易位的相应区带中。这些易位断裂点已被克隆和测序,从而提供了一个关于非生理性重组产物的详细图谱(图 5.20)。

从 8 号染色体所获得的序列与 c-myc 原癌基因相一致,该基因是最早发现于鸟类造白细胞组织增生病毒癌基因的哺乳类细胞基因同源物[743]。c-myc 易位入 Ig 重链基因座也见于鼠浆细胞瘤中 12;15 易位。最常涉及的 C_H 区是 α(在小鼠)和 μ(在人细胞),通常是位于非表达染色体的等位基因。这些易位使 Ig 重链和 c-myc 基因以头对头方式连接(相对方向)。如图 5.20 所示,c-myc 基因第一外显子通常在 Ig 重链相关的易位产物中是不存在的,但因其是非编码外显子,该基因仍能编码功能蛋白。针对 c-myc 和 Ig 重链的易位位点可在很长一段距离中变动,在某些 $14q^+$ 染色体中距离可达 100kb 以上。通常,伯基特瘤中的易位可分为两类,分别与该疾病的临床两种类型(流行性非洲型和散发型)相对应[744]。流行性伯基特瘤细胞系似乎处于 B 淋巴细胞早期阶段,因为它们主要产生膜 Ig;通过这些细胞系证实 Ig 基因座断裂点靠近 V 区和 J 区,c-myc 断裂点在 1 号外显子 5′端。然而,最近报道指出,流行性瘤细胞系有体细胞突变的证据[744a,744b],结合有关 VDJ 重组可在 GC 中重新激活的这一认识(上面已提到过),提示流行性瘤细胞系所处的 B 细胞发育阶段比以前研究者们所认为要晚些。少见的涉及 κ 和 λ 的易位可产生 c-myc 下游的这些基因,这些基因以相同的 5′→3′方向排列,参见图 5.20。分析这些易位作用提供了一个附带说明,即正常 Ig 基因座在各自染色体的着丝粒中按 5′→3′方向排列。

许多观察结果认为,造成 c-myc 与 Ig 基因座相邻接的易位作用参与了前体淋巴细胞恶变。正常细胞中,myc 蛋白在调控细胞周期进行方面有着复杂的作用,这种作用可能是通过影响与细胞分裂有关基因的转录激活而发挥的。Myc 蛋白有上面曾讨论过的 HLH 转录因子中 bHLH-拉链家族的典型结构。Myc 能与 Max 形成异源二聚体,其中 Myc 可在体外结合典型 E 盒基序 CACGTG[745],从而调节与其调控增生功能有关的几种基因[746,747]。在伯基特瘤系中,转录通常处于相对高的稳定水平,这可能利于这些细胞恶性增殖。在伯基特淋巴瘤和小鼠骨髓瘤体细胞杂交体中,发现在含有 $14q^+$ 染色体杂交体中有人 c-myc 转录物存在,但在有正

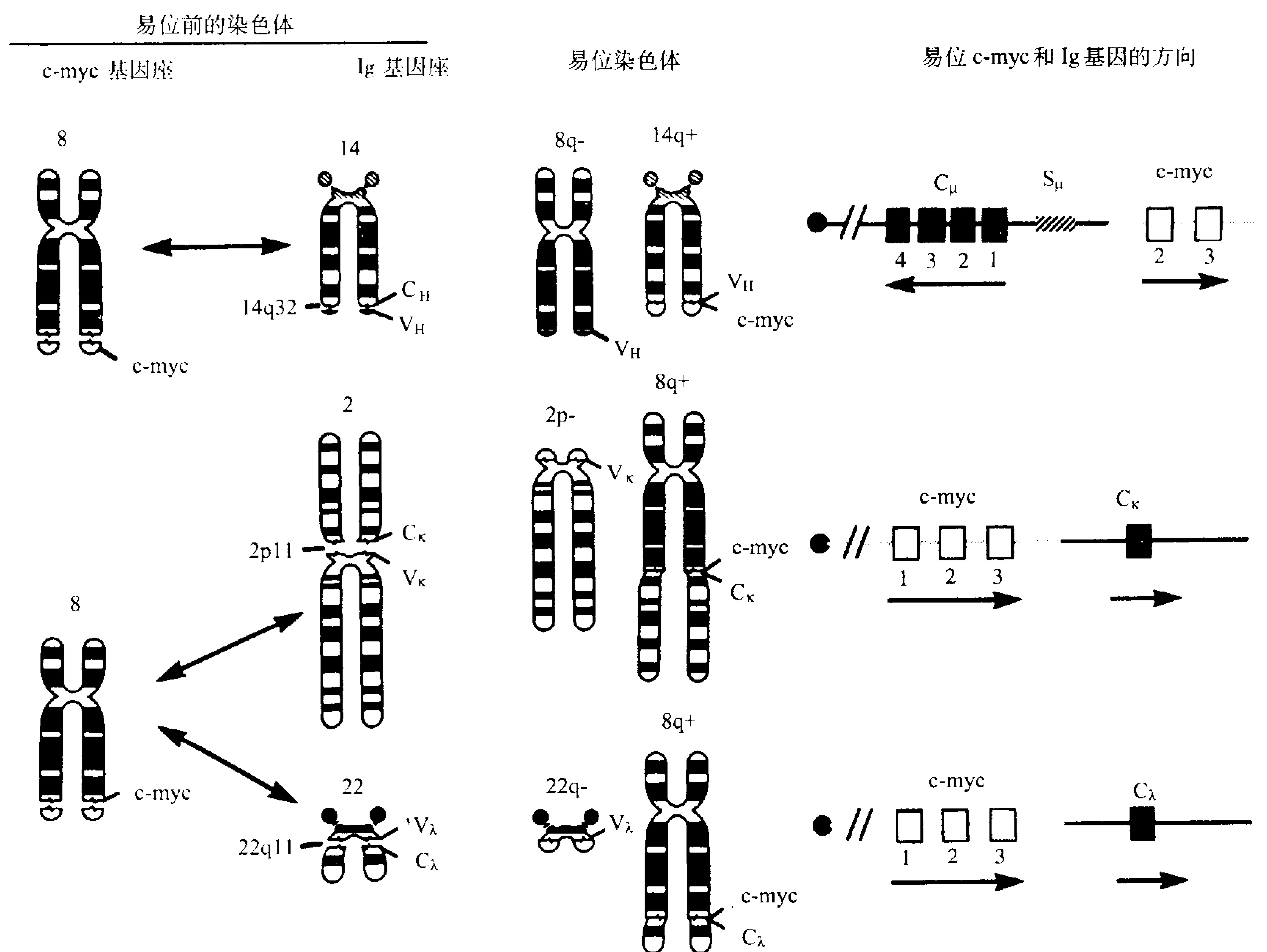


图 5.20　在恶性淋巴瘤中发现的在 Ig 基因和 c-myc 基因座之间发生的易位。8 号染色体上的 c-myc 基因(左侧)与易位有关,该易位是由于在基因自身上方(顶部)或下方(底部)发生染色体断裂所致。在前一情况中,易位到 14q32 的 Ig 重链基因座可导致产生 $14q^+$ 染色体,在这种染色体中 c-myc 序列和 Ig 重链序列的方向相反(右上)。在后一情况中,带有 2p11 的 Igκ 基因座或 22q11 的 Igl 基因座的易位可导致产生 myc 和 Ig 基因以相同方向进行的连接。

常 8 号染色体的杂交中却没有。这一发现证实,c-myc 基因易位入 Ig 基因座后可顺式激活其转录作用[748]。某些伯基特淋巴瘤中内含子内 μ 增强子邻近区可能介导此激活作用。在另外一些伯基特淋巴瘤中,该 μ 增强子不存在于易位的 c-myc 基因座中,此时 c-myc 的激活可能由 3′αE 和相关调节区所介导,这些区域有能力刺激其自 c-myc 启动子的转录[490]。这些区域的 LCR 特性暗示存在潜在长距离调控,这或许可解释某些伯基特瘤系中 c-myc 表达的失控(甚至当 c-myc 基因距 Ig 重链基因座相对较远时)。对有 c-myc 转位入 TCR-α 链基因座的 T 细胞白血病的研究[749]支持在癌发生中有失控性 c-myc 表达的普遍性。

涉及免疫球蛋白基因座的其他癌基因易位作用

除了 8 号染色体上 c-myc 的基因易位外,其他涉及 Ig 重链基因座的易位也见于淋巴恶性肿瘤,易位断裂点已被克隆,旨在鉴定新的原癌基因,这些基因可能像 c-myc 一样通过易位而被激活。一种 11;14 易位可见于某些 CLL 和中央细胞性 B 细胞淋巴瘤,易位的结果使非表达 Ig 重链基因座与 11 号染色体上名为 bcl-1(B 细胞白血病/淋巴瘤-1)的区域相连接[750]。虽然检测该区域失调性转录单位的企图最初未获成功,但发现了一个候选癌基因,该癌基因最早作为一种不同染色体重排的参与者而被发现,它与甲状旁腺基因有关[751]。该癌基因名为甲状旁腺腺瘤病-1(parathyroid adenomatosis-1,PRAD-1),它编码周期素 D1(一种细胞分裂调节子),它定位于 11q13,该位点参与了与 Ig 重链基因座的易位。周期素 D1/PRAD-1/Bcl-1 转录物在几种有 bcl 易位的

CLL 瘤系中升高(与未发生这种易位的 CLL 相比),同时在约 90%的被膜细胞淋巴瘤中这些转录物也升高[752]。

在大多数滤泡性淋巴瘤病例中,可见另一种涉及 14 号染色体的易位,且这种易位还可涉及 18 号染色体的 q21 带。通过分析包含易位断裂点的克隆片段,发现了一种名为 bcl-2 的新癌基因的特性[753]。14;18 易位可产生 bcl-2-Ig 融合基因,其 mRNA 转录物水平因转录失调和 RNA 加工改变而升高。bcl-2 基因是寻常的癌基因,其正常功能不是促进细胞增生而是阻止程序性细胞死亡或凋亡[754]。在以异二聚体形式激活或抑制凋亡的蛋白中,被发现的第一个成员就是 Bcl-2 蛋白[755]。Bcl-2 蛋白表达于某些细胞群正在凋亡的组织中,而被选择的亚群却不受伤害[756]。特别指出的是,该蛋白质还可在 GC 顶端轻链区被检测到,而该区被认为是 Ig 基因正在发生体细胞突变的区域,而且在此区只有表达了能以高亲和力结合抗原的表面 Ig 的 B 细胞亚群才能存活。Bcl-2 蛋白也表达于胸腺髓质中存活的 T 细胞。含 bcl-2-Ig 微小基因的转基因小鼠会患上淋巴细胞增殖综合征,这是因为其淋巴系寿命大大延长;最终大多数小鼠会患上淋巴瘤[757],这一点说明 bcl-2-Ig 转位在恶变中具有重要作用。

一种发生于 Ig 重链基因座和 19q13.1 之间的易位是 CLL 中反复发生但不具有普遍性的异常现象[758,759]。克隆的易位断裂点有一名为 bcl-3 的基因[760],它编码的蛋白质含有代表 IκB 样蛋白特征的七个钩素重复序列(如本章前面所述)。这种重组经常以头对头的方式发生位于 Ig 重链基因座中 S_α 位点的附近。与无这种异常的 CLL 系相比,发生 t(14;19)的 CLL 系中有完整 bcl-3 转录物的明显升高。尽管已有推测认为被 bcl-3 调控的基因正常情况下受 Rel 家族二聚体调控,但这些基因还尚未被鉴定。

bcl-6 最早是通过克隆 B 细胞性非霍奇金淋巴瘤中最常见易位的断裂点而发现的,这种易位涉及 IgH 基因座和 3q27[761]。易位作用使完整 bcl-6 转录物升高。Bcl-6 是一 DNA 结合蛋白,其分子质量为 95kDa,它有 6 个锌指结构域,能介导强烈的转录抑制,这主要是由于其 N 端 POZ 结构域的存在[762]。Bcl-6 的转录作用在活化 B 细胞中下调,但该蛋白质在 GC 中相对水平较高[763]。Bcl-6 敲除小鼠不能形成 GC,且不具亲和力成熟,但伴随有 IgE 淋巴细胞升高的弥散性炎症[764,765]。

bcl-7A 基因位于 12q24.1[766],bcl-8 位于 15q11-13[767],二者均从淋巴瘤中 Ig 重链易位断点被克隆。bcl-7A 序列同肌动蛋白结合蛋白 caldesmon 有同源性,bcl-8 表达于睾丸与前列腺中。但目前对二者知之甚少。

上述许多易位作用是通过克隆特有的扩增产物而经 PCR 被检测,这些产物可用于小量残瘤细胞的标记物[768]。

杂交重组

另一类发生于 Ig 重链基因座的异常染色体重排含有某些 T 细胞中 14 号染色体颠换[769,770]。这些显著的重排发生于 14q23 的 Ig 重链基因座和 14q11 的 TCR-α 基因座之间,这种重排显然是由 V 组装重组酶所介导。在一个详细研究的例子中,Ig V_H 片段同 TCR-α 片段相连于染色体端粒处,然而在着丝粒区发现了一个信号铰链;因为该铰链不同于同一染色体上 V_H-J_α 编码铰链,所以肯定至少发生了两次重组。在这些染色体颠换中未见有癌基因序列参与,所以它们与恶变的联系尚不肯定。通过 PCR,可在正常个体中检测出低水平的类似杂合抗原受体重组;这些重组在共济失调性毛细血管扩张病人和接触化学物质的农业工人(这些工人为淋巴恶性肿瘤高危人群)中比在正常人群中发生的概率高[771]。

疾病中异常 Ig 基因座

几种免疫缺陷疾病与血清中选择性或完全性 Ig 水平下降有关。虽然期望通过对 Ig 基因座的阐明而弄清楚这些疾病的分子基础,但关于 Ig 基因遗传性缺陷的例子却很少有报道。事实上,用 Ig 重链基因座中的探针检查限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)已揭示与 Ig 重链链有关的至少两种基因缺陷(家族性选择性 IgA 缺陷和高 IgM 综合症)不与 Ig 重链基因连锁。许多 Ig 缺陷症毫无疑问是由 B 发育、T 细胞相互作用、淋巴因子应答、抗原激发等复杂机制异常所导致的。

在一例罕见的因 Ig 基因突变而导致的 Ig 缺陷中,缺陷发生于 C_κ 基因,伴随有选择性 κ 合成缺陷[772]。

已发现该病人每一个 C_κ 等位基因上有不同的点突变，从而导致氨基酸替换，进而干扰了对 Ig 结构有至关重要作用的结构域内二硫键。

在人重链基因座已发现有六个大的缺失（图 5.7），最大的一个涉及到 γ1、Ψε1、α1、γ2 和 γ4 基因的丢失[55]。尽管血清中相关重链完全缺陷，但有这种纯合缺失的个体通常却没有免疫缺陷的临床表现。然而，发生在 μ 基因的纯合缺陷却导致了 γ 球蛋白缺乏症[772a]。

已有几个研究者发现，特异多态性 V 基因可能导致自身免疫疾病。虽然人 V 基因序列在不同个体间高度保守，但我们知道，人群中 V 基因座有很大的插入/缺失多态性[381,382,773~777]。从这一事实可推断，特异性异常胚系 γ 基因的存在可增加发生某些自身免疫应答的危险性，这非常像某些 MHC 单体型与某些疾病的高危险性相关。然而，表达自身免疫抗体的基因在人群中并不少见；并且虽然据报道某些疾病与 γ 单体有关[778,779]，但 V 基因多样性并非是主要危险因子。因特异性 V 区缺失引起的特异免疫缺陷也是有可能的。在纳瓦霍人（北美印第安人的一支）中，发现 V_κA2 基因（其编码产生优势 V_κ 链抗体能对抗流感嗜血杆菌）有一缺陷性拷贝，这提示这种缺陷可能导致了该人群对该细菌感染的易感性[780]。

Ig 基因的基因工程

运用以现代分子克隆技术获得的 Ig 基因有关知识，许多研究者将这些基因作为生物工程工具应用于各个基础研究领域和应用科学的目标。虽然对这些研究的详细讨论超出了本章范围，但我们还是简略描述一些有趣的想法。

一个基础研究目标是用工程化修饰的 Ig 结构来探索 Ig 分子的结构与功能的联系。最初使用产生异常抗体的自然突变杂交瘤细胞系，经这种方法研究了 IgM 分子。其异常 μ 基因被克隆并测序，所观察到的可能引起表型异常的突变通过定点突变的方法进行逆转或重新导入正常基因，从而验证其作用。使用此策略，在其分子近 C 端处发现了阻止五聚体形成的一段 39bp 序列的缺失[781]，同时发现替换 C_H3 结构域中第 436 个密码子可抑制补体激活的细胞溶解[782]。通过观察在两种 γ 亚型间进行不同残基交换而影响补体活化作用，已经鉴定了人 γ 亚型负责不同补体活化的序列[783]。在分析小鼠 γ2b 重链时，通过体外突变对 C_H2 结构域表面的氨基酸进行了系统改变，通过这种改变鉴定出了对结合补体 C1q 起至关重要作用的三个残基[784]。对 ε 重链结构与功能进行分析时，采用了测试 ε 链片段对其生物活性影响的方法，其中的 ε 链片段由细菌表达工程化 ε 基因序列的片段而产生。研究发现，C_H2-C_H3 边界处的一段 76 个氨基酸的片段能在体外结合肥大细胞，在体内抑制 IgE 功能[785]。对 V 区结构与功能的分析则用 V 区定点突变的方法来研究决定抗体亲和力和特异性的区域[786]。这些研究表明生物技术能提供强有力的方法来分析 Ig 蛋白结构的重要特性。

167

当充分了解结构与功能的关系后，下一步的挑战理所当然是提高 Ig 的天然性，通过修饰 Ig 基因适当片段来设计具有特定所需的 Ig 分子。一个目标是结合人与鼠单克隆抗体的优点来生产有用医药产品。鼠杂交瘤生长迅速，能产生大量抗体且相对稳定，而人杂交瘤在上三个方面则弱得多。但是，在许多应用中（如病人体内使用抗肿瘤抗体），容易制备的鼠单抗通常不能令人满意，因为其有免疫原性且相对缺乏 C 区依赖性功能（如补体固定和 ADCC）。许多实验室研究的一个解决方法是构建一个连接人 C 区基因到鼠杂交瘤 V 区的嵌合基因；将这种结构再转染鼠杂交瘤的无分泌功能的变异株，从而产生能分泌人源化的有鼠 V 区和人 C 区的抗体[787~789]。为降低因鼠 V 区引起的免疫原性，可将含目的特异性的鼠抗体中 CDR 移植到人 V 区框架序列中[790,791]。一种使用鼠杂交瘤技术获取人类抗体的完全不同的方法涉及了用基因工程鼠表达人类抗体[792]。这一宏伟目标先使用经过同源重组而使内源性 Igκ 和 Ig 重链基因座被破坏的小鼠，将这种小鼠的 ES 细胞与含人 DNA 的 YAC 构建体的酵母原生质体融合。这样产生的“杂种小鼠”含 66 个 V_H 区（约人类全部 V_H 的 80%）和全部 D_H、J_H、μ、δ 及 γ2 C 区基因，包括内含子内增强子和 3′α 增强子。转染的 κ 基因座含有大多数临近的 V_κ 基因座（32 个 V_κ 基因）、J_κ 和 C_κ 以及内含子内增强子和 3′增强子及 kde。人基因能支持鼠 B 细胞大致正常地发育，其中大部分分泌不含人源性的 Ig，B 细胞中 15%则表达含人重链和鼠 λ 链的抗体。人

基因座能支持对免疫产生的抗原特异性抗体应答,证明发生了类型转换和体细胞突变。杂种小鼠能用于产生能分泌人 Ig 但也保留其鼠源性抗体所有优点的杂交瘤。

随着 Ig 结构的进一步改变,生物工程师们设计了无需将分别含轻链和重链 V 区的不同蛋白质联合到一起的抗原结合分子。一种方法使用骆驼 Ig,其缺少轻链却仍能有效地结合抗原[793]。更广泛的研究则涉及单链 Fv 蛋白[794,795];这些 Fv 蛋白是将编码杂交瘤源性 V_κ 和 V_H 结构域的基因构建体用一段编码 15 个氨基酸柔性连接体的序列连接到一起,这样可使两个结构域通过相同的蛋白质-蛋白质相互作用而发生联系,从而使它们在一正常抗体中结合在一起。两条链因而形成一个组成型抗原结合结构,该结构通常保持了其亲本单抗的特异性和亲和力。

该范例还促成了另一项工程进展:即不使用杂交瘤融合而产生单抗的计划。被扩增的 V_κ 和 V_H 区文库被克隆入同一丝状噬菌体载体,这种载体可用以将两种 V 区以一种 Fv 融合蛋白的形式表达于噬菌体外膜上。随后,这种噬菌体展示文库可通过含有抗原的亲和层析柱[796]或用抗原成功沉淀[797]的方法进行筛选。经抗原结合的方法所筛选的噬菌体克隆包括编码有效抗原结合域的 V_κ 和 V_H 基因。在几个含 10^6 克隆的文库中,只要有来自经免疫后的 B 细胞的 V 区序列,便可将抗原结合噬菌体筛选出来;对于库容量足够大的文库,可无需进行预先免疫处理。一旦获得抗原结合克隆,可用其来进行随机突变和下一轮筛选来获得更高亲和力的抗体[798]。突变过程可经如下方法进行,包括化学致突变剂、错误倾向 PCR、在不同构建体中进行 V_κ 和 V_H 链更替、在致突变菌株中传代、基于密码子突变的策略[799]。一个相当有效的致突变策略是:利用抗体结构的序列空间在一蛋白序列内的不同位点进行更替式突变,从而在筛选前组装出含有不同突变的结合物[800]。一旦筛选出高亲和力 V_κ 和 V_H 组合,其中单个 V_κ 和 V_H 区便可被亚克隆并插入到适当表达载体中来产生 Ig 分子[801,802]。尽管关于由噬菌体展示文库技术得到的抗体序列是不是与天然抗体一样典型还在争论中,但因该技术不使用杂交瘤就可产生各种特异性高亲合力单抗而被普遍应用。

生物工程已用于改变 C 和 V 区天然序列以获得有特定属性的蛋白。修改 C 区序列可提高工程化抗体的功能。例如,在一 γ1 单克隆的 C_H3 结构域中,将其中丝氨酸残基替换为半胱氨酸残基可导致二聚化,从而大大提高了一种抗白血病抗体的功能[803]。V 区工程的一个特别有趣的应用是:设计有催化作用的抗体。酶催化作用在一定程度上是通过降低反应活化能而实现的,这就是说,酶能通过强有力的结合作用来稳定活化的转换状态中间体。利用相似机制,好几个小组都发现,抗体面对分子上类似于某化学反应的转化态时,其能催化该反应[804,805]。催化作用还能由 Fv 蛋白所激发[806]。V 区序列的定点突变可用于分析和增强这种催化活性[807]。的确,如果抗体催化作用能用来替代体内一种重要酶的缺失突变,那么,该抗体基因的随机变异就可在体内被选择用于提高活性[808]。

在另一个基因工程途径中,抗体结构域可被加到无关肽序列上,从而将某些需要的 Ig 功能赋予一种不同的蛋白质。最常见的是利用 V 区指导无关多肽链进入特定目标中。例如,在一试图提高组织血浆酶原激活物(t-PA,一种用于溶解心脏病突发患者中血栓的酶)的效能和特异性的实验中,可将一种抗纤维蛋白抗体连于 t-PA 序列上,从而将血栓酶原的激活集中在纤维块上[809]。另一个类似工程项目是将葡萄球菌核酸酶及大肠杆菌 DNA 聚合酶功能与 Ig 分子相结合。应用型研究的一个主要领域是研制和开发 Ig-毒素杂合体,该杂合体可将毒素带到特定目标,尤其是癌细胞上[810]。一种相关策略是将具有一种特异性的 V 区连接到具有另一种特异性的 Ig 上,从而创造出双特异性抗体或双抗体。双抗体有广泛用途,包括靶向 T 细胞(通过抗 CD3 分子)到携带特定抗原的细胞上,这种抗原能被抗体识别,不被 TCR 识别[811];双抗体还用于免疫实验中[812]。双抗体还能通将两条轻链和两条重链基因同时转染入一个生产细胞而产生,或通过将产生两种抗体的细胞融合而产生;在上面任一情况中,都需要将双抗体从混合物中提纯。另一方法是,通过一个氨基酸链将两个 Fv 蛋白连接到一起而使双抗体工程化[813]。

168

虽然上述例子代表了 IgV 区用途,但 IgC 区也已被应用,其通常被融合到具有各自靶蛋白的无关蛋白上;这种融合蛋白被命名为免疫黏附素。在这种结构中,Ig 恒定结构域可为多价,其稳定性增强并具有效应

功能(如结合 Fv 受体);这些特性对某些实际应用是有益的[814]。例如,大多数人鼻病毒受体是 ICAM-1,且该蛋白的可溶形式可作为捕获性受体而阻止感染。将 ICAM-1 分子融合到 Ig 重链结构域上形成的融合分子比单独 ICAM-1 抑制感染的作用有效得多[815]。

抗体基因结构已在多种表达系统中获得了表达,这些系统有 B 细胞系(转染瘤),其他哺乳动物(如 COS 细胞)和细菌等。最近实验发现,其可表达于昆虫[816]和植物[817]中,理论上讲,这两个系统表达的抗体能以不纯状态被吸收,从而可用于被动黏膜免疫治疗。Ig 基因结构还已被设计成不分泌抗体,从而用于结合细胞内靶分子(这种抗体称为"胞内抗体")[818]。

上面讨论的技术使用了 Ig 基因编码序列,但其调控序列也已被用于生物工程项目中;主要目的是获得外来基因构建体的 B 细胞特异性表达,这些构建体可被非特异性地导入多种类型的细胞中。例如,转基因可存在于每种细胞类型中,但将 μ 增强子连于 c-myc 基因的转基因构建体能特异性诱导 B 细胞系恶变,因为只有 B 细胞中这种增强子是活化的[819,820]。基于相同逻辑,含有一细胞内毒素(如白喉毒素)的反转录病毒构建体可程序化地在 B 细胞中特异表达,从而可能有助于治疗 B 细胞恶性肿瘤[821]。

结论

重组 DNA 技术对抗体应答研究的贡献是里程碑性的。最初研究使用强有力的克隆与序列测定方法来确定 Ig 基因结构,因为它们存在于胚系细胞和活化的分泌性 B 细胞中。新近研究已发现了这些基因在一些过程(如重排和体细胞突变)中独有的机制。尽管最近在无细胞提取物中产生 VDJ 和转换重组反应的实验有望对阐明这些过程的机制提供有价值的线索,但是这些更困难的问题仍然对今后相当长时期内的研究提出了挑战。同时,已获取的关于 Ig 基因中的知识正在用于许多临床和科学研究,有望在不远的将来取得令人鼓舞的进展。

(何凤田 译)

参 考 文 献

1. Dreyer WJ, Bennett JC. The molecular basis of antibody formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965;54:864–869.
2. Brack C, Hirama M, Lenhard SR, Tonegawa S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 1978;15:1–14.
3. Rabbitts TH. Evidence for splicing of interrupted immunoglobulin variable and constant region sequences in nuclear RNA. *Nature* 1978;275:291–296.
4. Seidman JG, Max EE, Leder P. A kappa-immunoglobulin gene is formed by site-specific recombination without further somatic mutation. *Nature* 1979;280:370–375.
5. Max EE, Seidman JG, Leder P. Sequences of five potential recombination sites encoded close to an immunoglobulin kappa constant region gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3450–3454.
6. Sakano H, Huppi K, Heinrich G, Tonegawa S. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* 1979;280:288–294.
7. Tonegawa S, Maxam AM, Tizard R, Bernard O, Gilbert W. Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:1485–1489.
8. Parhami SB, Margolies MN. Contribution of heavy chain junctional amino acid diversity to antibody affinity among p-azophenylarsonate-specific antibodies. *J Immunol* 1996;157:2066–2072.
9. Fang W, Mueller DL, Pennell CA, et al. Frequent aberrant immunoglobulin gene rearrangements in pro-B cells revealed by a bcl-xL transgene. *Immunity* 1996;4:291–299.
10. Gu H, Kitamura D, Rajewsky K. B cell development regulated by gene rearrangement: Arrest of maturation by membrane-bound D mu protein and selection of DH element reading frames. *Cell* 1991;65:47–54.
11. Corbett S, Tomlinson I, Sonnhammer E, Buck D, Winter G. Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: A systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination. *J Mol Biol* 1997;271:587–597
12. Ramsden DA, Baetz K, Wu GE. Conservation of sequence in recombination signal sequence spacers. *Nucleic Acids Res* 1994;22:1785–1796.
13. Nossal BJ, Szenberg A, Ada GL, Austin CM. Single cell studies on 19S antibody production. *J Exp Med* 1964;119:485–501.
14. Wang AC, Wang IYF, McCormick MN, Fudenberg HH. The identity of light chains of monoclonal IgG and monoclonal IgM in one patient. *Immunochemistry* 1969;6:451–459.
15. Nisonoff A, Fudenberg HH, Wilson SK, Hopper JE, Wang AC. Individual antigenic specificiy in immunoglobulins: Relationship to biosynthesis. *Fed Proc* 1972;31:206–209.
16. Gearhart PJ, Sigal NH, Klinman NR. Production of antibodies of identical idiotype but diverse immunoglobulin classes by cells derived from a single stimulated B cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:1707–1711.
17. Kincade PW, Lawton AR, Bockman DE, Cooper MD. Suppression of immunoglobulin G synthesis as a result of antibody mediated suppression of immunoglobulin M synthesis in chickens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970;67:1918–1925.
18. Davis MM, Calame K, Early PW, et al. An immunoglobulin heavy-chain gene is formed by at least two recombinational events. *Nature* 1980;283:733–739.
19. Kataoka T, Kawakami T, Takahashi N, Honjo T. Rearrangement of immunoglobulin gamma 1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:919–923.
20. Maki R, Traunecker A, Sakano H, Roeder W, Tonegawa S. Exon shuffling generates an immunoglobulin heavy chain gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:2138–2142.
21. Honjo T, Kataoka T. Organization of immunoglobulin heavy chain genes and allelic deletion model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:2140–2144.
22. Cory S, Adams JM. Deletions are associated with somatic rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* 1980;19:37–51.
23. Tucker PW, Marcu KB, Newell N, Richards J, Blattner FR. Sequence of the cloned gene for the constant region of murine gamma 2b immunoglobulin heavy chain. *Science* 1979;206:1303–1306.
24. Calame K, Rogers J, Early P, et al. Mouse Cmu heavy chain immunoglobulin gene segment contains three intervening sequences separating domains. *Nature*

1980;284:452–455.
25. Tucker PW, Slightom JL, Blattner FR. Mouse IgA heavy chain gene sequence: Implications for evolution of immunoglobulin hinge axons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7684–7688.
26. Tucker PW, Marcu KB, Slightom JL, Blattner FR. Structure of the constant and 3′ untranslated regions of the murine gamma 2b heavy chain messenger RNA. *Science* 1979;206:1299–1303.
27. Yamawaki KY, Kataoka T, Takahashi N, Obata M, Honjo T. Complete nucleotide sequence of immunoglobulin gamma2b chain gene cloned from newborn mouse DNA. *Nature* 1980;283:786–789.
28. Dard P, Huck S, Frippiat JP, et al. The IGHG3 gene shows a structural polymorphism characterized by different hinge lengths: Sequence of a new 2-exon hinge gene. *Hum Genet* 1997;99:138–141.
29. Yassalli P, Tedghi R, Lisowska-Bernstein B, Tartakoff A, Jaton JC. Evidence for hydrophobic region within heavy chains of mouse B lymphocyte membrane-bound IgM. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:5515–5519.
30. Alt FW, Bothwell AL, Knapp M, et al. Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin mu heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3′ ends. *Cell* 1980;20:293–301.
31. Early P, Rogers J, Davis M, et al. Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways. *Cell* 1980; 20:313–319.
32. Kemp DJ, Harris AW, Adams JM. Transcripts of the immunoglobulin C mu gene vary in structure and splicing during lymphoid development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:7400–7404.
33. Rogers J, Early P, Carter C, et al. Two mRNAs with different 3′ ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain. *Cell* 1980; 20:303–312.
34. Rogers J, Choi E, Souza L, et al. Gene segments encoding transmembrane carboxyl termini of immunoglobulin gamma chains. *Cell* 1981;26:19–27.
35. Tyler BM, Cowman AF, Gerondakis SD, Adams JM, Bernard O. mRNA for surface immunoglobulin gamma chains encodes a highly conserved transmembrane sequence and a 28-residue intracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:2008–2012.
36. Yamawaki KY, Nakai S, Miyata T, Honjo T. Nucleotide sequences of gene segments encoding membrane domains of immunoglobulin gamma chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:2623–2627.
37. Zhang K, Saxon A, Max EE. Two unusual forms of human immunoglobulin E encoded by alternative RNA splicing of epsilon heavy chain membrane exons. *J Exp Med* 1992;176:233–243.
38. Tsurushita N, Ho L, Korn LJ. Nuclear factors in B lymphoma enhance splicing of mouse membrane-bound mu mRNA in Xenopus oocytes. *Science* 1988;239: 494–497.
39. Galli G, Guise J, Tucker PW, Nevins JR. Poly(A) site choice rather than splice site choice governs the regulated production of IgM heavy-chain RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:2439–2443.
40. Peterson ML, Gimmi ER, Perry RP. The developmentally regulated shift from membrane to secreted mu mRNA production is accompanied by an increase in cleavage-polyadenylation efficiency but no measurable change in splicing efficiency. *Mol Cell Biol* 1991;11:2324–2327.
41. Peterson ML, Perry RP. Regulated production of mu m and mu s mRNA requires linkage of the poly(A) addition sites and is dependent on the length of the mu s-mu m intron. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8883–8887.
42. Tsurushita N, Korn LJ. Effects of intron length on differential processing of mouse mu heavy-chain mRNA. *Mol Cell Biol* 1987;7:2602–2605.
43. Watakabe A, Inoue K, Sakamoto H, Shimura Y. A secondary structure at the 3′ splice site affects the in vitro splicing reaction of mouse immunoglobulin mu chain pre-mRNAs. *Nucleic Acids Res* 1989;17:8159–8169.
44. Lassman CR, Milcarek C. Regulated expression of the mouse gamma 2b Ig H chain gene is influenced by polyA site order and strength. *J Immunol* 1992;148: 2578–2585.
45. Shimizu A, Takahashi N, Yaoita Y, Honjo T. Organization of the constant-region gene family of the mouse immunoglobulin heavy chain. *Cell* 1982;28:499–506.
46. Akahori Y, Kurosawa Y. Nucleotide sequences of all the gamma gene loci of murine immunoglobulin heavy chains. *Genomics* 1997;41:100–104.
47. Kirsch IR, Morton CC, Nakahara K, Leder P. Human immunoglobulin heavy chain genes map to a region of translocations in malignant B lymphocytes. *Science* 1982;216:301–303.
48. Flanagan JG, Rabbitts TH. Arrangement of human immunoglobulin heavy chain constant region genes implies evolutionary duplication of a segment containing gamma, epsilon and alpha genes. *Nature* 1982;300:709–713.
49. Max EE, Battey J, Ney R, Kirsch IR, Leder P. Duplication and deletion in the human immunoglobulin epsilon genes. *Cell* 1982;29:691–699.
50. Battey J, Max EE, McBride WO, Swan D, Leder P. A processed human immunoglobulin epsilon gene has moved to chromosome 9. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:5956–5960.
51. Hisajima H, Nishida Y, Nakai S, Takahashi N, Ueda S, Honjo T. Structure of the human immunoglobulin C epsilon 2 gene, a truncated pseudogene: Implications for its evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2995–2999.
52. Bensmana M, Huck S, Lefranc G, Lefranc MP. The human immunoglobulin pseudo-gamma IGHGP gene shows no major structural defect. *Nucleic Acids Res* 1988;16:3108.
53. Bottaro A, DeMarchi M, Migone N, Carbonara AO. Pulsed-field gel analysis of human immunoglobulin heavy-chain constant region gene deletions reveals the extent of unmapped regions within the locus. *Genomics* 1989;4:505–508.
54. Hofker MH, Walter MA, Cox DW. Complete physical map of the human immunoglobulin heavy chain constant region gene complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5567–5571.
55. Lefranc MP, Hammarstrom L, Smith CI, Lefranc G. Gene deletions in the human immunoglobulin heavy chain constant region locus: Molecular and immunological analysis. *Immunodefic Rev* 1991;2:265–281.
56. Knight KL, Becker RS. Isolation of genes encoding bovine IgM, IgG, IgA and IgE chains. *Vet Immunol Immunopathol* 1987;17:17–24.
57. Butler JE, Brown WR. The immunoglobulins and immunoglobulin genes of swine. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;43:5–12.
58. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993;363:446–448.
59. Bruggemann M, Free J, Diamond A, Howard J, Cobbold S, Waldmann H. Immunoglobulin heavy chain locus of the rat: Striking homology to mouse antibody genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:6075–6079.
60. Dahan A, Reynaud CA, Weill JC. Nucleotide sequence of the constant region of a chicken mu heavy chain immunoglobulin mRNA. *Nucleic Acids Res* 1983;11: 5381–5389.
61. Weill JC, Reynaud CA, Lassila O, Pink JR. Rearrangement of chicken immunoglobulin genes is not an ongoing process in the embryonic bursa of Fabricius. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3336–3340.
62. Parvari R, Avivi A, Lentner F, et al. Chicken immunoglobulin gamma heavy chains: Limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *EMBO J* 1988;7:739–744.
63. Reynaud CA, Dahan A, Anquez V, Weill JC. Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell* 1989;59:171–183.
64. Schrenzel MD, King DP, McKnight ML, Ferrick DA. Characterization of horse (*Equus caballus*) immunoglobulin mu chain-encoding genes. *Immunogenetics* 1997;45:386–393.
65. Kokubu F, Hinds K, Litman R, Shamblott MJ, Litman GW. Extensive families of constant region genes in a phylogenetically primitive vertebrate indicate an additional level of immunoglobulin complexity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84: 5868–5872.
66. Amemiya CT, Litman GW. Complete nucleotide sequence of an immunoglobulin heavy-chain gene and analysis of immunoglobulin gene organization in a primitive teleost species. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:811–815.
67. Wilson MR, Marcuz A, van GF, et al. The immunoglobulin M heavy chain constant region gene of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: an unusual mRNA splice pattern produces the membrane form of the molecule. *Nucleic Acids Res* 1990;18:5227–5233.
68. Litman GW, Murphy K, Berger L, Litman R, Hinds K, Erickson BW. Complete nucleotide sequences of three VH genes in Caiman, a phylogenetically ancient reptile: Evolutionary diversification in coding segments and variation in the structure and organization of recombination elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:844–848.
69. Yamawaki KY, Honjo T. Nucleotide sequences of variable region segments of the immunoglobulin heavy chain of *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res* 1987;15:5888.
70. Charlemagne J. Noninbred axolotls use the same unique heavy chain and a limited number of light chains for their anti-2,4-dinitrophenyl antibody responses. *Eur J Immunol* 1987;17:421–424.
71. Davis MM, Kim SK, Hood LE. DNA sequences mediating class switching in alpha immunoglobulins. *Science* 1980;209:1360–1365.
72. Dunnick W, Rabbitts TH, Milstein C. An immunoglobulin deletion mutant with implications for the heavy-chain switch and RNA splicing. *Nature* 1980;286: 669–675.
73. Kataoka T, Miyata T, Honjo T. Repetitive sequences in class-switch recombination regions of immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* 1981;23:357–368.
74. Nikaido T, Nakai S, Honjo T. Switch region of immunoglobulin Cmu gene is composed of simple tandem repetitive sequences. *Nature* 1981:292:845–848.
75. Marcu KB, Banerji J, Penncavage NA, Lang R, Arnheim N. 5′ flanking region of immunoglobulin heavy chain constant region genes displays length heterogeneity in germlines of inbred mouse strains. *Cell* 1980;22:187–196.
76. Winter E, Krawinkel U, Radbruch A. Directed Ig class switch recombination in activated murine B cells. *EMBO J* 1987;6:1663–1671.
77. Nikaido T, Yamawaki KY, Honjo T. Nucleotide sequences of switch regions of immunoglobulin C epsilon and C gamma genes and their comparison. *J Biol Chem* 1982;257:7322–7329.
78. Mowatt MR, Dunnick WA. DNA sequence of the murine gamma 1 switch segment reveals novel structural elements. *J Immunol* 1986:136:2674–2683.
79. Ravetch JV, Kirsch IR, Leder P. Evolutionary approach to the question of immunoglobulin heavy chain switching: Evidence from cloned human and mouse genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:6734–6738.
80. Rabbitts TH, Forster A, Milstein CP. Human immunoglobulin heavy chain genes: Evolutionary comparisons of C mu, C delta and C gamma genes and associated switch sequences. *Nucleic Acids Res* 1981;9:4509–4524.
81. Mills FC, Mitchell MP, Harindranath N, Max EE. Human Ig S gamma regions

and their participation in sequential switching to IgE. *J Immunol* 1995;155: 3021–3036.
82. Dunnick W. Hertz GZ, Scappino L, Gritzmacher C. DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res* 1993;21: 365–372.
83. Iwasato T, Shimizu A, Honjo T, Yamagishi H. Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination. *Cell* 1990;62:143–149.
84. Matsuoka M, Yoshida K, Maeda T, Usuda S, Sakano H. Switch circular DNA formed in cytokine-treated mouse splenocytes: Evidence for intramolecular DNA deletion in immunoglobulin class switching. *Cell* 1990;62:135–142.
85. von-Schwedler U, Jack HM, Wabl M. Circular DNA is a product of the immunoglobulin class switch rearrangement. *Nature* 1990;345:452–456.
86. Mills FC, Thyphronitis G, Finkelman FD, Max EE. Ig mu-epsilon isotype switch in IL-4-treated human B lymphoblastoid cells. Evidence for a sequential switch. *J Immunol* 1992;149:1075–1085.
87. Zhang K, Mills FC, Saxon A. Switch circles from IL-4-directed epsilon class switching from human B lymphocytes. Evidence for direct, sequential, and multiple step sequential switch from mu to epsilon Ig heavy chain gene. *J Immunol* 1994;152:3427–3435.
88. Malisan F, Briere F, Bridon JM, et al. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183:937–947.
89. Chu CC, Paul WE, Max EE. Quantitation of immunoglobulin mu-gamma 1 heavy chain switch region recombination by a digestion-circularization polymerase chain reaction method. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6978–6982.
90. Chu CC, Max EE, Paul WE. DNA rearrangement can account for in vitro switching to IgG1. *J Exp Med* 1993;178:1381–1390.
91. Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 1993;259:990–993.
92. Xu J, Foy TM, Laman JD, et al. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* 1994;1:423–431.
93. Hodgkin PD, Lee JH, Lyons AB. B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. *J Exp Med* 1996;184:277–281.
94. Siepmann K, Wohlleben G, Gray D. CD40-mediated regulation of interleukin-4 signaling pathways in B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1996;26:1544–1552.
95. Cheng G, Cleary AM, Ye ZS, Hong DI, Lederman S, Baltimore D. Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science* 1995;267: 1494–1498.
96. Cogne M, Lansford R, Bottaro A, et al. A class switch control region at the 3′ end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* 1994;77:737–747.
97. Jung S, Rajewsky K, Radbruch A. Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science* 1993;259:984–987.
98. Bottaro A, Lansford R, Xu L, Zhang J, Rothman P, Alt FW. S region transcription per se promotes basal IgE class switch recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *EMBO J* 1994;13:665–674.
99. Lorenz M, Jung S, Radbruch A. Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science* 1995;267:1825–1828.
100. Reaban ME, Griffin JA. Induction of RNA-stabilized DNA conformers by transcription of an immunoglobulin switch region. *Nature* 1990;348;342–344.
101. Daniels GA, Lieber MR. RNA:DNA complex formation upon transcription of immunoglobulin switch regions: implications for the mechanism and regulation of class switch recombination. *Nucleic Acids Res* 1995;23:5006–5011.
102. Snapper CM, Marcu KB, Zelazowski P. The immunoglobulin class switch: beyond "accessibility." *Immunity* 1997;6:217–223.
103. Ott DE, Alt FW, Marcu KB. Immunoglobulin heavy chain switch region recombination within a retroviral vector in murine pre-B cells. *EMBO J* 1987;6:577–584.
104. Leung H, Maizels N. Regulation and targeting of recombination in extrachromosomal substrates carrying immunoglobulin switch region sequences. *Mol Cell Biol* 1994;14:1450–1458.
105. Daniels GA, Lieber MR. Strand specificity in the transcriptional targeting of recombination at immunoglobulin switch sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5625–5629.
106. Du J, Zhu Y, Shanmugam A, Kenter AL. Analysis of immunoglobulin S gamma3 recombination breakpoints by PCR: Implications for the mechanism of isotype switching. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3066–3074.
107. Williams M, Maizels N. LR1, a lipopolysaccharide-responsive factor with binding sites in the immunoglobulin switch regions and heavy-chain enhancer. *Genes Dev* 1991;5:2353–2361.
108. Williams M, Hanakahi LA, Maizels N. Purification and properties of LR1, an inducible DNA binding protein from mammalian B lymphocytes. *J Biol Chem* 1993;268:13731–13737.
109. Hanakahi LA, Dempsey LA, Li MJ, Maizels N. Nucleolin is one component of the B cell-specific transcription factor and switch region binding protein, LR1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3605–3610.
110. Mizuta TR, Fukita Y, Miyoshi T, Shimizu A, Honjo T. Isolation of cDNA encoding a binding protein specific to 5′-phosphorylated single-stranded DNA with G-rich sequences. *Nucleic Acids Res* 1993;21:1761–1766.
111. Wuerffel RA, Nathan AT, Kenter AL. Detection of an immunoglobulin switch region-specific DNA-binding protein in mitogen-stimulated mouse splenic B cells. *Mol Cell Biol* 1990;10:1714–1718.
112. Kenter AL, Wuerffel R, Sen R, Jamieson CE, Merkulov GV. Switch recombination breakpoints occur at nonrandom positions in the S gamma tandem repeat. *J Immunol* 1993;151:4718–4731.
113. Ma L, Hu B, Kenter AL. Ig S-gamma-specific DNA binding protein SNAP is related to the helix-loop-helix transcription factor E47. *Int Immunol* 1997;9: 1021–1029.
114. Snapper CM, Zelazowski P, Rosas FR, et al. B cells from p50/NF-kappa B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class switching. *J Immunol* 1996;156:183–191.
115. Goldfarb AN, Flores JP, Lewandowska K. Involvement of the E2A basic helix-loop-helix protein in immunoglobulin heavy chain class switching. *Mol Immunol* 1996;33:947–956.
116. Lyon CJ, Aguilera RJ. Purification and characterization of the immunoglobulin switch sequence-specific endonuclease (Endo-SR) from bovine spleen. *Mol Immunol* 1997;34:209–219.
116a. Rolink A, Melchers F, Andersson J. The SCID but not the RAG-2 gene product is required for S mu-S epsilon heavy chain class switching. *Immunity* 1996;5: 319–330.
116b. Casellas R, Nussenzweig A, Wuerffel R, et al. Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J* 1998;17:2404–2411.
117. Jessberger R, Wabl M, Borggrefe T. Biochemical studies of class switch recombination. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;217:191–202.
118. Borggrefe T, Wabl M, Akhmedov AT, Jessberger R. A B-Cell specific DNA recombination complex. *J Biol Chem* 1998;in press.
119. Siebenkotten G, Esser C, Wabl M, Radbruch A. The murine IgG1/IgE class switch program. *Eur J Immunol* 1992;22:1827–1834.
120. Mandler R, Finkelman FD, Levine AD, Snapper CM. IL-4 induction of IgE class switching by lipopolysaccharide-activated murine B cells occurs predominantly through sequential switching. *J Immunol* 1993;150:407–418.
121. Jung S, Siebenkotten G, Radbruch A. Frequency of immunoglobulin E class switching is autonomously determined and independent of prior switching to other classes. *J Exp Med* 1994;179:2023–2026.
122. Baskin B, Islam KB, Evengard B, Emtestam L, Smith CI. Direct and sequential switching from mu to epsilon in patients with Schistosoma mansoni infection and atopic dermatitis. *Eur J Immunol* 1997;27:130–135.
123. Greenberg R, Lang RB, Diamond MS, Marcu KB. A switch region inversion contributes to the aberrant rearrangement of a mu immunoglobulin heavy chain gene in MPC-11 cells. *Nucleic Acids Res* 1982;10:7751–7761.
124. Jack HM, McDowell M, Steinberg CM, Wabl M. Looping out and deletion mechanism for the immunoglobulin heavy-chain class switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1581–1585.
125. Laffan M, Luzzatto L. Anomalous rearrangements of the immunoglobulin heavy chain genes in human leukemias support the loop-out mechanism of class switch. *J Clin Invest* 1992;90:2299–2303.
126. Knight KL, Kingzette M, Crane MA, Zhai SK. Transchromosomally derived Ig heavy chains. *J Immunol* 1995;155:684–691.
127. Maki R, Roeder W, Traunecker A, et al. The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. *Cell* 1981;24:353–365.
128. Shimizu A, Nussenzweig MC, Han H, Sanchez M, Honjo T. Trans-splicing as a possible molecular mechanism for the multiple isotype expression of the immunoglobulin gene. *J Exp Med* 1991;173:1385–1393.
129. Shimizu A, Honjo T. Synthesis and regulation of trans-mRNA encoding the immunoglobulin epsilon heavy chain. *FASEB J* 1993;7:149–154.
130. Mizuta TR, Suzuki N, Shimizu A, Honjo T. Duplicated variable region genes account for double isotype expression in a human leukemic B-cell line that gives rise to single isotype-expressing cells. *J Biol Chem* 1991;266:12514–12521.
131. Chen YW, Word C, Dev V, Uhr JW, Vitetta ES, Tucker PW. Double isotype production by a neoplastic B cell line. II. Allelically excluded production of mu and gamma 1 heavy chains without CH gene rearrangement. *J Exp Med* 1986;164: 562–579.
132. Akahori Y, Kurosawa Y, Kamachi Y, Torii S, Matsuoka H. Presence of immunoglobulin (Ig) M and IgG double isotype-bearing cells and defect of switch recombination in hyper IgM immunodeficiency. *J Clin Invest* 1990;85: 1722–1727.
133. Kunimoto DY, Sneller MC, Claflin L, Mushinski JF, Strober W. Molecular analysis of double isotype expression in IgA switching. *J Immunol* 1993;150: 1338–1347.
134. Hieter PA, Max EE, Seidman JG, Maizel JJ, Leder P. Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments. *Cell* 1980;22:197–207.
135. Hieter PA, Maizel JJ, Leder P. Evolution of human immunoglobulin kappa J region genes. *J Biol Chem* 1982;257:1516–1522.
136. Hieter PA, Korsmeyer SJ, Waldmann TA, Leder P. Human immunoglobulin kappa light-chain genes are deleted or rearranged in lambda-producing B cells. *Nature* 1981;290:368–372.
137. Durdik J, Moore MW, Selsing E. Novel kappa light-chain gene rearrangements in mouse lambda light chain-producing B lymphocytes. *Nature* 1984;307: 749–752.
138. Siminovitch KA, Bakhshi A, Goldman P, Korsmeyer SJ. A uniform deleting element mediates the loss of kappa genes in human B cells. *Nature* 1985;316:

260–262.
139. Klobeck HG, Zachau HG. The human CK gene segment and the kappa deleting element are closely linked. *Nucleic Acids Res* 1986;14:4591–4603.
140. Muller B, Stappert H, Reth M. A physical map and analysis of the murine C kappa-RS region show the presence of a conserved element. *Eur J Immunol* 1990;20:1409–1411.
141. Tonegawa S, Brack C, Hozumi N, Schuller R. Cloning of an immunoglobulin variable region gene from mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74: 3518–3522.
142. Miller J, Ogden S, McMullen M, Andres H, Storb U. The order and orientation of mouse lambda-genes explain lambda-rearrangement patterns. *J Immunol* 1988;141:2497–2502.
143. Storb U, Haasch D, Arp B, Sanchez P, Cazenave PA, Miller J. Physical linkage of mouse lambda genes by pulsed-field gel electrophoresis suggests that the rearrangement process favors proximate target sequences. *Mol Cell Biol* 1989;9: 711–718.
144. Sanchez P, Marche PN, Rueff JD, Cazenave PA. Mouse V lambda x gene sequence generates no junctional diversity and is conserved in mammalian species. *J Immunol* 1990;144:2816–2820.
145. Miller J, Selsing E, Storb U. Structural alterations in J regions of mouse immunoglobulin lambda genes are associated with differential gene expression. *Nature* 1982;295:428–430.
146. Scott CL, Mushinski JF, Huppi K, Weigert M, Potter M. Amplification of immunoglobulin lambda constant genes in populations of wild mice. *Nature* 1982;300:757–760.
147. Hieter PA, Hollis GF, Korsmeyer SJ, Waldmann TA, Leder P. Clustered arrangement of immunoglobulin lambda constant region genes in man. *Nature* 1981: 294:536–540.
148. Vasicek TJ, Leder P. Structure and expression of the human immunoglobulin lambda genes. *J Exp Med* 1990;172:609–620.
149. Kawasaki K, Minoshima S, Nakato E, et al. One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus. *Genome Res* 1997;7:250–261.
150. Dariavach P, Lefranc G, Lefranc MP. Human immunoglobulin C lambda 6 gene encodes the Kern+Oz-lambda chain and C lambda 4 and C lambda 5 are pseudogenes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9074–9078.
151. Stiernholm NB, Verkoczy LK, Berinstein NL. Rearrangement and expression of the human psi C lambda 6 gene segment results in a surface Ig receptor with a truncated light chain constant region. *J Immunol* 1995;154:4583–4591.
152. Taub RA, Hollis GF, Hieter PA, Korsmeyer S, Waldmann TA, Leder P. Variable amplification of immunoglobulin lambda light-chain genes in human populations. *Nature* 1983;304:172–174.
153. Hollis GF, Hieter PA, McBride OW, Swan D, Leder P. Processed genes: A dispersed human immunoglobulin gene bearing evidence of RNA-type processing. *Nature* 1982;296:321–325.
154. Sakaguchi N, Melchers F. Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Nature* 1986;324:579–582.
155. Kudo A, Sakaguchi N, Melchers F. Organization of the murine Ig-related lambda 5 gene transcribed selectively in pre-B lymphocytes. *EMBO J* 1987;6:103–107.
156. Kudo A, Melchers F. A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes. *EMBO J* 1987;6:2267–2272.
157. Sakaguchi N, Berger CN, Melchers F. Isolation of a cDNA copy of an RNA species expressed in murine pre-B cells. *EMBO J* 1986;5:2139–2147.
158. Dul JL, Argon Y, Winkler T, ten Boekel E, Melchers F, Martensson IL. The murine VpreB1 and VpreB2 genes both encode a protein of the surrogate light chain and are co-expressed during B cell development. *Eur J Immunol* 1996;26:906–913.
159. Hagiwara S, Tsunetsugu YY, Kimoto H, Takemori T. Expression of Vpre-B3 (8HS-20) molecules by alternative RNA processing. *Int Immunol* 1996;8: 1237–1244.
160. Tsubata T, Reth M. The products of pre-B cell-specific genes (lambda 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell. *J Exp Med* 1990;172:973–976.
161. Cherayil BJ, Pillai S. The omega/lambda 5 surrogate immunoglobulin light chain is expressed on the surface of transitional B lymphocytes in murine bone marrow. *J Exp Med* 1991;173:111–116.
162. Pillai S, Baltimore D. The omega and iota surrogate immunoglobulin light chains. *Curr Top Microbiol Immunol* 1988;137:136–139.
163. Tsubata T, Tsubata R, Reth M. Crosslinking of the cell surface immunoglobulin (mu-surrogate light chains complex) on pre-B cells induces activation of V gene rearrangements at the immunoglobulin kappa locus. *Int Immunol* 1992;4: 637–641.
164. Bauer TJ, McDermid HE, Budarf ML, Van KM, Blomberg BB. Physical location of the human immunoglobulin lambda-like genes, 14.1, 16.1, and 16.2. *Immunogenetics* 1993;38:387–399.
165. Bossy D, Milili M, Zucman J, Thomas G, Fougereau M, Schiff C. Organization and expression of the lambda-like genes that contribute to the mu-psi light chain complex in human pre-B cells. *Int Immunol* 1991;3:1081–1090.
166. Evans RJ, Hollis GF. Genomic structure of the human Ig lambda 1 gene suggests that it may be expressed as an Ig lambda 14.1-like protein or as a canonical B cell Ig lambda light chain: Implications for Ig lambda gene evolution. *J Exp Med* 1991;173:305–311.
167. Schiff C, Milili M, Bossy D, Fougereau M. Organization and expression of the pseudo-light chain genes in human B-cell ontogeny. *Int Rev Immunol* 1992;8: 135–145.
168. Frippiat JP, Williams SC, Tomlinson IM, et al. Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2. *Hum Mol Genet* 1995;4:983–991.
169. Van Ness BG, Coleclough C, Perry RP, Weigert M. DNA between variable and joining gene segments of immunoglobulin kappa light chain is frequently retained in cells that rearrange the kappa locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:262–266.
170. Hochtl J, Müller CR, Zachau HG. Recombined flanks of the variable and joining segments of immunoglobulin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79: 1383–1387.
171. Hochtl J, Zachau HG. A novel type of aberrant recombination in immunoglobulin genes and its implications for V-J joining mechanism. *Nature* 1983;302: 260–263.
172. Feddersen RM, Van NB. Double recombination of a single immunoglobulin kappa-chain allele: Implications for the mechanism of rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4793–4797.
173. Lewis S, Gifford A, Baltimore D. Joining of V kappa to J kappa gene segments in a retroviral vector introduced into lymphoid cells. *Nature* 1984;308:425–428.
174. Hesse JE, Lieber MR, Gellert M, Mizuuchi K. Extrachromosomal DNA substrates in pre-B cells undergo inversion or deletion at immunoglobulin V-(D)-J joining signals. *Cell* 1987;49:775–783.
175. Shapiro MA, Weigert M. How immunoglobulin V kappa genes rearrange. *J Immunol* 1987;139:3834–3839.
176. Shimizu T, Iwasato T, Yamagishi H. Deletions of immunoglobulin C kappa region characterized by the circular excision products in mouse splenocytes. *J Exp Med* 1991;173:1065–1072.
177. Selsing E, Voss J, Storb U. Immunoglobulin gene "remnant" DNA—implications for antibody gene recombination. *Nucleic Acids Res* 1984;12:4229–4246.
178. Maeda T, Sugiyama H, Tani Y, et al. Start of mu-chain production by the further two-step rearrangements of immunoglobulin heavy chain genes on one chromosome from a DJH/DJH configuration in an Abelson virus-transformed cell line: Evidence of secondary DJH complex formation. *J Immunol* 1987;138:2305–2310.
179. Reth M, Gehrmann P, Petrac E, Wiese P. A novel VH to VHDJH joining mechanism in heavy-chain-negative (null) pre-B cells results in heavy-chain production. *Nature* 1986;322:840–842.
180. Covey LR, Ferrier P, Alt FW. VH to VHDJH rearrangement is mediated by the internal VH heptamer. *Int Immunol* 1990;2:579–583.
181. Chen C, Nagy Z, Prak EL, Weigert M. Immunoglobulin heavy chain gene replacement: A mechanism of receptor editing. *Immunity* 1995;3:747–755.
182. Schuler W, Weiler IJ, Schuler A, et al. Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency. *Cell* 1986;46: 963–972.
183. Lafaille JJ, DeCloux A, Bonneville M, Takagaki Y, Tonegawa S. Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* 1989;59: 859–870.
184. McCormack WT, Tjoelker LW, Carlson LM, et al. Chicken IgL gene rearrangement involves deletion of a circular episome and addition of single nonrandom nucleotides to both coding segments. *Cell* 1989;56:785–791.
185. Schuler W, Ruetsch NR, Amsler M, Bosma MJ. Coding joint formation of endogenous T cell receptor genes in lymphoid cells from scid mice: Unusual P-nucleotide additions in VJ-coding joints. *Eur J Immunol* 1991;21:589–596.
186. Alt FW, Baltimore D. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: Implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:4118–4122.
187. Alt F, Rosenberg N, Lewis S, Thomas E, Baltimore D. Organization and reorganization of immunoglobulin genes in A-MULV-transformed cells: Rearrangement of heavy but not light chain genes. *Cell* 1981;27:391–390.
188. Lewis S, Rosenberg N, Alt F, Baltimore D. Continuing kappa-gene rearrangement in a cell line transformed by Abelson murine leukemia virus. *Cell* 1982;30: 807–816.
189. Reth MG, Ammirati P, Jackson S, Alt FW. Regulated progression of a cultured pre-B-cell line to the B-cell stage. *Nature* 1985;317:353–355.
190. Lewis S, Gifford A, Baltimore D. DNA elements are asymmetrically joined during the site-specific recombination of kappa immunoglobulin genes. *Science* 1985;228:677–685.
191. Lieber MR, Hesse JE, Mizuuchi K, Gellert M. Developmental stage specificity of the lymphoid V(D)J recombination activity. *Genes Dev* 1987;1:751–761.
192. Lieber MR, Hesse JE, Lewis S, et al. The defect in murine severe combined immune deficiency: Joining of signal sequences but not coding segments in V(D)J recombination. *Cell* 1988;55:7–16.
193. Lewis SM, Hesse JE, Mizuuchi K, Gellert M. Novel strand exchanges in V(D)J recombination. *Cell* 1988;55:1099–1107.
194. Akira S, Okazaki K, Sakano H. Two pairs of recombination signals are sufficient to cause immunoglobulin V-(D)-J joining. *Science* 1987;238:1134–1138.
195. Hesse JE, Lieber MR, Mizuuchi K, Gellert M. V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals. *Genes Dev* 1989;3:1053–1061.
196. Roth DB, Menetski JP, Nakajima PB, Bosma MJ, Gellert M. V(D)J recombina-

tion: Broken DNA molecules with covalently sealed (hairpin) coding ends in scid mouse thymocytes. *Cell* 1992;70:983–991.
197. Roth DB, Nakajima PB, Menetski JP, Bosma MJ, Gellert M. V(D)J recombination in mouse thymocytes: Double-strand breaks near T cell receptor delta rearrangement signals. *Cell* 1992;69:41–53.
198. Roth DB, Zhu C, Gellert M. Characterization of broken DNA molecules associated with V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10788–10792.
199. Schlissel M, Constantinescu A, Morrow T, Baxter M, Peng A. Double-strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5′-phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated. *Genes Dev* 1993;7:2520–2532.
200. Zhu C, Roth DB. Characterization of coding ends in thymocytes of scid mice: Implications for the mechanism of V(D)J recombination. *Immunity* 1995;2: 101–112.
201. Ramsden DA, Gellert M. Formation and resolution of double-strand break intermediates in V(D)J rearrangement. *Genes Dev* 1995;9:2409–2420.
202. Lewis SM. P nucleotide insertions and the resolution of hairpin DNA structures in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1332–1336.
203. Desiderio S, Baltimore D. Double-stranded cleavage by cell extracts near recombinational signal sequences of immunoglobulin genes. *Nature* 1984;308: 860–862.
204. Kataoka T, Kondo S, Nishi M, Kodaira M, Honjo T. Isolation and characterization of endonuclease J: A sequence-specific endonuclease cleaving immunoglobulin genes. *Nucleic Acids Res* 1984;12:5995–6010.
205. Hope TJ, Aguilera RJ, Minie ME, Sakano H. Endonucleolytic activity that cleaves immunoglobulin recombination sequences. *Science* 1986;231:1141–1145.
206. Schatz DG, Baltimore D. Stable expression of immunoglobulin gene V(D)J recombinase activity by gene transfer into 3T3 fibroblasts. *Cell* 1988;53: 107–115.
207. Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990;248: 1517–1523.
208. Bernstein RM, Schluter SF, Bernstein H, Marchalonis JJ. Primordial emergence of the recombination activating gene 1 (RAG1): Sequence of the complete shark gene indicates homology to microbial integrases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9454–9459.
209. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, et al. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992;68:869–877.
210. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992;68:855–867.
211. Schwarz K, Gauss GH, Ludwig L, et al. RAG mutations in human B cell-negative SCID. *Science* 1996;274:97–99.
212. Sadofsky MJ, Hesse JE, McBlane JF, Gellert M. Expression and V(D)J recombination activity of mutated RAG-1 proteins. *Nucleic Acids Res* 1993;21: 5644–5650.
213. McBlane JF, van GD, Ramsden DA, et al. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 1995;83:387–395.
214. van Gent DC, Mizuuchi K, Gellert M. Similarities between initiation of V(D)J recombination and retroviral integration. *Science* 1996;271:1592–1594.
215. van Gent DC, Ramsden DA, Gellert M. The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. *Cell* 1996;85:107–113.
216. Hiom K, Gellert M. A stable RAG1-RAG2-DNA complex that is active in V(D)J cleavage. *Cell* 1997;88:65–72.
217. Sawchuk DJ, Weis GF, Malik S, et al. V(D)J recombination: Modulation of RAG1 and RAG2 cleavage activity on 12/23 substrates by whole cell extract and DNA-bending proteins. *J Exp Med* 1997;185:2025–2032.
218. Cuomo CA, Mundy CL, Oettinger MA. DNA sequence and structure requirements for cleavage of V(D)J recombination signal sequences. *Mol Cell Biol* 1996;16:5683–5690.
219. Ramsden DA, McBlane JF, van Gent DC, Gellert M. Distinct DNA sequence and structure requirements for the two steps of V(D)J recombination signal cleavage. *EMBO J* 1996;15:3197–3206.
220. Cortes P, Weis GF, Misulovin Z, et al. In vitro V(D)J recombination: Signal joint formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14008–14013.
221. Leu TMJ, Eastman QM, Schatz DG. Coding joint formation in a cell-free V(D)J recombination system. *Immunity* 1997;7:303–314.
222. Ramsden DA, Paull TT, Gellert M. Cell-free V(D)J recombination. *Nature* 1997;388:488–491.
223. Agrawal A, Schatz DG. RAG1 and RAG2 form a stable postcleavage synaptic complex with DNA containing signal ends in V(D)J recombination. *Cell* 1997; 89:43–53.
224. Lin WC, Desiderio S. Regulation of V(D)J recombination activator protein RAG-2 by phosphorylation. *Science* 1993;260:953–959.
225. Lin WC, Desiderio S. Cell cycle regulation of V(D)J recombination-activating protein RAG-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2733–2737.
226. Li Z, Dordai DI, Lee J, Desiderio S. A conserved degradation signal regulates RAG-2 accumulation during cell division and links V(D)J recombination to the cell cycle. *Immunity* 1996;5:575–589.
227. Difilippantonio MJ, McMahan CJ, Eastman QM, Spanopoulou E, Schatz DG. RAG1 mediates signal sequence recognition and recruitment of RAG2 in V(D)J recombination. *Cell* 1996;87:253–262.
228. Spanopoulou E, Zaitseva F, Wang FH, Santagata S, Baltimore D, Panayotou G. The homeodomain region of Rag-1 reveals the parallel mechanisms of bacterial and V(D)J recombination. *Cell* 1996;87:263–276.
229. Chun JJ, Schatz DG, Oettinger MA, Jaenisch R, Baltimore D. The recombination activating gene-1 (RAG-1) transcript is present in the murine central nervous system. *Cell* 1991;64:189–200.
230. Carlson LM, Oettinger MA, Schatz DG, et al. Selective expression of RAG-2 in chicken B cells undergoing immunoglobulin gene conversion. *Cell* 1991;64: 201–208.
231. Takeda S, Masteller EL, Thompson CB, Buerstedde JM. RAG-2 expression is not essential for chicken immunoglobulin gene conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4023–4027.
232. Chen J, Lansford R, Stewart V, Young F, Alt FW. RAG-2-deficient blastocyst complementation: An assay of gene function in lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4528–4532.
233. Taccioli GE, Rathbun G, Oltz E, Stamato T, Jeggo PA, Alt FW. Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. *Science* 1993;260: 207–210.
234. Troelstra C, Jaspers NGJ. Ku starts at the end. *Curr Biol* 1994;4:1149–1151.
234a. Wu X, Lieber MR. Protein-protein and protein-DNA interaction regions within the DNA end-binding protein Ku70-Ku86. *Mol Cell Biol* 1996;16:5186–5193.
234b. Yaneva M, Kowalewski T, Lieber MR. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: Biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J* 1997;16:5098–5112.
235. Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, et al. Ku80: Product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science* 1994;265:1442–1445.
236. Errami A, Smider V, Rathmell WK, et al. Ku86 defines the genetic defect and restores X-ray resistance and V(D)J recombination to complementation group 5 hamster cell mutants. *Mol Cell Biol* 1996;16:1519–1526.
237. Blunt T, Finnie NJ, Taccioli GE, et al. Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* 1995;80:813–823.
238. Shin EK, Perryman LE, Meek K. A kinase-negative mutation of DNA-PK(CS) in equine SCID results in defective coding and signal joint formation. *J Immunol* 1997;158:3565–3569.
239. Gu Y, Jin S, Gao Y, Weaver DT, Alt FW. Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8076–8081.
240. de Vries E, van DW, Bergsma WG, et al. HeLa nuclear protein recognizing DNA termini and translocating on DNA forming a regular DNA-multimeric protein complex. *J Mol Biol* 1989;208:65–78.
241. Tuteja N, Tuteja R, Ochem A, et al. Human DNA helicase II: A novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *EMBO J* 1994;13: 4991–5001.
242. Li Z, Otevrel T, Gao Y, et al. The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell* 1995;83: 1079–1089.
243. Critchlow SE, Bowater RP, Jackson SP. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol* 1997;7:588–598.
244. Grawunder U, Wilm M, Wu XK, P., Wilson TE, Mann M, Lieber MR. Activity of DNA ligase IV stimulate by complex formation with XRCC4 in mammalian cells. *Nature* 1997;388:492.
244a. Leber R, Wise TW, Mizuta R, Meek K. The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1998;273: 1794-1801.
245. Hsieh JJ, Henkel T, Salmon P, Robey E, Peterson MG, Hayward SD. Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol Cell Biol* 1996;16:952–959.
246. Aguilera RJ, Akira S, Okazaki K, Sakano H. A pre-B cell nuclear protein that specifically interacts with the immunoglobulin V-J recombination sequences. *Cell* 1987;51:909–917.
247. Miyake S, Sugiyama H, Tani Y, Fukuda T, Kishimoto S. Identification of a recombinational signal sequence-specific DNA-binding protein(s) of Mr 115,000 in the nuclear extracts from immature lymphoid cell lines. *J Immunogenet* 1990;17:67–75.
248. Shirakata M, Huppi K, Usuda S, Okazaki K, Yoshida K, Sakano H. HMG1-related DNA-binding protein isolated with V-(D)-J recombination signal probes. *Mol Cell Biol* 1991;11:4528–4536.
249. Li M, Morzycka WE, Desiderio SV. NBP, a protein that specifically binds an enhancer of immunoglobulin gene rearrangement: Purification and characterization. *Genes Dev* 1989;3:1801–1813.
250. Halligan BD, Teng M, Guilliams TG, Nauert JB, Halligan NL. Cloning of the murine cDNA encoding VDJP, a protein homologous to the large subunit of replication factor C and bacterial DNA ligases. *Gene* 1995;161:217–222.
251. Guilliams TG, Teng M, Halligan BD. Site directed DNA joining. *Biochimie* 1997;79:13–22.
252. Wu LC, Mak CH, Dear N, Boehm T, Foroni L, Rabbitts TH. Molecular cloning of a zinc finger protein which binds to the heptamer of the signal sequence for V(D)J recombination. *Nucleic Acids Res* 1993;21:5067–5073.
253. Mak CH, Strandtmann J, Wu LC. The V(D)J recombination signal sequence and kappa B binding protein Rc binds DNA as dimers and forms multimeric struc-

tures with its DNA ligands. *Nucleic Acids Res* 1994;22:383–390.

254. Muegge K, West M, Durum SK. Recombination sequence-binding protein in thymocytes undergoing T-cell receptor gene rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4151–4155.
255. Jarvis CD, Geiman T, Vila SM, et al. A novel putative helicase produced in early murine lymphocytes. *Gene* 1996;169:203–207.
256. Kenter AL, Tredup J. High expression of a 3′–5′ exonuclease activity is specific to B lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1991;11:4398–4404.
257. Feeney AJ. Lack of N regions in fetal and neonatal mouse immunoglobulin V-D-J junctional sequences. *J Exp Med* 1990;172:1377–1390.
258. Victor KD, Capra JD. An apparently common mechanism of generating antibody diversity: Length variation of the VL-JL junction. *Mol Immunol* 1994;31:39–46.
259. Gilfillan S, Dierich A, Lemeur M, Benoist C, Mathis D. Mice lacking TdT: Mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 1993;261:1175–1178.
260. Komori T, Okada A, Stewart V, Alt FW. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT- deficient lymphocytes. *Science* 1993;261:1171–1175.
261. Landau NR, Schatz DG, Rosa M, Baltimore D. Increased frequency of N-region insertion in a murine pre-B-cell line infected with a terminal deoxynucleotidyl transferase retroviral expression vector. *Mol Cell Biol* 1987;7:3237–3243.
262. Kallenbach S, Doyen N, Fanton dAM, Rougeon F. Three lymphoid-specific factors account for all junctional diversity characteristic of somatic assembly of T-cell receptor and immunoglobulin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2799–2803.
263. Bentolila LA, Wu GE, Nourrit F, Fanton dAM, Rougeon F, Doyen N. Constitutive expression of terminal deoxynucleotidyl transferase in transgenic mice is sufficient for N region diversity to occur at any Ig locus throughout B cell differentiation. *J Immunol* 1997;158:715–723.
264. Hiramatsu R, Akagi K, Matsuoka M, et al. The 3′ enhancer region determines the B/T specificity and pro-B/pre-B specificity of immunoglobulin V kappa-J kappa joining. *Cell* 1995;83:1113–1123.
265. Wasserman R, Li YS, Hardy RR. Down-regulation of terminal deoxynucleotidyl transferase by Ig heavy chain in B lineage cells. *J Immunol* 1997;158:1133–1138.
266. Gilfillan S, Bachmann M, Trembleau S, et al. Efficient immune responses in mice lacking N-region diversity. *Eur J Immunol* 1995;25:3115–3122.
267. Gavin MA, Bevan MJ. Increased peptide promiscuity provides a rationale for the lack of N regions in the neonatal T cell repertoire. *Immunity* 1995;3:793–800.
268. Rolink A, Melchers F. B lymphopoiesis in the mouse. *Adv Immunol* 1993;53:123–156.
269. Hardy RR, Hayakawa K. B-lineage differentiation stages resolved by multiparameter flow cytometry. *Ann N Y Acad Sci* 1995;764:19–24.
270. Melchers F, Rolink A, Grawunder U, et al. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* 1995;7:214–227.
271. Li YS, Wasserman R, Hayakawa K, Hardy RR. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* 1996;5:527–535.
272. Karasuyama H, Rolink A, Melchers F. A complex of glycoproteins is associated with VpreB/lambda 5 surrogate light chain on the surface of mu heavy chain-negative early precursor B cell lines. *J Exp Med* 1993;178:469–478.
273. Reth MG, Alt FW. Novel immunoglobulin heavy chains are produced from DJH gene segment rearrangements in lymphoid cells. *Nature* 1984;312:418–423.
274. Yancopoulos GD, Alt FW. Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* 1985;40:271–281.
275. Mather EL, Perry RP. Transcriptional regulation of immunoglobulin V genes. *Nucleic Acids Res* 1981;9:6855–6867.
276. Takeda S, Zou YR, Bluethmann H, Kitamura D, Muller U, Rajewsky K. Deletion of the immunoglobulin kappa chain intron enhancer abolishes kappa chain gene rearrangement in cis but not lambda chain gene rearrangement in trans. *EMBO J* 1993;12:2329–2336.
277. Xu Y, Davidson L, Alt FW, Baltimore D. Deletion of the Ig kappa light chain intronic enhancer/matrix attachment region impairs but does not abolish V kappa J kappa rearrangement. *Immunity* 1996;4:377–385.
278. Gorman JR, van der Stoep N, Monroe R, et al. The Ig(kappa) enhancer influences the ratio of Ig(kappa) versus Ig(lambda) B lymphocytes. *Immunity* 1996;5:241–252.
279. Lauster R, Reynaud CA, Martensson IL, et al. Promoter, enhancer and silencer elements regulate rearrangement of an immunoglobulin transgene. *EMBO J* 1993;12:4615–4623.
280. Oltz EM, Alt FW, Lin WC, et al. A V(D)J recombinase-inducible B-cell line: Role of transcriptional enhancer elements in directing V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* 1993;13:6223–6230.
281. Kallenbach S, Babinet C, Pournin S, Cavelier P, Goodhardt M, Rougeon F. The intronic immunoglobulin kappa gene enhancer acts independently on rearrangement and on transcription. *Eur J Immunol* 1993;23:1917–1921.
282. Ferradini L, Gu H, De SA, Rajewsky K, Reynaud CA, Weill JC. Rearrangement-enhancing element upstream of the mouse immunoglobulin kappa chain J cluster. *Science* 1996;271:1416–1420.
283. Coleclough C, Perry RP, Karjalainen K, Weigert M. Aberrant rearrangements contribute significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expression. *Nature* 1981;290:372–378.
284. Alt FW, Enea V, Bothwell AL, Baltimore D. Activity of multiple light chain genes in murine myeloma cells producing a single, functional light chain. *Cell* 1980; 21:1–12.
285. ten Boekel E, Melchers F, Rolink A. The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development. *Int Immunol* 1995;7: 1013–1019.
286. Nottenburg C, St. John T, Weissman IL. Unusual immunoglobulin DNA sequences from the nonexpressed chromosome of mouse normal B lymphocytes: Implications for allelic exclusion and the DNA rearrangement process. *J Immunol* 1987;139:1718–1726.
287. Weaver D, Costantini F, Imanishi KT, Baltimore D. A transgenic immunoglobulin mu gene prevents rearrangement of endogenous genes. *Cell* 1985;42: 117–127.
288. Storb U, Pinkert C, Arp B, et al. Transgenic mice with mu and kappa genes encoding antiphosphorylcholine antibodies. *J Exp Med* 1986;164:627–641.
289. Nussenzweig MC, Shaw AC, Sinn E, et al. Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin mu. *Science* 1987;236: 816–819.
290. Picarella D, Serunian LA, Rosenberg N. Allelic exclusion of membrane but not secreted immunoglobulin in a mature B cell line. *Eur J Immunol* 1991;21:55–62.
291. Kitamura D, Rajewsky K. Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature* 1992;356:154–156.
292. Loffert D, Ehlich A, Muller W, Rajewsky K. Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development. *Immunity* 1996;4:133–144.
293. Papavasiliou F, Jankovic M, Suh H, Nussenzweig MC. The cytoplasmic domains of immunoglobulin (Ig) alpha and Ig beta can independently induce the precursor B cell transition and allelic exclusion. *J Exp Med* 1995;182:1389–1394.
294. Papavasiliou F, Misulovin Z, Suh H, Nussenzweig MC. The role of Ig beta in precursor B cell transition and allelic exclusion. *Science* 1995;268:408–411.
295. Grawunder U, Leu TM, Schatz DG, et al. Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity* 1995;3:601–608.
296. Schlissel MS, Morrow T. Ig heavy chain protein controls B cell development by regulating germ-line transcription and retargeting V(D)J recombination. *J Immunol* 1994;153:1645–1657.
297. Constantinescu A, Schlissel MS. Changes in locus-specific V(D)J recombinase activity induced by immunoglobulin gene products during B cell development. *J Exp Med* 1997;185:609–620.
298. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992;68: 855–867.
299. Ehlich A, Schaal S, Gu H, Kitamura D, Muller W, Rajewsky K. Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development. *Cell* 1993;72:695–704.
300. Spanopoulou E, Roman CA, Corcoran LM, et al. Functional immunoglobulin transgenes guide ordered B-cell differentiation in Rag-1-deficient mice. *Genes Dev* 1994;8:1030–1042.
301. Young F, Ardman B, Shinkai Y, et al. Influence of immunoglobulin heavy- and light-chain expression on B-cell differentiation. *Genes Dev* 1994;8:1043–1057.
301a. Minegishi Y, Coustan SE, Wang YH, Cooper MD, Campana D, Conley ME. Mutations in the human lambda5/14.1 gene result in B cell deficiency and agammaglobulinemia. *J Exp Med* 1998;187:71–77.
302. Pelanda R, Schaal S, Torres RM, Rajewsky K. A prematurely expressed Ig(kappa) transgene, but not V(kappa)J(kappa) gene segment targeted into the Ig(kappa) locus, can rescue B cell development in lambda5-deficient mice. *Immunity* 1996;5:229–239.
303. Reth M, Petrac E, Wiese P, Lobel L, Alt FW. Activation of V kappa gene rearrangement in pre-B cells follows the expression of membrane-bound immunoglobulin heavy chains. *EMBO J* 1987;6:3299–3305.
304. Iglesias A, Lamers M, Kohler G. Expression of immunoglobulin delta chain causes allelic exclusion in transgenic mice. *Nature* 1987;330:482–484.
305. Schlissel MS, Baltimore D. Activation of immunoglobulin kappa gene rearrangement correlates with induction of germline kappa gene transcription. *Cell* 1989;58:1001–1007.
306. Chen J, Trounstine M, Alt FW, et al. Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *Int Immunol* 1993;5:647–656.
307. Grawunder U, Rolink A, Melchers F. Induction of sterile transcription from the kappa L chain gene locus in V(D)J recombinase-deficient progenitor B cells. *Int Immunol* 1995;7:1915–1925.
308. Ritchie KA, Brinster RL, Storb U. Allelic exclusion and control of endogenous immunoglobulin gene rearrangement in kappa transgenic mice. *Nature* 1984; 312:517–520.
309. Ma A, Fisher P, Dildrop R, et al. Surface IgM mediated regulation of RAG gene expression in E mu-N-myc B cell lines. *EMBO J* 1992;11:2727–2734.
310. Torres RM, Flaswinkel H, Reth M, Rajewsky K. Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex. *Science* 1996;272:1804–1808.
311. Korsmeyer SJ, Hieter PA, Ravetch JV, Poplack DG, Waldmann TA, Leder P. Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7096–7100.
312. Zou YR, Takeda S, Rajewsky K. Gene targeting in the Ig kappa locus: efficient

generation of lambda chain-expressing B cells, independent of gene rearrangements in Ig kappa. *EMBO J* 1993;12:811–820.

313. Doglio L, Kim JY, Bozek G, Storb U. Expression of lambda and kappa genes can occur in all B cells and is initiated around the same pre-B-cell developmental stage. *Dev Immunol* 1994;4:13–26.
314. Hagman J, Lo D, Doglio LT, et al. Inhibition of immunoglobulin gene rearrangement by the expression of a lambda 2 transgene. *J Exp Med* 1989;169: 1911–1929.
315. Neuberger MS, Caskey HM, Pettersson S, Williams GT, Surani MA. Isotype exclusion and transgene down-regulation in immunoglobulin-lambda transgenic mice. *Nature* 1989;338:350–352.
316. Rudin CM, Hackett JJ, Storb U. Precursors of both conventional and Ly-1 B cells can escape feedback inhibition of Ig gene rearrangement. *J Immunol* 1991;146: 3205–3210.
317. Hengstschlager M, Maizels N. Isotype exclusion in lambda 1 transgenic mice depends on transgene copy number and diminishes with down-regulation of transgene transcripts. *Eur J Immunol* 1995;25:187–191.
318. Gollahon KA, Hagman J, Brinster RL, Storb U. Ig lambda-producing B cells do not show feedback inhibition of gene rearrangement. *J Immunol* 1988;141: 2771–2780.
319. Berg J, McDowell M, Jack HM, Wabl M. Immunoglobulin lambda gene rearrangement can precede kappa gene rearrangement. *Dev Immunol* 1990;1:53–57.
320. Ramsden DA, Wu GE. Mouse kappa light-chain recombination signal sequences mediate recombination more frequently than do those of lambda light chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10721–10725.
321. Arakawa H, Takeda S. Early expression of Ig mu chain from a transgene significantly reduces the duration of the pro-B stage but does not affect the small pre-B stage. *Int Immunol* 1996;8:1319–1328.
322. Harada K, Yamagishi H. Lack of feedback inhibition of V kappa gene rearrangement by productively rearranged alleles. *J Exp Med* 1991;173:409–415.
323. Levy S, Campbell MJ, Levy R. Functional immunoglobulin light chain genes are replaced by ongoing rearrangements of germline V kappa genes to downstream J kappa segment in a murine B cell line. *J Exp Med* 1989;170:1–13.
324. Kleinfield R, Hardy RR, Tarlinton D, Dangl J, Herzenberg LA, Weigert M. Recombination between an expressed immunoglobulin heavy-chain gene and a germline variable gene segment in a Ly 1+ B-cell lymphoma. *Nature* 1986;322: 843–846.
325. Radic MZ, Erikson J, Litwin S, Weigert M. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J Exp Med* 1993;177:1165–1173.
326. Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 1993;177:1009–1020.
327. Chen C, Nagy Z, Radic MZ, et al. The site and stage of anti-DNA B-cell deletion. *Nature* 1995;373:252 255.
328. Hertz M, Nemazee D. BCR ligation induces receptor editing in IgM⁺IgD⁻ bone marrow B cells in vitro. *Immunity* 1997;6:429–436.
329. Verkoczy LK, Stiernholm BJ, Berinstein NL. Up-regulation of recombination activating gene expression by signal transduction through the surface Ig receptor. *J Immunol* 1995;154:5136–5143.
330. Suzuki N, Harada T, Mihara S, Sakane T. Characterization of a germline Vk gene encoding cationic anti-DNA antibody and role of receptor editing for development of the autoantibody in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1996;98:1843 1850.
331. Han S, Zheng B, Schatz DG, Spanopoulou E, Kelsoe G. Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells. *Science* 1996;274: 2094–2097.
332. Hikida M, Mori M, Takai T, Tomochika K, Hamatani K, Ohmori H. Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells. *Science* 1996;274:2092–2094.
332a. Han S, Dillon SR, Zheng B, Shimoda M, Schlissel MS, Kelsoe G. V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes. *Science* 1997;278: 301-305.
332b. Papavasiliou F, Casellas R, Suh H, et al. V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses. Science 1997;278: 298-301.
333. Giudicelli V, Chaume D, Bodmer J, et al. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 1997;25:206–211.
334. Brodeur PH, Riblet R. The immunoglobulin heavy chain variable region (Igh-V) locus in the mouse. I. One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes. *Eur J Immunol* 1984;14:922–930.
335. Dildrop R. A new classification of mouse VH sequences. *Immunol Today* 1984; 5:85 88.
336. Meek K, Rathbun G, Reininger L, et al. Organization of the murine immunoglobulin VH complex: Placement of two new VH families (VH10 and VH11) and analysis of VH family clustering and interdigitation. *Mol Immunol* 1990;27: 1073–1081.
337. Tutter A, Brodeur P, Shlomchik M, Riblet R. Structure, map position, and evolution of two newly diverged mouse Ig VH gene families. *J Immunol* 1991;147: 3215–3223.
338. Mainville CA, Sheehan KM, Klaman LD, Giorgetti CA, Press JL, Brodeur PH. Deletional mapping of fifteen mouse VH gene families reveals a common organization for three Igh haplotypes. *J Immunol* 1996;156:1038–1046.
339. Tutter A, Riblet R. Conservation of an immunoglobulin variable-region gene family indicates a specific, noncoding function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:7460–7464.
340. Schroeder HWJ, Hillson JL, Perlmutter RM. Structure and evolution of mammalian VH families. *Int Immunol* 1990;2:41–50.
341. Kirkham PM, Mortari F, Newton JA, Schroeder HWJ. Immunoglobulin VH clan and family identity predicts variable domain structure and may influence antigen binding. *EMBO J* 1992;11:603–609.
342. Nei M, Gu X, Sitnikova T. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 7799–7806.
343. Kofler R, Geley S, Kofler H, Helmberg A. Mouse variable-region gene families: Complexity, polymorphism and use in non-autoimmune responses. *Immunol Rev* 1992;128:5–21.
344. Livant D, Blatt C, Hood L. One heavy chain variable region gene segment subfamily in the BALB/c mouse contains 500–1000 or more members. *Cell* 1986; 47:461–470.
345. Blankenstein T, Bonhomme F, Krawinkel U. Evolution of pseudogenes in the immunoglobulin VH-gene family of the mouse. *Immunogenetics* 1987;26: 237–248.
346. Kemp DJ, Cory S, Adams JM. Cloned pairs of variable region genes for immunoglobulin heavy chains isolated from a clone library of the entire mouse genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4627–4631.
347. Bothwell AL, Paskind M, Reth M, Imanishi KT, Rajewsky K, Baltimore D. Heavy chain variable region contribution to the NPb family of antibodies: Somatic mutation evident in a gamma 2a variable region. *Cell* 1981;24: 625–637.
348. Givol D, Zakut R, Effron K, Rechavi G, Ram D, Cohen JB. Diversity of germline immunoglobulin VH genes. *Nature* 1981;292:426–430.
349. Kemp DJ, Tyler B, Bernard O, et al. Organization of genes and spacers within the mouse immunoglobulin VH locus. *J Mol Appl Genet* 1981;1:245 261.
350. Rechavi G, Bienz B, Ram D, et al. Organization and evolution of immunoglobulin VH gene subgroups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:4405–4409.
351. Rathbun GA, Capra JD, Tucker PW. Organization of the murine immunoglobulin VH complex in the inbred strains. *EMBO J* 1987;6:2931–2937.
352. Brodeur PH, Osman GE, Mackle JJ, Lalor TM. The organization of the mouse Igh-V locus. Dispersion, interspersion, and the evolution of VH gene family clusters. *J Exp Med* 1988;168:2261–2278.
353. Blankenstein T, Krawinkel U. Immunoglobulin VH region genes of the mouse are organized in overlapping clusters. *Eur J Immunol* 1987;17:1351–1357.
354. Walter MA, Dosch HM, Cox DW. A deletion map of the human immunoglobulin heavy chain variable region. *J Exp Med* 1991;174:335–349.
355. Perlmutter RM, Kearney JF, Chang SP, Hood LE. Developmentally controlled expression of immunoglobulin VH genes. *Science* 1985;227:1597–1601.
356. Malynn BA, Berman JE, Yancopoulos GD, Bona CA, Alt FW. Expression of the immunoglobulin heavy-chain variable gene repertoire. *Curr Top Microbiol Immunol* 1987;135:75–94.
357. Feeney AJ. Predominance of VH-D-JH junctions occurring at sites of short sequence homology results in limited junctional diversity in neonatal antibodies. *J Immunol* 1992;149:222–229.
358. Gauss GH, Lieber MR. The basis for the mechanistic bias for deletional over inversional V(D)J recombination. *Genes Dev* 1992;6:1553–1561.
359. Early P, Huang H, Davis M, Calame K, Hood L. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 1980;19:981–992.
360. Sakano H, Kurosawa Y, Weigert M, Tonegawa S. Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 1981;290:562–565.
361. Kurosawa Y, von BH, Haas W, Sakano H, Trauneker A, Tonegawa S. Identification of D segments of immunoglobulin heavy-chain genes and their rearrangement in T lymphocytes. *Nature* 1981;290:565–570.
362. Kurosawa Y, Tonegawa S. Organization, structure, and assembly of immunoglobulin heavy chain diversity DNA segments. *J Exp Med* 1982;155:201–218.
363. Feeney AJ, Riblet R. DST4: A new, and probably the last, functional DH gene in the BALB/c mouse. *Immunogenetics* 1993;37:217–221.
364. Tsubata T, Tsubata R, Reth M. Cell surface expression of the short immunoglobulin mu chain (D mu protein) in murine pre-B cells is differently regulated from that of the intact mu chain. *Eur J Immunol* 1991;21:1359–1363.
365. Haasner D, Rolink A, Melchers F. Influence of surrogate L chain on DHJH-reading frame 2 suppression in mouse precursor B cells. *Int Immunol* 1994;6:21–30.
366. Horne MC, Roth PE, DeFranco AL. Assembly of the truncated immunoglobulin heavy chain D mu into antigen receptor-like complexes in pre-B cells but not in B cells. *Immunity* 1996;4:145–158.
367. Ehlich A, Martin V, Muller W, Rajewsky K. Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells. *Curr Biol* 1994;4:573–583.
368. Tarlinton D, Strasser A, McLean M, Basten A. DH element reading frame selection is influenced by an Ig heavy chain transgene, but not by bcl-2. *J Immunol* 1995;154:3341–3350.
369. Meek KD, Hasemann CA, Capra JD. Novel rearrangements at the immunoglobulin D locus. Inversions and fusions add to IgH somatic diversity. *J Exp Med* 1989;170:39–57.

370. Potter M, Newell JB, Rudikoff S, Haber E. Classification of mouse VK groups based on the partial amino acid sequence to the first invariant tryptophan: Impact of 14 new sequences from IgG myeloma proteins. *Mol Immunol* 1982;19: 1619–1630.
371. Kofler R, Helmberg A. A new Igk-V gene family in the mouse. *Immunogenetics* 1991;34:139–140.
372. Kofler R, Duchosal MA, Dixon FJ. Complexity, polymorphism, and connectivity of mouse Vk gene families. *Immunogenetics* 1989;29:65–74.
373. Strohal R, Helmberg A, Kroemer G, Kofler R. Mouse Vk gene classification by nucleic acid sequence similarity. *Immunogenetics* 1989;30:475–493.
374. Kroemer G, Helmberg A, Bernot A, Auffray C, Kofler R. Evolutionary relationship between human and mouse immunoglobulin kappa light chain variable region genes. *Immunogenetics* 1991;33:42–49.
375. George JB, Li S, Garrard WT. Yeast artificial chromosome contigs reveal that distal variable-region genes reside at least 3 megabases from the joining regions in the murine immunoglobulin kappa locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:12421–12425.
376. Kirschbaum T, Jaenichen R, Zachau HG. The mouse immunoglobulin kappa locus contains about 140 variable gene segments. *Eur J Immunol* 1996;26:1613–1620.
377. Schupp IW, Schlake T, Kirschbaum T, Zachau HG. Boehm T. A yeast artificial chromosome contig spanning the mouse immunoglobulin kappa light chain locus. *Immunogenetics* 1997;45:180–187.
378. Lee KH, Matsuda F, Kinashi T, Kodaira M, Honjo T. A novel family of variable region genes of the human immunoglobulin heavy chain. *J Mol Biol* 1987;195: 761–768.
379. Walter MA, Surti U, Hofker MH, Cox DW. The physical organization of the human immunoglobulin heavy chain gene complex. *EMBO J* 1990;9: 3303–3313.
380. Cook GP, Tomlinson IM, Walter G, et al. A map of the human immunoglobulin VH locus completed by analysis of the telomeric region of chromosome 14q. *Nature Genet* 1994;7:162–168.
381. Cook GP, Tomlinson IM. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol Today* 1995;16:237–242.
382. Matsuda F, Honjo T. Organization of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Adv Immunol* 1996;62:1–29.
383. Schroeder HJ, Walter MA, Hofker MH, et al. Physical linkage of a human immunoglobulin heavy chain variable region gene segment to diversity and joining region elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:8196–8200.
384. Nagaoka H, Ozawa K, Matsuda F, et al. Recent translocation of variable and diversity segments of the human immunoglobulin heavy chain from chromosome 14 to chromosomes 15 and 16. *Genomics* 1994;22:189–197.
385. Tomlinson IM, Cook GP, Carter NP, et al. Human immunoglobulin VH and D segments on chromosomes 15q11.2 and 16p11.2. *Hum Mol Genet* 1994;3: 853–860.
386. Ravetch JV, Siebenlist U, Korsmeyer SJ, Waldmann T, Leder P. Structure of the human immunoglobulin mu locus; characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell* 1981;27:583–591.
387. Ichihara Y, Matsuoka H, Kurosawa Y. Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. *EMBO J* 1988;7:4141–4150.
388. Moore BB, Meek K. Recombination potential of the human DIR elements. *J Immunol* 1995;154:2175–2187.
389. Tuaillon N, Miller AB, Tucker PW, Capra JD. Analysis of direct and inverted DJH rearrangements in a human Ig heavy chain transgenic minilocus. *J Immunol* 1995;154:6453–6465.
389a. Tuaillon N, Capra JD. Use of D gene segments with irregular spacers in terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT)+/+ and TdT-/- mice carrying a human Ig heavy chain transgenic minilocus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1703-1708.
390. Nagaoka H, Ozawa K, Matsuda F, et al. Recent translocation of variable and diversity segments of the human immunoglobulin heavy chain from chromosome 14 to chromosomes 15 and 16. *Genomics* 1994;22:189–197.
391. Schable KF, Zachau HG. The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1993;374:1001–1022.
392. Schable K, Thiebe R, Flugel A, Meindl A, Zachau HG. The human immunoglobulin kappa locus: Pseudogenes, unique and repetitive sequences. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994;375:189–199.
393. Ermert K, Mitlohner H, Schempp W, Zachau HG. The immunoglobulin kappa locus of primates. *Genomics* 1995;25:623–629.
394. Klein R, Zachau HG. Comparison of human germ-line kappa gene sequences to sequence data from the literature. *Eur J Immunol* 1993;23:3263–3271.
395. Arnold N, Wienberg J, Ermert K, Zachau HG. Comparative mapping of DNA probes derived from the V kappa immunoglobulin gene regions on human and great ape chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1995; 26:147–150.
396. Huber C, Thiebe R, Zachau HG. A potentially functional V kappa gene at a distance of 1.5 Mb from the immunoglobulin kappa locus. *Genomics* 1994;22: 213–215.
397. Williams SC, Frippiat JP, Tomlinson IM, Ignatovich O, Lefranc MP, Winter G. Sequence and evolution of the human germline V lambda repertoire. *J Mol Biol* 1996;264:220–232.
398. Wood DL, Coleclough C. Different joining region J elements of the murine kappa immunoglobulin light chain locus are used at markedly different frequencies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:4756–4760.
399. Nishi M, Kataoka T, Honjo T. Preferential rearrangement of the immunoglobulin kappa chain joining region J kappa 1 and J kappa 2 segments in mouse spleen DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6399–6403.
400. Yamada M, Wasserman R, Reichard BA, Shane S, Caton AJ, Rovera G. Preferential utilization of specific immunoglobulin heavy chain diversity and joining segments in adult human peripheral blood B lymphocytes. *J Exp Med* 1991;173: 395–407.
401. Cohn M, Blomberg B, Geckler W, Raschke W, Riblet R, Weigert M. First order considerations in analyzing the generator of diversity. In: EE Sercarz, AR Williamson, CF Fox, eds. *The immune system: Genes, receptors, signals.* New York: Academic Press, 1974;89.
402. Weigert M, Riblet R. Genetic control of antibody variable regions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1977;2:837–846.
403. Gearhart PJ, Johnson ND, Douglas R, Hood L. IgG antibodies to phosphorylcholine exhibit more diversity than their IgM counterparts. *Nature* 1981;291: 29–34.
404. Crews S, Griffin J, Huang H, Calame K, Hood L. A single VH gene segment encodes the immune response to phosphorylcholine: Somatic mutation is correlated with the class of the antibody. *Cell* 1981;25:59–66.
405. Manser T, Parhami SB, Margolies MN, Gefter ML. Somatically mutated forms of a major anti-p-azophenylarsonate antibody variable region with drastically reduced affinity for p-azophenylarsonate. By-products of an antigen-driven immune response? *J Exp Med* 1987;166:1456–1463.
406. Ray SK, Putterman C, Diamond B. Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: A paradigm for autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2019–2024.
407. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 1989;342:929–931.
408. Shokat KM, Goodnow CC. Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses. *Nature* 1995;375:334–338.
409. Choe J, Kim HS, Zhang X, Armitage RJ, Choi YS. Cellular and molecular factors that regulate the differentiation and apoptosis of germinal center B cells. Anti-Ig down-regulates Fas expression of CD40 ligand-stimulated germinal center B cells and inhibits Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 1996;157:1006–1016.
410. Eisen HN, Siskind GW. Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 1964;3:996–1008.
411. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 1991;354:389–392.
412. Jacob J, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med* 1992;176:679–687.
413. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med* 1994; 180:329–339.
414. Lebecque S, de Bouteiller O, Arpin C, Banchereau J, Liu YJ. Germinal center founder cells display propensity for apoptosis before onset of somatic mutation. *J Exp Med* 1997;185:563–571.
415. Zheng B, Han S, Kelsoe G. T helper cells in murine germinal centers are antigen-specific emigrants that downregulate Thy-1. *J Exp Med* 1996;184:1083–1091.
416. Razanajaona D, van Kooten C, Lebecque S, et al. Somatic mutations in human Ig variable genes correlate with a partially functional CD40-ligand in the X-linked hyper-IgM syndrome. *J Immunol* 1996;157:1492–1498.
417. Casamayor PM, Khan M, MacLennan IC. A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. *J Exp Med* 1995;181:1293–1301.
418. Han S, Zheng B, Dal PJ, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. IV. Affinity-dependent, antigen-driven B cell apoptosis in germinal centers as a mechanism for maintaining self-tolerance. *J Exp Med* 1995;182:1635–1644.
419. Pulendran B, Kannourakis G, Nouri S, Smith KG, Nossal GJ. Soluble antigen can cause enhanced apoptosis of germinal-centre B cells. *Nature* 1995;375: 331–334.
419a. Hande S, Notidis E, Manser T. Bcl-2 obstructs negative selection of autoreactive, hypermutated antibody V regions during memory B cell development. *Immunity* 1998;8:189-198.
420. Kuppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J* 1993;12:4955–4967.
421. Decker DJ, Linton PJ, Zaharevitz S, Biery M, Gingeras TR, Klinman NR. Defining subsets of naive and memory B cells based on the ability of their progeny to somatically mutate in vitro. *Immunity* 1995;2:195–203.
422. Kepler TB, Perelson AS. Cyclic re-entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation. *Immunol Today* 1993;14:412–415.
422a. Matsumoto M, Lo SF, Carruthers CJ, et al. Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice. *Nature* 1996;382:462-466.
423. Kim S, David M, Sinn E, Patten P, Hood L. Antibody diversity: Somatic hypermutation of rearranged VH genes. *Cell* 1981;27:573–581.
424. Lebecque SG, Gearhart PJ. Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5′ boundary is near the promoter, and 3′ boundary is

approximately 1 kb from V(D)J gene. *J Exp Med* 1990;172:1717–1727.
425. Gorski J, Rollini P, Mach B. Somatic mutations of immunoglobulin variable genes are restricted to the rearranged V gene. *Science* 1983:220:1179–1181.
426. Sablitzky F, Weisbaum D, Rajewsky K. Sequence analysis of non-expressed immunoglobulin heavy chain loci in clonally related, somatically mutated hybridoma cells. *EMBO J* 1985;4:3435–3437.
427. Giusti AM, Manser T. Hypermutation is observed only in antibody H chain V region transgenes that have recombined with endogenous immunoglobulin H DNA: Implications for the location of cis-acting elements required for somatic mutation. *J Exp Med* 1993;177:797–809.
428. Weiss S, Wu GE. Somatic point mutations in unrearranged immunoglobulin gene segments encoding the variable region of lambda light chains. *EMBO J* 1987;6:927–932.
429. Picard D, Schaffner W. Unrearranged immunoglobulin lambda variable region is transcribed in kappa-producing myelomas. *EMBO J* 1984:3:3031–3035.
430. O'Brien RL, Brinster RL, Storb U. Somatic hypermutation of an immunoglobulin transgene in kappa transgenic mice. *Nature* 1987;326:405–409.
431. Sharpe MJ, Milstein C, Jarvis JM, Neuberger MS. Somatic hypermutation of immunoglobulin kappa may depend on sequences 3′ of C kappa and occurs on passenger transgenes. *EMBO J* 1991;10:2139–2145.
432. Betz AG, Milstein C, Gonzalez FA, Pannell R, Larson T, Neuberger MS. Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell* 1994;77: 239–248.
432a.Goyenechea B, Klix N, Yelamos J, et al. Cells strongly expressing Ig(kappa) transgenes show clonal recruitment of hypermutation: a role for both MAR and the enhancers. *EMBO J* 1997;16:3987-3994.
432b.Klix N, Jolly CJ, Davies SL, Bruggemann M, Williams GT, Neuberger MS. Multiple sequences from downstream of the J kappa cluster can combine to recruit somatic hypermutation to a heterologous, upstream mutation domain. *Eur J Immunol* 1998;28:317-326.
433. Peters A, Storb U. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* 1996;4:57–65.
434. Bachl J, Wabl M. Enhancers of hypermutation. *Immunogenetics* 1996;45:59–64.
435. Yelamos J, Klix N, Goyenechea B, et al. Targeting of non-Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation. *Nature* 1995;376:225–229.
436. Tumas-Brundage K, Vora KA, Giusti AM, Manser T. Characterization of the cis-acting elements required for somatic hypermutation of murine antibody V genes using conventional transgenic and transgene homologous recombination approaches. *Semin Immunol* 1996;8:141–150.
437. Hengstschlager M, Williams M, Maizels N. A lambda 1 transgene under the control of a heavy chain promoter and enhancer does not undergo somatic hypermutation. *Eur J Immunol* 1994;24:1649–1656.
438. Storb U. The molecular basis of somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Curr Opin Immunol* 1996;8:206–214.
438a.Migliazza A, Martinotti S, Chen W, et al. Frequent somatic hypermutation of the 5′ noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:12520–12524.
439. Goyenechea B, Milstein C. Modifying the sequence of an immunoglobulin V-gene alters the resulting pattern of hypermutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:13979–13984.
440. Dorner T, Brezinschek HP, Brezinschek RI, Foster SJ, Domiati SR, Lipsky PE. Analysis of the frequency and pattern of somatic mutations within nonproductively rearranged human variable heavy chain genes. *J Immunol* 1997;158: 2779–2789.
441. Bachl J, Wabl M. An immunoglobulin mutator that targets G.C base pairs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:851–855.
442. Betz AG, Rada C, Pannell R, Milstein C, Neuberger MS. Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: Clustering, polarity, and specific hot spots. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 2385–2388.
443. Insel RA, Varade WS. Bias in somatic hypermutation of human VH genes. *Int Immunol* 1994;6:1437–1443.
444. Dildrop R, Bruggemann M, Radbruch A, Rajewsky K, Beyreuther K. Immunoglobulin V region variants in hybridoma cells. II. Recombination between V genes. *EMBO J* 1982;1:635–640.
445. Xu B, Selsing E. Analysis of sequence transfers resembling gene conversion in a mouse antibody transgene. *Science* 1994;265:1590–1593.
446. Reynaud CA, Anquez V, Dahan A, Weill JC. A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. *Cell* 1985;40: 283–291.
447. Becker RS, Knight KL. Somatic diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits. *Cell* 1990;63: 987–997.
448. Sun J, Butler JE. Molecular characterization of VDJ transcripts from a newborn piglet. *Immunology* 1996;88:331–339.
449. Bentley DL, Rabbitts TH. Evolution of immunoglobulin V genes: evidence indicating that recently duplicated human V kappa sequences have diverged by gene conversion. *Cell* 1983;32:181–189.
450. Cohen JB, Givol D. Allelic immunoglobulin VH genes in two mouse strains: Possible germline gene recombination. *EMBO J* 1983;2:2013–2018.
451. Rogerson BJ. Somatic hypermutation of VHS107 genes is not associated with gene conversion among family members. *Int Immunol* 1995;7:1225–1235.
452. Golding GB, Gearhart PJ, Glickman BW. Patterns of somatic mutations in immunoglobulin variable genes. *Genetics* 1987;115:169–176.
453. Seidman MM, Bredberg A, Seetharam S, Kraemer KH. Multiple point mutations in a shuttle vector propagated in human cells: Evidence for an error-prone DNA polymerase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:4944–4948.
454. Kim N, Kage K, Matsuda F, Lefranc MP, Storb U. B lymphocytes of xeroderma pigmentosum or Cockayne syndrome patients with inherited defects in nucleotide excision repair are fully capable of somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *J Exp Med* 1997;186:413–419.
454a.Shen HM, Cheo DL, Friedberg E, Storb U. The inactivation of the XP-C gene does not affect somatic hypermutation or class switch recombination of immunoglobulin genes. *Mol Immunol* 1997;34:527-533.
454b.Rada C, Yelamos J, Dean W, Milstein C. The 5′ hypermutation boundary of kappa chains is independent of local and neighboring sequences and related to the distance from the initiation of transcription. *Eur J Immunol* 1997;27:3115-3120.
454c.Tumas-Brundage K, Manser T. The transcriptional promoter regulates hypermutation of the antibody heavy chain locus. *J Exp Med* 1997;185:239-250.
454d.Cascalho M, Wong J, Steinberg C, Wabl M. Mismatch repair co-opted by hypermutation. *Science* 1998;279:1207-1210.
454e.Narayanan L, Fritzell MA, Baker SM, Liskay RM, Glazer PM. Elevated levels of mutation in multiple tissues of mice deficient in the DNA mismatch repair gene Pms2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3122-3127.
454f. Razanajaona D, Denepoux S, Blanchard D, et al. In vitro triggering of somatic mutation in human naive B cells. *J Immunol* 1997;159:3347-3353.
455. Roes J, Rajewsky K. Immunoglobulin D (IgD)-deficient mice reveal an auxiliary receptor function for IgD in antigen-mediated recruitment of B cells. *J Exp Med* 1993;177:45–55.
456. Liu YJ, de Boutellier O, Arpin C, et al. Normal human IgD^+IgM^- germinal center B cells can express up to 80 mutations in the variable region of their IgD transcripts. *Immunity* 1996;4:603–613.
457. Kallberg E, Jainandunsing S, Gray D, Leanderson T. Somatic mutation of immunoglobulin V genes in vitro. *Science* 1996;271:1285–1289.
458. Denepoux S, Razanajaona D, Blanchard D, et al. Induction of somatic mutation in a human B cell line in vitro. *Immunity* 1997;6:35–46.
459. Jolly CJ, Klix N, Neuberger MS. Rapid methods for the analysis of immunoglobulin gene hypermutation: Application to transgenic and gene targeted mice. *Nucleic Acids Res* 1997;25:1913–1919.
460. Williams AF. A year in the life of the immunoglobulin superfamily. *Immunol Today* 1987;8:298–303.
461. Hunkapiller T, Hood L. Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv Immunol* 1989;44:1–63.
462. Matsunaga T, Mori N. The origin of the immune system. The possibility that immunoglobulin superfamily molecules and cell adhesion molecules of chicken and slime mould are all related. *Scand J Immunol* 1987;25:485–495.
463. Hoek RM, Smit AB, Frings H, et al. A new Ig-superfamily member, molluscan defence molecule (MDM) from *Lymnaea stagnalis*, is down-regulated during parasitosis. *Eur J Immunol* 1996;26:939–944.
464. Sun SC, Lindstrom I, Boman HG, Faye I, Schmidt O. Hemolin: An insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science* 1990; 250:1729–1732.
465. Lindstrom-Dinnetz I, Sun SC, Faye I. Structure and expression of Hemolin, an insect member of the immunoglobulin gene superfamily. *Eur J Biochem* 1995; 230:920–925.
466. Parnes JR, Hunkapiller T. L3T4 and the immunoglobulin gene superfamily: New relationships between the immune system and the nervous system. *Immunol Rev* 1987;100:109–127.
467. Chretien I, Robert J, Marcuz A, Garcia SJ, Courtet M, Du PL. CTX, a novel molecule specifically expressed on the surface of cortical thymocytes in Xenopus. *Eur J Immunol* 1996;26:780–791.
468. Johnson P, Williams AF. Striking similarities between antigen receptor J pieces and sequence in the second chain of the murine CD8 antigen. *Nature* 1986;323:74–76.
469. Siu G, Kronenberg M, Strauss E, Haars R, Mak TW, Hood L. The structure, rearrangement and expression of D beta gene segments of the murine T-cell antigen receptor. *Nature* 1984;311:344–350.
470. Rast JP, Litman GW. T-cell receptor gene homologs are present in the most primitive jawed vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9248–9252.
471. Hawke NA, Rast JP, Litman GW. Extensive diversity of transcribed TCR-beta in phylogenetically primitive vertebrate. *J Immunol* 1996;156:2458–2464.
472. Rast JP, Anderson MK, Strong SJ, Luer C, Litman RT, Litman GW. Alpha, beta, gamma, and delta T cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny. *Immunity* 1997;6:1–11.
473. Hinds KR, Litman GW. Major reorganization of immunoglobulin VH segmental elements during vertebrate evolution. *Nature* 1986;320:546–549.
474. Reynaud CA, Anquez V, Grimal H, Weill JC. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* 1987;48:379–388.
475. Thompson CB, Neiman PE. Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment. *Cell* 1987;48:369–378.
476. Knight KL, Becker RS. Molecular basis of the allelic inheritance of rabbit

immunoglobulin VH allotypes: Implications for the generation of antibody diversity. *Cell* 1990;60:963–970.
476a. Lanning DK, Knight KL. Somatic hypermutation: mutations 3′ of rabbit VDJ H-chain genes. *J Immunol* 1997;159:4403-4407.
477. Parng CL, Hansal S, Goldsby RA, Osborne BA. Gene conversion contributes to Ig light chain diversity in cattle. *J Immunol* 1996;157:5478–5486.
478. Jack HM, Wabl M. Immunoglobulin mRNA stability varies during B lymphocyte differentiation. *EMBO J* 1988;7:1041–1046.
479. Bode J, Kohwi Y, Dickinson L, et al. Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science* 1992;255:195–197.
480. Freeman LA, Garrard WT. DNA supercoiling in chromatin structure and gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1992;2:165–209.
481. Baron MH. Developmental regulation of the vertebrate globin multigene family. *Gene Expr* 1996;6:129–137.
482. Razin A, Riggs AD. DNA metylation and gene function. *Science* 1980;210: 604–610.
483. Rogers J, Wall R. Immunoglobulin heavy chain genes: Demethylation accompanies class switching. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7497–7501.
484. Storb U, Wilson R, Selsing E, Walfield A. Rearranged and germline immunoglobulin kappa genes: Different states of DNase I sensitivity of constant kappa genes in immunocompetent and nonimmune cells. *Biochemistry* 1981;20:990–996.
485. Mather EL, Perry RP. Methylation status and DNase I sensitivity of immunoglobulin genes: Changes associated with rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:4689–4693.
486. Mills FC, Fisher LM, Kuroda R, Ford AM, Gould HJ. DNase I hypersensitive sites in the chromatin of human mu immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 1983;306:809–812.
487. Blackman MA, Koshland ME. Specific 5′ and 3′ regions of the mu chain gene are undermethylated at distinct stages of B-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:3809–3813.
488. Stavnezer-Nordgren J, Sirlin S. Specificity of immunoglobulin heavy chain switch correlates with activity of germline heavy chain genes prior to switching. *EMBO J* 1986;5:95–102.
489. Pfeiffer W, Zachau HG. Accessibility of expressed and non-expressed genes to a restriction nuclease. *Nucleic Acids Res* 1980;8:4621–4638.
490. Madisen L, Groudine M. Identification of a locus control region in the immunoglobulin heavy-chain locus that deregulates c-myc expression in plasmacytoma and Burkitt's lymphoma cells. *Genes Dev* 1994;8:2212–2226.
491. Mills FC, Harindranath N, Mitchell M, Max EE. Enhancer complexes located downstream of both human immunoglobulin C-alpha genes. *J Exp Med* 1997; 186:845–858.
492. Weischet WO, Glotov BO, Schnell H, Zachau HG. Differences in the nuclease sensitivity between the two alleles of the immunoglobulin kappa light chain genes in mouse liver and myeloma nuclei. *Nucleic Acids Res* 1982;10: 3627–3645.
493. Gimble JM, Max EE. Human immunoglobulin kappa gene enhancer: Chromatin structure analysis at high resolution. *Mol Cell Biol* 1987;7:15–25.
494. Singh H, LeBowitz JH, Baldwin AJ, Sharp PA. Molecular cloning of an enhancer binding protein: Isolation by screening of an expression library with a recognition site DNA. *Cell* 1988;52:415–423.
495. Falkner FG, Zachau HG. Correct transcription of an immunoglobulin kappa gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements. *Nature* 1984;310:71–74.
496. Parslow TG, Blair DL, Murphy WJ, Granner DK. Structure of the 5′ ends of immunoglobulin genes: A novel conserved sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;91:2650–2654.
497. Bergman Y, Rice D, Grosschedl R, Baltimore D. Two regulatory elements for immunoglobulin kappa light chain gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:7041–7045.
498. Grosschedl R, Baltimore D. Cell-type specificity of immunoglobulin gene expression is regulated by at least three DNA sequence elements. *Cell* 1985;41: 885–897.
499. Picard D, Schaffner W. Cell-type preference of immunoglobulin kappa and lambda gene promoters. *EMBO J* 1985;4:2831–2838.
500. Ballard DW, Bothwell A. Mutational analysis of the immunoglobulin heavy chain promoter region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9626–9630.
501. Wirth T, Staudt L, Baltimore D. An octamer oligonucleotide upstream of a TATA motif is sufficient for lymphoid-specific promoter activity. *Nature* 1987;329: 174 178.
502. Mizushima-Sugano J, Roeder RG. Cell-type-specific transcription of an immunoglobulin kappa light chain gene in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83: 8511–8515.
503. Hermanson GG, Briskin M, Sigman D, Wall R. Immunoglobulin enhancer and promoter motifs 5′ of the B29 B-cell- specific gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7341–7345.
504. Christensen SM, Martin BK, Tan SS, Weis JH. Identification of sites for distinct DNA binding proteins including Oct-1 and Oct-2 in the Cr2 gene. *J Immunol* 1992;148:3610–3617.
505. Thevenin C, Lucas BP, Kozlow EJ, Kehrl JH. Cell type- and stage-specific expression of the CD20/B1 antigen correlates with the activity of a diverged octamer DNA motif present in its promoter. *J Biol Chem* 1993;268:5949–5956.
506. Annweiler A, Muller IM, Wirth T. Oct2 transactivation from a remote enhancer position requires a B-cell-restricted activity. *Mol Cell Biol* 1992;12:3107–3116.
507. Clerc RG, Corcoran LM, LeBowitz JH, Baltimore D, Sharp PA. The B-cell-specific Oct-2 protein contains POU box- and homeo box-type domains. *Genes Dev* 1988;2:1570–1581.
508. Ko HS, Fast P, McBride W, Staudt LM. A human protein specific for the immunoglobulin octamer DNA motif contains a functional homeobox domain. *Cell* 1988;55:135–144.
509. Staudt LM, Clerc RG, Singh H, LeBowitz JH, Sharp PA, Baltimore D. Cloning of a lymphoid-specific cDNA encoding a protein binding the regulatory octamer DNA motif. *Science* 1988;241:577–580.
510. Sturm RA, Das G, Herr W. The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev* 1988;2: 1582–1599.
511. Klemm JD, Rould MA, Aurora R, Herr W, Pabo CO. Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules. *Cell* 1994;77:21–32.
512. Gerster T, Balmaceda CG, Roeder RG. The cell type-specific octamer transcription factor OTF-2 has two domains required for the activation of transcription. *EMBO J* 1990;9:1635–1643.
513. Tanaka M, Herr W. Differential transcriptional activation by Oct-1 and Oct-2: Interdependent activation domains induce Oct-2 phosphorylation. *Cell* 1990;60: 375–386.
514. Yang J, Muller IM, Seipel K, et al. Both Oct-1 and Oct-2A contain domains which can activate the ubiquitously expressed U2 snRNA genes. *EMBO J* 1991; 10:2291–2296.
515. Tanaka M, Lai JS, Herr W. Promoter-selective activation domains in Oct-1 and Oct-2 direct differential activation of an snRNA and mRNA promoter. *Cell* 1992;68:755–767.
516. Feldhaus AL, Klug CA, Arvin KL, Singh H. Targeted disruption of the Oct-2 locus in a B cell provides genetic evidence for two distinct cell type-specific pathways of octamer element-mediated gene activation. *EMBO J* 1993;12:2763–2772.
517. Corcoran LM, Karvelas M, Nossal GJ, Ye ZS, Jacks T, Baltimore D. Oct-2, although not required for early B-cell development, is critical for later B-cell maturation and for postnatal survival. *Genes Dev* 1993;7:570–582.
518. Corcoran LM, Karvelas M. Oct-2 is required early in T cell-independent B cell activation for G1 progression and for proliferation. *Immunity* 1994;1:635–645.
519. Pierani A, Heguy A, Fujii H, Roeder RG. Activation of octamer-containing promoters by either octamer-binding transcription factor 1 (OTF-1) or OTF-2 and requirement of an additional B-cell-specific component for optimal transcription of immunoglobulin promoters. *Mol Cell Biol* 1990;10:6204–6215.
520. Luo Y, Roeder RG. Cloning, functional characterization, and mechanism of action of the B-cell-specific transcriptional coactivator OCA-B. *Mol Cell Biol* 1995;15:4115–4124.
521. Strubin M, Newell JW, Matthias P. OBF-1, a novel B cell-specific coactivator that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamer-binding proteins. *Cell* 1995;80:497–506.
522. Gstaiger M, Knoepfel L, Georgiev O, Schaffner W, Hovens CM. A B-cell coactivator of octamer-binding transcription factors. *Nature* 1995;373:360–362.
523. Gstaiger M, Georgiev O, van LH, et al. The B cell coactivator Bob1 shows DNA sequence-dependent complex formation with Oct-1/Oct-2 factors, leading to differential promoter activation. *EMBO J* 1996;15:2781–2790.
524. Cepek KL, Chasman DI, Sharp PA. Sequence-specific DNA binding of the B-cell-specific coactivator OCA-B. *Genes Dev* 1996;10:2079–2088.
525. Kim U, Qin XF, Gong S, et al. The B-cell-specific transcription coactivator OCA-B/OBF-1/Bob-1 is essential for normal production of immunoglobulin isotypes. *Nature* 1996;383:542–547.
526. Schubart DB, Rolink A, Kosco VM, Botteri F, Matthias P. B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal centre formation. *Nature* 1996;383:538–542.
527. Luo Y, Fujii H, Gerster T, Roeder RG. A novel B cell-derived coactivator potentiates the activation of immunoglobulin promoters by octamer-binding transcription factors. *Cell* 1992;71:231–241.
528. Pfisterer P, Annweiler A, Ullmer C, Corcoran LM, Wirth T. Differential transactivation potential of Oct1 and Oct2 is determined by additional B cell-specific activities. *EMBO J* 1994;13:1655–1663.
529. Cook GP, Neuberger MS. Lymphoid-specific transcriptional activation by components of the IgH enhancer: Studies on the E2/E3 and octanucleotide elements. *Nucleic Acids Res* 1990;18:3565–3571.
530. Stern S, Tanaka M, Herr W. The Oct-1 homoeodomain directs formation of a multiprotein-DNA complex with the HSV transactivator VP16. *Nature* 1989; 341:624–630.
531. Kristie TM, Sharp PA. Interactions of the Oct-1 POU subdomains with specific DNA sequences and with the HSV alpha-trans-activator protein. *Genes Dev* 1990;4:2383–2396.
532. Murphy S, Yoon JB, Gerster T, Roeder RG. Oct-1 and Oct-2 potentiate functional interactions of a transcription factor with the proximal sequence element of small nuclear RNA genes. *Mol Cell Biol* 1992;12:3247 3261.
532a. Pelletier MR, Hatada EN, Scholz G, Scheidereit C. Efficient transcription of an immunoglobulin kappa promoter requires specific sequence elements overlapping with and downstream of the transcriptional start site. *Nucl Acids Res* 1997;

25:3995-4003.
533. Lenardo M, Pierce JW, Baltimore D. Protein-binding sites in Ig gene enhancers determine transcriptional activity and inducibility. *Science* 1987;236:1573–1577.
534. Jenuwein T, Grosschedl R. Complex pattern of immunoglobulin mu gene expression in normal and transgenic mice: Nonoverlapping regulatory sequences govern distinct tissue specificities. *Genes Dev* 1991;5:932–943.
535. Yuan D, Dang T, Hawley J, Jenuwein T, Grosschedl R. Role of the OCTA site in regulation of IgH chain gene transcription during B cell activation. *Int Immunol* 1995;7:1163–1172.
536. Su LK, Kadesch T. The immunoglobulin heavy-chain enhancer functions as the promoter for I mu sterile transcription. *Mol Cell Biol* 1990;10:2619–2624.
537. Currie RA, Roeder RG. Identification of an octamer-binding site in the mouse kappa light-chain immunoglobulin enhancer. *Mol Cell Biol* 1989;9:4239–4247.
538. Kemler I, Schaffner W. Octamer transcription factors and the cell type-specificity of immunoglobulin gene expression. *FASEB J* 1990;4:1444–1449.
539. Wirth T, Priess A, Annweiler A, Zwilling S, Oeler B. Multiple Oct2 isoforms are generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 1991;19:43–51.
540. Stoykova AS, Sterrer S, Erselius JR, Hatzopoulos AK, Gruss P. Mini-Oct and Oct-2c: Two novel, functionally diverse murine Oct-2 gene products are differentially expressed in the CNS. *Neuron* 1992;8:541–558.
541. Segil N, Roberts SB, Heintz N. Mitotic phosphorylation of the Oct-1 homeodomain and regulation of Oct-1 DNA binding activity. *Science* 1991;254:1814–1816.
542. Zwilling S, Konig H, Wirth T. High mobility group protein 2 functionally interacts with the POU domains of octamer transcription factors. *EMBO J* 1995;14:1198–1208.
543. Fontes JD, Jabrane FN, Toth CR, Peterlin BM. Binding and cooperative interactions between two B cell-specific transcriptional coactivators. *J Exp Med* 1996;183:2517–2521.
544. Atchison ML, Delmas V, Perry RP. A novel upstream element compensates for an ineffectual octamer motif in an immunoglobulin V kappa promoter. *EMBO J* 1990;9:3109–3117.
545. Sigvardsson M, Akerblad P, Leanderson T. Early B cell factor interacts with a subset of kappa promoters. *J Immunol* 1996;156:3788–3796.
546. Eaton S, Calame K. Multiple DNA sequence elements are necessary for the function of an immunoglobulin heavy chain promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7634–7638.
547. Landolfi NF, Yin XM, Capra JD, Tucker PW. A conserved heptamer upstream of the IgH promoter region octamer can be the site of a coordinate protein-DNA interaction. *Nucleic Acids Res* 1988;16:5503–5514.
548. Kemler I, Schreiber E, Muller MM, Matthias P, Schaffner W. Octamer transcription factors bind to two different sequence motifs of the immunoglobulin heavy chain promoter. *EMBO J* 1989;8:2001–2008.
549. LeBowitz JH, Clerc RG, Brenowitz M, Sharp PA. The Oct-2 protein binds cooperatively to adjacent octamer sites. *Genes Dev* 1989;3:1625–1638.
550. Poellinger L, Roeder RG. Octamer transcription factors 1 and 2 each bind to two different functional elements in the immunoglobulin heavy-chain promoter. *Mol Cell Biol* 1989;9:747–756.
551. Poellinger L, Yoza BK, Roeder RG. Functional cooperativity between protein molecules bound at two distinct sequence elements of the immunoglobulin heavy-chain promoter. *Nature* 1989;337:573–576.
552. Yoza BK, Roeder RG. Identification of a novel factor that interacts with an immunoglobulin heavy-chain promoter and stimulates transcription in conjunction with the lymphoid cell-specific factor OTF2. *Mol Cell Biol* 1990;10:2145–2153.
553. Cooper C, Johnson D, Roman C, Avitahl N, Tucker P, Calame K. The C/EBP family of transcriptional activators is functionally important for Ig VH promoter activity in vivo and in vitro. *J Immunol* 1992;149:3225–3231.
554. Webb CF, Das C, Eaton S, Calame K, Tucker PW. Novel protein-DNA interactions associated with increased immunoglobulin transcription in response to antigen plus interleukin-5. *Mol Cell Biol* 1991;11:5197–5205.
555. Herrscher RF, Kaplan MH, Lelsz DL, Das C, Scheuermann R, Tucker PW. The immunoglobulin heavy-chain matrix-associating regions are bound by Bright: A B cell-specific trans-activator that describes a new DNA-binding protein family. *Genes Dev* 1995;9:3067–3082.
556. Avitahl N, Calame K. A 125 bp region of the Ig VH1 promoter is sufficient to confer lymphocyte-specific expression in transgenic mice. *Int Immunol* 1996;8:1359–1366.
557. Buchanan KL, Hodgetts SI, Byrnes J, Webb CF. Differential transcription efficiency of two Ig VH promoters in vitro. *J Immunol* 1995;155:4270–4277.
558. Stiernholm NB, Berinstein NL. A mutated promoter of a human Ig V lambda gene segment is associated with reduced germ-line transcription and a low frequency of rearrangement. *J Immunol* 1995;154:1748–1761.
559. Buchanan KL, Smith EA, Dou S, Corcoran LM, Webb CF. Family-specific differences in transcription efficiency of Ig heavy chain promoters. *J Immunol* 1997;159:1247–1254.
560. Sawadogo M, Roeder RG. Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* 1985;43:165–175.
561. Chang LA, Smith T, Pognonec P, Roeder RG, Murialdo H. Identification of USF as the ubiquitous murine factor that binds to and stimulates transcription from the immunoglobulin lambda 2-chain promoter. *Nucleic Acids Res* 1992;20:287–293.
562. Blackwell TK, Moore MW, Yancopoulos GD, et al. Recombination between immunoglobulin variable region gene segments is enhanced by transcription. *Nature* 1986;324:585–589.
563. Berman JE, Humphries CG, Barth J, Alt FW, Tucker PW. Structure and expression of human germline VH transcripts. *J Exp Med* 1991;173:1529–1535.
564. Perry RP, Kelley DE, Coleclough C, et al. Transcription of mouse kappa chain genes: Implications for allelic exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:1937–1941.
565. Martin D, Huang RQ, LeBien T, Van Ness B. Induced rearrangement of kappa genes in the BLIN-1 human pre-B cell line correlates with germline J-C kappa and V kappa transcription. *J Exp Med* 1991;173:639–645.
566. Nelson KJ, Haimovich J, Perry RP. Characterization of productive and sterile transcripts from the immunoglobulin heavy-chain locus: Processing of micron and muS mRNA. *Mol Cell Biol* 1983;3:1317–1332.
567. Lennon GG, Perry RP. C mu-containing transcripts initiate heterogeneously within the IgH enhancer region and contain a novel 5′-nontranslatable exon. *Nature* 1985;318:475–478.
568. Neale GA, Kitchingman GR. mRNA transcripts initiating within the human immunoglobulin mu heavy chain enhancer region contain a non-translatable exon and are extremely heterogeneous at the 5′ end. *Nucleic Acids Res* 1991;19:2427–2433.
569. Li SC, Rothman PB, Zhang J, Chan C, Hirsh D, Alt FW. Expression of I mu-C gamma hybrid germline transcripts subsequent to immunoglobulin heavy chain class switching. *Int Immunol* 1994;6:491–497.
570. Alessandrini A, Desiderio SV. Coordination of immunoglobulin DJH transcription and D-to-JH rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Mol Cell Biol* 1991;11:2096–2107.
571. Kottmann AH, Brack C, Eibel H, Kohler G. A survey of protein-DNA interaction sites within the murine immunoglobulin heavy chain locus reveals a particularly complex pattern around the DQ52 element. *Eur J Immunol* 1992;22:2113–2120.
572. Kottmann AH, Zevnik B, Welte M, Nielsen PJ, Kohler G. A second promoter and enhancer element within the immunoglobulin heavy chain locus. *Eur J Immunol* 1994;24:817–821.
573. Martin DJ, Van Ness B. Initiation and processing of two kappa immunoglobulin germ line transcripts in mouse B cells. *Mol Cell Biol* 1990;10:1950–1958.
574. Weaver D, Baltimore D. B lymphocyte-specific protein binding near an immunoglobulin kappa-chain gene J segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1516–1520.
575. Frances V, Pandrau GD, Guret C, et al. A surrogate 15 kDa JC kappa protein is expressed in combination with mu heavy chain by human B cell precursors. *EMBO J* 1994;13:5937–5943.
576. Daitch LE, Moore MW, Persiani DM, Durdik JM, Selsing E. Transcription and recombination of the murine RS element. *J Immunol* 1992;149:832–840.
577. Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 1991;254:707–710.
578. Rothman P, Chen YY, Lutzker S, et al. Structure and expression of germ line immunoglobulin heavy-chain epsilon transcripts: Interleukin-4 plus lipopolysaccharide-directed switching to C epsilon. *Mol Cell Biol* 1990;10:1672–1679.
579. Delphin S, Stavnezer J. Characterization of an interleukin 4 (IL-4) responsive region in the immunoglobulin heavy chain germline epsilon promoter: Regulation by NF-IL-4, a C/EBP family member and NF-kappa B/p50. *J Exp Med* 1995;181:181–192.
580. Mikita T, Campbell D, Wu P, Williamson K, Schindler U. Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6. *Mol Cell Biol* 1996;16:5811–5820.
581. Shimoda K, van DJ, Sangster MY, et al. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 1996;380:630–633.
582. Takeda K, Tanaka T, Shi W, et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 1996;380:627–630.
583. Cooper C, Henderson A, Artandi S, Avitahl N, Calame K. Ig/EBP (C/EBP gamma) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators. *Nucleic Acids Res* 1995;23:4371–4377.
584. Cooper CL, Berrier AL, Roman C, Calame KL. Limited expression of C/EBP family proteins during B lymphocyte development. Negative regulator Ig/EBP predominates early and activator NF-IL-6 is induced later. *J Immunol* 1994;153:5049–5058.
585. Iciek LA, Delphin SA, Stavnezer J. CD40 cross-linking induces Ig epsilon germline transcripts in B cells via activation of NF-kappa B: Synergy with IL-4 induction. *J Immunol* 1997;158:4769–4779.
586. Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 1995;80:321–330.
587. Kim J, Reeves R, Rothman P, Boothby M. The non-histone chromosomal protein HMG-I(Y) contributes to repression of the immunoglobulin heavy chain germline epsilon RNA promoter. *Eur J Immunol* 1995;25:798–808.
588. Wang DZ, Ray P, Boothby M. Interleukin 4-inducible phosphorylation of HMG-I(Y) is inhibited by rapamycin. *J Biol Chem* 1995;270:22924–22932.
589. Liao F, Birshtein BK, Busslinger M, Rothman P. The transcription factor BSAP (NF-HB) is essential for immunoglobulin germ-line epsilon transcription. *J*

Immunol 1994;152:2904–2911.
589a. Thienes CP, De ML, Monticelli S, Busslinger M, Gould HJ, Vercelli D. The transcription factor B cell-specific activator protein (BSAP) enhances both IL-4- and CD40-mediated activation of the human epsilon germline promoter. *J Immunol* 1997;158:5874-5882.
590. Church GM, Ephrussi A, Gilbert W, Tonegawa S. Cell-type-specific contacts to immunoglobulin enhancers in nuclei. *Nature* 1985;313:798–801.
591. Ephrussi A, Church GM, Tonegawa S, Gilbert W. B lineage–specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science* 1985;227: 134–140.
592. Kadesch T, Zervos P, Ruezinsky D. Functional analysis of the murine IgH enhancer: Evidence for negative control of cell-type specificity. *Nucleic Acids Res* 1986;14:8209–8221.
593. Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 1989;56:777–783.
594. Murre C, McCaw PS, Vaessin H, et al. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 1989;58:537–544.
595. Lassar AB, Davis RL, Wright WE, et al. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 1991;66:305–315.
596. Lin H, Yutzey KE, Konieczny SF. Muscle-specific expression of the troponin I gene requires interactions between helix-loop-helix muscle regulatory factors and ubiquitous transcription factors. *Mol Cell Biol* 1991;11:267–280.
597. Voliva CF, Aronheim A, Walker MD, Peterlin BM. B-cell factor 1 is required for optimal expression of the DRA promoter in B cells. *Mol Cell Biol* 1992;12: 2383–2390.
598. Shen CP, Kadesch T. B-cell-specific DNA binding by an E47 homodimer. *Mol Cell Biol* 1995;15:4518–4524.
599. Sun XH, Copeland NG, Jenkins NA, Baltimore D. Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* 1991;11:5603–5611.
600. Wilson RB, Kiledjian M, Shen CP, et al. Repression of immunoglobulin enhancers by the helix-loop-helix protein Id: Implications for B-lymphoid-cell development. *Mol Cell Biol* 1991;11:6185–6191.
601. Bain G, Maandag EC, Izon DJ, et al. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 1994;79:885–892.
602. Zhuang Y, Soriano P, Weintraub H. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 1994;79:875–884.
603. Bain G, Robanus ME, te RH, et al. Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage. *Immunity* 1997;6:145–154.
604. Schlissel M, Voronova A, Baltimore D. Helix-loop-helix transcription factor E47 activates germ-line immunoglobulin heavy-chain gene transcription and rearrangement in a pre-T-cell line. *Genes Dev* 1991;5:1367–1376.
605. Choi JK, Shen CP, Radomska HS, Eckhardt LA, Kadesch T. E47 activates the Ig-heavy chain and TdT loci in non-B cells. *EMBO J* 1996;15:5014–5021.
606. Sloan SR, Shen CP, McCarrick WR, Kadesch T. Phosphorylation of E47 as a potential determinant of B-cell-specific activity. *Mol Cell Biol* 1996;16: 6900–6908.
607. Bain G, Gruenwald S, Murre C. E2A and E2-2 are subunits of B-cell-specific E2-box DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1993;13:3522–3529.
608. Zhuang Y, Cheng P, Weintraub H. B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol Cell Biol* 1996;16:2898–2905.
609. Ruezinsky D, Beckmann H, Kadesch T. Modulation of the IgH enhancer's cell type specificity through a genetic switch. *Genes Dev* 1991;5:29–37.
610. Genetta T, Ruezinsky D, Kadesch T. Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-loop-helix proteins: Implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol Cell Biol* 1994;14:6153–6163.
611. Carter RS, Ordentlich P, Kadesch T. Selective utilization of basic helix-loop-helix-leucine zipper proteins at the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol Cell Biol* 1997;17:18–23.
612. Merrell K, Wells S, Henderson A, et al. The absence of the transcription activator TFE3 impairs activation of B cells in vivo. *Mol Cell Biol* 1997;17: 3335–3344.
613. Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. The protein Id: A negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 1990;61:49–59.
614. Sun XH. Constitutive expression of the Id1 gene impairs mouse B cell development. *Cell* 1994;79:893–900.
615. Mellentin JD, Murre C, Donlon TA, et al. The gene for enhancer binding proteins E12/E47 lies at the t(1;19) breakpoint in acute leukemias. *Science* 1989;246: 379–382.
616. Inaba T, Roberts WM, Shapiro LH, et al. Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B-lineage leukemia. *Science* 1992;257:531–534.
617. Nelsen B, Tian G, Erman B, et al. Regulation of lymphoid-specific immunoglobulin mu heavy chain gene enhancer by ETS-domain proteins. *Science* 1993;261: 82–86.
618. Libermann TA, Baltimore D. Pi, a pre-B-cell-specific enhancer element in the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol Cell Biol* 1993;13:5957–5969.
619. Akbarali Y, Oettgen P, Boltax J, Libermann TA. ELF-1 interacts with and transactivates the IgH enhancer pi site. *J Biol Chem* 1996;271:26007–26012.
620. Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van BC, Maki RA. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* 1990;61:113–124.
621. Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 1994;265: 1573–1577.
622. Nikolajczyk BS, Nelsen B, Sen R. Precise alignment of sites required for mu enhancer activation in B cells. *Mol Cell Biol* 1996;16:4544–4554.
623. Nikolajczyk BS, Cortes M, Feinman R, Sen R. Combinatorial determinants of tissue-specific transcription in B cells and macrophages. *Mol Cell Biol* 1997;17: 3527–3535.
624. Rao E, Dang W, Tian G, Sen R. A three-protein-DNA complex on a B cell-specific domain of the immunoglobulin mu heavy chain gene enhancer. *J Biol Chem* 1997;272:6722–6732.
624a. Dang W, Sun XH, Sen R. ETS-mediated cooperation between basic helix-loop-helix motifs of the immunoglobulin mu heavy-chain gene enhancer. *Mol Cell Biol* 1998;18:1477-1488.
624b. Peterson CL, Eaton S, Calame K. Purified mu EBP-E binds to immunoglobulin enhancers and promoters. *Mol Cell Biol* 1988;8:4972–4980.
624c. Tsao BP, Wang XF, Peterson CL, Calame K. In vivo functional analysis of in vitro protein binding sites in the immunoglobulin heavy chain enhancer. *Nucleic Acids Res* 1988;16:3239-3253.
625. Raynal MC, Liu ZY, Hirano T, Mayer L, Kishimoto T, Chen KS. Interleukin 6 induces secretion of IgG1 by coordinated transcriptional activation and differential mRNA accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8024–8028.
626. Park K, Atchison ML. Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, delta), that binds to the immunoglobulin kappa 3′ enhancer and the immunoglobulin heavy-chain mu E1 site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9804–9808.
627. Shi Y, Seto E, Chang LS, Shenk T. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* 1991;67:377–388.
628. Bushmeyer S, Park K, Atchison ML. Characterization of functional domains within the multifunctional transcription factor, YY1. *J Biol Chem* 1995;270: 30213–30220.
629. Kiledjian M, Su LK, Kadesch T. Identification and characterization of two functional domains within the murine heavy-chain enhancer. *Mol Cell Biol* 1988;8: 145–152.
630. Wasylyk C, Wasylyk B. The immunoglobulin heavy-chain B-lymphocyte enhancer efficiently stimulates transcription in non-lymphoid cells. *EMBO J* 1986;5:553–560.
631. Imler JL, Lemaire C, Wasylyk C, Wasylyk B. Negative regulation contributes to tissue specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol Cell Biol* 1987;7:2558–2567.
632. Weinberger J, Jat PS, Sharp PA. Localization of a repressive sequence contributing to B-cell specificity in the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol Cell Biol* 1988;8:988–992.
633. Cockerill PN, Yuen MH, Garrard WT. The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements. *J Biol Chem* 1987;262:5394–5397.
634. Scheuermann RH, Chen U. A developmental-specific factor binds to suppressor sites flanking the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Genes Dev* 1989;3: 1255–1266.
635. Zong RT, Scheuermann RH. Mutually exclusive interaction of a novel matrix attachment region binding protein and the NF-muNR enhancer repressor. Implications for regulation of immunoglobulin heavy chain expression. *J Biol Chem* 1995;270:24010–24018.
636. Forrester WC, van Genderen C, Jenuwein T, Grosschedl R. Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin mu gene on nuclear matrix attachment regions. *Science* 1994;265:1221–1225.
637. McKnight RA, Shamay A, Sankaran L, Wall RJ, Hennighausen L. Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6943–6947.
638. Jenuwein T, Forrester WC, Qiu RG, Grosschedl R. The immunoglobulin mu enhancer core establishes local factor access in nuclear chromatin independent of transcriptional stimulation. *Genes Dev* 1993;7:2016–2032.
639. Jenuwein T, Forrester WC, Fernandez HL, Laible G, Dull M, Grosschedl R. Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature* 1997;385:269–272.
640. Dickinson LA, Joh T, Kohwi Y, Kohwi ST. A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell* 1992;70:631–645.
641. Dickinson LA, Kohwi ST. Nucleolin is a matrix attachment region DNA-binding protein that specifically recognizes a region with high base-unpairing potential. *Mol Cell Biol* 1995;15:456–465.
642. Klein S, Sablitzky F, Radbruch A. Deletion of the IgH enhancer does not reduce immunoglobulin heavy chain production of a hybridoma IgD class switch variant. *EMBO J* 1984;3:2473–2476.
643. Wabl MR, Burrows PD. Expression of immunoglobulin heavy chain at a high level in the absence of a proposed immunoglobulin enhancer element in cis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2452–2455.

644. Aguilera RJ, Hope TJ, Sakano H. Characterization of immunoglobulin enhancer deletions in murine plasmacytomas. *EMBO J* 1985;4:3689–3693.
644a. Klein U, Klein G, Ehlin HB, Rajewsky K, Kuppers R. Burkitt's lymphoma is a malignancy of mature B cells expressing somatically mutated V region genes. *Mol Med* 1995;1:495-505.
644b. Tamaru J, Hummel M, Marafioti T, et al. Burkitt's lymphomas express VH genes with a moderate number of antigen-selected somatic mutations. *Am J Pathol* 1995;147:1398-1407.
645. Eckhardt LA, Birshtein BK. Independent immunoglobulin class-switch events occurring in a single myeloma cell line. *Mol Cell Biol* 1985;5:856 868.
646. Gregor PD, Morrison SL. Myeloma mutant with a novel 3' flanking region: Loss of normal sequence and insertion of repetitive elements leads to decreased transcription but normal processing of the alpha heavy-chain gene products. *Mol Cell Biol* 1986;6:1903–1916.
647. Pettersson S, Cook GP, Bruggemann M, Williams GT, Neuberger MS. A second B cell-specific enhancer 3′ of the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature* 1990;344:165–168.
648. Dariavach P, Williams GT, Campbell K, Pettersson S, Neuberger MS. The mouse IgH 3'-enhancer. *Eur J Immunol* 1991;21:1499–1504.
649. Lieberson R, Giannini SL, Birshtein BK, Eckhardt LA. An enhancer at the 3′ end of the mouse immunoglobulin heavy chain locus. *Nucleic Acids Res* 1991;19:933–937.
650. Matthias P, Baltimore D. The immunoglobulin heavy chain locus contains another B-cell-specific 3′ enhancer close to the alpha constant region. *Mol Cell Biol* 1993;13:1547–1553.
651. Chauveau C, Cogne M. Palindromic structure of the IgH 3'locus control region. *Nat Genet* 1996;14:15–16.
652. Saleque S, Singh M, Little RD, Giannini SL, Michaelson JS, Birshtein BK. Dyad symmetry within the mouse 3′ IgH regulatory region includes two virtually identical enhancers (C alpha3'E and hs3). *J Immunol* 1997;158:4780–4787.
653. Meyer KB, Skogberg M, Margenfeld C, Ireland J, Pettersson S. Repression of the immunoglobulin heavy chain 3′ enhancer by helix-loop-helix protein Id3 via a functionally important E47/E12 binding site: Implications for developmental control of enhancer function. *Eur J Immunol* 1995;25:1770–1777.
654. Neurath MF, Max EE, Strober W. Pax5 (BSAP) regulates the murine immunoglobulin 3′ alpha enhancer by suppressing binding of NF-alpha P, a protein that controls heavy chain transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 5336–5340.
655. Ernst P, Smale ST. Combinatorial regulation of transcription II: the immunoglobulin mu heavy chain gene. *Immunity* 1995;2:427–438.
656. Singh M, Birshtein BK. Concerted repression of an immunoglobulin heavy-chain enhancer, 3′ alpha E(hs1,2). *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4392–4397.
657. Linderson Y, Cross D, Neurath MF, Pettersson S. NFE, a new transcriptional activator that facilitates p50 and c-Rel-dependent IgH 3′ enhancer activity. *Eur J Immunol* 1997;27:468–475.
658. Grant PA, Thompson CB, Pettersson S. IgM receptor-mediated transactivation of the IgH 3′ enhancer couples a novel Elf-1-AP-1 protein complex to the developmental control of enhancer function. *EMBO J* 1995;14:4501–4513.
659. Grant PA, Andersson T, Neurath MF, et al. A T cell controlled molecular pathway regulating the IgH locus: CD40-mediated activation of the IgH 3′ enhancer. *EMBO J* 1996;15:6691–6700.
660. Michaelson JS, Giannini SL, Birshtein BK. Identification of 3′ alpha-hs4, a novel Ig heavy chain enhancer element regulated at multiple stages of B cell differentiation. *Nucleic Acids Res* 1995;23:975–981.
661. Michaelson JS, Singh M, Snapper CM, Sha WC, Baltimore D, Birshtein BK. Regulation of 3′ IgH enhancers by a common set of factors, including kappa B-binding proteins. *J Immunol* 1996;156:2828–2839.
662. Chen J, Young F, Bottaro A, Stewart V, Smith RK, Alt FW. Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus. *EMBO J* 1993;12:4635–4645.
663. Serwe M, Sablitzky F. V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the immunoglobulin heavy chain intron enhancer. *EMBO J* 1993;12:2321–2327.
664. Lieberson R, Ong J, Shi X, Eckhardt LA. Immunoglobulin gene transcription ceases upon deletion of a distant enhancer. *EMBO J* 1995;14:6229–6238.
665. Singh M, Birshtein BK. NF-HB (BSAP) is a repressor of the murine immunoglobulin heavy-chain 3′ alpha enhancer at early stages of B-cell differentiation. *Mol Cell Biol* 1993;13:3611–3622.
666. Arulampalam V, Grant PA, Samuelsson A, Lendahl U, Pettersson S. Lipopolysaccharide-dependent transactivation of the temporally regulated immunoglobulin heavy chain 3'enhancer. *Eur J Immunol* 1994;24:1671–1677.
667. Arulampalam V, Furebring C, Samuelsson A, et al. Elevated expression levels of an Ig transgene in mice links the IgH 3′ enhancer to the regulation of IgH expression. *Int Immunol* 1996;8:1149–1157.
668. Picard D, Schaffner W. A lymphocyte-specific enhancer in the mouse immunoglobulin kappa gene. *Nature* 1984;307:80–82.
669. Queen C, Stafford J. Fine mapping of an immunoglobulin gene activator. *Mol Cell Biol* 1984;4:1042–1049.
670. Chung SY, Folsom V, Wooley J. DNase I-hypersensitive sites in the chromatin of immunoglobulin kappa light chain genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80: 2427–2431.
671. Emorine L, Kuehl M, Weir L, Leder P, Max EE. A conserved sequence in the immunoglobulin J kappa-C kappa intron: Possible enhancer element. *Nature* 1983;304:447–449.
672. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986;46:705–716.
673. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986;47:921–928.
674. Pierce JW, Lenardo M, Baltimore D. Oligonucleotide that binds nuclear factor NF-kappa B acts as a lymphoid-specific and inducible enhancer element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1482–1486.
675. Rooney JW, Dubois PM, Sibley CH. Cross-linking of surface IgM activates NF-kappa B in B lymphocyte. *Eur J Immunol* 1991;21:2993–2998.
676. Baeuerle PA, Baltimore D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell* 1988;53: 211–217.
677. Baeuerle PA, Baltimore D. I kappa B: A specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 1988;242:540–546.
678. Baldwin AS. The NF-kB and IkB proteins: New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649–681.
679. Stephens RM, Rice NR, Hiebsch RR, Bose HJ, Gilden RV. Nucleotide sequence of v-rel: The oncogene of reticuloendotheliosis virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983:80:6229–6233.
680. Lernbecher T, Muller U, Wirth T. Distinct NF-kappa B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature* 1993;365:767–770.
681. Liou HC, Sha WC, Scott ML, Baltimore D. Sequential induction of NF-kappa B/Rel family proteins during B-cell terminal differentiation. *Mol Cell Biol* 1994;14:5349–5359.
682. Miyamoto S, Schmitt MJ, Verma IM. Qualitative changes in the subunit composition of kappa B-binding complexes during murine B-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5056–5060.
683. Davis N, Ghosh S, Simmons DL, et al. Rel-associated pp40: An inhibitor of the rel family of transcription factors. *Science* 1991;253:1268–1271.
684. Haskill S, Beg AA, Tompkins SM, et al. Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. *Cell* 1991;65:1281–1289.
685. Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument BH, Tempst P, Ghosh S. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* 1995;80:573–582.
686. Zhang Q, Didonato JA, Karin M, McKeithan TW. BCL3 encodes a nuclear protein which can alter the subcellular location of NF-kappa B proteins. *Mol Cell Biol* 1994;14:3915–3926.
687. Bours V, Franzoso G, Azarenko V, et al. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 1993;72:729–739.
688. Fujita T, Nolan GP, Liou HC, Scott ML, Baltimore D. The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev* 1993;7:1354–1363.
689. Naumann M, Scheidereit C. Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *EMBO J* 1994;13:4597–4607.
690. Chen JC, Parent L, Maniatis T. Site-specific phosphorylation of I-kappa B-alpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* 1996;84: 853–862.
691. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I-kappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 1997;388:548–554.
691a. Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M. Identification and characterization of an I-kappa-B kinase. *Cell* 1997;90:373-383.
692. Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, et al. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1995;9:1586–1597.
693. Arenzana SF, Thompson J, Rodriguez MS, Bachelerie F, Thomas D, Hay RT. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 1995;15:2689–2696.
694. Scherer DC, Brockman JA, Bendall HH, Zhang GM, Ballard DW, Oltz EM. Corepression of RelA and c-rel inhibits immunoglobulin kappa gene transcription and rearrangement in precursor B lymphocytes. *Immunity* 1996;5:563–574.
695. Cockerill PN, Garrard WT. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* 1986;44:273–282.
696. Blasquez VC, Xu M, Moses SC, Garrard WT. Immunoglobulin kappa gene expression after stable integration. I. Role of the intronic MAR and enhancer in plasmacytoma cells. *J Biol Chem* 1989;264:21183–21189.
697. Xu M, Hammer RE, Blasquez VC, Jones SL, Garrard WT. Immunoglobulin kappa gene expression after stable integration. II. Role of the intronic MAR and enhancer in transgenic mice. *J Biol Chem* 1989;264:21190–21195.
698. Lichtenstein M, Keini G, Cedar H, Bergman Y. B cell-specific demethylation: A novel role for the intronic kappa chain enhancer sequence. *Cell* 1994;76: 913–923.
699. Kirillov A, Kistler B, Mostoslavsky R, Cedar H, Wirth T, Bergman Y. A role for

nuclear NF-kappaB in B-cell-specific demethylation of the Igkappa locus. *Nat Genet* 1996;13:435–441.
700. Schanke JT, Marcuzzi A, Podzorski RP, Van NB. An AP1 binding site upstream of the kappa immunoglobulin intron enhancer binds inducible factors and contributes to expression. *Nucleic Acids Res* 1994;22:5425–5432.
701. Pierce JW, Gifford AM, Baltimore D. Silencing of the expression of the immunoglobulin kappa gene in non-B cells. *Mol Cell Biol* 1991;11:1431–1437.
702. Saksela K, Baltimore D. Negative regulation of immunoglobulin kappa light-chain gene transcription by a short sequence homologous to the murine B1 repetitive element. *Mol Cell Biol* 1993;13:3698–3705.
703. Atchison ML, Perry RP. The role of the kappa enhancer and its binding factor NF-kappa B in the developmental regulation of kappa gene transcription. *Cell* 1987;48:121–128.
704. Meyer KB, Neuberger MS. The immunoglobulin kappa locus contains a second, stronger B-cell-specific enhancer which is located downstream of the constant region. *EMBO J* 1989;8:1959–1964.
705. Meyer KB, Sharpe MJ, Surani MA, Neuberger MS. The importance of the 3'-enhancer region in immunoglobulin kappa gene expression. *Nucleic Acids Res* 1990;18:5609–5615.
706. Pongubala JM, Atchison ML. Functional characterization of the developmentally controlled immunoglobulin kappa 3' enhancer: Regulation by Id, a repressor of helix-loop-helix transcription factors. *Mol Cell Biol* 1991;11:1040–1047.
707. Pongubala JM, Nagulapalli S, Klemsz MJ, et al. PU.1 recruits a second nuclear factor to a site important for immunoglobulin kappa 3' enhancer activity. *Mol Cell Biol* 1992;12:368–378.
708. Brass AL, Kehrli E, Eisenbeis CF, Storb U, Singh H. Pip, a lymphoid-restricted IRF, contains a regulatory domain that is important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1. *Genes Dev* 1996;10: 2335–2347.
709. Pongubala JM, Atchison ML. Activating transcription factor 1 and cyclic AMP response element modulator can modulate the activity of the immunoglobulin kappa 3' enhancer. *J Biol Chem* 1995;270:10304–10313.
710. Pongubala JM, Atchison ML. PU.1 can participate in an active enhancer complex without its transcriptional activation domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 127–132.
711. Roque MC, Smith PA, Blasquez VC. A developmentally modulated chromatin structure at the mouse immunoglobulin kappa 3' enhancer. *Mol Cell Biol* 1996;16:3138–3155.
712. Costa MW, Atchison ML. Identification of an Spl-like element within the immunoglobulin kappa 3' enhancer necessary for maximal enhancer activity. *Biochemistry* 1996;35:8662–8669.
713. Meyer KB, Ireland J. Activation of the immunoglobulin kappa 3' enhancer in pre-B cells correlates with the suppression of a nuclear factor binding to a sequence flanking the active core. *Nucleic Acids Res* 1994;22:1576–1582.
714. Takeda S, Zou YR, Bluethmann H, Kitamura D, Muller U, Rajewsky K. Deletion of the immunoglobulin kappa chain intron enhancer abolishes kappa chain gene rearrangement in cis but not lambda chain gene rearrangement in trans. *EMBO J* 1993;12:2329–2336.
715. Fulton R, Van Ness B. Kappa immunoglobulin promoters and enhancers display developmentally controlled interactions. *Nucleic Acids Res* 1993;21:4941–4947.
716. Fulton R, van NB. Selective synergy of immunoglobulin enhancer elements in B-cell development: A characteristic of kappa light chain enhancers, but not heavy chain enhancers. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4216–4223.
717. Meyer KB, Teh YM, Neuberger MS. The Ig kappa 3'-enhancer triggers gene expression in early B lymphocytes but its activity is enhanced on B cell activation. *Int Immunol* 1996;8:1561–1568.
718. Shaffer AL, Peng A, Schlissel MS. In vivo occupancy of the kappa light chain enhancers in primary pro- and pre-B cells: A model for kappa locus activation. *Immunity* 1997;6:131–143.
719. Hagman J, Rudin CM, Haasch D, Chaplin D, Storb U. A novel enhancer in the immunoglobulin lambda locus is duplicated and functionally independent of NF kappa B. *Genes Dev* 1990;4:978–992.
720. Rudin CM, Storb U. Two conserved essential motifs of the murine immunoglobulin lambda enhancers bind B-cell-specific factors. *Mol Cell Biol* 1992;12: 309–320.
721. Eisenbeis CF, Singh H, Storb U. PU.1 is a component of a multiprotein complex which binds an essential site in the murine immunoglobulin lambda 2-4 enhancer. *Mol Cell Biol* 1993;13:6452–6461.
722. Eisenbeis CF, Singh H, Storb U. Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev* 1995;9: 1377–1387.
723. Blomberg BB, Rudin CM, Storb U. Identification and localization of an enhancer for the human lambda L chain Ig gene complex. *J Immunol* 1991;147: 2354–2358.
724. Asenbauer H, Klobeck HG. Tissue-specific deoxyribonuclease I-hypersensitive sites in the vicinity of the immunoglobulin C lambda cluster of man. *Eur J Immunol* 1996;26:142–150.
725. Glozak MA, Blomberg BB. The human lambda immunoglobulin enhancer is controlled by both positive elements and developmentally regulated negative elements. *Mol Immunol* 1996;33:427–438.
726. Chen C, Birshtein BK. Virtually identical enhancers containing a segment of homology to murine 3'IgH-E(hs1,2) lie downstream of human Ig C alpha 1 and C alpha 2 genes. *J Immunol* 1997;159:1310–1318.
727. Pospelov VA, Klobeck HG, Zachau HG. Correlation between DNase I hypersensitive sites and putative regulatory sequences in human immunoglobulin genes of the kappa light chain type. *Nucleic Acids Res* 1984;12:7007–7021.
728. Potter H, Weir L, Leder P. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:7161–7165.
729. Gimble JM, Levens D, Max EE. B-cell nuclear proteins binding in vitro to the human immunoglobulin kappa enhancer: Localization by exonuclease protection. *Mol Cell Biol* 1987;7:1815–1822.
730. Judde JG, Max EE. Characterization of the human immunoglobulin kappa gene 3' enhancer: Functional importance of three motifs that demonstrate B-cell-specific in vivo footprints. *Mol Cell Biol* 1992;12:5206–5216.
731. Rabbitts TH, Forster A, Baer R, Hamlyn PH. Transcription enhancer identified near the human C mu immunoglobulin heavy chain gene is unavailable to the translocated c-myc gene in a Burkitt lymphoma. *Nature* 1983;306:806–809.
732. Hayday AC, Gillies SD, Saito H, et al. Activation of a translocated human c-myc gene by an enhancer in the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature* 1984; 307:334–340.
733. Okamura K, Ishiguro H, Ichihara Y, Kurosawa Y. Comparison of nucleotide sequences from upstream of the DQ52 gene to the S mu region of immunoglobulin heavy-chain gene loci between Suncus murinus, mouse and human. *Mol Immunol* 1993;30:461–467.
734. Enjoji M. Human HE2 (microB) and microA motifs show the same function as whole IgH intronic enhancer in transgenic mice. *Mol Cell Biochem* 1994;137: 33–37.
735. Waldmann TA. The arrangement of immunoglobulin and T cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders. *Adv Immunol* 1987;40:247–321.
736. Korsmeyer SJ. B-lymphoid neoplasms: immunoglobulin genes as molecular determinants of clonality, lineage, differentiation, and translocation. *Adv Intern Med* 1988;33:1–15.
737. Felix CA, Poplack DG. Characterization of acute lymphoblastic leukemia of childhood by immunoglobulin and T-cell receptor gene patterns. *Leukemia* 1991; 5:1015–1025.
738. Veronese ML, Schichman SA, Croce CM. Molecular diagnosis of lymphoma. *Curr Opin Oncol* 1996;8:346–352.
739. Roberts WM, Estrov Z, Kitchingman GR, Zipf TF. The clinical significance of residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia as detected by polymerase chain reaction amplification by antigen-receptor gene sequences. *Leuk Lymphoma* 1996;20:181–197.
740. Felix CA, Wright JJ, Poplack DG, et al. T cell receptor alpha-, beta-, and gamma-genes in T cell and pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 1987;80:545–556.
741. Wright JJ, Poplack DG, Bakhshi A, et al. Gene rearrangements as markers of clonal variation and minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1987;5:735–741.
742. Croce CM, Shander M, Martinis J, et al. Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76: 3416–3419.
743. Taub R, Kelly K, Battey J, et al. A novel alteration in the structure of an activated c-myc gene in a variant t(2;8) Burkitt lymphoma. *Cell* 1984;37:511–520.
744. Showe LC, Croce CM. The role of chromosomal translocations in B- and T-cell neoplasia. *Ann Rev Immunol* 1987;5:253–277.
745. Kato GJ, Lee WM, Chen LL, Dang CV. Max: Functional domains and interaction with c-Myc. *Genes Dev* 1992;6:81–92.
746. Galaktionov K, Chen X, Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 1996;382:511–517.
747. Schuldiner O, Eden A, Ben YT, Yanuka O, Simchen G, Benvenisty N. ECA39, a conserved gene regulated by c-Myc in mice, is involved in G1/S cell cycle regulation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7143–7148.
748. Nishikura K, ar-Rushdi A, Erikson J, Watt R, Rovera G, Croce CM. Differential expression of the normal and of the translocated human c-myc oncogenes in B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:4822–4826.
749. Shima EA, Le BM, McKeithan TW, et al. Gene encoding the alpha chain of the T-cell receptor is moved immediately downstream of c-myc in a chromosomal 8;14 translocation in a cell line from a human T-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3439–3443.
750. Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato SL, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 1984;224: 1403–1406.
751. Rosenberg CL, Wong E, Petty EM, et al. PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: Mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9638–9642.
752. de Boer C, van Krieken J, Schuuring E, Kluin PM. Bcl-1/cyclin D1 in malignant lymphoma. *Ann Oncol* 1997;2:109–117.
753. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984;226:1097–1099.
754. Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an

inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334–336.
755. Reed JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* 1995;7:541–546.
756. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6961–6965.
757. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, et al. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989;57:79–88.
758. McKeithan TW, Rowley JD, Shows TB, Diaz MO. Cloning of the chromosome translocation breakpoint junction of the t(14;19) in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9257–9260.
759. Michaux L, Dierlamm J, Wlodarska I, et al. t(14;19)/BCL3 rearrangements in lymphoproliferative disorders: A review of 23 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;94:36–43.
760. Ohno H, Takimoto G, McKeithan TW. The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell* 1990;60:991–997.
761. Baron BW, Nucifora G, McCabe N, Espinosa Rd, Le BM, McKeithan TW. Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3;14)(q27;q32) and t(3;22)(q27;q11) in B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5262–5266.
762. Seyfert VL, Allman D, He Y, Staudt LM. Transcriptional repression by the proto-oncogene BCL-6. *Oncogene* 1996;12:2331–2342.
763. Allman D, Jain A, Dent A, et al. BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood* 1996;87:5257–5268.
764. Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D, Staudt LM. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 1997;276:589–592.
765. Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, et al. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2- type inflammation. *Nat Genet* 1997;16:161–170.
766. Zani VJ, Asou N, Jadayel D, et al. Molecular cloning of complex chromosomal translocation t(8;14;12)(q24.1;q32.3;q24.1) in a Burkitt lymphoma cell line defines a new gene (BCL7A) with homology to caldesmon. *Blood* 1996;87:3124–3134.
767. Dyomin VG, Rao PH, Dalla-Favera R, Chaganti R. BCL8, a novel gene involved in translocations affecting band 15q11-13 in diffuse large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5728–5732.
768. Akasaka T, Muramatsu M, Ohno H, et al. Application of long-distance polymerase chain reaction to detection of junctional sequences created by chromosomal translocation in mature B-cell neoplasms. *Blood* 1996;88:985–994.
769. Denny CT, Yoshikai Y, Mak TW, Smith SD, Hollis GF, Kirsch IR. A chromosome 14 inversion in a T-cell lymphoma is caused by site-specific recombination between immunoglobulin and T-cell receptor loci. *Nature* 1986;320:549–551.
770. Baer R, Forster A, Rabbitts TH. The mechanism of chromosome 14 inversion in a human T cell lymphoma. *Cell* 1987;50:97–105.
771. Lipkowitz S, Garry VF, Kirsch IR. Interlocus V-J recombination measures genomic instability in agriculture workers at risk for lymphoid malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5301–5305.
772. Stavnezer-Nordgren J, Kekish O, Zegers BJ. Molecular defects in a human immunoglobulin kappa chain deficiency. *Science* 1985;230:458–461.
772a. Yel L, Minegishi Y, Coustan SE, et al. Mutations in the mu heavy-chain gene in patients with agammaglobulinemia. *N Engl J Med* 1996;335:1486-1493.
773. Humphries CG, Shen A, Kuziel WA, Capra JD, Blattner FR, Tucker PW. A new human immunoglobulin VH family preferentially rearranged in immature B-cell tumours. *Nature* 1988;331:446–449.
774. Chen PP, Siminovitch KA, Olsen NJ, Erger RA, Carson DA. A highly informative probe for two polymorphic Vh gene regions that contain one or more autoantibody-associated Vh genes. *J Clin Invest* 1989;84:706–710.
775. Sanz I, Kelly P, Williams C, Scholl S, Tucker P, Capra JD. The smaller human VH gene families display remarkably little polymorphism. *EMBO J* 1989;8:3741–3748.
776. Shin EK, Matsuda F, Nagaoka H, et al. Physical map of the 3′ region of the human immunoglobulin heavy chain locus: Clustering of autoantibody-related variable segments in one haplotype. *EMBO J* 1991;10:3641–3645.
777. Walter MA, Gibson WT, Ebers GC, Cox DW. Susceptibility to multiple sclerosis is associated with the proximal immunoglobulin heavy chain variable region. *J Clin Invest* 1991;87:1266–1273.
778. Moxley G. DNA polymorphism of immunoglobulin kappa confers risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1989;32:634–637.
779. Meindl A, Klobeck HG, Ohnheiser R, Zachau HG. The V kappa gene repertoire in the human germ line. *Eur J Immunol* 1990;20:1855–1863.
780. Feeney AJ, Atkinson MJ, Cowan MJ, Escuro G, Lugo G. A defective Vkappa A2 allele in Navajos which may play a role in increased susceptibility to haemophilus influenzae type b disease. *J Clin Invest* 1996;97:2277–2282.
781. Baker MD, Wu GE, Toone WM, Murialdo H, Davis AC, Shulman MJ. A region of the immunoglobulin-mu heavy chain necessary for forming pentameric IgM. *J Immunol* 1986;137:1724–1728.
782. Shulman MJ, Collins C, Pennell N, Hozumi N. Complement activation by IgM: Evidence for the importance of the third constant domain of the mu heavy chain. *Eur J Immunol* 1987;17:549–554.
783. Tao MH, Canfield SM, Morrison SL. The differential ability of human IgG1 and IgG4 to activate complement is determined by the COOH-terminal sequence of the CH2 domain. *J Exp Med* 1991;173:1025–1028.
784. Duncan AR, Winter G. The binding site for C1q on IgG. *Nature* 1988;332:738–740.
785. Helm B, Marsh P, Vercelli D, Padlan E, Gould H, Geha R. The mast cell binding site on human immunoglobulin E. *Nature* 1988;331:180–183.
786. Roberts S, Cheetham JC, Rees AR. Generation of an antibody with enhanced affinity and specificity for its antigen by protein engineering. *Nature* 1987;328:731–734.
787. Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* 1984;312:643–646.
788. Morrison SL. Transfectomas provide novel chimeric antibodies. *Science* 1985;229:1202–1207.
789. Liu AY, Robinson RR, Murray EJ, Ledbetter JA, Hellstrom I, Hellstrom KE. Production of a mouse-human chimeric monoclonal antibody to CD20 with potent Fc-dependent biologic activity. *J Immunol* 1987;139:3521–3526.
790. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986;321:522–525.
791. Co MS, Avdalovic NM, Caron PC, Avdalovic MV, Scheinberg DA, Queen C. Chimeric and humanized antibodies with specificity for the CD33 antigen. *J Immunol* 1992;148:1149–1154.
792. Mendez MJ, Green LL, Corvalan JR, et al. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet* 1997;15:146–156.
793. Desmyter A, Transue TR, Ghahroudi MA, et al. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat Struct Biol* 1996;3:803–811.
794. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, et al. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 1988;242:423–426.
795. Huston JS, Levinson D, Mudgett HM, et al. Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5879–5883.
796. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991;352:624–628.
797. Kang AS, Barbas CF, Janda KD, Benkovic SJ, Lerner RA. Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4363–4366.
798. Huse WD, Stinchcombe TJ, Glaser SM, et al. Application of a filamentous phage pVIII fusion protein system suitable for efficient production, screening and mutagenesis of F(ab) antibody fragments. *J Immunol* 1992;149:3914–3920.
799. Yelton DE, Rosok MJ, Cruz G, et al. Affinity maturation of the BR96 anti-carcinoma antibody by codon-based mutagenesis. *J Immunol* 1995;155:1994–2004.
800. Crameri A, Cwirla S, Stemmer WP. Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nat Med* 1996;2:100–102.
801. Orlandi R, Gussow DH, Jones PT, Winter G. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3833–3837.
802. Persic L, Roberts A, Wilton J, Cattaneo A, Bradbury A, Hoogenboom HR. An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. *Gene* 1997;187:9–18.
803. Caron PC, Laird W, Co MS, Avdalovic NM, Queen C, Scheinberg DA. Engineered humanized dimeric forms of IgG are more effective antibodies. *J Exp* Med 1992;176:1191–1195.
804. Pollack SJ, Jacobs JW, Schultz PG. Selective chemical catalysis by an antibody. *Science* 1986;234:1570–1573.
805. Tramontano A, Janda KD, Lerner RA. Catalytic antibodies. *Science* 1986;234:1566–1570.
806. Gibbs RA, Posner BA, Filpula DR, et al. Construction and characterization of a single-chain catalytic antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4001–4004.
807. Jackson DY, Prudent JR, Baldwin EP, Schultz PG. A mutagenesis study of a catalytic antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:58–62.
808. Tang Y, Hicks JB, Hilvert D. In vivo catalysis of a metabolically essential reaction by an antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8784–8786.
809. Schnee JM, Runge MS, Matsueda GR, et al. Construction and expression of a recombinant antibody-targeted plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6904–6908.
810. Thrush GR, Lark LR, Clinchy BC, Vitetta ES. Immunotoxins: An update. *Annu Rev Immunol* 1996;14:49–71.
811. Staerz UD, Bevan MJ. Hybrid hybridoma producing a bispecific monoclonal antibody that can focus effector T-cell activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1453–1457.
812. Suresh MR, Cuello AC, Milstein C. Advantages of bispecific hybridomas in one-step immunocytochemistry and immunoassays. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:7989–7993.
813. Mallender WD, Voss EJ. Construction, expression, and activity of a bivalent bis-

pecific single-chain antibody. *J Biol Chem* 1994;269:199–206.
814. Staunton DE, Ockenhouse CF, Springer TA. Soluble intercellular adhesion molecule 1-immunoglobulin G1 immunoadhesin mediates phagocytosis of malaria-infected erythrocytes. *J Exp Med* 1992;176:1471–1476.
815. Martin S, Casasnovas JM, Staunton DE, Springer TA. Efficient neutralization and disruption of rhinovirus by chimeric ICAM- 1/immunoglobulin molecules. *J Virol* 1993;67:3561–3568.
816. Hasemann CA, Capra JD. High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3942–3946.
817. Ma JK, Hiatt A, Hein M, et al. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 1995;268:716–719.
818. Mhashilkar AM, Bagley J, Chen SY, Szilvay AM, Helland DG, Marasco WA. Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies. *EMBO J* 1995;14:1542–1551.
819. Knight KL, Spieker PH, Kazdin DS, Oi VT. Transgenic rabbits with lymphocytic leukemia induced by the c-myc oncogene fused with the immunoglobulin heavy chain enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:3130 3134.
820. Schmidt EV, Pattengale PK, Weir L, Leder P. Transgenic mice bearing the human c-myc gene activated by an immunoglobulin enhancer: A pre-B-cell lymphoma model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6047–6051.
821. Maxwell IH, Glode LM, Maxwell F. Expression of the diphtheria toxin A-chain coding sequence under the control of promoters and enhancers from immunoglobulin genes as a means of directing toxicity to B-lymphoid cells. *Cancer Res* 1991;51:4299–4304.
822. Pascual V, Capra JD. Human immunoglobulin heavy-chain variable region genes: Organization, polymorphism, and expression. *Adv Immunol* 1991;49:1–74.
823. Miwa H, Nosaka T, Kita K, et al. Immunogenotypes of lymphoid malignancies: The rearrangement of T cell receptor beta chain gene can occur before the gamma chain gene rearrangement. *Jpn J Cancer Res* 1988;79:484–490.
824. Max EE, Maizel JJ, Leder P. The nucleotide sequence of a 5.5-kilobase DNA segment containing the mouse kappa immunoglobulin J and C region genes. *J Biol Chem* 1981;256:5116–5120.

第 6 章　B 淋巴细胞发育及其生物学

Fritz Melchers and Antonius Rolink[①]

183

来自小鼠、人类和其他哺乳动物骨髓和鸟类法氏囊的 B 淋巴细胞,能产生多样性的抗体。免疫球蛋白分子由重链和轻链组成,它们的 N 端均有一个 Ig 样结构域。在免疫球蛋白之间,其结构内部是可变的。就是由于这些可变区,使免疫球蛋白分子能够结合抗原。特异性结合抗原的区域由三个互补决定区(CDR)组成。大多数 B 淋巴细胞以一组 CDR 区与单个的重链和轻链结合,在抗体库中结合的概率很多(参考第 3、4 章)。

Ig 分子结合抗原的 V 区存在多样性,这是由其基因重排决定的,在连接位点插入了 P 区序列和 N 区序列,在一个重排的 V_H 或 V_L 基因内,可能有其他的 V 区片段代替某个 V 区片段(参考第 5 章)。多数 B 细胞使重链和轻链等位基因只出现一次重排。两个 Ig 轻链等位基因和两个 Ig 轻链等位基因不能同时表达，因此,识别抗原的 Ig 分子的全部可变性就会受到免疫系统中 B 细胞数量的限制。B 淋巴细胞表面表达 Ig 分子,可以作为结合抗原的受体分子,又叫 B 细胞受体(BCR)。成熟 B 细胞接触抗原以后,可以启动其增殖,并促进 B 细胞克隆的成熟,导致浆细胞的形成,后者分泌 Ig 分子进入血液。在 B 细胞增殖和成熟期间,Ig 分子的结构会由于以下原因而发生改变:①机体可变区基因的超突变使 DNA 发生改变;②V_H和 V_L 基因区域的转变;③重链基因区域的类型转换(参考第 7、24、25 章)。为了防御病原微生物入侵,血液中的免疫球蛋白分子具有抗原特异性,而且是免疫系统中体液免疫的必需成分。影响 B 细胞和抗体产生的免疫缺陷能说明体液免疫的重要性(见第 43 章),如果机体不能产生 B 细胞和抗体,那么注射人的免疫球蛋白也可防止细菌的感

① F. Melchers and A. Rolink: Basel Institute for Immunology, CH-4005 Basel, Switzerland.

染和其他感染性疾病，这种保护反应对阻止同一种病原微生物的入侵也会起到保护作用(参考第38、39、40、41章)。在结合抗原后，免疫球蛋白分子能够固定并活化补体(见第29章)，在表达抗原的病原体(如细菌等)表面，免疫球蛋白与补体形成的复合物能使病原体细胞膜形成孔洞，从而溶破病原体细胞。以免疫复合物形式存在的Ig分子也能与单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞以及天然杀伤细胞(NK)上的Fc受体结合，天然免疫系统中的这些细胞结合了免疫复合物以后，通过吞噬作用、细胞溶解作用和炎症浸润作用来清除这些病原体。B细胞在特定位置上的发育，叫做中枢淋巴器官，它们从多能造血干细胞(HSC)和所有不同的血细胞系发育而来。B细胞发育可分为不同的阶段：首先，细胞变成可以分化的B细胞系；然后，Ig分子重链、轻链等位基因片段重排以产生Ig蛋白分子，并存在于B细胞上。表达Ig分子的B细胞在中枢淋巴器官自体抗原的特异性作用下进行选择，该过程叫阴性选择，导致中枢免疫耐受。少量剩余的表达膜免疫球蛋白(sIg)的B细胞从初级淋巴器官迁移到次级淋巴器官，该过程叫阳性选择。sIg^+ B细胞再次被自体抗原筛选，就不存在于中枢淋巴器官中，而是存在于次级淋巴器官中(阴性选择，导致外周耐受)(参见第20章)，只有少量的未成熟B细胞(幼B细胞)被存入长存B细胞库中，即循环的B细胞(阳性选择)。

184

在阴性选择期间，表达sIg的B细胞与自体抗原反应，就导致自身的死亡(即凋亡，参见第20、23章)或者使其处于无反应性状态(an anergic state)。另一方面，成熟的B细胞已经改变了其反应特性而进入增殖状态，成为能分泌Ig的细胞，以及产生记忆B细胞。从多能干细胞到浆细胞和记忆细胞发育的许多阶段，B细胞都会与许多别的细胞发生协同作用，首先就与中枢淋巴器官中基质细胞协同作用，然后与周围淋巴器官生发中心的辅助性T细胞(Th细胞)、巨噬细胞、树突细胞、滤泡状树突细胞等发生协同作用，这些过程都是受到严格控制的。

本章主要讨论B淋巴细胞从多能造血干细胞、B细胞受体的表达、细胞增殖、迁移、阴性选择、阳性选择到成熟阶段、抗原反应性B细胞、准备进入T细胞依赖的和T细胞非依赖的抗原性激活过程。该过程在小鼠中已有很多的研究，因此，我们首先要讨论的就是小鼠的B细胞发育。

人类的B细胞发育与小鼠的极为相似，但是其他哺乳动物和鸟类的B细胞发育与人和小鼠的似乎有些不同。

小鼠的B细胞发育

多能造血干细胞在胚胎期的发育和在成年后的再生

在小鼠胚胎发育至第6～7天，三个胚原基层，即内胚层、中胚层和外胚层形成(图6.1)，胚盘上层细胞(外胚层)通过原始内胚层下面的原条的移动而产生中胚层，由此而产生的细胞叫中胚层。中胚层经过侧向增殖后，再向后面，最后向前面增殖，然后胚胎内部的中胚层开始发育成内皮心肌祖细胞、肌细胞和造血细胞[1]。将内皮和造血细胞的前体叫做mangioblast[2]，在第7～7.5天，胚胎内部的中胚层形成胚脏壁(splachnopleura)，它在第10天发育成主动脉-性腺-中期肾区(aorta-gonad-mesonephros AGM)，此时造血干细胞(HSC)开始形成并增大[3](图6.1)。有人认为这些造血干细胞可迅速增殖为卵黄囊(yolk sac)，似乎不在卵黄囊中开始产生第一个胚胎髓样细胞(erythromyeloid cell)[4]。从AGM区域获得的HSC不能进入组织培养，在持续第一阶段的几天以后，加入T细胞、B细胞或髓样细胞，则可以培养[5]。这些实验表明：从第7～7.5天(也就是在胚胎循环建立之前)的胚脏壁发育而来的HSC能够产生红细胞、髓样细胞以及T、B淋巴样细胞。多能造血干细胞(Pluripotent HSC)已在许多实验体系中根据其基因型得以详细说明[6~14]，通过专门的染色体易位和插入反转录病毒等实验来标记HSC，从中可以推测多能造血干细胞是否存在[15,16]。结果发现：单个的HSC就可以分化成所有的血细胞系，其中包括T细胞系和B细胞系。但也说明所有的细胞系都不稳定，而且在不同时间不同区域内改变，使其标志消失[17,18]。不同HSC在不同时间的重新分化过程中是有活

性的，不是所有的细胞系都能携带有标记的染色体，表明不同的造血区域存在不同的周转率，或者具有更新能力的原细胞不存在多能性，而是已经具备所有造血细胞系存在或多或少的多样性。可以用胚胎干细胞来研究原始外胚层向中胚层的变化过程，之后可在体外研究 HSC 的发育，胚胎干细胞可在组织培养中生长[19~21]，胚胎干细胞系可以发育成胚状体（embryoid body），在胚状体中可形成血岛（blood island）。将分裂的胚状体进一步在体外培养则可发育成红细胞、髓样细胞和淋巴样细胞[22~24]。

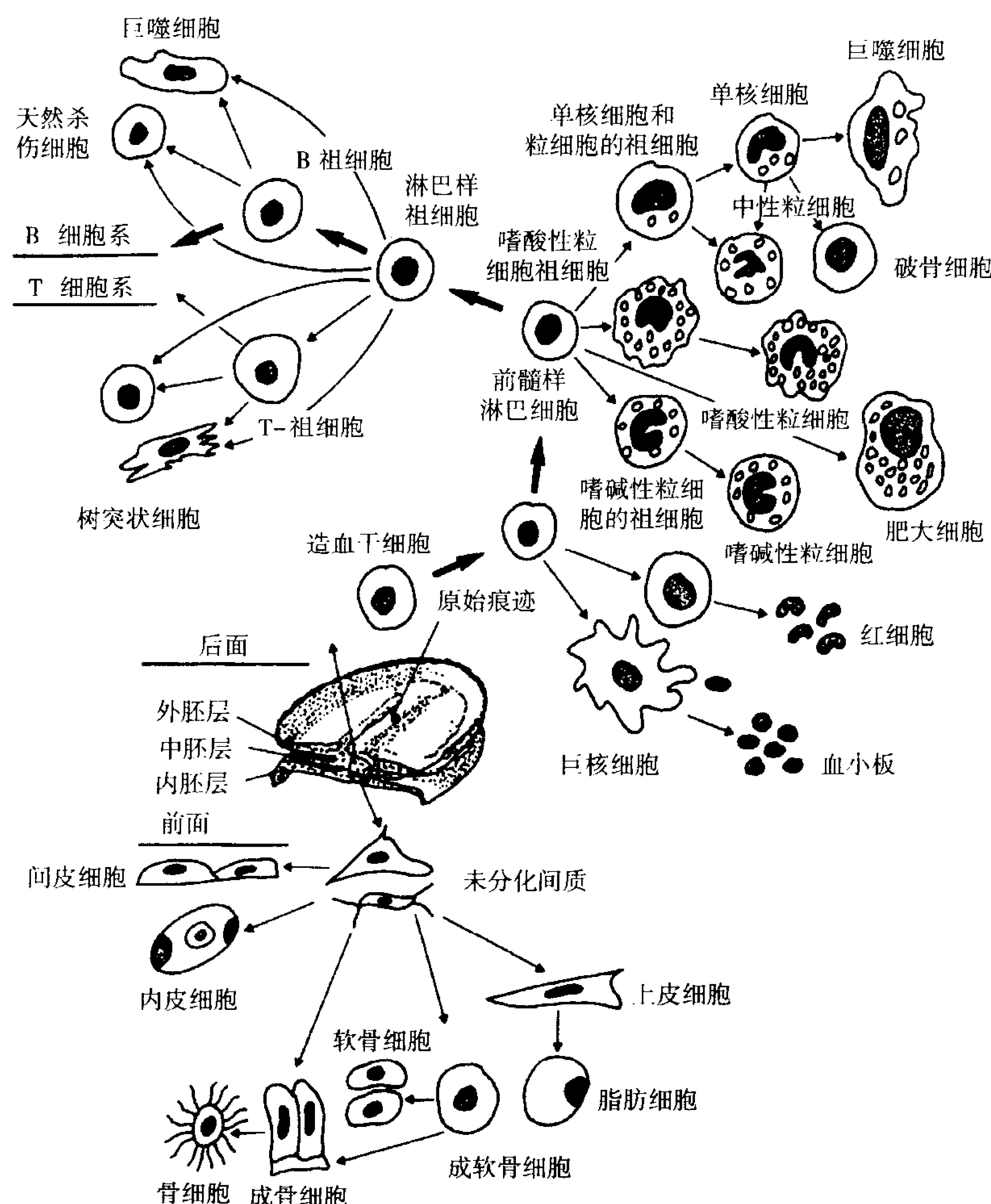


图 6.1　通过造血干细胞和早期红细胞-髓样细胞-淋巴样细胞的始祖阶段，从内胚胎中胚层的 B 细胞发育。

在染色体上的任何位点整合异源基因或同源基因[25]，或者在内源性基因拷贝的同源位点上[26]也可以在体外改变 ES 细胞的遗传特性。若将遗传特性改变了的 ES 细胞注入小鼠胚囊中，进而将混合的胚囊植入代孕母鼠体内[27,28]，其后代就是嵌合体。无论什么时候，注入的 ES 细胞都可产生生殖细胞，嵌合体小鼠就是一个新型的转基因小鼠，并且携带整合 ES 细胞突变基因[29]。

将 ES 细胞注入胚囊中也可用于研究淋巴细胞分化途径中致死突变对胚胎和生后的影响。在所谓的胚囊互补分析（blastocyst complementation assay）中，用同源重组诱导致死突变，将携带致死突变基因的 ES 细胞注入重组酶活化基因-1 或-2 缺失（recombinase-activating gene，$RAG\text{-}1^{-/-}$ 或 $RAG\text{-}2^{-/-}$）小鼠的胚囊中，由于 RAG 基因突变不能使 T、B 淋巴细胞发育，这些小鼠必须注入突变的 ES 细胞才能使淋巴细胞发育成熟[30]。因此，RAG 基因缺失所致阻断后而影响 T、B 淋巴细胞发育的任何突变都可以检测得到。

早期血细胞生成的阶段性

185 移植后的造血干细胞具有自我更新能力，所以又叫具有自我更新能力的细胞，它能产生所有的红细胞、髓样细胞和淋巴细胞系等。针对造血干细胞移植能力的核糖核酸控制基因试验（stringent test）实际上是第二次的移植[31~36]。在第一次和第二次过继转移过程期间，造血干细胞离开其天然环境就不是那么稳定，以至于从移植的宿主中做过继转移时很少有成功的[37]。但是，从原理上讲，一个红细胞应当保持该能力，并且仅仅一个红细胞足以在相当长的一段时间内重构所有的造血细胞系。

小鼠和人的造血干细胞（HSC）已经得到鉴定，一般而言，它们不表达不同血细胞之间特异性的标志（如B细胞系的CD19分子，或者巨噬细胞系的Mac-1分子），因此，它们都是表面标志呈阴性的细胞系。小鼠中他们是Sca-1$^+$[38]、c-kit表达量低、MHC I分子高、CD71$^-$[79]、VLA-4$^+$[4]。

在组织培养中HSC细胞不能生长，因此，目前还不知道对HSC细胞做怎样的分类，也不知道怎样保持其分化的干细胞状态。HSC细胞在体内具有可动性，所以它们应该存在于血流中，移植时可以从中收集，干细胞因子（SCF）[40~41]、粒细胞集落刺激因子（G-CSF）[40]、IL-8[42,43]、抗α4整合素特异性抗体[44,45]等就是其中的主要活性成分。

在胎儿和成人的血细胞生成期间，对HSC细胞的需求量是不一样的[46]，很大的可能是：HSC细胞的可动性也可以活化造血祖细胞的演化，而这些造血祖细胞并非完全都是多能干细胞，但血细胞的有些世系却具有这种功能。因此，SCF和IL-7也许能够动员淋巴样细胞系和B细胞系[47,48]。

HSC细胞能够在体外诱导不同的克隆分化为不同的血细胞系[49]，在二步培养体系中（two-step culture system）发现：只要给予适当条件，结合SCF和IL-6或IL-11或G-CSF后就能够产生B细胞[50]。IL-6受体的信号诱导型亚单位gp130分子和c-kit分子可以在体外协同刺激HSC细胞的增殖[51]，flt-3配体则能促进它们的成活[52]。

决定造血干细胞的形成

造血细胞早期的一系列转录因子的表达，以及它们后来由于缺陷拷贝的同源性重组，而造成的失活，都

186 在血细胞发育早期被安排好了。胚囊互补性分析[30]（Blastocyst complementation assays）表明：Rbtn-1[53]、TAL-1[54]以及GATA-2[55~57]分子缺陷小鼠也缺乏所有造血细胞的功能（图6.2和图6.3）。目前仍需要发现血细胞生成的早期所涉及的一些转录因子的靶基因，由于RAG$^{-/-}$缺陷型小鼠的红细胞和中性粒细胞发育正常，在T、B细胞系的前体细胞中淋巴细胞发育也正常，所以胚囊互补性分析不能区别致死突变（使发育完全停止）和缺陷突变（降低发育速度）。因此，正在发育的突变型造血祖细胞必须与RAG$^{-/-}$缺陷小鼠的内源性的、正常的祖细胞竞争。

造血干细胞向能使其分化的部位迁移

HSC细胞从其产生部位到初级血细胞发生的整个胚胎发育期间，是可以迁移的（如在胚脏壁和AGM区域），并伴随红细胞的产生，后者又能产生胎儿血红蛋白（如卵黄囊），能产生胎儿血红蛋白的红细胞能够发育成为成人血红蛋白的红细胞[58,59]。GATA-1分子在初级红细胞生成和已确定的红细胞生成中是必需的[60,61]，AML-1、CBF-b和EKLF突变小鼠能够生成初级红细胞，但不能生成成熟的红细胞[62~64]（图6.2）。

在妊娠的第一天，HSC细胞已开始形成，第八天胚胎就有血液循环，在AGM区域，HSC细胞的数量一直增加到第十天，此后开始下降（图6.4），从第九天开始，在胚胎血液中就能检测到B细胞系的原细胞[65,66]。第十二天最频繁，以后就消失了。HSC细胞通过胚胎循环迁移到具体的部位，如迁移到胎肝、胸腺、网膜、骨髓等部位，在这些地方它们寻找适合的环境条件，特定地向红细胞样、髓样细胞或淋巴样细胞，在β1整合素缺陷型小鼠中，HSC细胞的迁移会受到影响[67]。

Flk-1$^{-/-}$缺陷小鼠的内皮细胞不能发育，血管也不能生成。显然，Flk-1$^{-/-}$缺陷细胞也不能促成初级红细

胞、成熟红细胞和淋巴细胞的生成，原细胞不能达到造血细胞分化部位，一是因为血管没有形成；二是因为 $Flk\text{-}1^{-/-}$ 缺陷型原细胞不能迁移。因此，Flk-1 分子可能参与了细胞从原始中胚层向卵黄囊的迁移(图 6.1)，也可能参与细胞向造血细胞早期的胚胎内部迁移[68]。

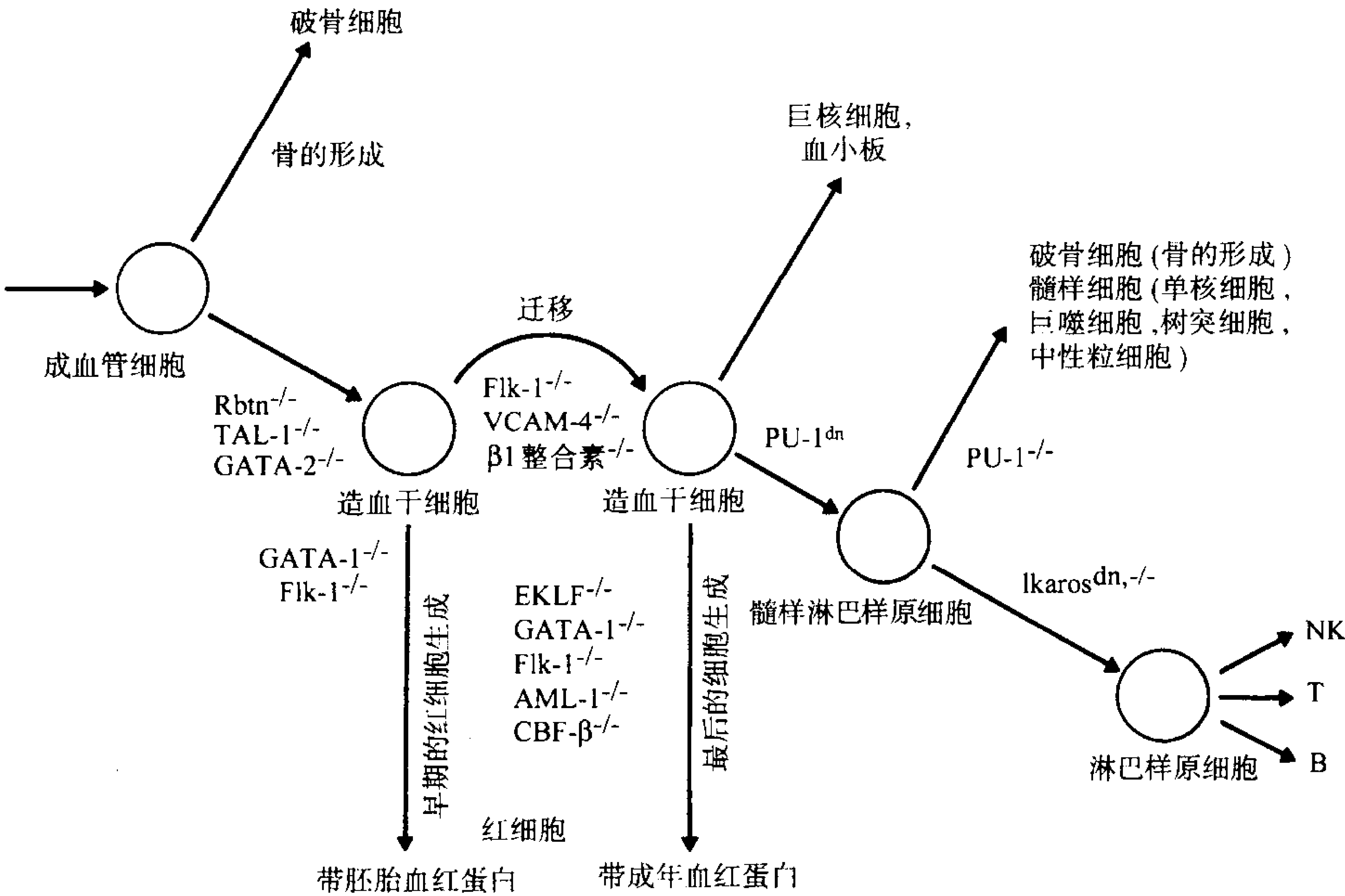


图 6.2　控制早期造血过程的基因。dn：明显阴性　-/-：纯合子缺失。

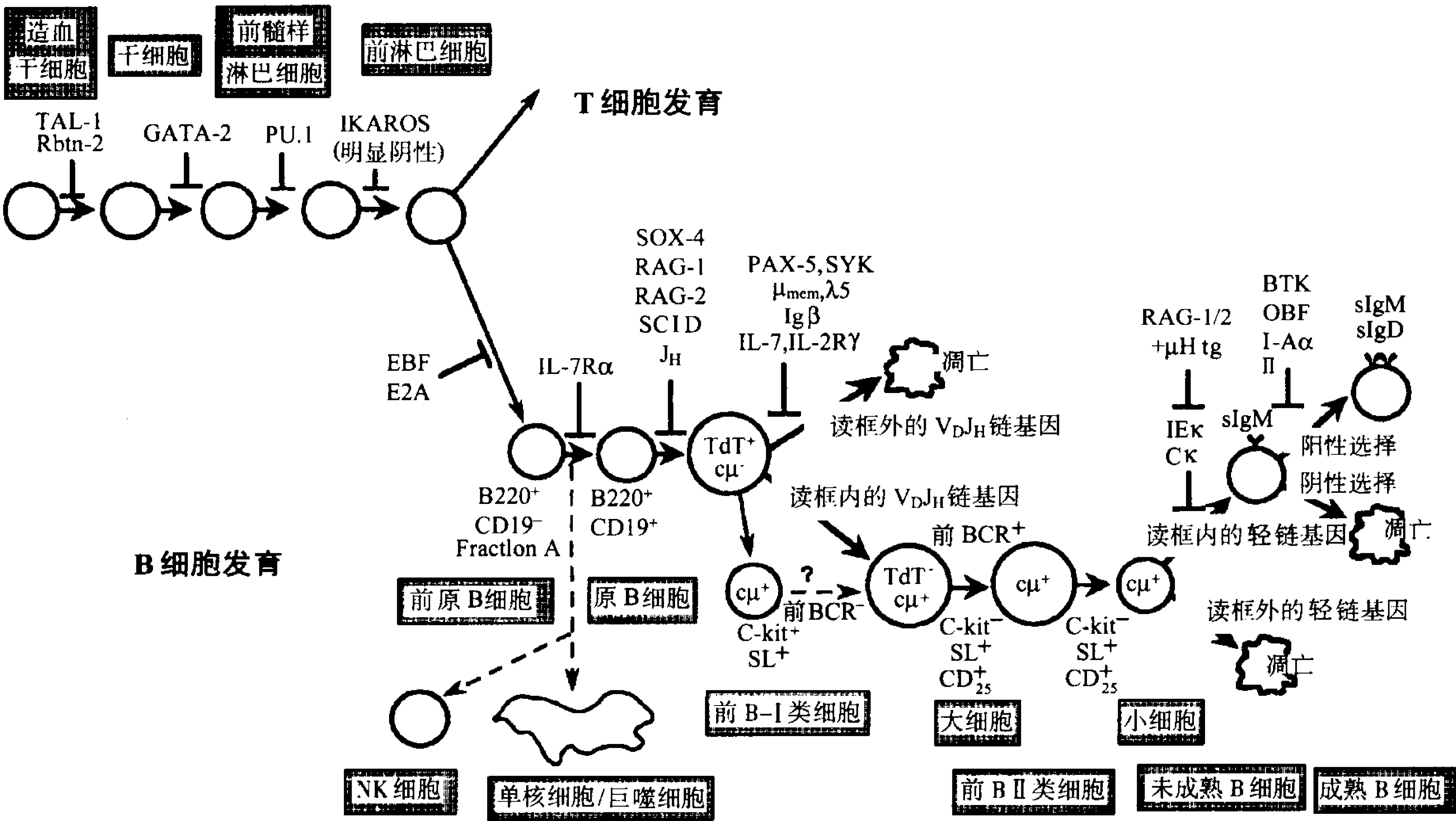


图 6.3　控制小鼠 B 淋巴细胞系发育的基因(详见文中说明)大细胞优先进入细胞生命周期；小细胞为静息细胞。本图也标示了敲除基因小鼠停止突变的情形(如敲除 TAL-1 和 Rbtn-2 基因小鼠，其造血干细胞不能转变为干细胞)。

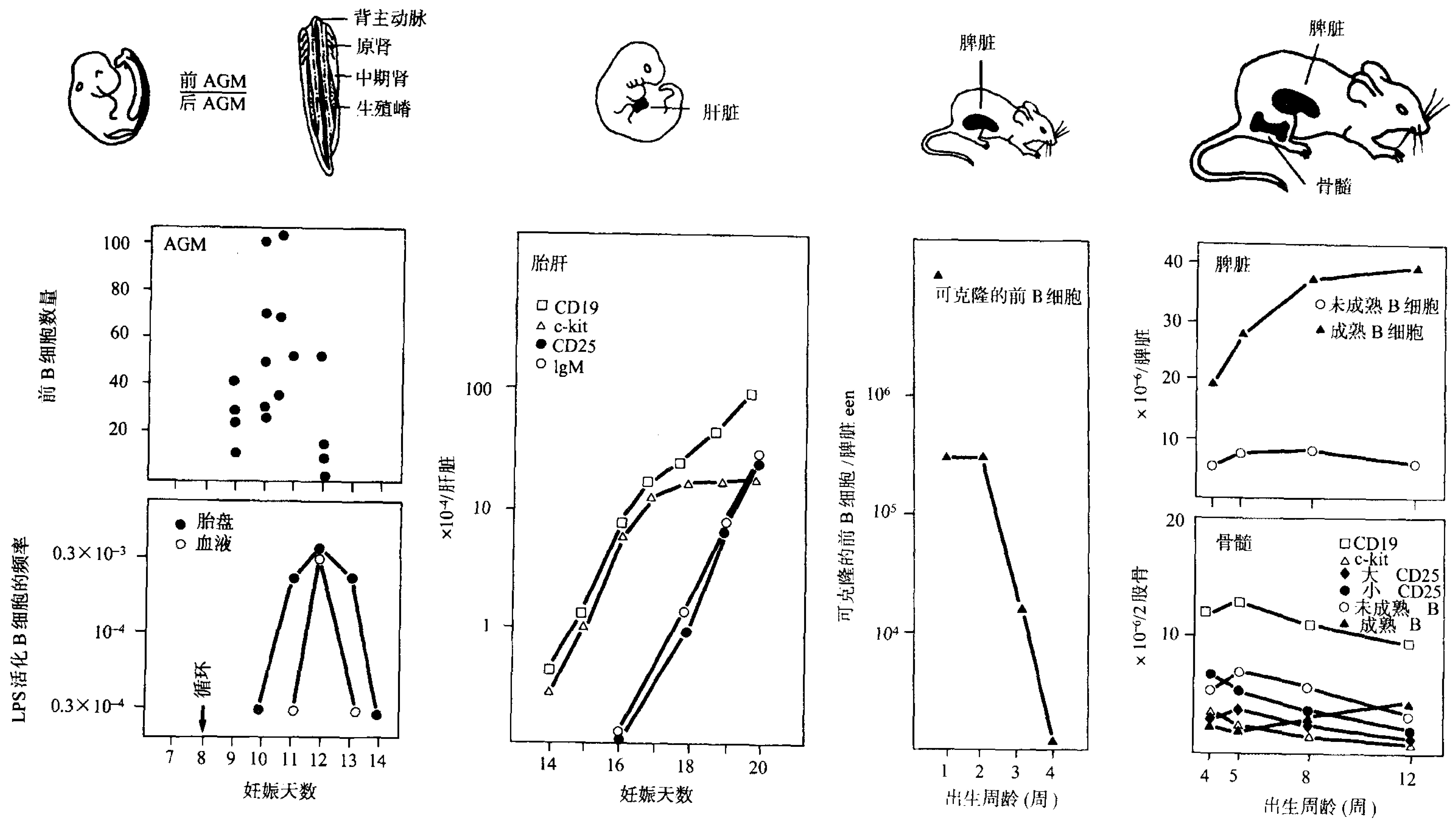


图 6.4 小鼠出生前后 B 细胞发育曲线。从 AGM 区胚脏壁发育而来的多能造血干细胞，其最早位点能够发育成为 B 淋巴细胞。图中所列的含有该区域的组织有：原肾、中期肾、生殖嵴和背主动脉。AGM 的前部分就发育为 B 淋巴细胞(文献[550])，胚胎血液及其由此血管化的胎盘的胚胎部分是紧靠胎肝和网膜，网膜也会发育成 B 细胞，出生时的脾脏才含有前 B 细胞，出生后由骨髓继续产生 B 细胞，但随着年龄增加而减退。

决定髓样-淋巴细胞与巨核细胞-血小板细胞之间分化

造血细胞下一步的分化就是成为巨核细胞和血小板，或者成为髓样细胞和淋巴细胞（图 6.2，图 6.3）。在 PU-1 突变小鼠中就是例证，原癌基因 Spi-1 编码具 ets 结构域的蛋白家族，PU-1 是该蛋白家族与 DNA 结合结构域的转录因子。Spi-1 原癌基因在造血细胞中呈特异性表达[69~72]。由 PU-1 调节表达的靶基因包括 μ 重链基因[73]、轻链基因[74,75]、编码 Igα 的 mb-1 基因[75,76]和 J 链基因[77]。对因编码 ets-DNA 结合结构域的外显子缺失，所形成的 Spi-1 基因突变体可能由于取代了 PU-1 蛋白的正常形式而影响以阴性选择起支配作用的状态（dominant-negative fashion），因为正常的 PU-1 蛋白与其他的转录因子以复合物的形式存在。这些 PU-1 突变小鼠的红细胞、巨核细胞、血小板都发育正常，但其髓样细胞、NK 细胞、T 细胞和前 B 细胞等的发育却严重缺陷[72,78]。随着年龄增长，当这些小鼠能够产生少量中性粒细胞和一些 T 细胞系细胞时，阻断细胞的分化可以完善 B 细胞系。

187

PU-1 缺陷小鼠（PU-1$^{-/-}$）的 Spi-1 基因也一同缺失了，其表型与那些只有 DNA 结合域缺失小鼠相比，还是有些不同[69,79]。突变型裸鼠形成巨噬细胞和破骨细胞的能力受到抑制（图 6.2，图 6.3），破骨细胞缺失就导致骨硬化病。通过移植野生型骨髓细胞就可以改变这种情况，说明：这些都是自发形成细胞，而且破骨细胞可能来源于共同的造血祖细胞[80~82]。当然，是否来源于共同祖细胞，只有等到植入单个的多能祖细胞后，才能下最后的结论，因为多能祖细胞能够修复巨噬细胞和破骨细胞缺陷。

决定淋巴细胞的分化

Ik 基因（Ikaros gene）控制进入 T、B 细胞系的淋巴细胞的发育（图 6.2，图 6.3），将 Ik 基因与 DNA 呈高结合的区域予以缺失突变，会造成淋巴细胞的发育停止[83]。Ik 基因主要编码能与 DNA 结合的锌指蛋白家族成员，由于 mRNA 的不同拼接，使锌指蛋白形成了一个家族，4/5 的蛋白其 N 端含有一个低亲和力的 DNA 结合位点，在其羧基端含有一个高亲和力的 DNA 结合位点[84]。将具有高亲和力的结合 DNA 的结构域基因序列予以敲除，用与其他转录因子形成复合体的野生型来代替，所形成的突变体就有了阴性选择起支配作用的状态（dominant-negative fashion）。Ik 基因转录因子针对的目标包括以下内容：①基因重排机制的必需元件（如 RAG 基因、TdT 基因等）；②Ig 重链和轻链基因；③编码 Igα 的 mb-l 基因；④CD3 复合体成员（抗原受体复合体的必需元件，TCR 、BCR 及其前体物等）。

事实上，该结果说明：Ik 基因的阴性选择起支配作用状态对产生该缺陷型有影响，而且是通过干涉重排机制和干涉早期形成的 TCR 、BCR 复合体来发挥影响作用的。这些小鼠的红细胞、巨核细胞、血小板发育正常，但 NK 细胞、T、B 细胞系却严重缺陷。再就是，因为缺乏最早期的前 B 细胞，所以 B 细胞系的发育完全不能进行。但随着年龄的增长，由于发现了少量的早期的 T 细胞系细胞，所以不能完全阻断 T 细胞的发育。

Ik 基因阴性的裸鼠（Ik$^{-/-}$）不能表达整个基因，在表型上就有些不同，该突变的纯合小鼠在胎肝中就缺乏 T、B 细胞的发育，就是在成年后也缺乏 B 细胞发育，它们也缺乏大部分的 NK 细胞、γ/δ 型的 TCR 亚群、以及胸腺树突细胞。然而在出生后，CD4$^+$ T 细胞随着年龄增长而有所发育[85]，因此，没有理由希望这些能够引起造血缺陷的转录因子基因就完全被具有同样功能的转录因子的其他基因突变了，虽然效率很低。很有可能是：不同细胞系，如髓样细胞、NK 细胞、T、B 细胞等，面临的选择压力有所不同，甚至可能是环境的影响，如抗原的不同。总而言之，Ik 基因突变的表型说明：髓样细胞的祖细胞存在于那些 T、B 细胞系共同的祖细胞中[15,16,86]。

189

B 细胞系途径的定型

从造血祖细胞发育成为 B 淋巴细胞系，与其他的造血细胞系一样，都是一个发展的过程，称之为定型（commitment），它是一个不可逆的级联分化阶段。随着定型的进程，造血祖细胞分化为别的细胞系的能力也与之相伴地逐渐丢失。目前还不知道定型是怎样获得的，不过，造血祖细胞分化为淋巴细胞系的一个定型终

止信号就是重排基因(如 RAG-1 和 RAG-2 基因以及成年后的 TdT 基因)的活化与表达。编码前体细胞、未成熟淋巴细胞和成熟淋巴细胞上抗原特异性受体复合物的基因活化,以及编码 Igα 和 Igβ 等锚固型受体和信号转导分子的基因活化都是造血祖细胞向 B 细胞系分化或者向 T 细胞系分化的类似的定型终止信号(表6.1)。

表 6.1　处于不同发育阶段的 B 淋巴细胞系相关标志分子的表达

				大前 B Ⅱ[b] 细胞				
	前/原 B 细胞[a]	原 B 细胞	前 B Ⅰ类细胞	A	B	小前 BⅡ类细胞	未成熟细胞	成熟细胞
标志物								
B220(CD45R)	■	■	■	■	■	■	■	■
CD19	□	■	■	■	■	■	■	■
CD25(IL-2Rα 链)	□	□	□	■	■	■	■/□	□
前 B 细胞和 BCR								
Igα, Igβ	■	■	■	■	■	■	■	■
gp130		■	■					
假定的轻链	■	■	■	■	□	□	□	□
I cμRNA	■	■	■	■	■	■	■	■
D_HJ_H DNA	■	■	■	■	■	■	■	■
$V_HD_HJ_H$ DNA	□	□	(■)/□	■	■	■	■	■
Icκ RNA	□	□	□	□	■	■	■	■
VκDκDNA	□	□	□	□	□	■	■	■
膜 IgM	□	□	□	□	□	□	■	■
膜 IgD	□	□	□	□	□	□	□	■
重排机制								
RAG-1	□	□	■	□	(■)/□	■	■	□
RAG-2	□	□	■	□	(■)/□	■	■	□
TdT	□	□	■	□	□	□	□	□
细胞因子受体								
Flk-2		■	□	□	□	□	□	□
c-kit	■	■	■	□	□	□	□	□
IL7-R	■	■	■	■	■/□	□	□	□
IFN-τR			■					
CD40	□	□	□	□	□	■/□	■	■
胞内信号								
myc		■	■	■	□	□	□	■/□

实心方格,表达;空方格,不表达。

[a] 前 B 细胞/原 B 细胞约占骨髓中 B220 阳性、CD19 阴性细胞数量的 1%,但不表达 CD4、NK1.1 和 MHCⅡ类分子。

[b] 大的前 B-Ⅱ类细胞可以分为两部分,A 部分可表达前 BCR 受体,而 B 部分则不能表达该受体。

通过转录因子活化的定型

正如对特异基因作定向诱变那样,转录因子活化的定型有助于较早地鉴定血细胞生成时期(图 6.2),因此,同样的实验有助于我们鉴定在定型中具瓶颈功能的基因,以及鉴定 B 细胞系分化途径中的 B 细胞(图 6.3)。此外,到目前为止,编码转录因子的基因已使该途径的早期阶段更加明了,这些基因主要包括 E2A、EBF、Sox-4 和 PAX-5 (图 6.3)。Rolink 等[87]和 Opstelten[88]分别在其论著中讨论了这些基因对 B-淋巴细胞生成的影响。

通过选择性的拼接,小鼠 E2A 基因能够产生 2 个具有螺旋-环-螺旋结构(helix-loop-helix, bHLH)的蛋白

质 E12 和 E47[89,90]，bHLH 蛋白通过 HLH 区域形成同源二聚体或异二聚体，然后通过碱性区域与 DNA 结合。包括 E12 和 E47 在内的许多 bHLH 蛋白都广泛表达于各类细胞，B 细胞中的 Ig 重链和 Ig 轻链基因增强子中能够检测到这些 E 蛋白的结合位点[89,90]。

尽管 E2A 基因广泛表达于造血细胞中，但对该基因的定向缺失只影响 B 淋巴细胞的发育[89,90]，在缺失该基因的小鼠中，几乎检测不到 $B220^+$ 细胞，也检测不到 D_HJ_H 或 $V_\kappa J_\kappa$ 基因的重排，而且，Iμ、RAG-1、mb1、CD19、λ5 和 Pax-5 基因的转录消失，至少转录水平降低。E2A 基因的这种特殊性以及对 B 细胞发育的早期阻断，可能在 B 细胞系定型中发挥着至关重要的作用。E47 基因在前 T 细胞系的过度表达会刺激转录水平和 Ig 重链基因位点的重排[91]，就是对上述结论地支持。E2A 基因对 B 细胞系定性有重要影响的最有说服力的证据还是来源于以下实验发现，即 E47 基因转染纤维母细胞并在其中表达，可以活化 TdT 基因和 Ig 重链等位基因的表达[92]。相反，编码 PU-1 蛋白和其他早期活化转录因子的基因则不能活化这些 B 细胞相关的或特异的基因座。

190

早期 B 细胞活化因子(early B-cell factor，EBF)又叫组织特异性转录活化因子，在造血细胞系内，其表达受到原 B 细胞系和前 B 细胞系的限制[76,93]。$EBF^{-/-}$ 缺失小鼠与此相类似，即使不完全相同，但在 B 细胞发育的早期就受到中断，$E2A^{-/-}$ 缺失小鼠也出现一样的现象[94]。因此，就 $EBF^{-/-}$ 缺失小鼠，在其胚系结构中只发现少量带 Ig 重链和 Ig 轻链基因的 $B220^+$ 细胞，根本就检测不到 RAG-1、RAG-2、Hmb-1、B29、前 B 细胞 V 区基因和 λ5 基因。与 E2A 基因一样，EBF 基因在 B 细胞系定型中也会发挥重要作用，Hmb-1 基因是活化 EBF 的潜在的靶基因，它主要编码 Igα 分子[76,93]。然而，由于 $HB29^{-/-}$ 缺失小鼠阻断 B 细胞发育的时间明显地晚于 $EBF^{-/-}$ 缺失小鼠，$EBF^{-/-}$ 缺失小鼠的表型是否是因为缺乏了 Hmb-1 基因表达，还不得而知。B29 基因编码 Igβ 蛋白，mb-1 基因编码 Igα 蛋白，Igα 和 Ig 在功能上又有协同关系[95]。

Sox-4 基因编码一些特殊的蛋白质，它们的 N 端有高移动性基团(high-mobility group，HMG)和 C-端的富丝氨酸区，高移动性基团与 DNA 的结合呈序列特异性。Sox-4 基因能够通过 AACAAAG 基序反式活化转录过程，C 端的非 DNA 结合区不能缺少 AACAAAG 基序[96]。

在小鼠的胚胎发育期间，Sox-4 基因可以在不同的部位表达，但成年以后，在成熟 B 细胞和 T 细胞中表达则受到限制[96]。$Sox\text{-}4^{-/-}$ 缺失小鼠由于循环衰竭，在胚胎第 14 天死于子宫内[97]。在干细胞加 IL-7 的培养系统中做体外分析实验，发现 $Sox\text{-}4^{-/-}$ 缺失小鼠在胚胎第 13 天时，使胎肝 B 细胞大量增殖的一些细胞减少。此外，在很早的时期阻断 B 淋巴细胞生成(大概在 D_HJ_H 基因重排的时候)，这些细胞的生长率会大大降低，若将 $Sox\text{-}4^{-/-}$ 缺失小鼠的胎肝细胞移植到正常的受体小鼠内，其红细胞生成、髓样细胞生成、淋巴细胞生成均不受影响。因此，Sox-4 基因在 B 细胞发育中起着重要的作用，虽然体外实验发现它不是绝对需要。目前尚不清楚 B 细胞中 Sox-4 基因的靶基因。

转录因子 Pax 基因家族在几个不同的发育阶段都有重要的作用，有 8 个 Pax 基因家族成员都有 1 个含 128 个氨基酸残基的保守区域，被命名为成对结构域(paired domain)，该结构域具有 DNA 结合活性[98~100]。PAX-5 蛋白就表达于中脑-后脑连接部，在胚胎中期沿脊髓向前，成年后，就成为除浆细胞外的整个 B 细胞发育过程中的惟一的成员[101,102]。PAX-5 基因编码 BSAP 蛋白，在 CD19[103]、B 淋巴细胞特异的酪氨酸激酶(B lymphoid-specific tyrosine kinase)BLK[104]、λ5 和 VpreB[105]，以及 Ig 重链 3′端增强子[106]的启动子区域内发现了 PAX-5 基因的潜在结合位点，在 Ig 分子开关区域内还发现了 BSAP 蛋白的另外的结合位点[107~110]。$PAX\text{-}5^{-/-}$ 缺陷小鼠骨髓中的 B 细胞发育在前 B 细胞阶段就停止了，另一方面，在 $PAX\text{-}5^{-/-}$ 缺陷小鼠胎肝中检测不到原 B 细胞和前 B 细胞，在骨髓和胎肝中存在如此差异的原因还不清楚。

总之，表达于 B 细胞系上的一些早期基因至少有 E2A、EBF、SOX-4 和 PAX-5 等转录因子基因，当对这些基因进行突变时，还需要观察这些早期基因是怎样产生瓶颈效应的。

不同部位 B 细胞的发育

小鼠在胚胎发育期间和出生以后，就产生了 B 细胞[112~117](图 6.4)，在胚胎血和由此来源的器官(作为胎

盘的胚胎部分)中就能够发现第一个B细胞系的前体细胞,在妊娠的第8天就建立起血液循环[5,65,116]。在妊娠第11天和第12天后,能在网膜[118]和胎肝中[119,120]检测到第一个原B细胞和后来的前B细胞。因为造血干细胞HSC趋向于胚胎的AGM区,所以HSC在其中产生,它们迁移到能诱导B细胞分化的部位。在这些细胞进入胚胎器官之前,目前还不知道用什么方法或将这些器官置于什么样的环境中,使HSC细胞发育成为B细胞系的前体细胞。

胎肝中的大部分B细胞处于同步发育,在妊娠第16天,能检测到的第一个细胞是$sIgM^+$细胞。到第18天,丝分裂素反应性B细胞(mitogen-reactive B cells)的$sIgM^+$细胞数量达到最高值,此后其数量下降[120~124](图6.4)。细胞在12~18小时就增殖循环一次,细胞发育的代谢动力学可能会启动B淋巴细胞生成,所有的B细胞系在原位增殖[47]。但该动力学不能排除少量的细胞在后一段时间启动分化,要到出生后第4周才能在脾脏中发现前B细胞[120](图6.4)。骨髓中的B细胞要在出生后才发育,lef-1基因缺陷小鼠在胚胎期,其B细胞完整地发育,但在成年后则停止[72,125]。这是胚胎期与成年期B细胞发育差异性的重要标志之一。

网膜和胎肝中B细胞发育的早期阶段能够产生免疫球蛋白重连基因库,由于末端脱氧核酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase ,TdT)不能表达在这些B细胞系中,所以在重连基因库中V、D、J之间的连接不包含N-核苷酸的插入[126~130]。

在出生后的头4周内,骨髓是B细胞发育的主要部位,B细胞数量会大量增加(图6.4),从那时以后,B细胞,尤其是原B细胞和前B细胞的数量开始随着年龄增长而增加。骨髓中会逐渐充满脂肪,使血细胞和B淋巴细胞生成的空间逐渐减少,但只有HSC细胞和B细胞系的前体细胞不会完全停止,即使老年小鼠,其骨髓仍是血细胞系重构的重要来源,包括骨髓中的B细胞系和经致死剂量辐射后的功能重建[120]。

B细胞生成的环境

骨髓的超微结构及其产生

191 骨髓是骨腔中的细胞成分,骨是从间充质细胞发育而来,在胚胎的骨形成部位,间充质细胞增殖为致密的集簇,形成了后来的骨(图6.5)。

软骨母细胞分泌能产生胶原纤维的物质,作为软骨细胞发育的细胞间质。软骨细胞肥大起来并开始分泌不同的基质,如不同类型的胶原蛋白和纤维连接蛋白,这些新的基质能够吸引带有成骨细胞的血管,软骨开始形成,钙盐沉积在胞内基质中,致使软骨钙化。一些外来侵入的细胞能够破坏剩留的尚未钙化的软骨基质,毛细血管和间充质细胞充满了剩余的空间,导致基质钙化。间充质细胞能分化成软骨细胞、成骨细胞和骨细胞。成骨细胞能在钙化的胞内基质上形成新的基质。另一方面,在IL-11[80~82]影响下由单核细胞分化而来的破骨细胞,能够破坏骨中基质的中枢区域,骨中心产生的空间由造血细胞和纤维原细胞样的干细胞所填充,其中至少有一些是前脂肪细胞。在这样的骨髓中,造血细胞和淋巴细胞开始生成,并在整个生命过程中一直发生。由于红细胞是造血细胞的一部分,所以骨髓是红色的,带白髓的骨一般不会造血,只含有能产生脂肪的脂肪细胞。老龄的造血骨髓在增加其造血活性的同时,又增加了产脂肪的能力。

红髓中剩留的基质形成细管样网络(图6.6),骨内膜、单层的成骨细胞和破骨细胞覆盖在骨内膜上,还能够观察到:基质细胞能与多能干细胞和髓样-淋巴细胞的祖干细胞发生特异性的作用,这些多能干细胞和髓样-淋巴细胞的祖干细胞是在骨内膜中诱导出生的。

192 滋养动脉提供主要的血液来源和成熟淋巴细胞迁移部位的营养,大约在干体中间进入骨髓,迁移至两个末端。毛细血管中的动脉末端与静脉窦中的网络相连接,静脉窦汇集成桡静脉,再汇集到中央静脉,在中央静脉中将血小板运至中心动脉。静脉窦为淋巴器官所特有,允许骨髓中的淋巴细胞和白细胞从产生部位转运至血液,然后从初级淋巴器官转运至外周的次级淋巴器官,但不能转运至脾脏(图6.6)。

细小管与血管之间的空间由网状细胞和造血细胞占据,网状细胞形成细胞间互相连接的骨架,该连接细胞可以提供与造血细胞相互作用的基质。已经分化了的B细胞系在骨髓中将按规定的大小填充在骨髓的

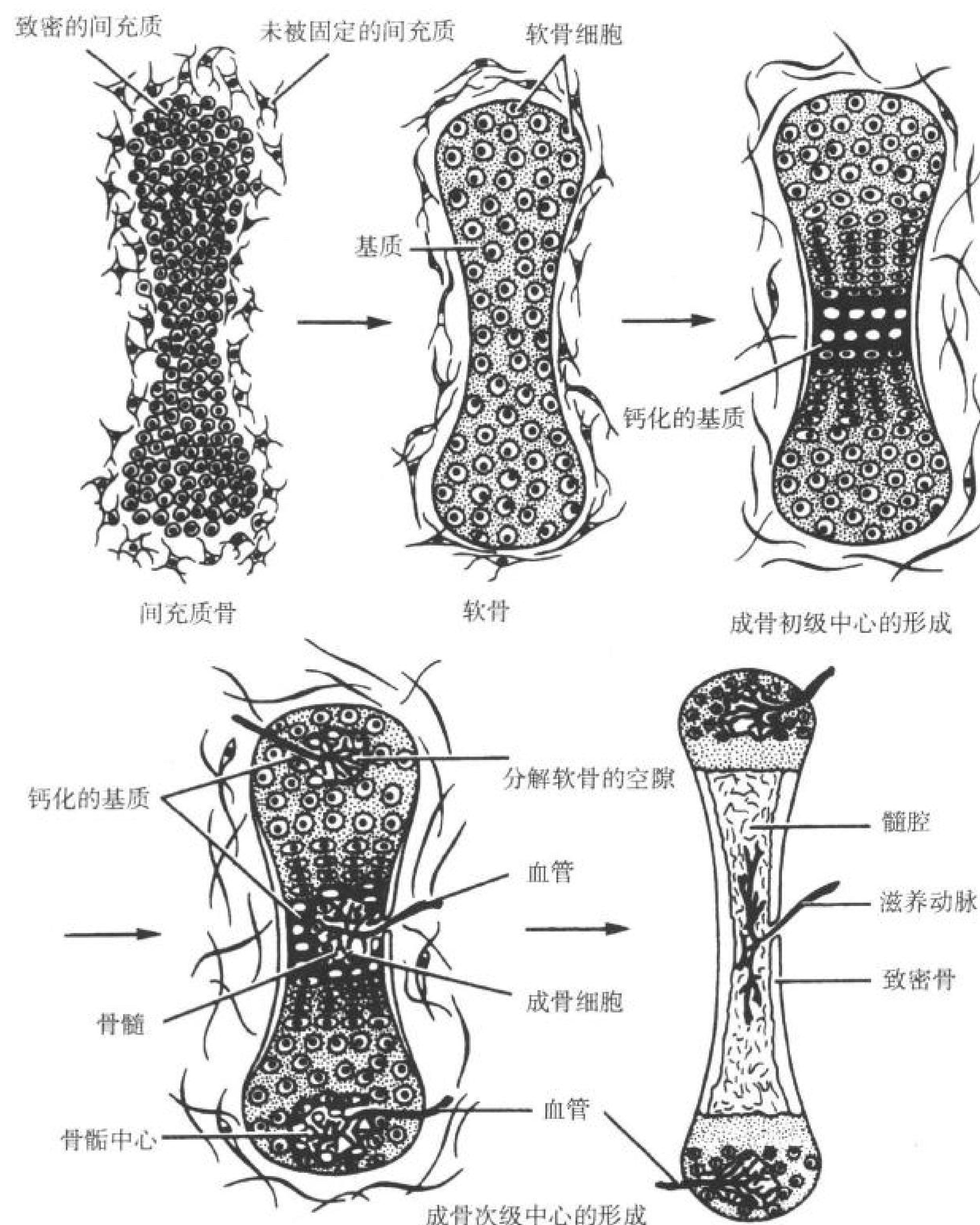


图 6.5　来自未分化间充质中的长骨的发育阶段[551]。

一些小室中,详细内容将在以后的章节中讨论(图 6.7)。

B 细胞系前体细胞池的动态平衡

能为 B 细胞系的原 B 细胞和前 B 细胞发育提供环境保证的一些部位,所产生的 B 细胞就存在于能提供这些环境的器官中(图 6.6)。在能够产生 B 细胞的器官中,环境基质细胞还未得到准确的鉴定。正常小鼠的前体 B 细胞在体外的增殖需要与基质细胞接触,该基质细胞将会分化成前脂肪性纤维母细胞(以后还将做讨论)。当这些前脂肪细胞发育成熟到能产生脂肪时,它们便失去了支持前 B 细胞生长的能力。这说明:产脂细胞和脂肪的发育不仅减少了 B 淋巴细胞的发育空间,而且还会停止 B 细胞的分化。体外实验发现,前 B 细胞能在基质细胞上生长,也表明:与能够产生 B 细胞的环境接触后,使这些前体细胞处于它们的发育状态之中。失去与环境细胞的接触,将诱导更多的已经分化了的 B 细胞系细胞的发育。前 B 细胞发育空间的大小取决于基质细胞的数量和它们之间的间隙,在间质间隙内,只有有限数量的前 B 细胞能够与这些基质细胞相接触。

通过测量突变小鼠的原 B 细胞和前 B 细胞间隔大小后,也支持以上结论。该突变小鼠在自身的生长发育中,其B细胞的发育停止(图6.7)。而且这些小鼠的前B细胞和未成熟的B细胞会在骨髓中消失,较早

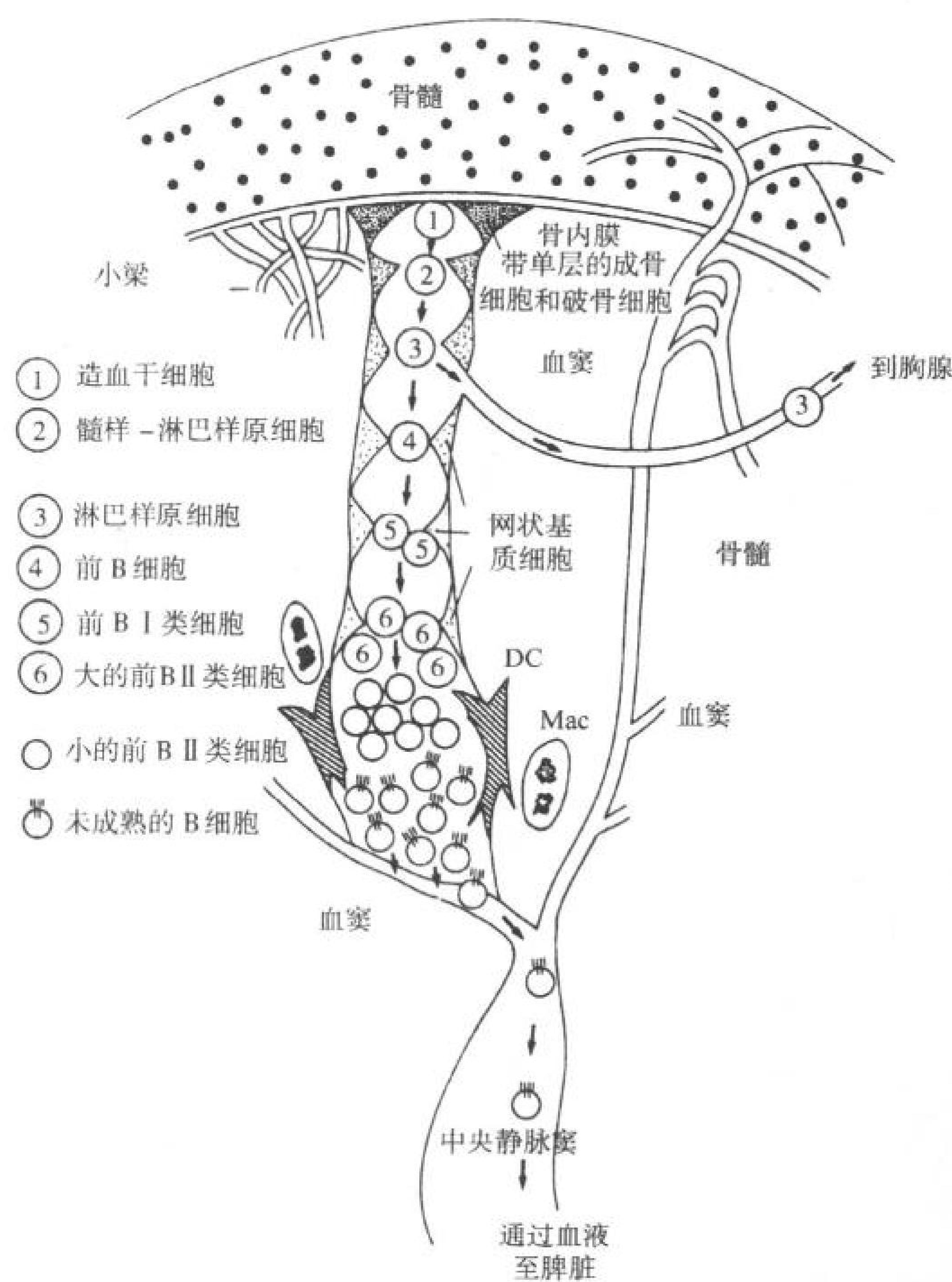


图 6.6　骨髓中 B 淋巴细胞系的发育以及与不同类型干细胞的相互作用(图的左侧)。最早期的 B 细胞位于骨内膜附近,前淋巴细胞的原细胞有机会移行至胸腺并进入 T 淋巴细胞的分化,或者继续下移进入 B 细胞的分化。在以后的阶段,树突细胞(DC)与 sIg⁺ 的未成熟细胞相互作用,这期间,巨噬细胞会吞噬已凋亡的 B 细胞。未成熟的 sIgM⁺ B 细胞通过血窦离开骨髓进入中心静脉窦,并通过静脉血进入心脏,使淋巴细胞进入主动脉,最后进入脾脏(参考图 6.12)。

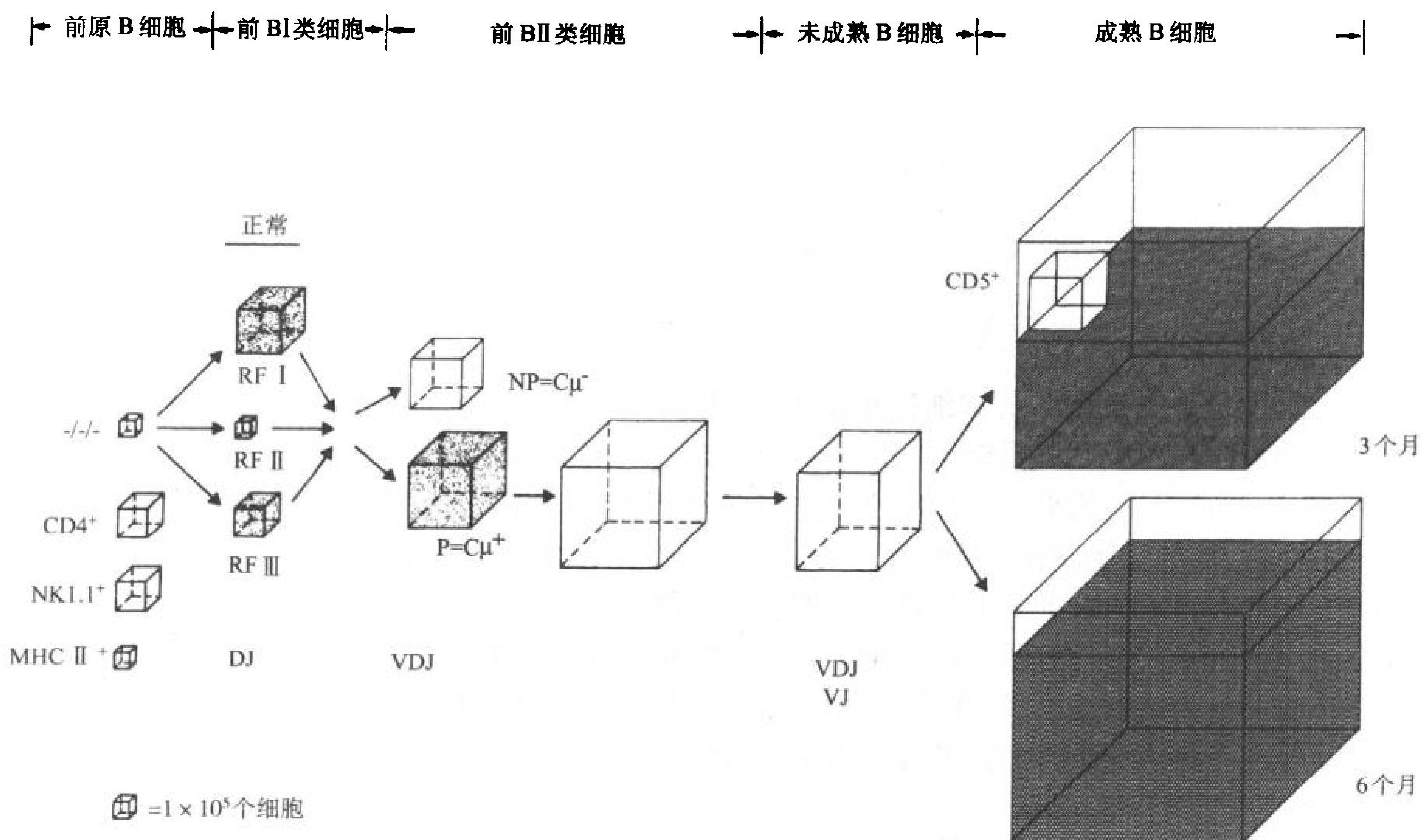


图 6.7　骨髓和外周中 B 淋巴细胞腔隙的大小。阴影方框表示循环中的细胞;无阴影方框表示静息状态的细胞;黑色方框表示长期存活的细胞。

期的原 B 细胞和前 B 细胞的数量要么保持一样,要么略有增加。因此,它们不会增殖到骨髓的空余空间中去。 193

当一个原 B 细胞或前 B 细胞分进到这些间隔中时,产生一个子细胞保持与基质接触,也就是说:它将保持其分化状态。但是,另一个子细胞就不能与基质接触了,并被排除出这些间隔室,发生迁移并开始进一步分化。因此,前体细胞可能呈线性增长而非指数生长,只要细胞的分化阶段保持在特定的间隔中,诱导前体细胞的分化是由于失去了一个配体,而不是暴露了另一个细胞。对原 B 细胞和前 B 细胞的体外增殖和分化研究后,其结果就更加明显了。

在 HSC 发育到 B 细胞的过程中,对于基质细胞与这些细胞相互协同作用的特异性、稳定性、活性的调节、分化状态和发育等问题,我们目前几乎一无所知。这一点是清楚的,即,不同类型的基质细胞特异地与不同类型的前体细胞相互作用(图 6.6)。在产生 B 细胞的器官内,会按线性的方式形成 B 细胞,该特异性是存在空间顺序的。在基质细胞和 B 细胞之间,这种特异性也可由特定分子的接触、一种细胞产生的专门的细胞因子和淋巴因子来证实。已知大多数的原细胞,包括 HSC 细胞,优先积聚于骨髓的骨内膜区域[131](图 6.6)。但在造血细胞和 B 细胞生成的后期,在胎肝和骨髓中均看不到这类空间顺序[132,133]。B 细胞系不同分化阶段的分布三维图像在起产生器官中还没有建立起来,估计该图像是按线性方式装配的。

不同前体细胞间隔的大小反映出它们的增殖能力,目前能够测定发生在这些间隔内凋亡细胞比率[131,134~139]、每天在骨髓中的细胞产量[140]以及 sIgM$^+$ 细胞流出并进入外周的数量[141]等。随着对测量方法的改进和测量精度的提高,我们可以建立骨髓中 B 细胞产生的动力学模型了。处于增殖状态的前体细胞间隔内的细胞估计是按对称方式和非对称方式进行分裂,如细胞按线性方式和指数方式增长,这样使细胞在骨髓中维持稳定的状态,并持续向外流出,使 sIgM$^+$ B 细胞成熟。

环境的干扰

将多种外源性因子注入小鼠体内,能够增加骨髓中的 B 细胞的产生[134,142~145],这些因子的属性变化很大,从绵羊红细胞到矿物油都有,会延长早期原 B 细胞的增殖时间,晚期原 B 细胞和未成熟的 B 细胞就相应地消失。矿物油缓慢地活化 B 细胞,使 B 细胞系中的肿瘤细胞也可能成长起来[146~148]。在这些增殖的原 B 细胞中,活化了 Ig 基因的重排机制(主要是 TdT、RAG-1 和 RAG-2 基因),但增加了原癌基因染色体易位的概率,myc 基因就会进入 Ig 重链和轻链的基因座内[149]。

妊娠小鼠骨髓内会选择性抑制 B 细胞的发育,早期原 B 细胞(如原 B 细胞 、前 B 细胞和一些前 B Ⅰ类细胞)似乎比晚期细胞(如前 B Ⅱ类细胞和未成熟 B 细胞)所受到的影响要小[150],分娩后,B 细胞返回到正常的骨髓池容积中(pool sizes in the marrow)。雌酮、雌三醇和 β-雌二醇等性激素都有抑制作用[150~151],自身的孕激素对此无影响,但会增加对雌激素的敏感性。由于性腺的、类固醇生成再生缺陷,遗传性性腺机能减退的雌小鼠的骨髓中,B 细胞会过多地生成,施予雌激素就会使其降低[152]。因此,性激素在正常的环境中可能会影响 B 细胞的生成[153]。 194

B1 细胞和传统的 B 细胞

来自发育中的 B 细胞系有两类:即 B1 细胞和常规的 B 细胞[154,155](图 6.7 所示)。在发育期间,sIgM 分子首先表达后,这两类细胞可被选择(如从共同的前体细胞中分开)[156~158],B1 细胞是网膜中产生的惟一的细胞系,也是胎肝(B1a)和骨髓(B1b)中两个细胞系的较早期的细胞[154,159]。因此,它们是生命早期 B 细胞库中的主流细胞系,B1 细胞优先在胸膜腔、腹膜和脾边缘区聚集生长,至少有一些 B1 细胞可表达 CD21 分子,但不表达 CD23 分子[160]。部分 B1 细胞(B1a 细胞)通过表达 CD5 分子而与常规的 B 细胞相区别开来[154,161]。在能产生自身抗体的 B 细胞群[162~166]和 B 细胞瘤中[118,167],最多的是 B1 细胞。识别像磷酸胆碱等细菌抗原的免疫球蛋白受体常表达在 B1 细胞上[158,163,168~171]。当机体不能产生 B1 细胞的时候,它具有从 sIgM$^+$ B 细胞库中自我补充的努力,重链上经选择的 V 基因片段库(V_H repertoire)表达在 B1 细胞上,可以反映特异性抗原的选择作用[166,172~175],它们能与辅助性 T 细胞(helper T, Th)合作,但是在与 T 细胞非依赖性抗原和与多克

隆活化因子的结合活性方面，与常规的 B 细胞明显不同[164,176]。在体外，多克隆活化因子 LPS 能激烈地活化 B1 细胞，但在体内，LPS 却耗尽这些 B1 细胞[177]。另一方面，将腹膜腔中的 B1 细胞转染表达对红细胞呈特异性的自身反应性膜免疫球蛋白(sIg)后，被 LPS 刺激后可以产生和分泌自身抗体，可发生自身免疫性溶血性贫血[178]。显然，这些能产生自身抗体的 B 细胞不能在骨髓中被清除，也不会由于外周自身抗原的存在而使其成为无反应性状态(在“非成熟的 B 细胞”中讨论)。B1 细胞中的信号转导活化分子 STAT-3 可被组成型激活，而常规 B 细胞中只是诱导型表达[179]。B1 细胞的发育需要 IL-12，常规 B 细胞却不，$CD19^{-/-}$ 缺陷型小鼠会影响 B1 细胞的产生[181]。

其他 B 细胞系(常规 B 细胞)能从 sIg 阴性的前体细胞中再次形成其中枢间隔和外周间隔，在整个生命活动中也是如此。在成年后，脾和淋巴结的小囊区域发现大部分的构成主要 B 细胞的间隔，它能表达 CD23 (只低水平表达 CD21)[160,182]。以正常的方式对 T 细胞依赖性抗原和 T 细胞非依赖性抗原以及丝分裂素均有应答，在第 7 章中做详细讨论。在中枢和外周淋巴器官中，针对高亲和力的自身抗体的阴性选择，筛选形成了这些细胞库(参考第 20 章)。因此，这些细胞主要针对外来抗原，虽然其中也能检测到能够与自身抗原结合的自身抗体[183]。

发育中前 B 细胞的顺序

B 细胞从早期的原 B 细胞到成熟的、sIg^+ B 细胞的发育的特征按以下变化：

①免疫球蛋白重链和轻链基因的重排；

②胞内和表面结合标志物的表达，以及发育中一些功能的表达；

③细胞周期状态；

④体内生长的原 B 细胞及对细胞因子、趋化因子、丝分裂素和抗原等应答；

⑤有转移到缺陷宿主中的能力，并在这些宿主中能够发育增殖；

⑥在体内的预期寿命。

图 6.3 概括了 B 细胞发育的不同阶段；表 6.1 列出了鉴定 B 细胞的标志；图 6.8a 和图 6.8b 则是检测与分离这些细胞的方法；图 6.7 为骨髓和外周中这些细胞的大小。

Osmond[131]、Hardy 等[184]、Tsubata 和 Nishikawa[185]、Rajewsky 及同事[186]以及我们自己[187~193]对 B 细胞发育的不同阶段作了全面地研究。在本章中，我们将引用自己定义的前 B 细胞亚群这一术语，其他实验室所用的术语列于表 6.2 中。对 Ig 分子基因座的两个重链、κ 轻链和 λ 轻链等位基因做单细胞 PCR 分析，使我们在 B 细胞系分化途径中可以对 B 细胞系原 B 细胞和前 B 细胞进行排序[194,195]，对自然突变小鼠或人工诱变小鼠进行细胞学分析发现，这将导致 B 细胞发育途径的改变，该结论便支持以上排序结果(图 6.3)。在下面的章节中将介绍这些突变对 B 细胞系发育的影响。

在网膜和胎肝中的早期胚胎发育，与出生后和成年后在骨髓中的发育明显不同。后者不同的骨髓细胞表面上表达了 MHCⅡ类分子[196,197]和肌浆球蛋白样轻链[198]，而胎肝不表达 MHCⅡ类分子。此外，胎肝中的前体细胞不表达 TdT 酶[130]，而在骨髓中则可以表达该酶，只有在小鼠重链基因重排期间，其骨髓中才表达 TdT，当轻链基因发生重排时，则该酶的表达消失。因此，发生在骨髓中的 B 细胞的重链，通常将 N 区域插入到 V-D 连接和 D-J 连接中，而发生在胎肝中的这些 B 细胞却不含这些基因片段，在小鼠胎肝和骨髓也不能产生 κ 轻链和 λ 轻链。

表 6.2　不同实验室对 B 细胞系细胞的命名

Rolink 和 Melchers	原 B 细胞	前 BⅠ类细胞	大前 BⅡ类细胞	小前 BⅡ类细胞	未成熟 B 细胞	成熟 B 细胞
Osmond	早期原 B 细胞	介导原 B 细胞	后期前 B 细胞/大前 BⅡ类细胞	小前 B 细胞	未成熟 B 细胞	成熟 B 细胞
Nishikawa	原 BⅠ类细胞//仅 PA6 B	原Ⅱ类细胞//PA6-IL7	仅 CFU-IL7			
Hardy	–	A	B　C　C′	D	未成熟 B 细胞	成熟 B 细胞
		前/原 B 细胞	原 B 细胞 原 B 细胞	前 B 细胞		

前 B 细胞和原 B 细胞

Hardy 等[184]在研究 A 部分发现了最早型的 B 细胞，即原 B 细胞（图 6.8A），本部分的 B 细胞以表达 B220 和 CD34 分子为特征，但不表达 HSA 和 BP-1 分子（表 6.1），它们约占骨髓中细胞总数的 3%（图 6.7 所示）。属于 A 部分的 B 细胞系不表达 CD19，而 B 细胞发育的其他阶段则都可表达 CD19[189]。A 部分的大多数 B 细胞不属于 B 细胞系（图 6.8B），它们中约 30%是 NK 细胞的前体细胞，它们表达 NK 细胞的表面标志，具有重要意义的是，在受到 IL-2 刺激时，会溶解 NK 细胞的目标靶物[189]；另外 30% ~ 40%的细胞共表达 CD4，表达水平与 RAG-1 和 RAG-2 缺陷小鼠中的 T 细胞的数量相近，但由于它们没有表达 TCR，所以又不属于 T 细胞系，若将 RAG-1 和 RAG-2 基因移植到该缺陷小鼠中，也不能产生出 T 细胞。另外的 25% 则在其表面表达 MHC Ⅱ 类分子。A 部分的细胞既可表达 CD4，又可表达 MHC Ⅱ 类分子，但在 IL-7 存在下，不能在基质细胞上增殖，原 B 细胞和前 B Ⅰ 类细胞也是这样。此外，将这两类细胞转移到 $RAG^{-/-}$ 小鼠中，导致 B 细胞发育的数量太少，根本检测不到，也检测不到其他的造血细胞。因此，这些细胞的起源、功能及最终的命运都不甚清楚。 195

另一方面，在 A 部分剩余下来的 30% 的细胞中，存在对基质细胞和 IL-7 有反应性的原 B 细胞（如 $B220^+$、$CD43^+$、$CD19^-$、$NK1.1^-$、$CD4^-$ 的细胞亚群）。在 IL-7 存在下，这些细胞在基质细胞上增殖，它们将表面标志变成 $B220^+$、$CD19^+$、$CD43^+$、$c\text{-}kit^+$ 细胞后就获得了前 B Ⅰ 类细胞的表型。此外，将这些细胞置入 $RAG\text{-}2^{-/-}$ 小鼠内，可以发育成为少量的，但又是很重要的成熟 B 细胞间隔。表达 IL-2 受体 α 链（CD25，TAC）的转基因小鼠在 λ5 启动子的控制下[199]，使 A 部分的原 B 细胞和前 B 细胞表达人 CD25 分子。因此，这些细胞以及非转基因动物中它们正常的类似细胞，可能都会表达 λ5。

总而言之，A 部分中只有极少部分的细胞具有原 B 细胞的活性，这些细胞是否已经发育成为了 B 细胞系，或者它们是否具有发育成其他细胞系的能力等问题，却不得而知。近来，对这些早期的原 B 细胞群进行分析发现：原 B 细胞能够表达 AA4.1、Igα 和 Igβ、替代轻链、EBF 和 E2A 等分子[200,201]。$E2A^{-/-}$ 和 $EBF^{-/-}$ 小鼠缺乏具有原细胞活性的原 B 细胞和前 B 细胞，这些细胞中的 E2A 和 EBF 能够决定 B 细胞系的走向。

在 B 细胞发育的早期阶段，IL-7 受体 α 链缺陷小鼠（$IL\text{-}7R\alpha^{-/-}$）具有重要的阻断作用，但不是绝对的阻断作用[202]。由于 α 链是 IL-7 受体和胸腺衍生的淋巴细胞生成素（thymic stromal cell-derivedlymphopoietin，TSLP）的一个亚单位[202,203]，其生物活性与 IL-7 一样，按正常速度和途径发育的 B 细胞，很可能需要正常 IL-7 或 TSLP 分子，为什么不能绝对阻断 B 细胞的发育？将在以下的内容中讨论。

原 B 细胞（Progenitor B）和前 B Ⅰ 类细胞

B 细胞发育过程中，Ig 基因的重链首先发生重排，然后是轻链。但是我们并不知道重链中从 D_H 到 J_H 片段的基因重排是否就使这些细胞发育成为 B 细胞系。用 B 细胞系和巨噬细胞系的标志分子通过病毒载体转染到早期的细胞中，能够产生前体 B 细胞系和前体巨噬细胞系，两个细胞系都携带有 D_H-J_H 片段重排的 Ig 重链等位基因[204,205]，它们似乎与胎肝中的双能克隆形成细胞（bi-potential colony-forming cell）相似，在一些克隆中能够产生正常的前 B 细胞和前巨噬细胞[206,207]。

前 B Ⅰ 类细胞在 IL-7 存在时，在体外具有长期增殖的努力，还曾经历 D_HJ_H 基因重排（将在以后的章节中讨论），在胚系中还有其轻链基因座，它们还能够表达 B220、c-kit、CD43、RAG-1 和 RAG-2、类似的轻链以及 TdT 等分子，在骨髓中只有晚期才表达 TdT，胎肝中不表达。大多数的前 B Ⅰ 类细胞与 Hardy 报道的 A 到 C 部分的前原 B 细胞[184]、Osmond 报道的原 B 细胞[185]、Nishikawa 报道的 PA-6/IL-7 原 B 细胞[185]相似（图 6.8A 和图 6.8B）。

在 $RAG\text{-}1^{-/-}$ 和 $RAG\text{-}2^{-/-}$ 小鼠、重症联合免疫缺陷（SCID）小鼠、$\lambda5^{-/-}$[208]、$\mu H\text{-}tm^{-/-}$[209]、$Ig\beta^{-/-}$[95]、$IL\text{-}2R\gamma^{-/-}$[210]，$IL\text{-}7^{-/-}$[211]、$Syk^{-/-}$[212,213]，以及 $PAX\text{-}5^{-/-}$[101,102,111]等小鼠的 B 细胞发育受到中断，在前 B Ⅰ 类细胞阶段也有类似结果，但在 D_HJ_H 基因重排阶段则没有该结果。在 $\lambda5^{-/-}$、$IL\text{-}2R\gamma^{-/-}$、$Syk^{-/-}$ 和 $IL\text{-}7^{-/-}$ 小鼠的

骨髓和外周淋巴器官中，发现了数量不多的成熟 B 细胞，而在 μH-tm$^{-/-}$、Ig$\beta^{-/-}$ 和 PAX/5$^{-/-}$ 小鼠，其 B 细胞发育被完全阻断。下面将讨论这些突变细胞功能变化以及前 BCR 的功能。

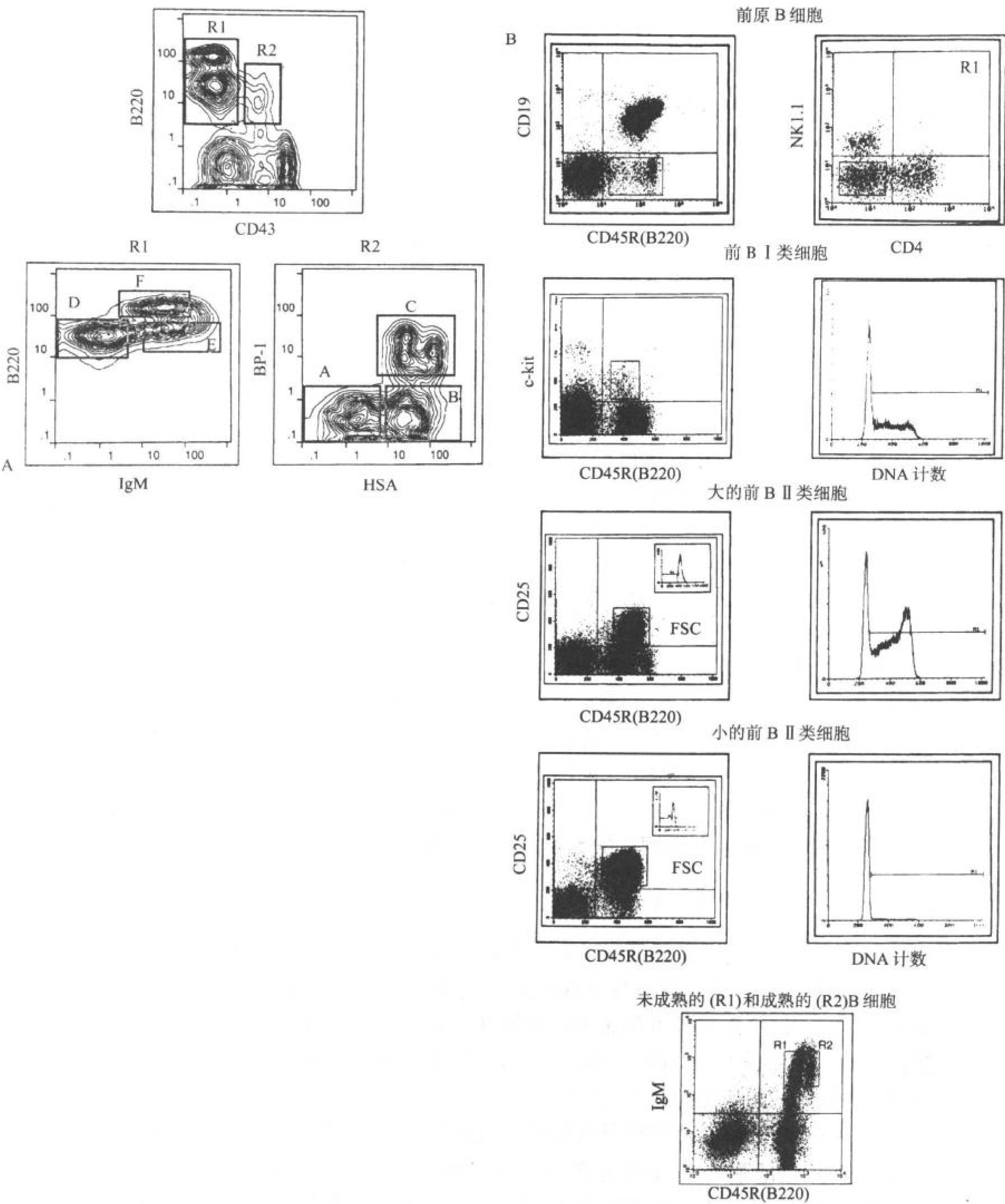


图 6.8　通过流式细胞分析(FAC)鉴定的小鼠骨髓和外周中的 B 淋巴细胞。A：Hardy 等[184]用不同的分子标记；B：Rolink 等的方法[188,189]。

在缺乏基质细胞但有 IL-7 存在的培养基中，前 BⅠ类细胞具有有限的增殖能力，一般可达 1 周，它们可能就是 Nishikawa 所报道的原 B 细胞(表 6.2)。前 BⅠ类细胞一旦在体内增殖，即使有单独的 IL-7 也不会增

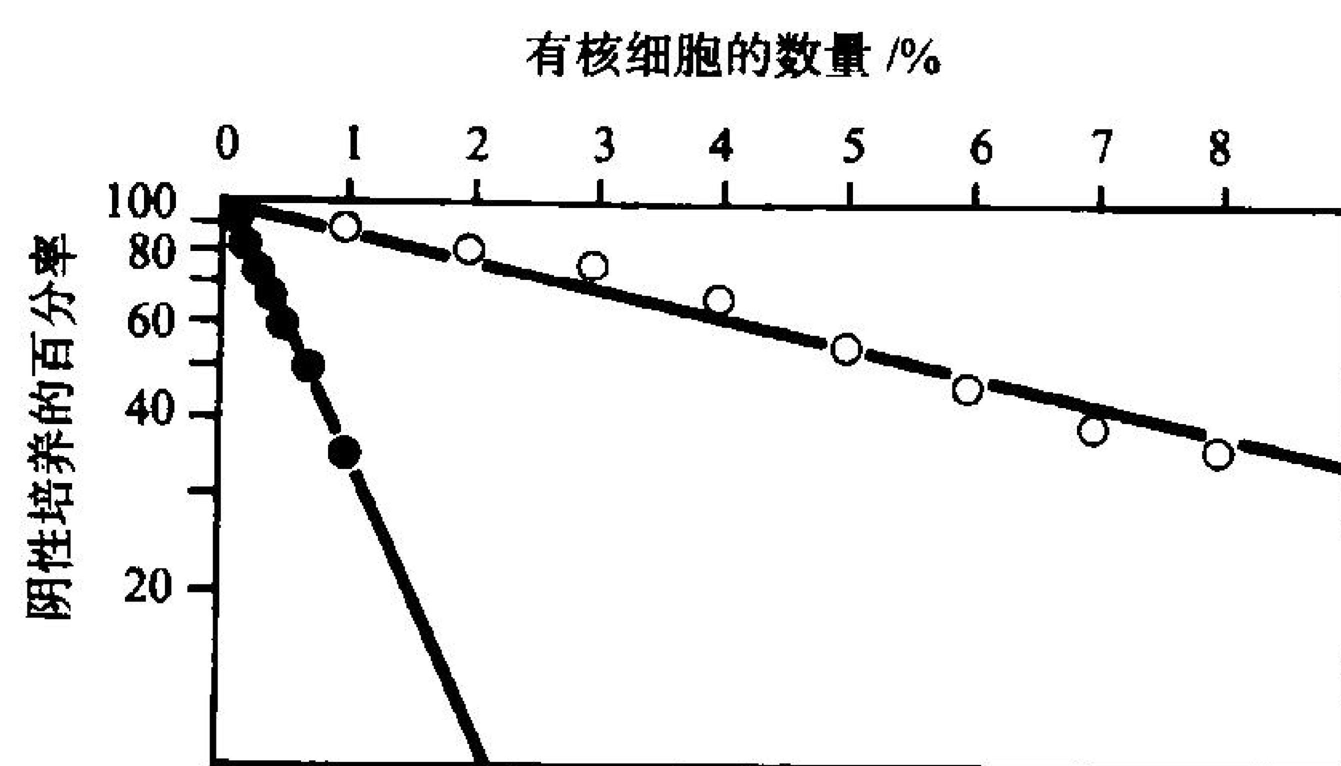
殖,但仍保留了其作为 D_HJ_H 重排和同源细胞的增殖状态[195,214-216]。正常年轻小鼠骨髓中,前BⅠ类细胞库含有 $2\times10^6\sim5\times10^6$ 个细胞(图6.7)。原B细胞与前BⅠ类细胞在表型上没有明显区别,其表面和胞内标志及生长特性一样,但是,它们的Ig基因座则以胚系构型的方式存在,$RAG^{-/-}$ 小鼠的原B细胞腔隙会替代正常小鼠的前BⅠ类细胞的腔隙(图6.7)。

在组织培养中,对前BⅠ类细胞生长、分化和存活特性的研究有助于了解B细胞在体内发育的可能的分子机制和代谢动力学[191,217,218]。

197

原B细胞和前BⅠ类细胞在体外的增殖

正常小鼠和大多数突变小鼠的原B细胞和前BⅠ类细胞,在IL-7和IL-3的刺激下,可以增殖数周至数月,平皿接种率达100%[214,216](图6.9)。事实上,当在培养基中反复多次加入IL-7和IL-3时,原B细胞和前BⅠ类细胞一样,能够对这两种细胞因子产生应答[216]。



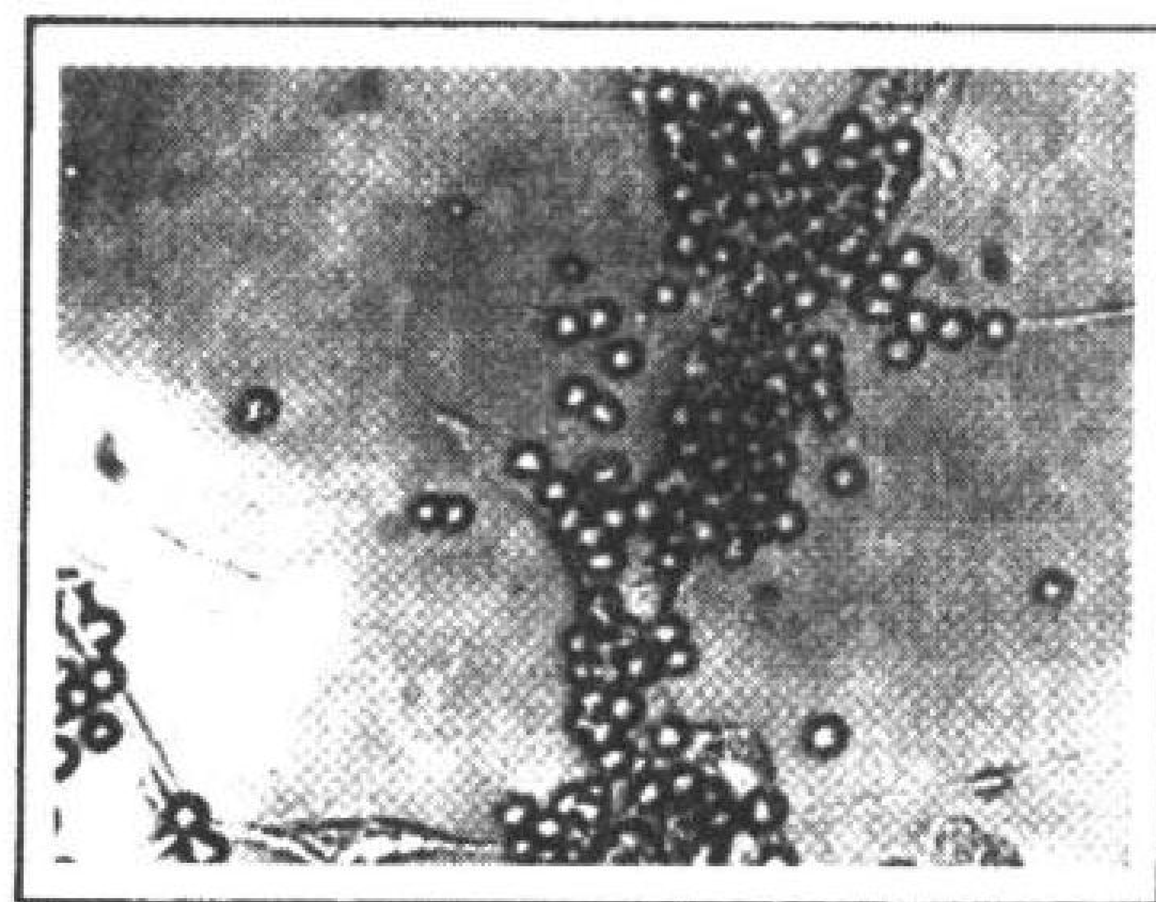


图6.9 IL-7或IL-3存在下,在妊娠第18天的胎肝(—●—)和第15周的骨髓(—○—)中,基质细胞上前B细胞克隆的频率。较低的部分表示IL-7作用下,基质细胞上的前B细胞克隆。

在永久培养基中,原B细胞和前BⅠ类细胞需要与基质细胞接触才能增殖并维持分化状态。两种细胞都能接受信号,基质细胞能被诱导分泌如IL-7、SCF、胰岛素样生长因子(IGF-1)等细胞因子,也能诱导黏附分子和前B细胞上一些受体的响应配体的表达和类型转换[219~221]。参与这些交联的黏附分子主要有CD44、透明质酸酶、极晚期活化抗原-4、纤连蛋白等[222~225],原B细胞和前BⅠ类细胞通过细胞因子受体和黏附分子接受信号来增殖,但不能进一步分化。参与这些信号反应的细胞因子受体有IL-7受体、IL-3受体、酪氨酸c-kit等,它们是基质细胞产生SCF的受体,也是IGF-1的受体。与其他受体和黏附分子一样,它们在调节细胞增殖、分化中的作用仍不十分清楚。小鼠原B细胞和前BⅠ类细胞表面能表达CD43和c-kit分子就说明:它们与基质细胞接触后具有增殖的能力,并能以循环增殖的细胞群体保持这种状态,但不能表达前BCR的 μ 重链。

c-kit特异性抗体在体外能抑制原B细胞和前BⅠ类细胞增殖[226],在体内也能抑制许多造血细胞的增殖。奇怪的是:能够在体外抑制B细胞增殖的同一个单抗(ACK-2)在体内却能增强B细胞的增殖[227]。由于c-kit特异性抗体也能抑制骨髓生成,受该抗体处理后髓样细胞就空出了骨髓腔隙。在体内,骨髓中前B数量的增加将使前B细胞占据原来髓样细胞的空间。由于它缺乏将前BⅠ类细胞转变为前BⅡ类细胞的努力,加之其前BⅠ类细胞腔隙正常或者只有沿边缘扩大,突变小鼠的情况就有所不同了(下一节将详细讨论,见图6.3和图6.7)。这就说明:正常的未经处理的小鼠,其前体细胞腔隙和大小是有限的。

体内用c-kit抗体处理后,使前B细胞生长过快,说明不是所有的前B细胞都是以c-kit来作为调节生长的酪氨酸激酶[228]。这也说明:在c-kit抗体的作用下,受c-kit分子抑制的细胞亚群可以被别的亚群取代,甚至还可增殖。

在IL-7存在的环境中,原前BⅠ类细胞的增殖能被γ干扰素所抑制[229],正常的原前BⅠ类细胞在体内

受到 γ 干扰素作用下会发生凋亡。Eμ-bcl-2 转基因小鼠的 B 细胞在体内和体外都可长时间生长[230]，其原 B 细胞和前 B 细胞生长正常，数量也正常，γ 干扰素仍可抑制这些细胞的增殖，它们与正常细胞一样，会发生凋亡。显然，γ 干扰素不能诱导这些细胞分化为成熟的 B 细胞系，在基质细胞和 IL-7 的环境中，正常小鼠和 Eμ-bcl-2 转基因小鼠的前 B 细胞受到 γ 干扰素作用后就不会分化，也就是说，它们不能表达膜免疫球蛋白分子，只表达前 B 细胞的 V 片段(VpreB)和 $\lambda5$，也不能表达 IL-2 受体的 α 链，一旦将 γ 干扰素移出，在 IL-7 的作用下，就能够在基质细胞上增殖。

一些支撑原 B 细胞和前 BⅠ类细胞增殖的基质细胞，至少有一部分是能分化为脂肪细胞的前脂肪纤维母细胞[228]，一旦形成了前脂肪纤维母细胞，它们就失去了支撑原 B 细胞和前 BⅠ类细胞增殖的能力，如果这发生在体内，会使 B 细胞的活性降低。

B 细胞系定型的前体细胞的移植：B 细胞系免疫缺陷的修复以及自身免疫性疾病 B 细胞系表达基因缺陷的分析

离体(ex vivo)分离或体外生长的前 BⅠ类细胞有两个使用目的，其一，当将其转移至适当的免疫缺陷小鼠(如 SCID 或 $RAG^{-/-}$)体内时，它们能再装配成 B 细胞系的中枢腔隙和外周腔隙。移植后，小鼠就可发育 B 细胞系的外周腔隙，并对 T 细胞非依赖抗原有应答，对 T 依赖抗原无应答，但没有成熟 T 细胞的发育。3～4 周以后，IgM 达到正常水平，IgA 达到正常水平的一半，所有 IgG 亚类仍低于正常小鼠的 20～50 倍，再装配 B 细胞腔隙将维持一段时间(可达 1 年以上)[214,232]。将 $CD4^+$ T 共转染也能建立 IgG 亚类的正常水平，而且，外周 B 细胞也能与 T 依赖抗原反应。从胎肝和骨髓获得的前 BⅠ类细胞也可稳定地再装配，并可维持一段时间，有些 B 细胞系腔隙有所不同。来自胎肝的前体细胞可以较长时间地重构，而来自骨髓的前体细胞只能短暂地重构外周 B 细胞腔隙[233]。

198

当移植成熟的 T、B 细胞时，外周免疫系统以同样的方式发生重构[234]，移植前 BⅠ类细胞还有另外的优势，那就是：能够从 D_HJ_H 重排的前体细胞中产生新的外周 B 细胞库。显然，该 B 细胞库能够过滤自身反应性抗体，因为在前 BⅠ类细胞转基因小鼠中没有抗双链 DNA 的自身反应性抗体。如果人的前体 B 细胞系也能够通过移植进行发育的话，就可以置入具有活性的、固定的 B 细胞腔隙来重建骨髓。

将前 BⅠ类细胞置入免疫缺陷宿主中，对其体内的遗传性影响也将导致免疫缺陷性疾病和自身免疫性疾病，在 B 细胞系中常表现这种疾病[235～237]。其中一个例证就是 NZB 与 NZW 杂交 F1 代的细胞抑制，置入前 BⅠ类细胞给 SCID 或 $RAG^{-/-}$ 小鼠后，表现出对 B 细胞的高反应性和高 γ 球蛋白血症，红斑狼疮小鼠的 IgM 和 IgG2a 水平较高，再就是：无 T 细胞发育。这些说明：与调节紊乱有关的狼疮选择性的表现于 B 细胞。血清中 IgG2a 抗体含有抗双链 DNA 的抗体，对引起这种现象做进一步的遗传分析，发现 NZB 小鼠的前 BⅠ类细胞主要使 IgM 增高，而不能使 IgG2a 增高，NZW 小鼠的前 BⅠ类细胞正好相反，主要使 IgG2a 增高，而不能使 IgM 增高。在 NZW 小鼠中发现了抗双链 DNA 的特异性抗体，但在移植了 NZB 小鼠前 BⅠ类细胞的小鼠就没有此类抗体。

另一方面，将前 BⅠ类细胞置入免疫缺陷小鼠，使它们在 B 细胞腔隙的免疫缺陷过继转移，发现 B 细胞系中的遗传性免疫缺陷与那些由于和 T 细胞相互作用所产生的免疫缺陷有所不同，也与环境中的其他协作细胞相互作用缺陷有所不同。移植这些 BⅠ类细胞有助于分析，对人的 B 细胞系缺失可以提供有效的治疗路线。

D_HJ_H 重排

在小鼠基因组中，重链基因 D_HJ_H 片段的 5′端含有启动子，从而启动了前 BⅠ类细胞重链基因的转录[238～243]。当 D_H 片段重排入第二读框的 J_H 片段时，相应的 mRNA 就会编码 D_HJ_H C_μ 蛋白[244]，但该蛋白只在阿贝尔森病毒(Abelson virus)转染的细胞系中发现，在已发生 D_HJ_H 基因重排的正常前 B 细胞中则没有[245]。因此，可以推测，正常细胞中储存了前 B 细胞表面上的这些蛋白，并通过二硫键与替代轻链的 $\lambda5$ 蛋白结合。人的前 B 细胞不表达 D_HJ_H C_μ 蛋白，说明该蛋白是小鼠 B 细胞系中独特的、甚至惟一的蛋白质。

从原B细胞到前B细胞的转化过程中，所有的三个读框都会发生 D_H 到 J_H 的基因重排[246~248]。第一读框比第二、三读框优先[239]。在前B细胞和成熟B细胞库中读框的表达不均等，诸多原因如下。

第一，D、J片段中短股同源性序列会介导重组DNA链的排列，只要N端区域被介导，就会选择第一读框(如小鼠出生前的胎肝中)。在发现的环状DNA的重排 D_HJ_H 结合中可见第一读框被首选、第二读框缺失。在前B细胞重链基因D片段到J片段的重排期间，重排 D_HJ_H 能够提高产量[242]，用重组底物法测定第一、第二、第三读框的比例为70:15:15[249]。此比例在无N端区域插入的情况下，与胎肝中最早期的前BⅠ类细胞的比例相近[250]。

第二，在第三读框内，许多 D_H 片段包含一个或多个终止密码[247,248]。

第三，在IL-7存在下，体内胎肝中或体外基质细胞上前BⅠ类细胞的增殖，将导致带第二读框细胞的消失[250]，这说明：D_HJ_H C_μ 蛋白能够抑制前B细胞的克隆增殖，这正如 μH链在前BⅠ类细胞分化为前BⅡ类细胞时所发挥的作用一样。带有其他两个读框的细胞比带第二读框的细胞的增殖要快，μ 重链-tm$^{-/-}$ 和 λ5$^{-/-}$ 小鼠的前BⅠ类细胞中，未见第二读框受到抑制，证明前BCR受体的早期形式会介导抑制第二读框。

第四，以 D_HJ_H C_μ 替代轻链形式存在的前BCR受体，能发出信号使等位基因排斥，如抑制前BⅠ类细胞中第二等位基因从 V_H 到 D_HJ_H 的重排[194]，这将从表达 μ 重链细胞库中移去它们的作用。

前BⅡ类细胞

通过胞质 μ 重链的表达鉴定了B细胞系的下一个发育阶段，定义为前BⅡ类细胞阶段。这些典型的前B细胞已经失去了表达c-kit和TdT的能力，多数不表达CD43分子[188]，另一方面，这些细胞获得了表达 μ 重链和CD25分子的能力[188]。

前BⅡ类细胞可再分为三个不同的发育阶段：两个是大细胞和增殖循环期阶段(large and cycling)；一个是小细胞和静息阶段(small and resting)。即使在IL-7和IL-3存在条件下，前BⅡ类细胞也失去了在基质细胞上克隆增殖的能力。第一阶段含有大量增殖循环的细胞，这些细胞在由替代链组成的前BCR受体表面上表达，替代链与 μ 重链相关[214,216,251]。在胚系基因构型中，这些细胞不表达RAG-1和RAG-2，但仍具有它们的Ig轻链基因座。

原B细胞受体和前B细胞受体

结构

199

前B细胞特异性的V基因和λ5编码2种蛋白质[252,253]，与形成链样结构有关，所以叫轻链替代物(图6.10)[254]。发现：轻链替代物与不表达 μ 重链的原B细胞表面的糖蛋白复合物分子有关，该复合物就是BCR的前身。

前BCR中轻链替代物与 μ 重链相关[257~260](图6.10)，前BCR的结构与BCR类似，由 μ 重链和轻链组成，因为有人发现作为信号转导分子功能的附属分子(Igα和Igβ)与这两个受体有关(图6.10)[95,260~266]。

编码前B细胞V片段和λ5蛋白分子的基因，在小鼠(16号染色体)和人类(22号染色体)的染色体上作为λ轻链基因[267,268]。在小鼠，与两个功能性前B细胞V基因具有很高的同源性[253]，VpreB1和λ5基因相距在10 kb以内，但与VpreB2和λ轻链的距离不清楚。在第三CDR区类似的区域，其蛋白氨基酸的氨基末端处，VpreB蛋白与 V_H、V_L 片段的同源性很低，但λ5基因与J、C片段区域的λ轻链有很高的同源性。λ5蛋白的N端与V区域的相似性很弱，在V区域中缺失了β折叠的C、D、E片层，到目前为止，还未找到与VpreB蛋白C端序列类似的基因。

与轻链基因位点的V、J片段相反，在B细胞发育期间，VpreB基因和λ5基因相互间不发生重排，VpreB和λ5基因中缺失了典型的重排信号序列，该序列立即存在于 V_L 链基因的3′端和J轻链基因的5′端。

另一个 VpreB 样分子发现于前 B 细胞(早期又叫 8HS20)[269],被称为 VpreB3 细胞[270]。与 VpreB1 基因和 VpreB2 基因相反,VpreB3 基因含有的一个内含子将 V 样区域分为两个内含子,小鼠的前 B3 细胞 V 基因已经定位。

在人类,只有一个 VpreB 基因位于 V_λ 基因簇内[271],与小鼠 的前 B1/2 细胞 V 基因有 80%的同源性[272],已经发现了多个 λ5 样基因[240,273~275]。在 B 细胞发育期间,有 3 个基因不会排列,这 3 个基因是 14.1、16.1 和 Fλ1。但另外 1 个基因,Igλ1 基因,在 B 细胞发育期间是会发生重排的,而且也会参与典型的 3-外显子结构,该结构与 λ5 和 14.1 基因相似[276]。14.1 基因可转录、翻译成 λ5 样蛋白,还没有发现其他的 λ5 样基因能够转录翻译成蛋白,有趣的是:Igλ1 基因正表现为原始 λ5 样基因的下降,而在此时的 λ5 样基因中,已经整合了重排的信号序列。目前仍不清楚,轻链替代物基因怎样进化为 λ 轻链基因座和用于 Ig 重链和 κ 轻链基因重排中的 V 区基因的。

5′端 λ5 区域含 2 个可分元件:带一般启动子活性的 3′端和能够对表达具特异性的 5′端增强子。5′端 λ5 区域也可作为异源启动子而发挥功效[277~280]。显然,在以后的 B 细胞发育阶段和别的细胞中,该增强子可以作为抑制表达的元件而发挥作用。转录因子 EBF 能与 λ5 基因增强子的 DNA 基序结合,当 λ5 基因 5′端的 1 个 722bp 长的区域偶联上人 CD25 基因(编码 IL-2 受体的 α 链)后,培育了一个转基因小鼠,报告基因与内源性 λ5 基因一起表达[199]。可以充分利用报告基因精确的表达来研究和鉴定小鼠的早期的祖细胞。

到目前为止,总是发现前 B 细胞的 V 区基因与 λ5 基因共表达在同样的细胞上。在小鼠和人的转基因细胞系中,从最早期的前 B 细胞到 $sIgM^+$ 未成熟的 B 细胞的基因表达是以 $B220^+$ $CD19^-$ 的祖细胞开始,在前 BⅠ类细胞和大细胞及表达前 B 细胞受体的前 BⅡ类细胞中继续表达,而正常细胞中这些基因的表达受到更多的限制。当小的前 BⅡ类细胞和未成熟的 $sIgM^+$ 细胞不再表达替代轻链的时候,以上的表达便会停止[254],在其他任何的细胞系中不再有前 B 细胞的 V 区基因与 λ5 基因的表达,只是早期 B 细胞系的基因除外。

虽然有些学者对小鼠和人类的替代轻链的表达模式提出些问题[273,282],但现在有足够的实验证据说明:小鼠和人类替代轻链的表达模式是惊人的相似,它们的祖 B 细胞和前 B 细胞都会以所谓的祖 B 细胞受体的糖蛋白复合物的形式表达替代轻链基因[283,284],大前 BⅡ类细胞以所谓的前 B 细胞受体的形式,在其表面与 μH 链共表达替代轻链基因[273,282,285],人和小鼠正常的未成熟 $sIgM^+$ B 细胞却不表达替代轻链基因。我们在以后有关 B 细胞发育的章节中将讨论人和小鼠骨髓中细胞发育的相似性。

功能

替代轻链分子与 gp130 分子相关的复合物的功能尚不明了,在 $\lambda5^{-/-}$ 小鼠,早期 B 细胞系的发育早于 μH 链基因的表达(图 6.3),体外加 IL-7 时,来自这些小鼠的前 BⅠ类细胞在基质细胞上能正常地生长,生长模式和分化动力学都正常。

然而,我们必须记住:λ5 基因缺失小鼠的前 B 细胞的 V 片段基因是正常的,可能由前 B 细胞的 V 片段组成的早期的受体复合物与 gp130 和其他蛋白有关,λ5 蛋白缺失后也能表现正常的功能,当对小鼠 16 号染色体上所有的 3 个基因(VpreB1、VpreB2 和 λ5)予以敲除,就可以检测这个假设,观察该敲除基因小鼠的 B 细胞能否正常发育到前 BⅠ类细胞将是十分有趣的。同样,对编码 gp130 蛋白的鉴定和对该基因靶向性的断裂将轻微地减弱 B 细胞发育中早期受体复合物的作用。

对已经发生 D_HJ_H 基因重排的前 BⅠ类细胞,当再将 V_H 基因重排到其 D_HJ_H 基因座中时,在读框内、外都可发生这样的重排,据估计,仅有 10%~15%的前 BⅠ类细胞能够终止至少 1 个 μ 重链基因座。$\lambda5^{-/-}$ 小鼠的 $B220^+$ B 细胞系中,胞质表达 μ 重链基因的前 BⅠ类细胞的百分率与之相近[188]。

201

每当 V_H 到 D_HJ_H 在读框内发生重排的时候,能产生一条 μ 重链与替代轻链配对,以形成一个前 BCR 受体,此次重排也能产生一个大前 BⅡ类细胞。B 细胞发育处于该阶段,能够在 B 细胞系中启动 2 个重要的反应,一个是导致表达前 B 细胞受体的前 B 细胞增殖爆发,一个是在第二个重链等位基因处关掉 V_H 到 D_HJ_H 的基因重排[188],该过程将导致这两个 $V_HD_HJ_H$ 发生重排的重链基因出现等位基因排斥现象(也就是说,可以预防两条

重链被表达在同样的 B 细胞系中)[286],并且它们可能包括前 B 细胞受体。这些反应极有可能位于表达前 B 细胞受体的前 BⅡ类细胞内,它们处于细胞增殖周期中和已被关闭的 $V_HD_HJ_H$ 重排基因中[287]。轻链基因座还没有转录活化,以及未发生 $V_HD_HJ_H$ 重排的重链基因座难以进一步发生重排,其方式需要进一步阐明。

大前 BⅡ类细胞和 B 细胞发育的后阶段,含有大量的发生 $V_HD_HJ_H$ 重排的重链基因座[184,188,208],而且正常小鼠胞质表达 μ 重链基因的细胞是 $\lambda5^{-/-}$ 小鼠的细胞数量的 10~15 倍[188,288]。因此,前 B 细胞受体的表达可以保证前 B 细胞的增殖,并对已发生 $V_HD_HJ_H$ 重排的前 B 细胞进行阳性选择。

从以上的计算中,我们可以看出,携带不能转录的 $V_HD_HJ_H$ 等位基因的细胞最初形成的细胞库要比携带可以转录的 μ 重链重排基因的细胞库大。Ehlich 及其同事[194]对重链等位基因的重排状况做单细胞分析(Single-cell analyses),发现携带 2 个无功能的 $V_HD_HJ_H$ 重排等位基因的细胞积聚在 Hardy 等研究结果的 C 部分(图 6.8A)[184],C 部分主要包括表达 CD43、HAS 和 BP-1 分子的等表面标志的细胞。

死亡抑制基因 bcl-x,是 bcl-2 家族成员,能够阻断淋巴细胞的多条凋亡途径,它在这个发育阶段起着十分重要的作用[289,290]。因此,bcl-$x^{-/-}$ 小鼠会大大的降低 $c\mu H^+$ 前 BⅡ细胞腔隙[289]。这些发现说明,通过前 B 细胞受体的信号可以诱导 bcl-x 的表达,从而可以延长发生 $V_HD_HJ_H$ 重排的前 B 细胞的生命期。

发育期间早期的 V_H 库及其变化

V_H 库中有 14 个家族、13 个 D 片段、4 个 J_H 片段,它们之间随机排列。从 V_H 到 D、从 D 到 J_H 结合点的 N-区插入,就可以诱导更多的多样性,这样就提供了前 BCR 中不同的 μ 重链基因库[239,291~294]。但是,V_H、D 或 J_H 片断主要在前 B 细胞中,以后主要在成熟的 $sIgM^+/sIgD^+$ 细胞库中,这些片段与胚系中的表达数量并不成比例[240,247,295~298]。V_H 基因属于 V_H7183 和 V_HQ52 家族成员,在 B 细胞发育早期过表达(如在胎肝 B 细胞中)[299~304]。尤其是,V_H 基因绝大多数 D 端功能片段,如 V_H81X,属于 V_H7183 家族成员,在整个生命期都处于主导地位[300~305]。相反,成年小鼠外周成熟 B 细胞群表达 V_H 基因,其中每个 V_H 基因家族的频率与其胚系的复杂性密切相关[301,306~309]。成年小鼠骨髓中的 B 细胞发育期间,V_H81X 基因的表达会降低 $V_HD_HJ_H$ 重排[305]。其实,脾脏中几乎不能发现表达 V_H81X 基因的 B 细胞[296,301,310]。此外,脾脏 sIg^+ B 细胞库中利用 V_H81X 基因的所有 $V_HD_HJ_H$ 重排片段都不能有效转录,骨髓中 sIg^- 的前 B 细胞也只有 25%~30% 的 V_H81X 重排的细胞具有可转录性[295,296,311]。利用 V_H 基因的重排就相反,它们大多数是可以转录的[248,310,311]。

B 细胞发育早期,优先表达 V_H7183 和 V_HQ52 基因家族,这是因为在发生重排期间,在胚系水平上首先利用了这些基因片段的缘故[300,302~304,307]。与本研究相一致的是:V_H7183 基因的重组信号序列比 V_HJ558 基因所介导的更为频繁[312]。在 B 细胞产生期间,某些 V_H 基因片段的表达被抑制,可能是由于前 BCR 活化的结果。缺失前 BCR 表达的突变小鼠,如 $\lambda5^{-/-}$ 小鼠,其成年后的骨髓中,V_H 基因表达的改变则不能表现出来,表达重链的前 B 细胞也被排除在该细胞库之外[313,314]。

事实上,在正常小鼠骨髓中的已发生重排的 B 前体细胞的早期也会出现这种情况。在 μ 重链阳性 B 细胞的 c-kit^+ 胞质部分中,会表达 1 个 V_H 基因库,无论在可以转录的等位基因和不能转录的等位基因上,都偏向于表达 V_H 基因家族、V_H7183 和 V_HQ52 的 D 端片段[314]。表达在这些细胞中只有一半的 μ 重链能够形成前 B 细胞受体,μ 重链阳性、胞质的循环增殖其的前 BⅡ细胞会抑制转录等位基因上 V_H 基因家族 D 端基因片段的表达,而在不能转录的等位基因上则不能抑制该基因片段的表达。表达在这些细胞中 95%以上的 μ 重链,能够形成前 B 细胞受体。在 $\lambda5^{-/-}$ 小鼠,胞质 μ 重链阳性的前体 B 细胞,会抑制 V_H 基因库的表达,而且偏向于抑制 V_H 基因家族中的 D 端片段[314]。一半的 μ 重链与替代的轻链有关,但是,$\lambda5^{-/-}$ 小鼠脾脏中的成熟 B 细胞,V_H 基因家族中 D 端片段的表达在可转录的等位基因中会受到抑制,而在不可转录的等位基因中则不会受到抑制[314]。在正常的骨髓 B 细胞系中,前 BCR 似乎能够介导 V_H 基因库的变化,在 λ5 缺陷小鼠中,BCR 也有这种功能。说明:前 B 细胞和 B 细胞的阳性选择是由于它们能够表达重链,并由此形成前 BCR

202

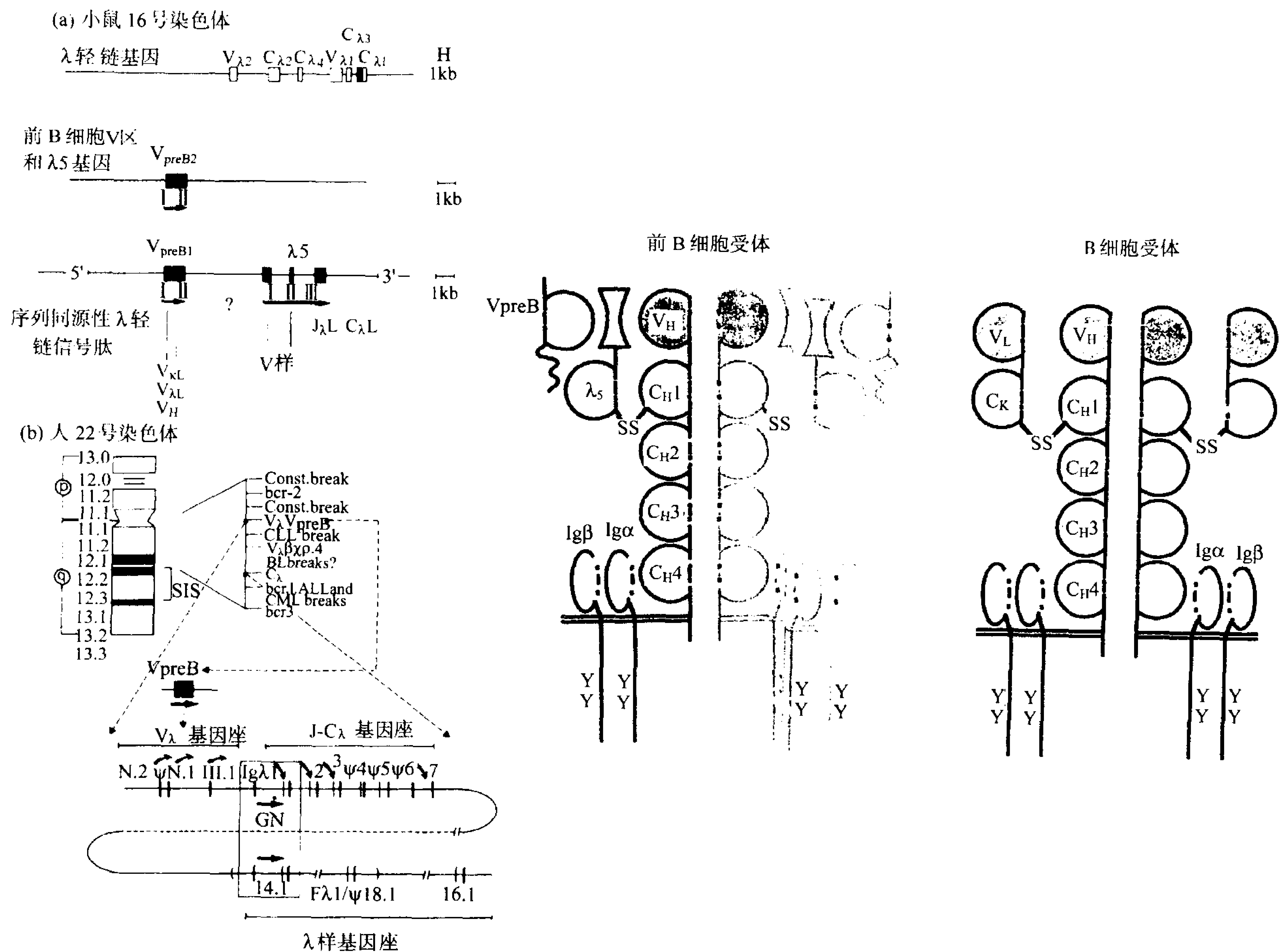


图 6.10　在小鼠 16 号染色体和人类 22 号染色体上，前 B 细胞 V 片段基因和 λ5 基因的排列，以及前 BCR 受体的特殊结构。(a)代表小鼠的 λ 轻链基因的排列，其资料来源于 Carson 和 WU 等[552]；(b)代表人的 λ 轻链基因的排列，其资料来源于 Combriato 和 Klobeck 等[553]。小鼠的 λ 轻链样前 B 细胞特异的基因座 VpreB2、VpreB1、和 λ5，与人的 Gλ1/Igλ/14.1，Fλ/ψ18.1 和 16.1 位于同一条染色体上，但到 λ 轻链基因的距离不详，人的前 B 细胞 V 基因片段在 V_λ 基因内，进一步在淋巴细胞和白细胞中发现染色体位移现象。→ 表示前 B 细胞特异性表达；↗↘表示由 $V_{\lambda L}$ 重排到 $J_{\lambda L}$ 并形成具有转录功能的($V_L J_L$)λ 轻链基因；在基因图谱底端标明小鼠 VpreB1λ5 基因座的核苷酸同源性，在 DNA 水平上不能检测到 V 样基因的同源性，但在氨基酸水平上也类似。用目前所报道的任何序列都不能检测其同源性。在前 BCR 受体的蛋白质结构中，VpreB 作为 Ig 的 V 区与 V 区 CDR3 类似的 C 端相连。λ5 与类似于 C_L 的 C 区相连，并与 V 区样的 N 端相连，其中，Ig 结构域的 7 个 β 带中有 4 个出现(分别是 A、B、F 和 G)[254]，前 B 细胞和 BCR 受体通过 Igα 和 Igβ 分子锚固在细胞膜表面。

和 BCR。

缺陷前 B 细胞受体的突变影响从前 BⅠ类细胞到前 BⅡ类细胞转变的其他突变

前 BⅡ类细胞发育阶段的重要性，尤其是能使正常 B 细胞发育的前 B 细胞受体的表达，在不能产生这些受体的突变体中得到充分地表现。因此，缺失了 μ 重链 μH-tm$^{-/-}$ 跨膜区的小鼠，和缺失了编码替代轻链 λ5 部分的小鼠，都没有增殖循环中的前 BⅡ类细胞，而且前 B 细胞的数量也会减少[188,209,288]。缺失了 Igβ 基因小鼠也有相似的表型[95]，说明：前 BCR 与 Igβ 之间、前 BCR 也可能与 Igα 之间的关联需要从前 BⅠ类细胞到前 BⅡ类细胞的转变。

μH-tm$^{+/-}$ 杂合体小鼠，野生型等位基因能将完整的 μ 重链插入到细胞膜中，使前 BⅡ类细胞腔隙正常增

殖和发育,以及使后来的正常数量的成熟 B 细胞按正常速度发育[208]。但是,在许多 B 细胞中,突变的等位基因并不属于等位性排斥(它也可能是可转录性重排)。如果结合在膜上的重链涉及 V_H 到 D_HJ_H 基因重排的信号抑制过程,那么,带两个可转录的 $V_HD_HJ_H$ 重排的 Ig 重链等位基因和 μH-tm$^-$ 等位基因的所有 μH-tm$^{+/-}$ 杂合体小鼠的 B 细胞,将首先发生重排。

酪氨酸激酶 Syk 缺失小鼠会阻断前 BⅠ类细胞到前 BⅡ类细胞的发育,说明 Syk 在前 BCR 信号中起关键作用[212,213],在这个问题上,值得注意的是:在前 BCR 信号中起关键作用的同源激酶 ZAP-70,能够代替 B 细胞发育中的 Syk 激酶,说明此发育阶段的 T、B 细胞具有相似类型的信号转导[315]。

PAX-5$^{-/-}$ 小鼠,骨髓中 B 细胞发育的同一个转移阶段能被阻断,具有 D_H-J_H 重排中的两个 Ig 重链基因的前 BⅠ类细胞与 PAX-5$^{-/-}$ 小鼠骨髓相关,但是,V_H-D_HJ_H 基因重排是引人注目的,如果不是绝对的话,在这些小鼠中会受到阻断[101,102,111]。缺乏功能性 Pax-5 基因产物是怎样导致对 B 细胞发育中的选择性阻断,却不得而知,可能引起该缺陷的基因,如 RAG-1 、RAG-2、λ5 或 VpreB 等基因,会在 Pax-5$^{-/-}$ 小鼠的前 BⅠ类细胞中表达到正常水平[102,111]。从这一点上看,目前已知的可受 Pax-5 基因缺失影响的基因就只有 CD19,在 Pax-5$^{-/-}$ 小鼠中检测不到 CD19 的转录产物和翻译的蛋白质[101,102,111]。但是,缺乏 CD19 的表达又不能解释 Pax-5 的基因型,因为 CD19$^{-/-}$ 小鼠与正常 B 细胞发育相关[181,316]。

前 B 细胞受体中转基因 μ 重链的作用

在 E_μ 增强子的控制下,一些不同的转基因 μ 重链的早期表达,可以抑制两个内源性重链等位基因从 V_H 到 D_HJ_H 链的重排[317]。不管在合适的位点上是否插入了同源重组序列[318],或者在基因组中其他部位插入了异源重组序列,转入 μ 重链后都会发生重排。μ 重链的膜结合形式需要等位基因排斥,正如转入的 μ 重链基因处于隐蔽状态,而不能抑制内源性 V_H片段向 D_HJ_H 片段的重排一样[319,320]。当在 E_μ 控制下表达时,转入 δ 重链基因也会介导对 $V_HD_HJ_H$ 片段重排一样的抑制效果[321]。正如根据表型和前 BⅡ类未成熟的及已成熟的 B 细胞数量所判定的那样,虽然这些细胞的 Ig 库已被修改,但是,前体细胞似乎维持正常状态。

在 E_μ 控制下,转入 γ2b重链基因,在前 BⅡ类细胞阶段对 B 细胞发育却有不同的影响[322~324]。在一些 γ2b重链转基因小鼠,内源性的 V_H 片段向 D_HJ_H 片段的重排受到强烈抑制,在不允许正常细胞发育为 sIg$^+$ B 细胞,sIg$^+$ B 细胞以较低的比率发育,但在 γ2b重链转基因小鼠中都表达内源性的 μ 重链,说明:内源性的 V_H 片段向 D_HJ_H 片段的重排只受到部分抑制。γ2b重链转基因小鼠与 μ 重链转基因小鼠的杂交后代能够发育正常数量的前 B 细胞和 B 细胞,说明转入这些 γ2b重链基因是没有毒性的。这些结果说明,在两个内源性转基因小鼠的其他等位基因上抑制 $V_HD_HJ_H$ 重排的信号与细胞增殖信号并进一步发育成前 BⅡ类细胞的信号是不一样的。由于 μ 重链和 δ 重链在胞质内的尾部都较短,而 γ2b重链的却较长,所以在 γ2b重链转基因小鼠中,该差异的结构基础是由于这些胞质内尾部不同的信号特征所造成。

在 SCID 小鼠[325~329]或 RAG-T$^{-/-}$ 小鼠[330]或 RAG-2$^{-/-}$ 小鼠[188,331]中,最容易看到转入 μ 重链基因后对细胞发育和前 BⅡ类细胞腔隙的影响程度。在这些小鼠中,转入了四个不同的 μ 重链基因(其中还有一个是人的 μ 重链基因),将导致正常数目的前 BⅡ类细胞完全发育[用 Hardy 的方法测定的细胞数量,或者以 CD25 (TAC)$^+$ 前 BⅡ类细胞的数量来表示],Rolink 等[188]也发现在前 B 细胞腔隙内有循环细胞的少量静息细胞,而循环细胞的数量 是正常的,说明:μ 重链基因在前 BⅠ类细胞向前 BⅡ类细胞转变过程中,可以诱导这些细胞的增殖。这些结果也说明,在该转变过程中表达特定 V_H 区域的骨髓微环境不可能有针对已确定抗原的自身反应性问题,V_H 区域是在 V_H 基因向 D_HJ_H 基因重排信号受到抑制后,或者是在前 B 细胞进入前 BⅡ类细胞腔隙增殖时,由前 BⅠ类细胞向前 BⅡ类细胞转变过程中表达的。在发育早期作为转基因表达的正常轻链可以克服 λ5$^{-/-}$ 小鼠的 B 细胞发育缺陷[332~334],这进一步支持以下观点,即:前 BCR 受体为了发挥自身的功能,不需要与某个配体相互作用。

203

重链的所有转基因形式都需要与替代轻链联合,才能进入前 BCR 受体的信号增殖状态,并发育成前 BⅡ

类细胞。一个明显的例外是:已经发生 D_HJ_H 基因重排的缩短了的 μ 重链与 $C_{\mu H2}$ 链的 3′端结合,随后是其他 μ 重链(如 $C_{\mu H3}$、$C_{\mu H4}$ 基因的跨膜蛋白和胞质蛋白)[260]。该缩短的 μ 重链虽然不能与替代轻链联合,但它能存在于外周 B 细胞的表面[335]。在 λ5 基因存在时,以及在缺乏 λ5 基因时,该缩短的 μ 重链也允许 B 细胞系细胞分化成为前 BⅡ类细胞。相反,将 μ 重链基因转入 RAG 基因缺乏小鼠,在其外周有表达 μ 重链基因的 B 细胞存在。

重链基因座的等位排斥现象

由于 μH-tm$^{-/-}$ 和 λ5$^{-/-}$ 小鼠缺乏等位基因排斥现象[208,286],但在前 BCR 受体似乎涉及等位基因排斥现象。目前在 λ5$^{-/-}$ 小鼠所发现的都是一个特别的表型,它们产生的一条 μ 重链能够与替代轻链配对,但产生的第二条 μ 重链却不能与替代轻链配对[314,336]。此外,在正常小鼠中,也发现一条链与替代轻链配对,而第二条链却不与替代轻链配对的现象,而且发生的频率都一样。事实上,这说明:λ5 基因的缺陷并不能消除两个配对 μ 重链的等位基因排斥现象,因为,即使缺乏 λ5 蛋白,前 B 细胞的 V 区基因也能与 μ 重链基因配对[337]。就有了这样的可能性:前 BCR 受体的前 B 细胞的 V 区基因/μ 重链基因二聚体会传递信号,使前 BⅡ类细胞在第二基因位点上结束 V_H 基因 向 D_HJ_H 基因的重排。

轻链基因转录与重排的启动

在所有可能性中,继前 BCR 阳性细胞之后的前 B 细胞都是大的循环的前 BⅡ类细胞,它们失去了替代轻链的表达[188,216,251]。与前 BCR 阳性细胞有所不同,这些细胞在 RNA 水平上表达 RAG-1 和 RAG-2,但在蛋白质水平上却不表达[287]。此外,尽管这些细胞中轻链基因位点仍处于胚系构型中,但检测不到来自 κ 轻链基因位点的转录产物[195,287]。

当大的循环的前 BⅡ类细胞成为静息的、小的细胞时,RAG-1 和 RAG-2 在 RNA 水平和蛋白质水平上都会表达,至少一些为 sIg$^+$ 的非成熟 B 细胞[287],发现有大量的细胞在轻链基因位点上已经发生了重排[195]。尽管小的前 BⅡ类细胞表面不表达 Ig 分子,但在该阶段,κ 轻链与 λ 轻链基因以 10:1 的比率发生重排[195]。

为什么发生 V_LJ_L 重排的小的前 BⅡ类细胞表面不表达作为 IgM 分子的与 μ 重链密切相关的轻链蛋白,现有四种可能的解释。首先,发生的重排都在读框以外;其次,源自能够复制的重排等位基因的轻链不能与 μ 重链匹配;第三,重排已经发生,但细胞表面还检测不到所产生的蛋白数量;第四,作为能与自身抗原相互作用的序列,使 sIgM 受到下调。

研究中已经发现了能够特异性影响大的循环的前 BCR 受体阴性细胞和随后的静息的前 BⅡ类细胞腔隙的突变,认识了解与正常细胞周期共同形成大、小前 BⅡ类细胞腔隙是很重要的。甚至在既不能发生 κ 轻链基因重排[338,339],又不能发生任何轻链基因座重排但只表达 μ 重链的小鼠中(如 RAG$^{-/-}$ 或 SCID 背景的小鼠),都可以表达 CD25 分子,而且数量接近正常。这说明:前 BCR 受体能够通过细胞的增殖来促进前 BⅡ类细胞的发育,骨殖中这些细胞腔隙的积累能使任何轻链基因独自地发生重排。

在由前 BⅠ类细胞向前 BⅡ类细胞转变过程中,IL-7$^{-/-}$ 小鼠封阻了其 B 细胞发育,该发现有力地说明 IL-7 参与了前 BCR 受体阳性的前 BⅡ类细胞的增殖[211]。本结果与 IL-7 转基因小鼠能够大量增殖前 BⅡ类细胞的研究结果相一致。

未成熟 B 细胞

形成

具有转录能力的 κ 轻链或 λ 轻链重排的小的前 BⅡ类细胞能够转变成为 sIgM$^+$ 的未成熟 B 细胞,在小鼠,表达 κ 轻链的 B 细胞与表达 λ 轻链 B 细胞的数量之比大约为 10:1[246]。正常小鼠中小的前 BⅡ类细胞发育为未成熟 B 细胞的比率大约是 1[131,188]。但是,由于内含子增强子的靶向性缺失而未经 κ 轻链重排的小

鼠[338]，或由于 C_κ 区缺失而不能产生 κ 轻链蛋白的小鼠[339]，由于未成熟 B 细胞数量的减少，该比率大约为 4。因此，不能产生 κ 轻链蛋白极大地影响前 BⅡ类细胞能够向 sIgM⁺ 未成熟 B 细胞转变，λ 轻链与 μ 重链配对的效率很低，同样，λ 轻链基因发生重排的效率也很低，这也许可以解释以上的结果。

阴性选择：未成熟 B 细胞分化的停止

未成熟 B 细胞与抗原接触后，会导致 sIgM 和 B220（CD45R）分子表达的下调（图 6.11），不论是体内实验还是体外实验，表达鸡卵溶菌酶（hen egg lysozyme HEL）的转基因小鼠，其未成熟 B 细胞表达突变的 IgM[340]。体外实验：将抗 HEL 转基因的未成熟 B 细胞与表达膜结合形式的 HEL（mHEL）的胸腺细胞接触，会导致转基因小鼠未成熟 B 细胞 sIgM 和 B220 分子表达的下调。体内实验：骨髓中 mHEL 的存在会产生 sIgM、B220 分子都低的未成熟 B 细胞，并且停止 mHEL 反应性转基因 B 细胞的进一步分化。在其他的转基因小鼠模型中，这些细胞被称为过渡性 B 细胞[341]。在体外，在抗原的存在下（如表达 mHEL 抗原的胸腺细胞），停止的转基因未成熟 B 细胞会保持在 sIgM、B220 分子双低的状态。但是，它们在缺乏 mHEL 时，将分化为成熟的 B 细胞，为 $sIgM^+$ $sIgD^+$、丝分裂素⁻、表达 L 选择素、补体受体-1、补体受体-2 和 CD22、CD23 等标志的抗原反应性 B 细胞。在不表达 mHEL 的转基因动物的体内也会发生抗 HEL 反应。

204

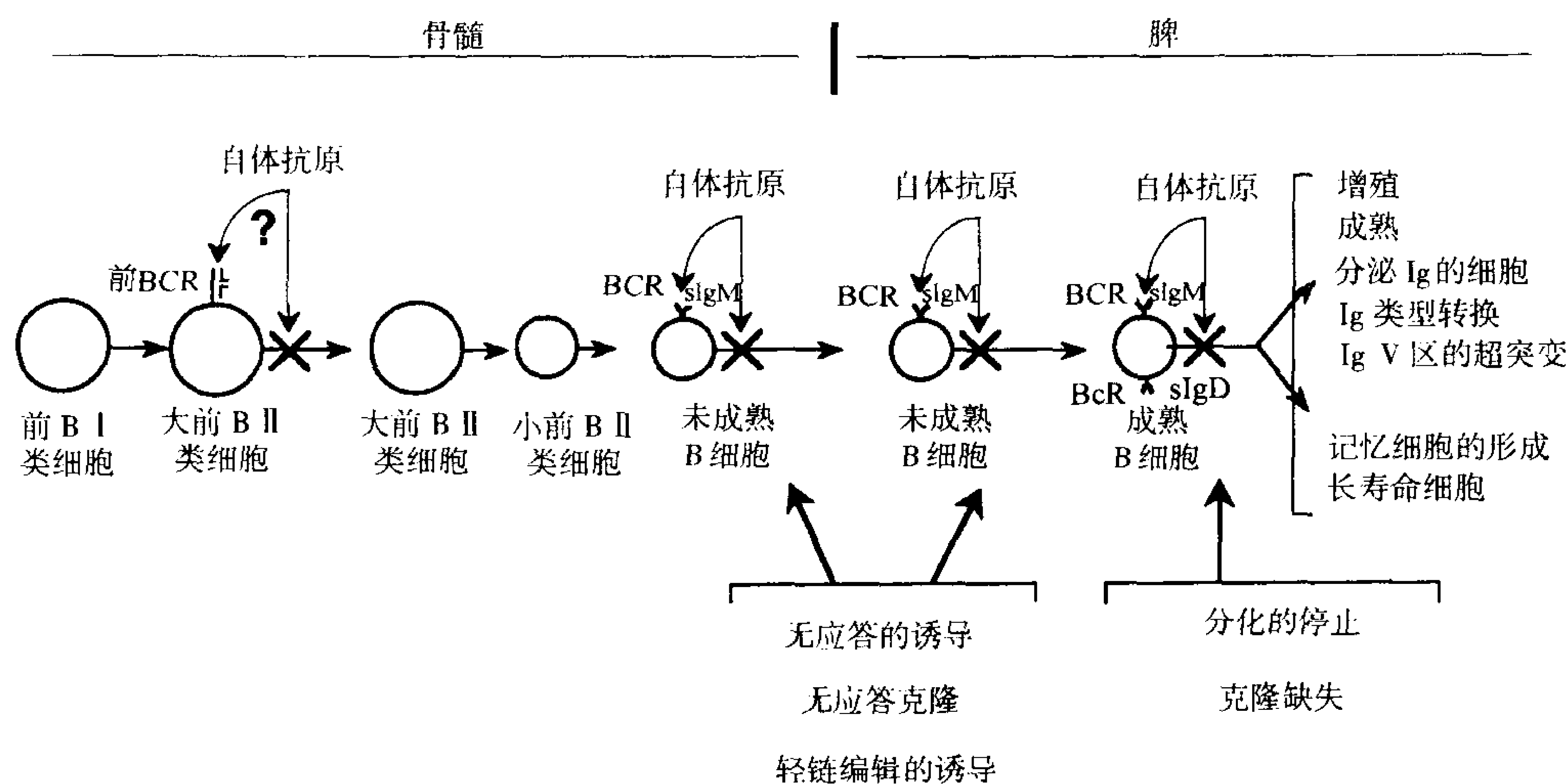


图 6.11　初级免疫器官（骨髓）和次级免疫器官（脾脏）中，B 细胞发育期间，自体抗原的活化，前 B 细胞可能识别自体抗原，并导致大前 BⅡ类细胞发育停止和消失，自体抗原能对 3 种细胞（分别是骨髓和脾脏中的未成熟 B 细胞和脾脏中的成熟 B 细胞）进行阴性选择。

当内源性轻链不能发生重排的时候（当重链和轻链基因转入到 $RAG\text{-}1^{-/-}$ 或 $RAG\text{-}2^{-/-}$ 遗传背景 的同型 SCID 小鼠的时候），能够很清楚地观察到分化的停止[325,330,331,342,343]。在这些转基因模型中，有三种模型的自体抗原为可疑[325,330,343]，该抗原不能控制。但是，第四种情形的转 sIgM 基因的特异性为已知[330]，在 $H2^b$ 小鼠骨髓中（如存在特异性自身抗原），sIgM⁺、MHC Ⅰ 类分子特异的未成熟 B 细胞在 IgM、B220 双低阶段的分化是停止的。相反，sIgM⁺ 未成熟的和成熟的 B 细胞会按正常数目发育，当不存在自身抗原时，也不会出现有害的反应性，$H2^d$ 小鼠就是例证。

在 $186.2V_{H\mu}C/\lambda_1$ 轻链抗 NP 的转基因小鼠中未见分化停止的现象，该小鼠为 RAG-2 基因型[331]。所表现出的 B 细胞是正常的、成熟的、具有抗原反应性。这说明：转基因受体既不能识别初级淋巴器官中未知的自体抗原，也不能在未成熟的 B 细胞中传递信号，但在成熟 B 细胞中没有损害。到目前为止，在正常遗传背景上（如轻链的重排）对这些转基因小鼠的分析表明：在能够说明该缺陷的 B 细胞库中，还没有发现异常的情况。

在转入针对小鼠红细胞的特异性 Ig 分子的小鼠中产生了一个有趣的现象，腹膜中的 CD5⁺ B 细胞系能够逃避分化停止，相反，其他淋巴器官存留的少量正常的 B 细胞出现无应答现象[344]。口服脂多糖(lipopolysaccharide)则能活化腹膜和固有层的 CD5⁺ B 细胞，导致自身抗体的分泌，出现自身免疫性贫血症状[178]，红细胞以不同的方式呈递转基因小鼠的自身抗原，这是由于正常的 B 细胞被停止、检测和编辑，而 CD5⁺ B 却没有这样的缘故。另外，因为 CD5⁺ B 细胞，至少是部分的 CD5⁺ B 细胞，在胚胎发育的早期从胎肝中产生[345]，而大多数传统的 B 细胞在整个生命期都是在骨髓中产生，所以，在这些细胞系中其分化停止，以及/或者细胞的检测和编辑要么不会发生，要么以不同的规则发生。在 CD5⁺ 腔隙内发现的活化了的 B 细胞，常常具有自身的反应性，而且不能诱导耐受。

抗原分子和一些能与自体抗原具有交叉反应性的分子，可能与未成熟 B 细胞的分化停止相矛盾。抗 TNP 单抗转基因小鼠 Sp6，其基因重排缺陷，若注入 T 细胞非依赖抗原 TNP 以后，其细胞分化受到抑制的现象有所减轻，并且使能够分泌转基因 IgM 的细胞大量发育。这一点说明其中心免疫耐受遭到破坏，或者根本就没有建立起来[343]。如果外来抗原(如本例中的 TNP 半抗原)与自体抗原具有交叉反应性，那么，自体抗原特异性 B 细胞就会从停止进一步分化的状态转向成熟的 B 细胞阶段。

许多致病性细菌可能会诱导自身免疫性疾病[346]，因为细菌有些模拟物具有自身抗原的特征。已知许多细菌的结构犹如 T 细胞非依赖性抗原的结构那样[347]。它们在自体抗原和 sIg⁺ 的 B 细胞之间会发生竞争性的相互作用，不管它们与自体抗原的交叉反应性如何，以及它们在初级淋巴器官是否存在。

免疫球蛋白受体的编辑

205

由于增殖和突变，成熟 B 细胞成为 Ig 分泌细胞，对抗原刺激和丝裂素刺激就没有应答[231,348~352]，它们仍能表达 RAG-1 和 RAG-2 蛋白，并经历第二次轻链的重排[231,353-355]。在从表达 κ 轻链的细胞变成表达 λ 轻链的细胞的过程中，或者从表达 κ 轻链或表达 λ 轻链的细胞变成 sIg 轻链的过程中，随着 κ 轻链 λ 轻链比率的下降，第二次轻链的重排更加明显。

甚至，至少一些重排基因的连续表达，以及第二次轻链的重排是由中枢淋巴器官中的自身抗原所诱导的[353,356,357]。未成熟的 sIg⁺ B 细胞与自体抗原相互作用说明：当 λ 轻链的表达水平增加，超过 κ 轻链的表达水平时，以及自身反应性转基因 Ig 分子能够诱导轻链发生变化时，配体(自体抗原)与未成熟 B 细胞上的 sIg 分子的相互作用并不能结束细胞的未成熟状态，但能够进一步诱导重排。这具有潜在的优势，因为这可以使自身反应性 B 细胞有机会通过改变轻链的 V 区或 V、C 区来失去自体抗原的特异性。

在 Ig 转基因小鼠(能够有效地发生重排)中分析已经编辑的 B 细胞库，常常发现转基因的轻链和内源性的轻链共表达于同一细胞中[358]。对于不同的 Ig 转基因品系小鼠，两个轻链共表达的百分率是不相同的。可以想像，共表达转基因轻链和内源性轻链的未成熟 B 细胞及其所分化的细胞，能够产生淋巴样 sIgM 分子，该分子能够使细胞具有与自体抗原反应的不同能力，这是怎样干涉编辑和停止分化的，还需要做更多的论述。

骨髓中 B 细胞的预期寿命

原 B 细胞、前 B Ⅰ类、前 B Ⅱ类细胞和 sIg⁺ 的未成熟 B 细胞都会快速地产生，它们在骨髓中的半衰期大约 2~4 天，每天只有少部分的 sIgM⁺ 的未成熟 B 细胞被选择到成熟的 B 细胞库中(200~300 万)[141,359~363]。说明：不管它们是否分化成为 sIgM⁺ 的未成熟 B 细胞，骨髓中产生的大部分细胞会在原位死亡。但目前仍不清楚这些细胞是死于凋亡还是死于巨噬细胞的吞噬[141]。因此，当未成熟 B 细胞能够通过改变其 sIgM 分子的抗原结合区域来逃避自体抗原的识别时，但由于其生命期太短而使其作用受限，使之不能摆脱其自身反应性，从而导致细胞的死亡。目前几乎没有细胞黏附分子、细胞因子与之相互作用，也没有能与之相互作用的提呈自体抗原细胞和控制未成熟 B 细胞行为的信号转导途径[349,350]。在不同的方式中曾发现占据在未成熟 B 细胞和成熟 B 细胞上的 sIg 分子可以诱导磷酸化作用和去磷酸化作用，这说明该差异性在 sIg 分子介导的

信号转导途径的跨膜水平阶段就已经发生了[364-368]。但是,未成熟 B 细胞对自体抗原的识别可以加快其死亡,甚至使其生命期缩短[369]。

未成熟 B 细胞从骨髓到脾的转移以及外周 B 细胞从未成熟到成熟的过程

由一系列标志分子的表达、细胞的生命类型以及 B 细胞的反应性等,就可以鉴定未成熟 B 细胞向成熟 B 细胞的转变(图 6.3 和表 6.1),成熟 B 细胞能表达 L 选择素、淋巴结归巢受体、补体受体 CR1 和 CR2 (CD35 和 CD21)、CD22、CD23 和 CD40 等分子[340]。T 细胞依赖抗原和 T 细胞非依赖抗原可以刺激这些细胞增殖并成熟地进入 Ig 分泌细胞(第 7 章),其中,有些细胞成为长命细胞,半衰期可达 6 周或更长。

在骨髓中有一个含有 $2\times10^7\sim4\times10^7$ 个未成熟 B 细胞的细胞库,由于每天有 2×10^7 个新的细胞产生[131],那么,就有相同数量的细胞要么通过凋亡,要么转移至脾[359]。未成熟 B 细胞通过中央动脉进入脾,并定位在囊泡内、外区域(图 6.12)[363,370]。在脾的这些部位中,B 细胞仍然没有成熟,并根据其半衰期的不同(数天与数周的差别),与成熟的 B 细胞有明显的区别,B220 和 sIgD 为低表达,HSA 和 sIgM 则为高表达水平[184,361]。新产生的未成熟的 B 细胞只有 5% ~ 10% 才能被选择进入成熟的 B 细胞库中[141,234,360-363]。目前都还不太知道为什么仅有如此少的未成熟 B 细胞能被选择进入成熟的细胞库中,也不太知道它们是怎样被选择的。通过与 T 细胞发育的比较,$CD4^+$ $CD8^+$ 双阳性的未成熟胸腺细胞移行至胸腺,$CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞被选择的数量极为接近。因此,一般认为,胸腺中TCR与MHC分子相互作用后可以介导T细胞的阳性选择,

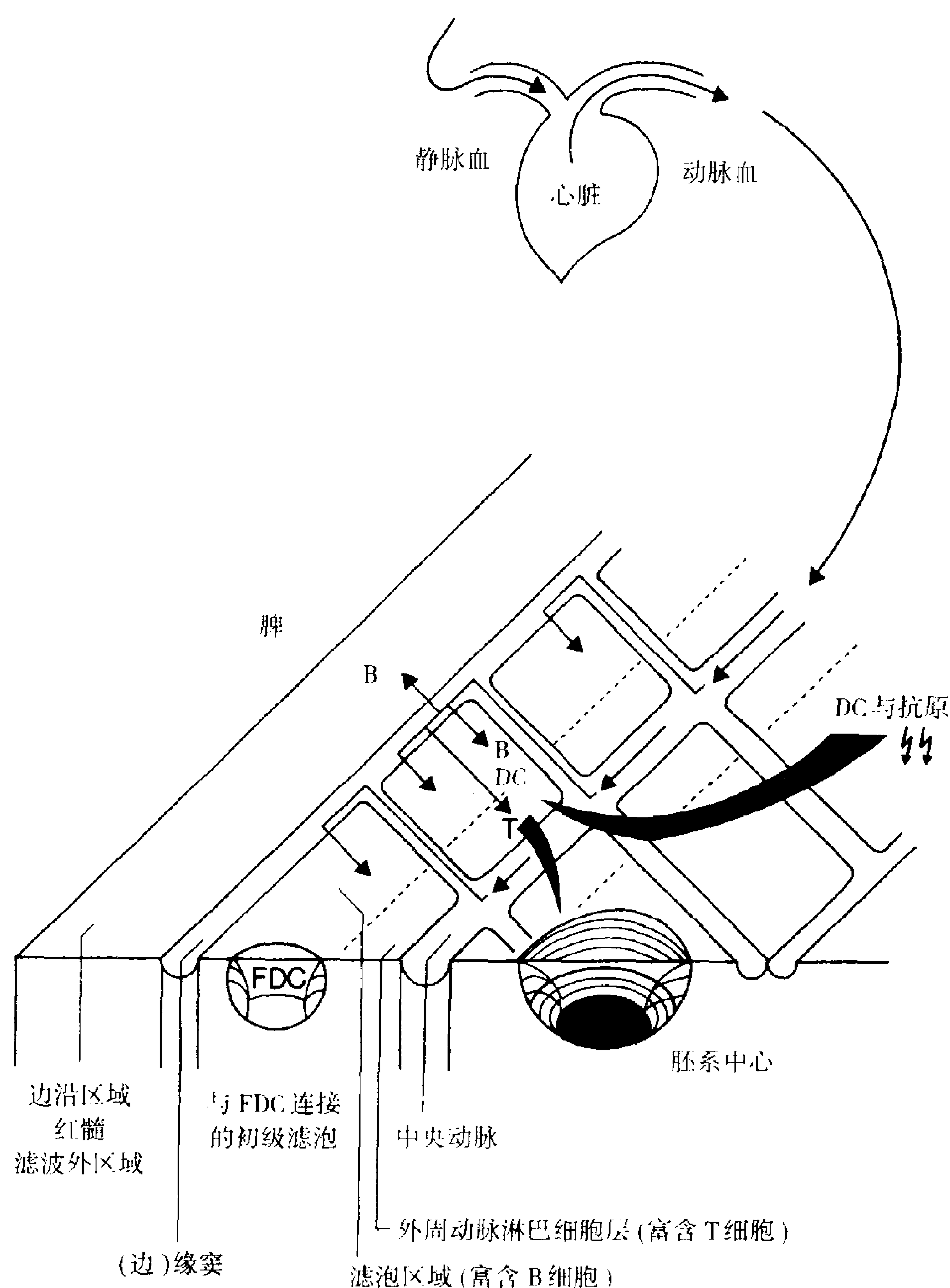


图 6.12 B 淋巴细胞进入脾,通过血窦存在于骨髓中的 B 细胞进入静脉血,并由心脏通过动脉进入脾,通过远端血窦进入滤泡和滤泡外区域,来自胸腺的 T 细胞通过同样的途径进入靠近主动脉的脾,并在 B 细胞远离动脉期间形成外周动脉淋巴细胞层(periartiolar lymphocyte sheet, PALS),在滤泡区域内的初级滤泡包含滤泡树突细胞(FDC)的网络,该细胞能积聚大量天然抗原。当抗原以天然的形式进入滤泡区域中时,就通过膜表面 Ig 分子与 B 细胞结合,或者通过补体受体与 FDC 结合作为免疫复合体,抗原被呈递在 DC 细胞上形成肽-MHC Ⅱ 类分子复合物,在 PALS 的边沿刺激 Th 细胞,在富含 T 细胞的 PALS 与富含 B 细胞的滤泡区域,在 Th 细胞的作用下启动刺激了抗原特异性 B 细胞。被激活的 B 细胞进入含有 FDC-抗原复合物的滤泡内,并通过增殖、体细胞超突变、类型转换而扩展其数量,形成分泌 Ig 的细胞,滤泡转化形成胚系中心。

尽管表达在 B 细胞上的 IgM 的特异性十分重要，但仍不清楚形成成熟 B 细胞 Ig 库的自体抗原的阳性选择[247,371-373]。曾有完全不同的观点，认为成熟淋巴细胞的产生是由于血细胞系产生所致，而且由自我平衡机制来维持成熟淋巴细胞库，该机制认为并不利用抗原特异性受体来作为细胞选择的分子模型。

未成熟 B 细胞从骨髓向脾的转移只是 B 细胞成熟两阶段的第一步（图 6.3），$OBF^{-/-}$ 突变小鼠[374,375]，CBA/N 和 $CD40^{-/-}$ 双突变小鼠[376,377]，就会出现转移缺失。此外，仅表达 Igα（mb-1）部分片段的小鼠也会出现转移缺失[378]。这说明需要通过膜表面 Ig 分子介导信号，而且，A/WySnJ 小鼠由于一个叫 Bcmd 的隐性基因而失去了 B 细胞的转移能力[379,380]，目前尚未确定这个基因的功能。$CD45^{-/-}$ 小鼠的脾中未成熟 B 细胞的数量增加了 3～4 倍[381]，CD45 磷酸化酶要么通过增加脾中未成熟 B 细胞的存活率，要么降低未成熟 B 细胞向成熟 B 细胞的分化率，来增加 B 细胞的选择率。

在 Btk 基因缺失的 CBA/N 小鼠[382,383]，B6 MHC Ⅰ、Ⅱ类分子和 $A\alpha^{-/-}$ 小鼠[384]，恒定链（invariant-chain，il）缺失小鼠[385]，其未成熟 B 细胞向成熟 B 细胞的成熟过程，即产生成熟 B 细胞的第二阶段，受到损害。通过以上的遗传分析发现：未成熟细胞的成熟过程是发生在免疫系统内不同部位的多阶段过程。是什么样的机制作用在这些细胞上，目前尚没有多少线索，也不清楚 B1 细胞或常规的 B 细胞是胚胎的肝脏或骨髓产生的呢，还是成年后的肝脏或骨髓所产生。

206

体外 B 细胞在有或无 Ig 分子时的分化

当失去与基质细胞接触后，原 B 细胞和前 BⅠ类细胞在体外 2～3 天内就会分化为 sIg^+ 的未成熟 B 细胞和 sIg^- 的 B 细胞系细胞，从 V_H 到 D_HJ_H 片段的无转录能力的重排就可能产生 sIg^- 的 B 细胞系细胞，V_H 到 D_HJ_H 的重排以及从 V_L 到 J_L 的重排就产生前 B 细胞，后者在起始阶段的 κ/λ 之比为 10∶1[226,386]，因此，在 IL-7 存在下，sIg^+ 或 sIg^- B 细胞不能在基质细胞上增殖。如果不能与基质接触，就缺乏诱导原 B 细胞和前 BⅠ类细胞的信号，就不能完成所有重链和轻链基因的重排，也不能分化为 sIg^+ 和 sIg^- 的成熟 B 细胞。分化细胞就立即获得了表达 CD25 的能力，但又降低了 c-kit、CD43 和 IL-7 受体的表达，随后就失去了替代轻链、RAG-1 和 RAG-2 基因的表达。事实上，当体内的前 BⅠ类细胞向前 BⅡ类细胞分化过程中不能表达期间，前 BⅠ类细胞在体外的分化就使 RAG-1 和 RAG-2 分子的表达快速地下调[231]。

从胎肝前 BⅠ类细胞行体外诱导分化为 sIg^+ 的未成熟 B 细胞，LPS 刺激该细胞后表达了 V_H 基因，从该结果发现：在体外分化期间，位于 3′端的 V_H 家族成员 V_H7183 和 V_HQ52 被优先利用[387]。因此，在体外分化的前 B 细胞会表达 V_H 基因，该基因在胎肝的早期基因库已得到鉴定。

事实上，分化培养基中产生的 sIg^- 的前 B 细胞会发生 $V_HD_HJ_H$ 和 V_LJ_L 基因重排，但在读框之外，因此，重链或轻链，以及这两个 Ig 基因座都没有转录活性。在缺乏细胞分裂时发生了体外的细胞分化，有 95% 以上的细胞仍能存活，在 rIL-7 存在下，分化细胞失去了在基质细胞上增殖的能力（在 2～3 日内不会有克隆增殖），这说明：绝大部分细胞是在这些环境中分化而成的。

207

细胞分化不仅来自正常的前 BⅠ类细胞，也来自 SCID、$RAG^{-/-}$、$\lambda5^{-/-}$ 小鼠以及在体外经历了细胞凋亡、在 IL-7 存在时不能在基质细胞上增殖的其他突变小鼠[191,214]，尽管前 BⅠ类细胞不会死于凋亡，但是它们转入 bcl-2 基因后失去了克隆增殖能力[231,388]。这说明：B 祖细胞和前 BⅠ类细胞的分化能力与 Ig 基因重排没有关系，也与 B 前体细胞进入凋亡的能力没有关系。bcl-2 转基因小鼠中发生无转录活性基因重排（如 sIg^- 细胞）的细胞会死亡，但在 bcl-xL 转基因小鼠中这些细胞又会存活下来[290]。因此，bcl-xL 基因可能参与了体内前 BⅡ类细胞的死亡控制过程，在体内仍能看到引起细胞死亡的是哪种机制在起作用（凋亡？吞噬？还是其他？）。

不管 Ig 重链基因座发生的基因重排是否具转录能力，或者根本就不发生重排；不管轻链能否发生重排[338]，在移去 IL-7 之后，原 B 细胞和前 BⅠ类细胞在没有细胞分裂的情况下仍可在体外分化，并导致轻链基因座转录活化。而且，不管分化的细胞是否发生 Ig 基因重排，或者是否表达 Ig 链，当加入抗 CD40 特异性单

抗(mAb)和IL-4时,都会诱导ε重链基因座的转录[389]。RAG-2$^{-/-}$小鼠而非SCID小鼠的B细胞系中,大部分的细胞与正常小鼠分化的细胞一样,以同样的频率诱导S_μ-S_ϵ的开关,说明抗CD40抗体和IL4诱导的S_μ-S_ϵ开关需要SCID小鼠编码蛋白激酶的基因,而非编码RAG-2蛋白的基因参与。从早期的原B细胞和前BⅠ类细胞到S_μ-S_ϵ开关的B细胞发育过程,了解影响和控制该发育过程的机制都一样重要。实现B细胞系分化的成熟B细胞需要该细胞系与基质细胞和T细胞的共同作用,并由细胞因子的介导和细胞-细胞间接触,而不需要抗原特异性BCR Ig的表达[390]。

人的B细胞发育

细胞发育的不同阶段

虽然有少部分能表明细胞不同发育阶段的各种表面标志不甚相同[282,285,391,392],但人体骨髓中的B细胞发育与小鼠的极为相似(图6.13)。人骨髓中B细胞发育最早期阶段的细胞,类似与小鼠的原B细胞/前BⅠ类细胞腔隙阶段,会表达$CD19^+$、$CD10^+$和$CD34^+$分子,它们能在胞内表达TdT和RAG,但不表达μ重链,在这些细胞表面也表达替代轻链,但是,还没有鉴定到与该分化阶段相关的替代轻链基因的蛋白质。这些细胞与小鼠的一样,在细胞生命周期中有活性,但又与小鼠细胞不一样,这些人体细胞在IL-7或其他细胞因子作用下,又不能生长在基质细胞上。值得注意的是:IL-7在人的B细胞发育中远远没有在小鼠中那么重要。基于以上发现,IL-2Rγ链(它是IL-7受体的一部分)缺失小鼠在前BⅠ类细胞向前BⅡ类细胞转变时,就不能使B细胞正常发育[210],而IL-2Rγ链未活化的病人,其B细胞发育似乎是正常的[393,394]。

人体中第二类前体细胞相当于小鼠的表达前BCR受体的前BⅡ类细胞,人体中这类前体细胞为$CD19^+$、$CD10^+$、$CD34^-$、TdT^-、RAG-1、表达前BCR受体的循环细胞,当它们的轻链基因仍处于胚系状态时,其发生$V_HD_HJ_H$基因重排的Ig重链基因座就具有转录活性了。与小鼠的$\lambda5^{-/-}$、$\mu H\text{-}tm^{-/-}$、$IL\text{-}7R\alpha^{-/-}$或$Syk^{-/-}$突变体相比,目前还没有找到作为人类B细胞免疫缺陷的突变体。因此,只是假设人的前BCR受体与小鼠的一样,在B细胞发育过程中发挥着重要作用,但还没有直接的证明,只能称为前B细胞的选择性增殖,或者读框内发生重排的$V_HD_HJ_H$基因片段的等位排斥现象。该假设是基于以下事实:即,人体骨髓中的绝大多数前B细胞在胞质内表达了μ重链。

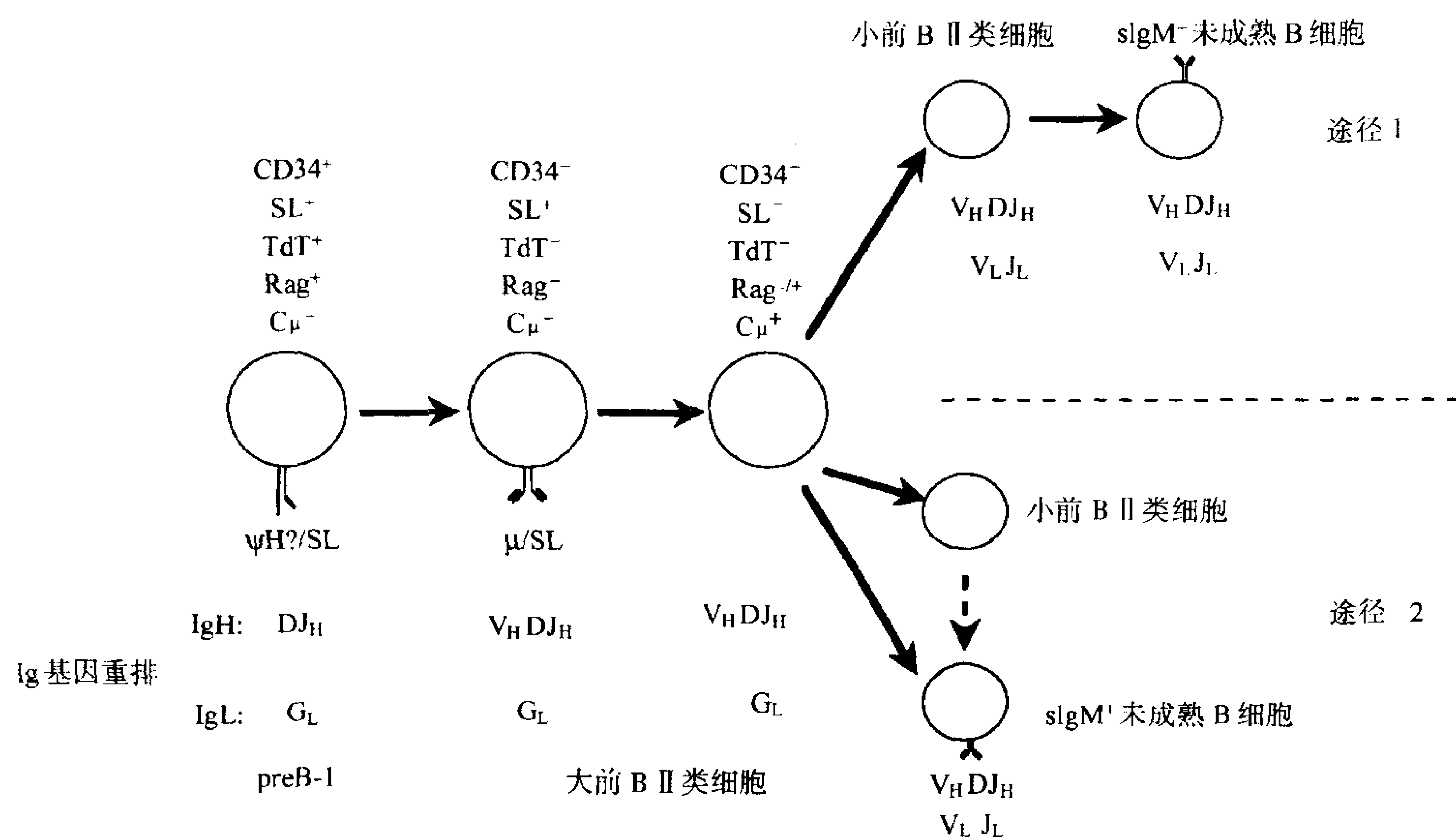
下一个B细胞系为$CD19^+$、$CD10^+$、$CD34^-$、TdT^-、RAG-1低,表达胞质μ重链、前BCR阴性的前BⅡ类细胞,但在本发育阶段,人与小鼠之间还有较小的差异。因此,人体中有少量的前BCR受体的前BⅡ类细胞会经历轻链的重排过程,其数量不很明显,而且,在这些细胞中仍可以检测到低量的前B细胞可变区的mRNA,但检测不到蛋白质。

当人体中大的、循环的、表达前BCR受体的前BⅡ类细胞离开细胞生命周期时,它们会下调RAG蛋白的表达,且不能表达前B细胞可变区。通过对单细胞的PCR分析,发现大多数细胞重排了它们的轻链基因,因此,这些细胞相当于小鼠中的小的、静息的前BⅡ类细胞。

总之,这些结果说明:人体骨髓中B细胞发育的不同阶段,与小鼠的发育阶段极为相似,青年小鼠和青年人的不同前B细胞腔隙的大小也极为相似。通过对某个阶段B细胞不能发育病人的分析鉴定,有助于阐明人—小鼠间更多的相似性,并可找到在人和小鼠B细胞发育过程中参与的细胞因子、细胞表面受体以及信号分子的差异性。

胚胎及成年B细胞的发育

和小鼠一样,人的B细胞发育主要分为两个阶段,即早期的胚胎阶段和出生后阶段,并在成人期继续发育。随着年龄的增长,原B细胞和前B细胞逐渐下降,尽管如此,在人的整个生命期间,B细胞都在发育[285,395]。成年后的B细胞发育主要在骨髓完成,且主要产生B1细胞和常规的B细胞。



	原 B 细胞/前 BⅠ类细胞	大前 BⅡ类细胞类型 1	大前 BⅡ类细胞类型 2	小前 BⅡ类细胞	未成熟 B 细胞	成熟 B 细胞
CD34	+	-	-	-	-	-
CD19	+	+	+	+	+	+
CD10	+	+	+	+	+	-
替代轻链(SL)	+	+	-	-	-	-
	(未知的联合作用)	(μ重链)				
CD40	-	-	-	+	+	+
TdT	+	-	-	-	-	-
μ重链蛋白	-	+	+	+	+	+
RAG-1 RNA	+	nd	nd	+	+	-

图 6.13 人的 B 细胞发育,人 B 细胞在骨髓中的分化表,该图表说明未成熟 B 细胞产生的两条途径,在小前 BⅡ类细胞与 sIgM⁺ 的未成熟 B 细胞之间的过程,由表达 RAG 蛋白的前 BⅡ类细胞继续重排为 κ 轻链和 λ 轻链的基因座[285]。

在妊娠第 8 周的胎肝中就有处于不同阶段的前 B 细胞,在第 9 周,可以检测到 sIgM⁺ 的未成熟的 B 细胞,第 12 周,可检测到 sIgM⁺/sIgD⁺ 双阳性的成熟 B 细胞,以后不久,可在胚胎中检测到开启 Ig 重链基因启动的 B 细胞和分泌 Ig 分子的浆细胞,尽管胎肺和网膜的效率低,但也是产生 B 细胞的胚胎器官[118]。说明:抗原反应性 B 细胞在出生前就已经形成了[396],事实上,在早产儿中就已经发现了该类 B 细胞[397]。在胚胎期第 20~21 周,Ig 分子会从母体向胎盘转移[398],因此,儿童大部分的 Ig 分子是来自母体,出生后逐渐代谢分解,1 月龄只剩余 1/2,逐渐开始由骨髓来源的 Ig 分子代替。所以出生后 3~6 月龄,Ig 水平为最低,IgM 、IgG、IgA 达到正常水平的时间分别为 1 岁、6 岁和青春期。6 月龄时能检测到对破伤风类毒素和白喉毒素的免疫应答,在 2 岁之前还不能检测到对细菌多糖的免疫应答[399~401]。

大约 100 个 V_H 基因片段与胚系期按比例地表达,但不是所有的基因片段都这样表达,有些会过表达,而有些则表达不足,因此,在重组水平上 V_H 基因片段的阴性选择和阳性选择、基因的表达,对蛋白质的利用等方面都与小鼠的相类似。

208

免疫缺陷性疾病

人的 SCID 是一组遗传和表型杂合的疾病[402,403],这会严重地影响到儿童的死亡[404,405],有些 SCID 病人有外周的 B 细胞,而有些则没有。

RAG-1 和 RAG-2 突变

RAG-1 和 RAG-2 突变体,又叫 RAG 突变体[404,405],最早由 Hitzig 等人描述为瑞士型无丙种球蛋白血

症[406]，表现为 T、B 细胞严重缺陷，血清中无 Ig。RAG-1 和 RAG-2 基因首先被克隆在纤维母细胞中[407~409]，在小鼠、人类、鸡、兔、爪蟾等动物中高度保守，可能在鲨鱼、金鱼、大硬鲭鱼和美西钝口螈（axolotl）中也高度保守[408,410~414]。小鼠中这两个基因在2p 上，其 3′端会互相在一起，人类中这两个基因位于 11p 13。它们仅供表达于已知的能介导 V(D)J 片段发生重组的细胞中[408,409,415~417]，细胞生命周期以及胸腺和骨髓中 T、B 细胞的发育时期不同而调节该基因的蛋白表达水平[287,421]。

在文献 422～424 中已经描述了这两个基因在 V(D)J 重组机制中的功能，对小鼠的 RAG-1 或 RAG-2 基因进行定向缺失突变，将停止 T、B 细胞的早期分化[422~424]，在 B 细胞系中，从原 B 细胞/前 BⅠ类细胞向大的前 BⅡ类细胞转变的过程中也会被停止（图 6.3）[425,426]，没有 T 细胞或者 B 细胞的发育。

通过单链构象多态性分析（single-stranded conformation polymorphism analysis）对人的 RAG-1 或 RAG-2 基因座进行筛选[427]，发现：RAG-1 基因有三个多态型，RAG-2 基因只有一个[404,428]。在 SCID 病人也发现了失去 B 细胞功能的 RAG 基因突变[405]。在所有的 SCID 病人中，有 15%是 B 细胞的严重缺陷，其中就有 50%为 RAG 基因突变，另外 50%的基因尚未确认。因此，SCID 突变小鼠的位于 16 号染色体上的编码 DNA-蛋白激酶的基因，在同样缺陷的人中却没有发现[429~432]。不是 RAG 基因突变的 B 细胞严重缺陷病人可能有以下基因或别的基因的突变，如 Ik、EBF、E2A 和 PAX-5 等，但在小鼠中又没有发现这些突变基因。

X 连锁的无丙种球蛋白血症-btk 突变体

Bruton 首先报道了一个患低丙种球蛋白血症的男孩，该男孩极易受细菌感染[433]，X 连锁的无丙种球蛋白血症病人（XLA），其血清 Ig 水平严重低下，但并不缺乏，病人有成熟的 T 细胞，但其 T 细胞依赖的 B 细胞应答受到严重损害[434]，而且缺乏生发中心。

人的 B 细胞发育在两个点上受到损害（图 6.13），第一点是从原 B 细胞/前 BⅠ类细胞向大的前 BⅡ类细胞转变。XLA 病人，原 B 细胞/前 BⅠ类细胞（为 TdT^+ 阳性，胞质 μ 重链阴性）在数量上增加，但大的前 BⅡ类细胞（为 TdT^- 阴性，胞质 μ 重链阳性）在数量和活性上都减少[333,435,436]。第二点是：B 细胞从骨髓到外周淋巴器官的过程中，从未成熟阶段到成熟阶段的转变，$sIgM^+$ B 细胞在外周中的数量大大减少，说明这些细胞是未成熟的表型，并对抗原刺激无应答[434,437]。后一种缺陷与 XID 突变小鼠的 B 细胞发育一样[382,383]。虽然病人的遗传背景异质性与环境的影响存在明显的不同，但人类中的这种缺陷发生在 B 细胞系的内部，而不是由于环境损害所造成[434]，在不同的病人中也不相同。

编码胞质酪氨酸激酶的 btk 基因位于 X 染色体上[438,439]，编码 659 个氨基酸长度的蛋白质，该蛋白属于 Srk 相关的酪氨酸激酶超家族成员，拥有血小板-白细胞底物激酶和一个 tec 同源结构域、一个 src 同源区域（SH3）、一个 SH2 结构域和一个 SH1 激酶结构域[440]，在产生 XLA 表型的所有结构域中都发现了突变体，但是，免疫缺陷病人的严重程度随不同的突变体而有所不同。而且，在人和鼠的血小板-白细胞底物激酶同源结构域内做相同氨基酸的替换，在人体中产生特别严重的表型，而在小鼠中就要轻得多[382,383,441,442]。当人的突变体可能对两者都会有影响时，如果小鼠的突变仅仅影响 B 细胞发育的第二阶段，那么后一种情况就可以解释了。人类中不同突变体可能会影响分化的两个阶段，它们在不同的遗传背景和（或）不同的环境中或多或少地会有以下影响。人类其他的 SCID 缺陷会间接影响 B 细胞的发育，或者影响 B 细胞的成熟阶段[392,434]。

兔的 B 细胞发育

Ig 重链、轻链基因座的结构

兔的 Ig 重链基因座含有多个 V_H 基因（约 200 个）、D_H 基因（10 个以上）和 J_H 基因片段（5 个）[443~445]，和 1 个 C_μ 区域、1 个 C_δ 区域和 13 个 C_ϵ 区域（参见第 3、5、18 章）。在 13 个 C_α 基因的每一个都可表达 IgA 亚类分

子[446~449]。该 IgA 亚类分子的多样性表明:肠相关淋巴组织(GALT)在兔的免疫系统发育和功能中具有重要作用,虽然亚类的功能目前不完全清楚。

90% ~ 95%的 Ig 分子含有 κ 轻链,5% ~ 10%的 Ig 分子含有 λ 轻链,两个 $C_κ$ 基因,每个都与单个的 $J_κ$ 基因片段相关,最大可能与单个的 $V_κ$ 基因相关,它们都不能决定编码这些轻链的 $V_λ$、$J_λ$、$C_λ$ 基因的数量[450~455]。

早期 B 细胞库中位于 3′端 V_H1 片段的用途

大约一半的 V_H 片段是潜在的功能区[443,456~465],但是,还不知道它们的启动子。已经发现兔的 Ig 重链存在多个同种异型[466]。在 IgM、IgG 和 IgA 分子上也先后发现 α 同种异型[467,468]。这明显与过去一个基因编码一条多肽链的认识相违背。Ig 分子 V 区、C 区和编码区重排的发现[469]说明:α 同种异型可能是 V 区重排所致[472]。事实上,是 V_H1 基因段编码兔的 α1、α2 以及 α3 同种异型;换言之,兔存在三种等位基因[473,474]。大多数 B 细胞仅仅使用这三个 V_H 片段。V_Hλ 在 $V_HD_HJ_H$ 重排中生成重链的等位基因[475]。在有各种幻觉精神症状的患老(Alicia)[476]中,这种突变株的 Ig 重链基因座有 10kb 的缺失,其中包括 α2 同种异型的 V_H-Ⅰ片段。结果是:Alicia 不能产生具有 V_H1-α2 的 Ig 分子,但是血浆 Ig 水平正常,而且 B 细胞含有其他 V 区[460,477],说明其他 V_H 区域有功能,并且能建立 B 细胞库。但是不表达 V_H-Ⅰ[478,479]。在正常(Alicia × 正常)F_1 代兔中,所有的 B 细胞和 Ig 分子的同种异型由野生型等位基因 V_H 决定。因此,正常等位基因的中的 3′V_HⅠ基因优先重排导致野生型等位基因在 B 细胞表达中占主要地位(除了突变等位基因的表达)[476]。这些 α 同种异型 V_H 区域在兔 B 细胞库中约为 10% ~ 20%[474]。在注射抗同种异型特异性抗体后,α 同种异型[464,480]表达则受到抑制。

210

在 sIgM 胞内区 μH^+ 的前 B 细胞中,也观察到 V(D)J 重组优先使用 V_Hλ 基因的现象[445]。表明 V_Hλ 并非阳性选择的结果,而在 DNA 水平的重排中就已经占据优势。大多数前 B 细胞 V(D)J 重排仅仅为一个等位基因,而其他等位基因仍维持原状,或仅仅是 D_HJ_H 重排[481]。而小鼠中,一半的 B 细胞有第二等位基因V(D)J 重排发生,另一半是 D_HJ_H 重排[95]。因此,兔重链基因座的等位基因排斥是由 V(D)J 重排所决定,而且兔胚胎还有 B 细胞 V_H1(D)J 重排和优先重排现象[482]。

B 细胞从胚胎发生到出生后生长发育直至衰老死亡的全过程

在妊娠第 17 ~ 21 天,前 B 细胞出现在兔胎肝中,第 25 天出现在骨髓中[483,484],在网膜[118]中也有。胎肝中的前 B 细胞,其发育高峰在出生以后就很快出现,但 10 天后就从肝中消失。

骨髓中,前 B 细胞在出生后第一天就最高,然后很快下降[484~486]。成年兔的前 B 细胞大约只有 1%。但是无法确定它们对维持和更新外周成熟 B 细胞库有什么作用[461,462,487]。有些实验支持以下观点:从 B 细胞系中的原 B 细胞和前 B 细胞能产生有限数量的 B 细胞。理由是,第一,所有兔的 B 细胞都表达 CD5,该标记分子在人和小鼠生命早期的 B1α 细胞系中得到鉴定,成年后就消失,并重新成为 $sIgM^+$ B 细胞[162,175,488]。第二,用异型特异性抗体抑制新生期的 B 细胞,对小鼠 $CD5^+$ 细胞和兔的全部 B 细胞具有长期的影响,认为这种处理消除了 B1 细胞的 $CD5^+$ 分子[480,489]。第三,随着兔的年龄增加,其 V(D)J 片段联合具有更多的多样性[487],重链基因座的 V(D)J 重排序列的多样性是体细胞基因反转,以及 sIg^+ B 细胞中 V(D)J 重排基因座发生点突变的结果。第四,在生命期的早期就可以看到重排基因的表达(如 RAG-1 和 RAG-2 基因),在生命的晚期却不能观察得到[412]。

成年期 Ig 可变区基因的体细胞分化

由于 V_H1 基因的优先使用,新生兔 B 细胞 Ig 库相当有限,对许多抗原均无反应。对抗原的反应随着时间的增长而增长。相应地,V(D)J 重排序列的多样性也增加。4 ~ 5 周,大多数 V(D)J 顺序仍然没有多样

性[487]。密码子的插入、缺失和核苷酸序列簇集的变化,在此基础上的 V_H1 D_HJ_H 片段和上游 V_H 基因的转换形成了主要的多样性。在一月龄之前,重链基因座在 V(D)J 重排时的点突变也能产生更多的多样性[461,490]。无菌兔的多样性是有限的[491,492],这和新生兔相似,对许多抗原刺激没有应答[493]。

肠相关淋巴组织作为 Ig 分化的场所

在肠相关淋巴组织(GALT)的固有层和滤泡,都有 B 淋巴细胞。切除新生兔的阑尾、球囊和肠道集合淋巴结,免疫功能将降低,外周血中的 B 细胞和血浆 Ig 会减少,新生兔只对部分抗原有应答[494]。GALT 在 V 区的变化可能促进 Ig 库的多样化。另外,外界影响(如外来抗原等)将扩展整个库容量。摘除新生兔和裸兔的派尔集合淋巴结,便缺乏抗原应答能力[495]。裸兔的 V(D)J 多样性显著降低,表明抗原刺激对 Ig 多样化和反应性起主要作用。

胚胎羔羊及成年绵羊的 B 细胞发育

绵羊 B 细胞的发生发育过程与另外的哺乳动物显著不同。整妊娠期为 150 天左右,母体血浆的 Ig 分子不能透过胎盘[496]。妊娠约 16 天,卵黄囊开始造血,在植入前 5 天就有红细胞产生。造血的发生引起红细胞、巨核细胞和髓样细胞发育,淋巴细胞发育要在第 21 ~ 23 天才在胎肝中开始。其实,胎肝并非淋巴细胞增殖器官,在第 38 ~ 40 天开始,淋巴细胞在胸腺中开始发育,约第 45 ~ 50 天,脾中开始出现 B 细胞[497,498]。到第 77 天时增加到 20%左右。在第 81 天时,只有约 5%的 $sIgM^+$ 细胞表达 CD5,第 90 天时,可见带有脾白髓滤泡的特征样结构。在第 63 天时,注射抗 IgM 抗体,绵羊脾、派尔集合淋巴结的 B 细胞数量明显降低[499]。羔羊在出生前一星期时,T 细胞数目正常,但是仅有分散的 B 细胞,没有正常的滤泡。这些试验表明:第 63 日的 $sIgM^+$ B 细胞是以后 B 细胞发育的祖先。在妊娠 100 天之前,多数 B 细胞在派尔集合淋巴结产生[500]。第 70 天直到终生,当派尔集合淋巴结停止产生 B 细胞后,骨髓只产生小部分的 B 细胞。出生后,在回肠派尔集合淋巴结的近 100 000 个滤泡中,从广义上说,B 淋巴细胞生成可以看作细胞增殖。切除羊胎和出生后一周新生羔羊的派尔集合淋巴结,将导致 B 淋巴细胞的严重缺乏[501]。这些证据支持派尔集合淋巴结是 B 淋巴细胞的主要发生地的观点,胎羊在出生以前就对抗原有反应,因此,外部微生物菌落抗原在某种程度上并不刺激这样的发育过程[502~504]。对出生前、后回肠派尔集合淋巴结来源的 B 细胞 V 区序列分析发现,出生前无菌的胎儿环境和出生后食物和细菌抗原,促使细胞发生了高度突变[505]。切去胎羊回肠片段,切除羊胎胸腺或羊饲养在无菌条件下,它们 IgⅥ区突变的细胞数目随着年龄变化而变化[506]。替换的突变体 V 区蛋白质结构有偏好性,因此,有证据表明:派尔集合淋巴结对外部抗原无反应性[507]。问题是:前 B 细胞是否在派尔集合淋巴结里产生 B 细胞,$sIgM^+$ B 细胞如何被驱动发生增殖,突变以及在外部抗原缺乏的情况下如何进行选择等。

211

鸡的 B 细胞发育

鸟类的法氏囊是 B 细胞产生最重要的器官(图 6.14,A ~ E)。切除胚胎时期的黏液囊会导致严重的丙种球蛋白缺乏血症。事实上,B 细胞得名也就是由于它们源于鸟类的法氏囊。

胚胎发育

在人、鼠等哺乳动物以外,鸟类不仅是惟一的淋巴细胞研究动物来源,也为免疫系统发育和功能的研究提供了不少方便[512,513]。在胚胎器官发生期间,就可以固定起来进行试验,也可以获得与众不同的初步轮廓。事实上,鸡和鹌鹑的 B 细胞发育非常相似,通过手术的办法,它们的早期胚胎甚至可以做部分交换,将之发育成嵌合体。能通过细胞核或其他标志来区分鸡和鹌鹑的起始细胞[514~516]。

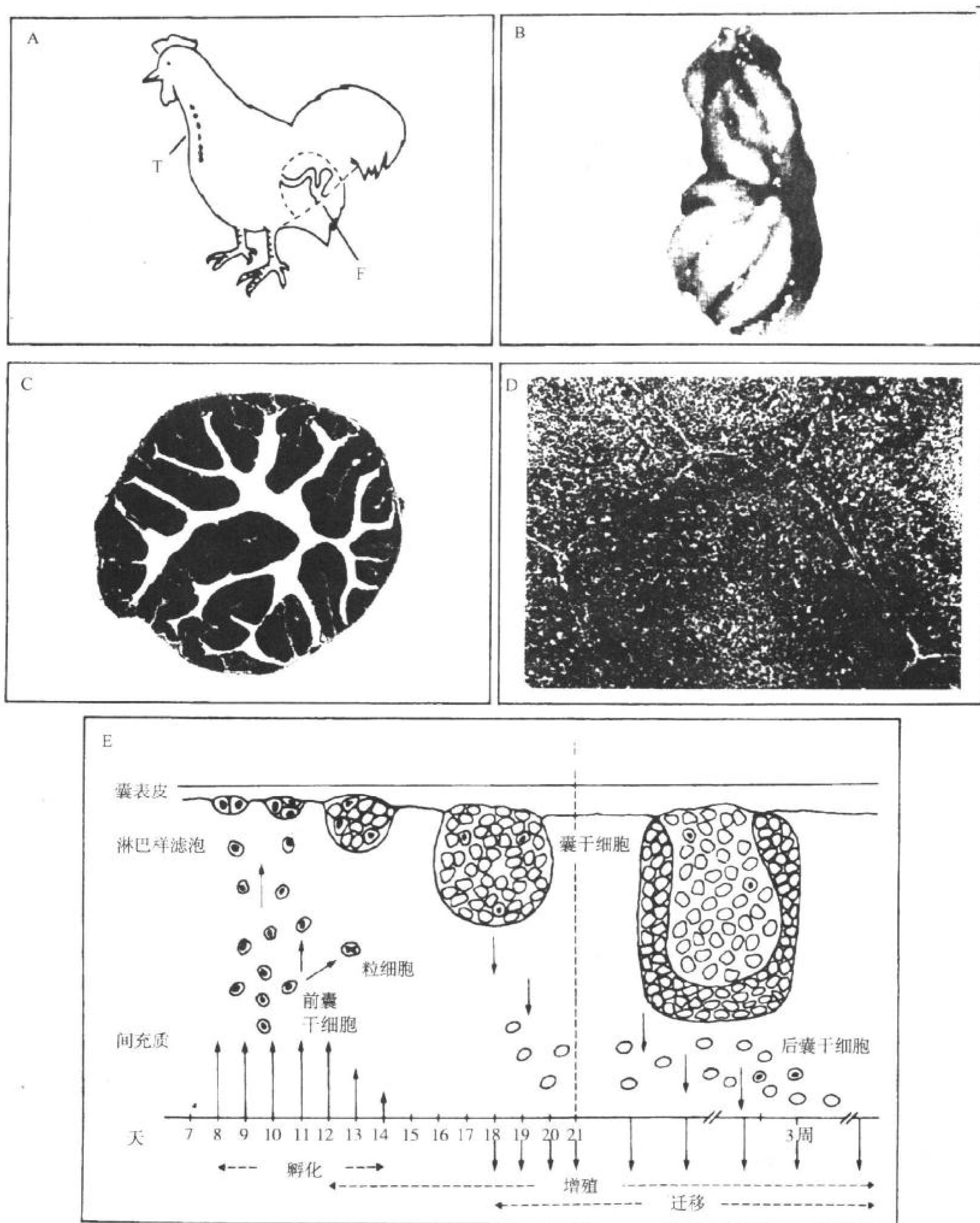


图 6.14 A:胸腺和法氏囊的位置; B:法氏囊; C:在低放大倍数下(10倍)的法氏囊; D:在250倍下的法氏囊; E:在前法氏囊、法氏囊、后法氏囊中的B细胞发育[554]。

鸟类造血干细胞分化发育成B细胞系的途径,在法氏囊作为主要发生地之前或之后都是相同的。因此,干细胞的定义不仅与位置有关,而且与它们恢复机体B细胞群的能力有关(图6.14A~D和E)。法氏囊前干细胞可能源于孵化3天时在主动脉附近的造血岛间充质细胞[518],第7天时,在胚胎间充质就可发现该细胞[519,520]。原始法氏囊在胚胎期第8~15天就开始形成[515,521,522],囊泡发育成10 000个滤泡,每个滤泡来源于2到10个前法氏囊干细胞[523,524]。前法氏囊干细胞可能是sIg阴性[525],法氏囊干细胞却是sIg阳性[523,526~528]。在法氏囊形成期间,注射Ig同种异型抗体,可以引起滤泡B细胞发育受抑,表明定居的前体细胞已经是sIg^+。一个滤泡内大约有$2\times10^5\sim5\times10^5$个细胞数量。第18天,法氏囊B细胞迁移到外周,随之

形成法氏囊后干细胞。孵化三周后，切除法氏囊不再引起丙种球蛋白缺乏血症。6个月后，法氏囊几乎完全消失。$sIgM^+$ B细胞在外周主要定植在骨髓和脾脏。但这些细胞不能像在法氏囊中时那样，可以诱导分化。后法氏囊中$sIgM^+$细胞诱导的分化事件将在下面予以讨论。前法氏囊干细胞和后法氏囊干细胞似乎处于B细胞系发育的不同阶段。

Ig重、轻链基因的组织与重排

鸡的重链和轻链基因座有独特的组织和重排方式。在结构上，轻链座与λ轻链相似，组成包括功能性的V_λ、J_λ和C_λ区段，重排形成轻链的主要部分。在V_λ基因上游段的40kb的范围内，有25个假的可变区基因，在染色体上呈反向平行排列[529,530]。

在重链基因座，功能性V_H1片段通过16个D片段和1个J片段重排形成重链主链。在V_λ基因上游的60~80kb的范围内，有80~100个假V_H基因段，也是反向平行排列的[531,532]。在其3′端，没有重组信号，但是包含了D、J相似的序列。

因此，它们有编码CDR3区V_H的潜在能力。D序列编码8、9或者10个氨基酸。在三个潜在的读框内重排后，读框Ⅰ编码亲水性氨基酸和芳香氨基酸；在读框Ⅱ，编码疏水性氨基酸；终止密码子位于读框Ⅲ内[532,533]。三个读框内的翻译与鼠D_{fl16}和D_{sp2}家族表达的相似。鸡的Dx表达低下，并且在法氏囊B细胞增殖期间存在反向选择现象[532]。在鸡Ig重链基因上可见D-D连接。

来自前B细胞的B细胞群体中，只有一个Ig重链基因座会发生$V_HD_HJ_H$片段重排，而前B细胞主要的两个重链基因座发生V_HJ_H重排。再就是，只有一个Ig轻链基因座会发生V_HJ_H重排[532,534]。在D片段编码的CDR3中具有受到限制的多样性的一条重链和CDR3中几乎不具有多样性的一条轻链都来自带Ig分子的B细胞。而且该Ig分子具有两个确定的CDR1和CDR2区域（如一个带限制性多样性的Ig分子）。推测该CDR1和CDR2区域能够与法氏囊上皮组织的未知抗原结合，该抗原能够诱导初始$sIgM^+$ B细胞增殖，并出现以下所要描述的多样性分化反应[531,534~536]。

基因转换所致的Ig分化

在小鸡中发现了主要的重链基因和轻链基因，也发现了假基因：在鸡的成熟免疫系统中，观察到了Ig分子的异质性，这可能就是基因转变的一种机制，进而产生了基因的多样性。这与Hilschman和Craig[469]、Smithies[537]、Edelmann和Cally[538]提出的有关V基因中产生变异性的重组模型相类似[469,537,538]。

对法氏囊发育期间，其B细胞Ig V区序列进行分析，也证实了这个结论[530,539]。V基因转换事件随着时间的延长而增加，在出生之前，每3周发生1~3次，而在出生之后，增加到4~6次。由此可以估计每10~20次B细胞分裂就有一次基因转换事件发生。用一种转化后的法氏囊来源的B细胞系为研究材料，发现基因转换与RAG-2表达是相互独立的[540]。转换序列的长度范围从10~100个不等，有时甚至会更长些[530]。在早期法氏囊B细胞中会表达未转化的主宰基因，如读框Ⅰ中的D基因。假V_H基因中的D样片段也在读框Ⅰ中，D区变换通常不显著改变这些区域的V区序列，这对与主宰基因高度同源的假V_H基因和V_κ基因更为有利。在发生转换事件的边界处，可以观测到无模板突变现象，甚至有可能发生体细胞的点突变[541]。但值得注意的是，V(D)J重排后的体细胞突变只发生在两条主宰基因中的一个，这样避免了在单个B细胞内出现等位基因相互包容的问题。

在前法氏囊、法氏囊、后法氏囊中的基因重排和基因转换

采用PCR分析，对鸡B细胞发育过程中的重链和轻链基因座的分布格局进行研究，结果显示：D_HJ_H重排开始于孵化后的第5~6天（也就是说，此时造血祖细胞开始向蛋黄囊迁移）。如果这些重排是有细胞迁移诱导，那么，可能是蛋黄囊微环境或内胚层主动脉周的微环境所引起的。当前法氏囊干细胞定植于不同的淋巴

器官时，继续发生 D_H 基因与 J_H 基因的重排。在胚胎期的第1～2天或更晚些，胚胎循环中可以发现第一个有 $V_HD_HJ_H$ 重排重链基因座的细胞，但并未出现在细胞循环中[532,542]。在胚胎期第8天的卵黄囊中，发生 D_HJ_H 重排的原B细胞约有1000～2000个(此后消失)，在第10天在血液中，约为 $1\times10^5\sim2.5\times10^5$ 个，第13天，就增加到 $2.5\times10^5\sim5\times10^5$ 个，第17天减少到 10^3 左右。在脾中，上述时间范围内的细胞数量分别是：$2\times10^3\sim5\times10^3$、$5\times10^5$ 和 $2\times10^3\sim4\times10^4$。骨髓中则分别是：10～20、$10^5$ 和 $2\times10^3\sim10^4$。

在胚胎期的第17天时，法氏囊是数量增加的惟一器官，其数量在第10、13、17天时分别是：10^2、10^3 和 10^6[543]。在B细胞发育中期和死亡过程中，尚不明了脾脏和骨髓是否有重要作用[528,543～545]。在第10和第13天的 $sIgM^+$ B细胞中，可见发生 $V_HD_HJ_H$ 重排的重链和 V_HJ_H 重排的轻链。因此，在法氏囊定植以前，至少有部分V(D)J基因就已经发生了重排[546]。轻链的 V_HJ_H 重排和重链的 $V_HD_HJ_H$ 重排在发生时间上没有差异。最初没有N区插入，而且读框Ⅰ占优势。B细胞在法氏囊发育时，读框内的基因表达没有什么变化，表明读框DNA序列选择应该发生在 $V_HD_HJ_H$ 重排水平上(如B细胞表达的重链)[532]。

在细胞大量增殖期间，$sIgM^+$ B细胞产生的 $V_HD_HJ_H$ 重排和 V_HJ_H 重排要比 sIg^- 细胞的多，平均有2～10个细胞定植在每个滤泡内，经过15～16次分裂后，增加到 $1\times10^5\sim2\times10^5$ 个。如果最初的Ig分子在法氏囊上皮环境中就识别自身抗原，同时识别的信号不断增强的话，任何特异性识别自身抗原的能力就会转向，其他特异性的细胞将停止增殖，同时会获得新的特异性。在小鸡出生时，104个滤泡每天产生 $1\times10^9\sim2\times10^9$ 个细胞，其中至少 10^8 个细胞有转化的V区基因。法氏囊是产生变异体的淋巴器官，在将Ig基因结构弄清楚之前，Jerne就推测有这样的变异体发育器官，才能合理解释产生抗体差异性[547]。

鸡的法氏囊B细胞在出生时达到一个高峰，在出生以后的后法氏囊B细胞发育中不再出现基因重排[533]。而且，随着法氏囊的复杂化，由于基因转化产生多样性的区域逐步消失，在体细胞突变时，是否有其他区域能产生多样性？能否与B细胞共同生存，保持自我更新能力等，均有待做进一步的研究。

B淋巴细胞生成及其变化的规律

很明显，不同物种的B淋巴细胞产生Ig的多样性是不同的，当然其中也有共同之处。

所有物种的淋巴细胞均源于多能造血干细胞，在特定的微环境中，前体细胞首先通过V(D)J基因重排产生 sIg^+ 细胞，在此进程中需要RAG-1、RAG-2以及TdT产物。

在人和小鼠，这些V(D)J重排是有顺序的，即，D_H-J_H 重排发生在 V_H-V_HD_H 和 V_H-J_H 之前。因此，重排机制应当是基因开启或关闭的重要特征。在形成前BCR时，替代轻链在重排的顺序中非常必要。

其他物种(如鸡)的所有基因座都立即重排，而没有在不同的细胞阶段分开进行。在成熟B细胞中是否有V(D)J基因的再次重排，需要做更深入的研究[548,549]。可以确定在所有物种中，在胚胎发育时期就已经开始了B细胞发育和V(D)J基因的重排。

产生第一代 $sIgM^+$ B细胞库时，似乎只有兔和鸡的B细胞库可以终身保留使用，在这些物种成年期的免疫系统中，B细胞的更新补充依赖于sIg阳性的干细胞。人和小鼠则源于sIg阴性的前体细胞，这种能力随着年龄增加而减弱。另一方面，人和小鼠也有 sIg^+ 的干细胞，它们至少在所在的区域内能再生部分B细胞系，其效率也随着年龄增加而下降。目前尚不清楚自身抗原的识别是如何发生的，也不知道会有怎样的具体影响。V_H 区的V(D)J重排和 V_H 表达不是随机的，倾向于选择特定的 V_H 区，在Ig分子中表达 V_H 区。事实上，鸡的胚系基因库中只有一个功能性 V_H 片段。让人吃惊的是，这些优先选择的 V_H 片段如何在进化中得以保存？同样的 V_H 区域，在早期发育中会优先利用，而后期则不然。库容的变化就是通过细胞的新旧更替来实现的，另一方面，在V(D)J重排位点上，V区在DNA水平上可以被另一个代替。上述变化在人和小鼠中均可发现，但在鸡和兔中，通过 sIg^+ 干细胞的基因变换，使V区序列发生改变。在受到抗原刺激之前，绵羊V基因编码库变化的重要分子机制是其早期点突变，特定淋巴器官的微环境对于B细胞库的发育和变化至关

重要，很明显，庞大的 B 细胞库的多样性都源于少量的 sIg^- 或 sIg^+ 细胞不断的扩增所致。因此，微环境为 B 细胞的 V(D)J 重排、V 区替换、转换和（或）V 区高度突变，以及细胞的增殖提供了诱导因素。我们对微环境需要做更多的了解，特别是其中牵涉的分子，尤其包括能与 BCR 或 BCR 前体、细胞因子受体以及细胞间相互作用的分子。在淋巴细胞发生器官的 sIg V 区突变可能改变前 BCR^+ 或 BCR^+ B 细胞的命运。目前只有对小鼠有些稍微清楚地了解，呈现的 B 细胞库经过终止分化和无反应性的阴性选择，甚至可能存在的阳性选择。但是，即使是在小鼠也还不清楚 B 淋巴细胞系谱和常规 B 细胞库是如何受阳性选择和阴性选择所修订的，但两者却又明显不同。在其他物种中，其 B 细胞库的阳性选择和阴性选择也需要做进一步的研究。B 淋巴细胞系谱在发育过程中是连续变化的，而且外部抗原的接触是无法预计的，很明显，每个个体的免疫系统都不会是完全相同的。因此，任何物种的 B 细胞生成与其年龄有关。鼠和人的 B 细胞系发育阶段和库容大小都很相似，很多有关小鼠 B 细胞的研究结果也许都实用于人类，这对最终进行 B 细胞系相关的免疫缺陷和自身免疫疾病诊断和治疗都非常重要。

214

更让人吃惊的是，小鼠骨髓中的 B 细胞发育和胸腺中的 T 细胞发育十分相似（图 6.15），胸腺和骨髓细胞数量相近，前胸腺细胞（与前 B 细胞相当）和 $CD4^-$ $CD8^-$ 胸腺细胞（与胸腺中前 B Ⅰ类细胞相当）大约占所有胸腺细胞的 3%，可参与体内的活性循环，表达 c-kit，而且在体外对 IL-7 和 SCF 的刺激有增殖反应。辐射后宿主的胸腺经过胸腺内移植可以通过 c-kit^+ 前体细胞重建，小鼠未出生前，TdT 在胸腺细胞不表达，出生后 3～5 天才开始表达，TCRβ 基因发生重排的时间要比 TCRα 基因的重排时间更早。

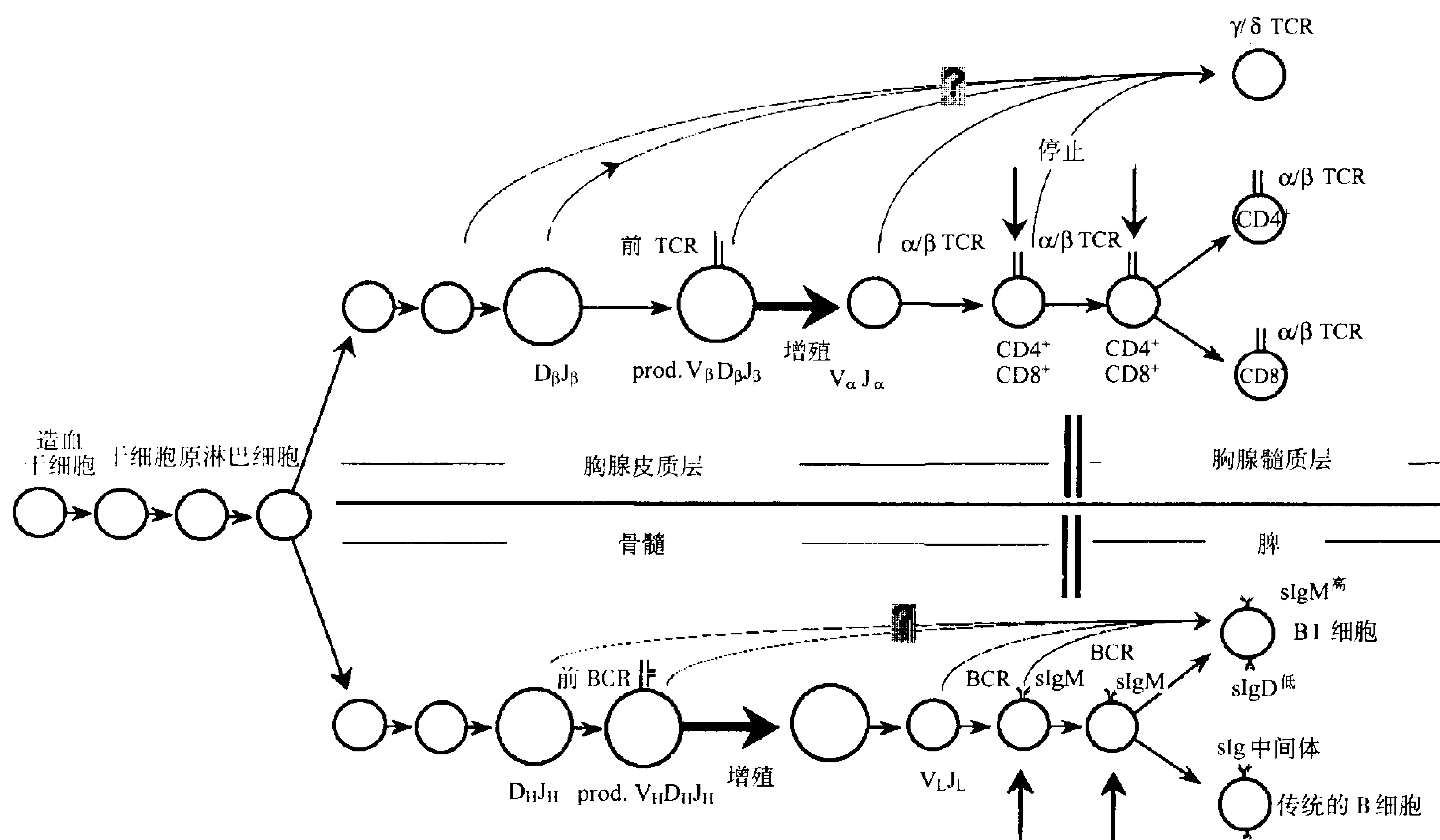


图 6.15　胸腺中 T 细胞发育与骨髓、脾中的 B 细胞发育的相似性。

为了监测 V_H 基因到 $D_H J_H$ 片段的重排，B 和 T 细胞系进化时产生替代链，该链与前淋巴细胞的 TCRβ 链或 μ 重链共表达，这些替代链可以看作淋巴细胞发育的窗口。在 B 细胞系和 T 细胞系中，它们起到控制增生的作用，而且是等位排斥的。免疫系统演变出两种相似但又明显不同的替代链，而作用又十分相近，所以这个问题非常有吸引力。

215

B、T 细胞系发育过程中的明显相似之处是：自身反应性细胞的阴性选择。给人印象特别深刻的是，转导 TCRβ、μ 重链、或 α/βTCR 或 IgM 的基因给免疫重排缺失小鼠后，它们具有对初级淋巴器官或外周表达的自身

抗原的特异性反应性，从而导致分化终止或无反应状态。

在 B 和 T 细胞系的幼稚阶段，表达抗原受体的细胞，基因重排机制仍起作用，允许轻链和 TCRα 链的二级重排。T 细胞可以在 V(D)J 重排缺失的情况下，分化到 CD4/CD8 双阳性，甚至到 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ 单阳性阶段。每天从胸腺和骨髓来源的表达抗原受体的未成熟细胞(约 5×10^7)中，两种细胞各有 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 的数量进入外周，有关 T 淋巴细胞发育的阳性选择已经了解得比较清楚，但是，B 细胞发育的相关机制尚有待进一步了解。

(吕凤林 译)

参 考 文 献

1. Zon LI. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* 1995;86:2876–2891.
2. Eichmann A, Corbel C, Nataf V, Vaigot P, Breant C, Le Douarin NM. Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5141–5146.
3. Müller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1994;1: 291–301.
4. Morrison SJ, Wright DE, Cheshier SH, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: challenges to expectations. *Curr Opin Immunol* 1997;9:216–221.
5. Cumano A, Dieterlen Lievre F, Godin I. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 1996;86:907–916.
6. Siminovitch L, McCulloch E, Till E. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol* 1963;62:327–336.
7. Wu A, Till J, Siminovitch L, McCulloch E. A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *J Cell Physiol* 1967;69:177–184.
8. Wu A, Till J, Siminovitch L, McCulloch E. Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J Exp Med* 1968;127:455–467.
9. Cooper MD, Van Alten PJ, Good RA. Development and function of the immunoglobulin producing system. I. Effect of bursectomy at different stages of development on germinal centers, plasma cells, immunoglobulins, and antibody production. *Int Arch Allergy* 1969;35:242–252.
10. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988;241:58–62.
11. Jordan CT, Lemischka IR. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev* 1990;4:220–232.
12. Smith LG, Weissmann IL, Heimfeld S. Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2788–2792.
13. Moore MAS, Metcalf D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of *in vivo* and *in vitro* colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 1970;18:279–296.
14. Dieterlen-Lièvre F. On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J Embryol Exp Morphol* 1975;33:607–619.
15. Keller G, Paige C, Gilboa E, Wagner EF. Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoietic precursors. *Nature* 1985;318:149–154.
16. Fulop GM, Phillips RA. Use of *scid* mice to identify and quantitate lymphoid-restricted stem cells in long-term bone marrow cultures. *Blood* 1989;74: 1537–1544.
17. Keller G, Snodgrass R. Life span multipotential hematopoietic stem cells in vivo. *J Exp Med* 1990;171:1407–1418.
18. Snodgrass R, Keller G. Clonal fluctuation within the haematopoietic system of mice reconstituted with retrovirus-infected stem cells. *EMBO J* 1987;6: 3955–3960.
19. Evans MJ, Kaufmann MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154–156.
20. Magnuson T, Epstein CJ, Silver LM, Martin GR. Pluripotent embryonic stem cell lines can be derived from tw5/tw5 blastocysts. *Nature* 1982;298:750–753.
21. Martin G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by terratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7634–7638.
22. Potocnik AJ, Nielsen PJ, Eichmann K. *In vitro* generation of lymphoid precursors from embryonic stem cells. *EMBO J* 1994;13:5274–5283.
23. Potocnik AJ, Köhler H, Eichmann K. Hemato-lymphoid in vivo reconstitution potential of subpopulations derived from in vitro differentiated embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10295–10300.
24. Potocnik AJ, Nerz G, Köhler H, Eichmann K. Reconstitution of B cell subset in RAG deficient mice by transplantation of in vitro differentiated embryonic stem cells. *Immunol Lett* 1997;57:131–137.
25. Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:9065–9069.
26. Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987;51:503–512.
27. Stewart TA, Mintz B. Successive generations of mice produced from an established culture line of euploid teratocarcinoma cells. *J Embryol Exp Morphol* 1981;70:99–112.
28. Rossant J, McBurney MW. The developmental potential of a euploid male teratocarcinoma cell line after blastocyst injection. *J Embryol Exp Morphol* 1992;70: 99–112.
29. Torres RM, Kühn R. *Laboratory protocols for conditional gene targeting*. Oxford: Oxford University Press, 1997.
30. Chen J. Analysis of gene function in lymphocytes by RAG-2-deficient blastocyst complementation. *Adv Immunol* 1996;62:31–59.
31. Lemischka IR, Raulet D, Mulligan RC. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* 1986;45:917–927.
32. Harrison DE, Lerner C, Hoppe PC, Carlson GA, Alling D. Large numbers of primitive stem cells are active simultaneously in aggregated embryo chimeric mice. *Blood* 1987;69:773–777.
33. Harrison DE, Astle CM, Lerner C. Number and continuous proliferative pattern of transplanted primitive immunohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:822–826.
34. Pietrzyk ME, Priestley GV, Wolf NS. Normal cycling patterns of hematopoietic stem cell subpopulations: an assay using long-term *in vivo* BrdU infusion. *Blood* 1985;66:1460–1462.
35. Morrison SJ, Hemmati HD. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10302–10306.
36. Li CL, Johnson GR. Murine hematopoietic stem and progenitor cells. I. Enrichment and biologic characterization. *Blood* 1995;85:1472–1479.
37. Spangrude GJ, Brooks DM, Tumas DB. Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells: *in vivo* expansion of stem cell phenotype but not function. *Blood* 1995;85:1006–1016.
38. Morrison SJ, Weissmann IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1994;1: 661–673.
39. Doi H, Inaba M, Yamamoto Y, et al. Pluripotent hemopoietic stem cells are c-kit$^{<low}$. *Immunology* 1997;94:2513–2517.
40. Bodine DM, Seidel NE, Zsebo KM, Orlic D. *In vivo* administration of stem cell factor to mice increases the absolute number of pluripotent stem cells. *Blood* 1993;82:445–455.
41. Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Weissman IL. Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3760–3764.
42. Laterveer L, Lindley IJD, Heemskerk DPM, Camps JAJ, Pauwels EKJ, Willemze R, Fibbe WE. Rapid mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by a single intravenous injection of interleukin-8. *Blood* 1997;87: 781–788.
43. Laterveer L, LI J, Hamilton MS, Willemze R, Fibbe WE. Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood* 1995;85:2269–2275.
44. Papayannopoulou T, Nakamoto B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA integrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 9374–9378.
45. Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS. The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and

spleen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9647–9751.
46. Arroyo A, Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Differential requirements for alpha-4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell* 1996;85:997–1008.
47. Ceredig R, ten Boekel E, Rolink A, Melchers F, Andersson J. Fetal liver organ cultures allow the proliferative expansion of pre-B receptor-expressing pre-B II cells and the differentiation of immature and mature B cells in vitro. *Intl Immunol* 1998;10:49–59.
48. Mertsching E, Grawunder U, Meyer V, Rolink T, Ceredig R. Phenotypic and functional analysis of B lymphopoiesis in interleukin-7-transgenic mice: expansion of pro/pre-B cell number and persistence of B lymphocyte development in lymph nodes and spleen. *Eur J Immunol* 1996;26:28–33.
49. Tsuji K, Lyman SD, Sudo T, Clark SC, Ogawa M. Enhancement of murine hematopoiesis by synergistic interactions between steel factor (ligand for *c-kit*), interleukin-11, and other early acting factors in culture. *Blood* 1992;11:2855–2860.
50. Hirayama F, Shih JP, Awgulewitsch A, Warr GW, Clark SC, Ogawa M. Clonal proliferation of murine lymphohemopoietic progenitors in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5907–5911.
51. Sui X, Tsuji K, Tanaka R, et al. gp130 and c-Kit signalings synergize for *ex vivo* expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;92:2859–2863.
52. Veiby OP, Jacobsen FW, Cui L, Lyman SD, Jacobsen SEW. The *flt3* ligand promotes the survival of primitive hemopoietic progenitor cells with myeloid as well as B lymphoid potential. *Am Assoc Immunol* 1996;157:2953–2960.
53. Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Smith AJ, Rabbitts TH. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* 1994;78:45–57.
54. Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 1996;86:47–57.
55. Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 1992;80:575–581.
56. Weiss MJ, Orkin SH. GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol* 1995;23:99–107.
57. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, et l. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994;371:221–226.
58. Tavassoli M. Embryonic and fetal hematopoiesis: an overview. *Blood Cells* 1991;1:269–281.
59. Kennedy M, Firpo M, Choi K, et al. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 1997;386:488–493.
60. Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12355–12358.
61. Onodara K, Takahashi S, Nishimura S, et al. GATA-1 transcription is controlled by distinct regulatory mechanisms during primitive and definitive erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4487–4492.
62. Okuda T, Van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996;84:321–330.
63. Sasaki K, Yagi R, Bronson RT, et al. Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor β. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12359–12363.
64. Nuez B, Michalovich D, Bygrave A, Ploemacher R, Grosveld F. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature* 1995;375:316–318.
65. Melchers F, Abramczuk J. Murine embryonic blood between day 10 and 13 of gestation as a source of immature precursor B cells. *Eur J Immunol* 1980;10:763–767.
66. Delassus S, Cumano A. Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo. *Immunity* 1996;4:97–106.
67. Hirsch E, Iglesias A, Potocnik AJ, Hartmann U, Fassler R. Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of beta-1 integrins. *Nature* 1996;380:171–175.
68. Shalaby F, Ho J, Stanford WL, et al. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997;89:981–990.
69. Klemsz M, McKercher S, Celada A, Van Beveren C, Maki R. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* 1990;61:113–124.
70. Hromas R, Orazi A, Neiman R, et al. Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1. *Blood* 1993;182: 2998–3004.
71. Goebl M. The PU.1 transcription factor is the product of the putative oncogene Spi-1. *Cell* 1990;61:1165–1166.
72. Singh H. Gene targeting reveals a hierarchy of transcription factors regulating specification of lymphoid cell fates. *Curr Opin Immunol* 1996;8:160–165.
73. Nelsen B, Tian G, Erman B, et al. Regulation of lymphoid-specific immunoglobulin μ heavy chain gene enhancer by ETS-domain proteins. *Science* 1993;261: 82–86.
74. Eisenbeis C, Singh H, Storb U. PU.1 is a component of a multi-protein complex which binds an essential site in the murine immunoglobulin λ2–4 enhancer. *Mol Cell Biol* 1993;13:6452–6461.
75. Hagman J, Grosschedl R. An inhibitory carboxyl-terminal domain in Ets-1 and Ets-2 mediates differential binding of ETS family factors to promoter sequences of the mb-1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:8889–8893.
76. Feldhaus AL, Mbangkollo D, Arvin KL, Klug CA, Singh H. BLyF, a novel cell-type-and stage-specific regulator of the B-lymphocyte gene mb-1. *Mol Cell Biol* 1992;12:1126–1133.
77. Shin M, Koshland M. Ets-related protein PU.1 regulates expression of the immunoglobulin J-chain gene through a novel Ets-binding element. *Genes Dev* 1993;7:2006–2015.
78. McKercher S, Torbett BE, Anderson KL, et al. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* 1996;15: 5647–5658.
79. Tondravi MM, McKercher SR, Anderson K, et al. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* 1997;386:81–84.
80. Hayase Y, Muguruma Y, Lee MY. Osteoclast development from hematopoietic stem cells: apparent divergence of the osteoclast lineage prior to macrophage commitment. *Exp Hematol* 1997;25:19–25.
81. Hayashi S, Miyamoto A, Yamane T, et al. Osteoclast precursors in bone marrow and peritoneal cavity. *J Cell Physiol* 1997;170:241–247.
82. Girasole G, Passeri G, Jilka RL, Manolagas SC. Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development. *J Clin Invest* 1994;93:1516–1524.
83. Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, et al. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 1994;79:143–156.
84. Molnar A, Georgopoulos K. The *Ikaros* gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA binding proteins. *Mol Cell Biol* 1994;14:8292–8303.
85. Wang J-H, Nichogiannopoulou A, Wu L, et al. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an ikaros null mutation. *Immunity* 1996;5:537–549.
86. Müller-Sieburg CE, Whitlock CA, Weissman IL. Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1[lo] hematopoietic stem cell. *Cell* 1986;44:653–662.
87. Rolink A, Andersson J, Ghia P, et al. Molecular mechanisms guiding B cell development. In: Ochs H, Smith E, Puck J, eds. *Primary immunodeficieny diseases: a molecular and genetic approach.* 1998 (*in press*).
88. Opstelten D. B lymphocyte development and transcription regulation *in vivo*. *Adv Immunol* 1996;63:197–268.
89. Bain G, Maandag EC, Izon DJ, et al. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 1994;79:885–892.
90. Zhuang Y, Soriano P, Weintraub H. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 1994;79:875–884.
91. Schlissel M, Voronova A, Baltimore D. Helix-loop-helix transcription factor E47 activates germ-line immunoglobulin heavy-chain gene transcription and rearrangement in a pre-T-cell line. *Genes Dev* 1991;5:1367–1376.
92. Choi JK, Shen CP, Radomska HS, Eckhardt LA, Kadesch T. E47 activates the Ig-heavy chain and TdT loci in non-B cells. *EMBO J* 1996;15:5014–5021.
93. Hagman J, Travis A, Grosschedl R. A novel lineage-specific nuclear factor regulates mb-1 gene transcription at the early stages of B cell differentiation. *EMBO J* 1991;10:3409–3417.
94. Lin H, Grosschedl R. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* 1995a;376:263–267.
95. Gong S, Nussenzweig MC. Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Igβ. *Science* 1996;272:411–414.
96. van de Wetering M, Oosterwegel M, van Norren K, Clevers H. Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J* 1993;12:3847–3854.
97. Schilham MW, Oosterwegel MA, Moerer P, et al. Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* 1996;380:711–714.
98. Walther C, Guenet JL, Simon D, et al. Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics* 1991;11:424–434.
99. Stoykova A, Gruss P. Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 1994;14:1395–1412.
100. Strachan T, Read AP. PAX genes. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:427–438.
101. Urbanek P, Wang ZQ, Fetka I, Wagner EF, Busslinger M. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* 1994;79:901–912.
102. Busslinger M, Urbanek P. The role of BSAP (Pax-5) in B-cell development. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:595–601.
103. Kozmik Z, Wang S, Dorfler P, Adams B, Busslinger M. The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol Cell Biol* 1992;12:2662–2672.
104. Zwollo P, Desiderio S. Specific recognition of the blk promoter by the B-lymphoid transcription factor B-cell-specific activator protein. *J Biol Chem* 1994; 269:15310–15317.
105. Okabe T, Watanabe T, Kudo A. A pre-B- and B cell-specific DNA-binding protein, EBB-1, which binds to the promoter of the V_{preB1} gene. *Eur J Immunol* 1992;22:37–43.
106. Neurath MF, Strober W, Wakatsuki Y. The murine Ig 3′ alpha enhancer is a target site with repressor function for the B cell lineage-specific transcription factor BSAP (NF-HB, S alpha-BP). *J Immunol* 1994;153:730–742.
107. Waters SH, Saikh KU, Stavnezer J. A B-cell-specific nuclear protein that binds to DNA sites 5′ to immunoglobulin S_α tandem repeats is regulated during dif-

ferentiation. *Mol Cell Biol* 1989;9:5594–5601.
108. Rothman P, Li SC, Gorham B, Glimcher L, Alt F, Boothby M. Identification of a conserved lipopolysaccharide-plus-interleukin-4-responsive element located at the promoter of germ line epsilon transcripts. *Mol Cell Biol* 1991;11: 5551–5561.
109. Liao F, Giannini SL, Birshtein BK. A nuclear DNA-binding protein expressed during early stages of B cell differentiation interacts with diverse segments within and 3′ of the Ig H chain gene cluster. *J Immunol* 1992;148:2909–2917.
110. Xu L, Kim MG, Marcu KB. Properties of B cell stage specific and ubiquitous nuclear factors binding to immunoglobulin heavy chain gene switch regions. *Int Immunol* 1992;4:875–887.
111. Nutt SL, Urbanek P, Rolink A, Busslinger M. Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev* 1997;11:476–491.
112. Cooper MD, Peterson RDA, Good RA. Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. *Nature* 1965;205:143–146.
113. Kincade PW. Formation of B lymphocytes in fetal and adult life. *Adv Immunol* 1981;31:177–245.
114. Owen JJT, Raff MC, Cooper MD. Studies on the generation of B lymphocytes in the mouse embryo. *Eur J Immunol* 1975;5:468–473.
115. Melchers F. Three waves of B lymphocyte development during embryonic development in the mouse. In: le Douarin N, ed. *Cell lineage, stem cells and cell determination. INSERM Symposium 10*, vol 10. Amsterdam: Elsevier Science, 1979a:281–289.
116. Melchers F. Murine embryonic B lymphocyte development in the placenta. *Nature* 1979b;277:219–221.
117. Marcos MA, Gutierrez JC, Huetz F, Martinez C, Dieterlen-Lievre F. Waves of B-lymphopoiesis in the establishment of the mouse B-cell compartment. *Scand J Immunol* 1991;34:129–135.
118. Solvason N, Kearney JF. The human fetal omentum: a site of B cell generation. *J Exp Med* 1992;175:397–404.
119. Owen JJT, Cooper MD, Raff MC. *In vitro* generation of B lymphocytes in mouse fetal liver, a mammalian "bursa equivalent". *Nature* 1974;249:361–363.
120. Rolink A, Haasner D, Nishikawa SI, Melchers F. Changes in frequencies of clonable preB cells during life in different lymphoid organs of mice. *Blood* 1993c;81:2290–2300.
121. Strasser A, Rolink T, Melchers F. One synchronous wave of B cell development in mouse fetal liver changes at day 16 of gestation from dependence to independence of a stromal cell environment. *J Exp Med* 1989;170:1973–1986.
122. Melchers F. B lymphocyte development in fetal liver. I. Development of reactivities to B cell mitogens *in vivo* and *in vitro*. *Eur J Immunol* 1977a;7:476–481.
123. Rosenberg YJ, Cunningham AJ. Ontogeny of the antibody-forming cells in mice. I. Kinetics of appearance of mature B cells. *Eur J Immunol* 1976a;5:444–447.
124. Rosenberg YJ, Cunningham AJ. Ontogeny of the antibody-forming cells in mice. II. Maturation of B cells during fetal development. *J Immunol* 1976b;117: 1618–1621.
125. Clevers HC, Grosschedl R. Transcriptional control of lymphoid development: lessons from gene targeting. *Immunol Today* 1996;17:336–343.
126. Holmberg D, Anderson A, Carlsson L, Forsgren S. Establishment and functional implications of B cell connectivity. *Immunol Rev* 1989;110:889–903.
127. Gu H, Förster I, Rajewsky K. Sequence homologies, N sequence insertion and J_H gene utilization in V_HDJ_H joining: implications for the joining mechanism and the ontogenetic timing of Ly1 B cell and B-CLL progenitor generation. *EMBO J* 1990;9:2133–2140.
128. Meek K. Analysis of junctional diversity during B lymphocyte development. *Science* 1990;250:820–823.
129. Feeney A. Lack of N regions in fetal and neonatal mouse immunoglobulin V-D-J junctional sequences. *J Exp Med* 1990;172:1377–1390.
130. Gregoire KE, Goldschneider I, Barton RW, Bollum FJ. Ontogeny of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive cells in lymphohemopoietic tissues of rat and mouse. *J Immunol* 1979;123:1347–1352.
131. Osmond DG. Proliferation kinetics and the lifespan of B cells in central and peripheral lymphoid organs. *Curr Opin Immunol* 1991;3:179–185.
132. Hermans MH, Hartsuiker H, Opstelten D. An *in situ* study of B-lymphocytopoiesis in rat bone marrow. Topographical arrangement of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive cells and pre-B cells. *J Immunol* 1989;142:67–73.
133. Jacobsen K, Osmond DG. Microenvironmental organisation and stromal cell associations of B lymphocyte precursor cells in mouse bone marrow. *Eur J Immunol* 1990;20:2395–2404.
134. Fulop GM, Osmond DG. Regulation of bone marrow lymphocyte production. III. Increased production of B and non-B lymphocytes after administering systemic antigens. *Cell Immunol* 1983a;75:80–90.
135. Fulop GM, Osmond DG. Regulation of bone marrow lymphocyte production. IV. Cells mediating the stimulation of marrow lymphocyte production by sheep red blood cells: studies in anti-IgM-suppressed mice, athymic mice, and silica-treated mice. *Cell Immunol* 1983b;75:91–102.
136. Fulop G, Gordon J, Osmond DG. Regulation of lymphocyte production in the bone marrow. I. Turnover of small lymphocytes in mice depleted of B lymphocytes by treatment with anti-IgM antibodies. *J Immunol* 1983c;130:644–648.
137. Opstelten D, Osmond DG. Pre-B cells in mouse bone marrow: immunofluorescence stathmokinetic studies of the proliferation of cytoplasmic μ-chain-bearing cells in normal mice. *J Immunol* 1983;131:2635–2640.
138. Opstelten D, Osmond DG. Regulation of pre-B cell proliferation in bone marrow: immunofluorescence stathmokinetic studies of cytoplasmic μ-chain-bearing cells in anti-IgM-treated mice, hematologically deficient mutant mice and mice given sheep red blood cells. *Eur J Immunol* 1985;15:599–605.
139. Lu L, Osmond DG. Apoptosis during B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *J Immunol* 1997;158:5136–5145.
140. Dejbakhsh-Jones S, Okazaki H, Strober S. Similar rates of production of T and B lymphocytes in the bone marrow. *J Exp Med* 1995;181:2201–2211.
141. Osmond DG. The turnover of B lymphocyte populations. *Immunol Today* 1993;14:34–37.
142. Fulop GM, Pietrangeli CE, Osmond DG. Regulation of bone marrow lymphocyte production: IV. Altered kinetic steady state of lymphocyte production after chronic changes in exogenous stimuli. *Exp Hematol* 1986;14:27–34.
143. Pietrangeli CE, Osmond DG. Regulation of B-lymphocyte production in the bone marrow: role of macrophages and the spleen in mediating responses to exogenous agents. *Cell Immunol* 1985;94:147–158.
144. Osmond DG, Fulop GM, Opstelten D, Pietrangeli C. *In vivo* regulation of B lymphocyte production in the bone marrow: effects and mechanism of action of exogenous stimuli on pre-B cell proliferation and lymphocyte turnover. *Adv Exp Med Biol* 1985;186:35–46.
145. Rico-Vargas SA, Potter M, Osmond DG. Perturbation of B cell genesis in the bone marrow of pristane-treated mice. Implications for plasmacytoma induction. *J Immunol* 1995;154:2082–2091.
146. Potter M. Genetics of susceptiblity to plasmacytoma development in BALB/c mice. *Cancer Surv* 1984;3:247–264.
147. Cancro M, Potter M. The requirement of an adherent cell substratum for the growth of developing plasmacytoma cells in vivo. *J Exp Med* 1976;144: 1554–1567.
148. Potter M, Wax JS. Peritoneal plasmacytomagenesis in mice: comparison of different pristane dose regimens. *J Natl Cancer Inst* 1983;71:391–395.
149. Potter M, Melchers F. C-Myc in B-cell neoplasia. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997;224:1–291.
150. Medina KL, Smithson G, Kincade PW. Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *J Exp Med* 1993;178:1507–1515.
151. Medina KL, Kincade PW. Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5382–5386.
152. Smithson G, Beamer WG, Shultz KL, Christianson SW, Shultz LD, Kincade PW. Increased B lymphopoiesis in genetically sex steroid-deficient hypogonadal (hpg) mice. *J Exp Med* 1994;180:717–720.
153. Kincade PW, Medina KL, Smithson G. Sex hormones as negative regulators of lymphopoiesis. *Immunol Rev* 1994;137:119–134.
154. Kantor AB, Stall AM, Adams S, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3320–3324.
155. Kantor AB, Stall AM, Adams S, Watanabe K, Herzenberg LA. *De novo* development and self-replenishment of B cells. *Int Immunol* 1995;7:55.
156. Solvason N, Lehuen A, Kearney JF. An embryonic source of Ly1 but not conventional B cells. *Int Immunol* 1991;3:543–550.
157. Hardy RR, Hayakawa K. A developmental switch in B lymphopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991b;88:11550–11554.
158. Arnold LW, Pennell CA, McCray SK, Clarke SH. Development of B-1 cells: segregation of phosphatidyl choline-specific B cells to the B-1 population occurs after immunoglobulin gene expression. *J Exp Med* 1994;179:1585–1595.
159. Stall AM, Adams S, Herzenberg LA, Kantor AB. Characteristics and development of the murine B-1b (Ly-1 B sister) cell population. *Ann NY Acad Sci* 1992; 651:33–43.
160. Waldschmidt TJ, Kroese FGM, Tygrett LT, Lynch C, Lynch RG. The expression of B cell surface receptors. III. The murine low affinitiy IgE FcεR is not expressed on Ly1 or "Ly1-like" B cells. *Int Immunol* 1991;3:305–315.
161. Hayakawa KRR, Hardy LA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Progenitors for Ly1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med* 1985;161: 1554–1568.
162. Hayakawa K, Hardy RR, Honda M, Herzenberg LA, Steinberg AD, Herzenberg LA. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2494–2498.
163. Mercolino TJ, Arnold LW, Haughton G. Phosphatidyl choline is recognized by a series of Ly1 murine B cell lymphomas specific for erythrocyte membranes. *J Exp Med* 1986;163:155–165.
164. Nisitani S, Murakami M, Honjo T. Anti-red blood cell immunoglobulin transgenic mice. An experimental model of autoimmune hemolytic anemia. *Ann NY Acad Sci* 1997;815:246–252.
165. Hayakawa K, Carmack CE, Hyman R, Hardy RR. Natural autoantibodies to thymocytes: origin, VH genes, fine specificities, and the role of Thy-1 glycoprotein. *J Exp Med* 1990;172:869–878.
166. Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Riblet RJ, Hayakawa K. A single V_H gene is utilized predominantly in anti-BrMRBC hybridomas derived from purified Ly-1 B cells. Definition of the V_H11 family. *J Immunol* 1989;142:3643–3651.
167. Stall AM, Farinas MC, Tarlinton DM, et al. Ly-1 B-cell clones similar to human chronic lymphocytic leukemias routinely develop in older normal mice and

young autoimmune (New Zealand Black-related) animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7312–7316.

168. Mercolino TJ, Arnold LW, Hawkins LA, Haughton G. Normal mouse peritoneum contains a large population of Ly-1⁺ (CD5) B cells that recognize phosphatidyl choline. Relationship to cells that secrete hemolytic-antibody specific for autologous erythrocytes. *J Exp Med* 1988;168:687–698.
169. Masmoudi H, Mota-Santos S, Huetz F, Coutinho A, Casenave PA. All T15 Id-positive antibodies (but not the majority of V_HT15^+ antibodies) are produced by peritoneal $CD5^+$ B lymphocytes. *Int Immunol* 1990;2:515–520.
170. Arnold LW, Haughton G. Autoantibodies to phosphatidylcholine. The murine antibromelain RBC response. *Ann NY Acad Sci* 1992;651:354–359.
171. Arnold LW, Spencer DH, Clarke SH, Haughton G. Mechanisms that limit the diversity of antibody: three sequentially acting mechanisms that favor the spontaneous production of germline encoded anti-phosphatidyl choline. *Int Immunol 1993;5:1365–1373.*
172. Hardy RR. Variable gene usage, physiology and development of $Ly1^+$ ($CD5^+$) B cells. *Curr Opin Immunol* 1992b;4:181–185.
173. Pennell CA, Mercolino TJ, Grdina TA, Arnold LW, Haughton G, Clarke SH. Biased immunoglobulin variable region gene expression by Ly-1 B cells due to clonal selection. *Eur J Immunol* 1989;19:1289–1295.
174. Tarlinton D, Stall AM, Herzenberg LA. Repetitive usage of immunoglobulin VH and D gene segments in $CD5^+$ Ly-1 B clones of (NZB × NZW)F1 mice. *EMBO J* 1988;7:3705–3710.
175. Förster I, Rajewsky K. Expansion and functional activity of $Ly\text{-}1^+$ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice. *Eur J Immunol* 1987;17:521–528.
176. Hardy RR, Hayakawa K. CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol* 1994a;55:297–339.
177. Paeng N, Kido N, Kato Y, et al. Marked reduction of mouse peritoneal $CD5^+$ B cells by intraperitoneal administration of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1997;65:122–126.
178. Murakami M, Tsubata T, Shinkura R, et al. Oral administration of lipopolysaccharides activates B-1 cells in the peritoneal cavity and lamina propria of the gut and induces autoimmune symptoms in an autoantibody transgenic mouse. *J Exp Med 1994;180:111–121.*
179. Karras JG, Wang Z, Huo L, Howard G, Frank DA, Rothstein TL. Signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) is constitutively activated in normal, self-renewing B-1 cells but only inducibly expressed in conventional B lymphocytes. *J Exp Med* 1997;185:1035–1042.
180. Jones BM. Effect of 12 neutralizing anti-cytokine antibodies on in vitro activation of B-cells. Interleukin-12 is required by B1a but not B2 cells. *Scand J Immunol* 1996;43:64–72.
181. Rickert RC, Rajewsky K, Roes J. Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature* 1995;376: *352–355.*
182. Oliver AM, Martin F, Gartland GL, Carter RH, Kearney JF. Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur J Immunol* 1997;27:2366–2374.
183. Rolink AG, Radaszkiewicz T, Melchers F. The autoantigen-binding B cell repertoires of normal and of chronically graft-versus-host-diseased mice. *J Exp Med* 1987;165:1675–1687.
184. Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. Resolution and characterization of proB and pre-pro B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 1991a;173:1213–1225.
185. Tsubata T, Nishikawa S. Molecular and cellular aspects of early B-cell development. *Curr Opin Immunol* 1991a;3:186–192.
186. Rajewsky K. Early and late B-cell development in the mouse. *Curr Opin Immunol* 1992;4:171–176.
187. Rolink A, Melchers F. Molecular and cellular origins of B lymphocyte diversity. *Cell* 1991b;66:1081–1094.
188. Rolink A, Grawunder U, Winkler TH, Karasuyama H, Melchers F. IL-2 receptor a chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in preB cell development. *Int Immunol* 1994;6:1257–1264.
189. Rolink A, Ten Boekel E, Melchers F, Fearon DT, Krop I, Andersson J. A subpopulation of $B220^+$ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains NK cell-progenitors. *J Exp Med* 1996a;183:187–194.
190. Rolink A, Karasuyama H, Haasner D, et al. Two pathways of B lymphocyte development in mouse bone marrow and the roles of surrogate L chain in this development. Immunol Rev 1994a;137:185–201.
191. Rolink A, Ghia P, Grawunder U, et al. In vitro analyses of mechanisms of B-cell development. *Semin Immunol* 1995;7:155–167.
192. Rolink A, Melchers F. Generation and regeneration of cells of the B-lymphocyte lineage. *Curr Opin Immunol* 1993a;5:207–217.
193. Melchers F, Rolink A, Grawunder U, et al. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* 1995;7:214–227.
194. Ehlich A, Matin V, Müller W, Rajewsky K. Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells. *Curr Biol* 1994;4:573–583.
195. ten Boekel E, Melchers F, Rolink A. The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development. *Int Immunol* 1995;7: 1013–1019.
196. Hayakawa K, Tarlinton D, Hardy RR. Absence of MHC class II expression distinguishes fetal from adult B lymphopoiesis in mice. *J Immunol* 1994;152:4801.
197. Lam KP, Stall AM. Major histocompatibility complex class II expression distinguishes two distinct B cell developmental pathways during ontogeny. *J Exp Med* 1994;180:507–516.
198. Oltz EM, Yancopoulos GD, Morrow MA, et al. A novel regulatory myosin light chain gene distinguishes pre-B cell subsets and is IL-7 inducible. *EMBO J* 1992;11:2759–2767.
199. Mårtensson I-L, Melchers F, Winkler TH. A transgenic marker for mouse B lymphoid precursors. *J Exp Med* 1997a;185:653–661.
200. Li YS, Wasserman R, Hayakawa K, Hardy RR. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* 1996;5:527–535.
201. Winkler TH, Melchers F. Structure and function of the pro- and pre-B cell receptors on B-lymphoid lineage precursor cells. In: Monroe J, Rothenberg E, eds. *Molecular biology of B and T cell development.* Clifton, NJ: Humana Press, 1997 (*in press*).
202. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 1994;180: 1955–1960.
203. Ray RJ, Furlonger C, Williams DE, Paige CJ. Characterization of thymic stromal-derived lymphopoietin (TSLP) in murine B cell development *in vitro. Eur J Immunol* 1996;26:10–16.
204. Davidson WF, Fredrickson TN, Rudikoff EK, Coffman RL, Hartley JW, Morse HC III. A unique series of lymphomas related to the $Ly\text{-}1^+$ lineage of B lymphocyte differentiation. *J Immunol* 1984;133:744–753.
205. Davidson WF, Pierce JH, Rudikoff S, Morse HC III. Relationships between B cell and myeloid differentiation. Studies with a B lymphocyte progenitor line, HAFTL-1. *J Exp Med* 1988;168:389–407.
206. Cumano A, Paige CJ. Enrichment and characterization of uncommitted B-cell precursors from fetal liver at day 12 of gestation. *EMBO J* 1992a;11:593–601.
207. Cumano A, Paige CJ, Iscove NN, Brady G. Bipotential precursors of B cells and macrophages in murine fetal liver. *Nature* 1992b;356:612–615.
208. Kitamura D, Rajewsky K. Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature* 1992a;356:154–156.
209. Kitamura D, Roes J, Kühn R, Rajewsky K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin μ chain gene. *Nature* 1991;350:423–426.
210. DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:377–381.
211. von-Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med 1995;181:1519–1526.*
212. Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 1995;378: 303–306.
213. Turner M, Mee PJ, Costello PS, et al. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 1995;378:298–302.
214. Rolink A, Kudo A, Karasuyama H, Kikuchi Y, Melchers F. Long-term proliferating early pre B cell lines and clones with the potential to develop to surface-Ig positive mitogen-reactive B cells *in vitro* and *in vivo. EMBO J* 1991d;10:327–336.
215. Winkler TH, Melchers F, Rolink AG. Interleukin-3 and interleukin-7 are alternative growth factors for the same B-cell precursors in the mouse. *Blood 1994;85:* 2045–2051.
216. Winkler TH, Rolink AG, Melchers F, Karasuyama H. Precursor B cells of mouse bone marrow express two different complexes with the surrogate light chain on the surface. *Eur J Immunol* 1995;25:446–450.
217. Denis KA, Witte ON. Long-term lymphoid cultures in the study of B-cell differentiation. In: Honjo T, Alt FW, Rabbits TH, eds. *Immunoglob Genes,* London: Academic Press Ltd., 1989;45–59.
218. Suda T, Ohara A, Suda S, et al. Early B cell differentiation from hematopoietic stem cells in the presence of stromal cells and interleukin-7 (IL-7). *Exp Haemtol Today 1990:45–52.*
219. Landreth KS, Narayanan R, Dorshkind K. Insulin-like growth factor-I regulates pro-B cell differentiation. *Blood* 1992;80:1207–1212.
220. Toksoz D, Zsebo KM, Smith KA, et al. Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7350–7354.
221. Jacobsen K, Miyake K, Kincade PW, Osmond DG. Highly restricted expression of a stromal cell determinant in mouse bone marrow *in vitro. J Exp Med* 1992; 176:927–935.
222. Bernardi P, Patel VP, Lodish HF. Lymphoid precursor cells adhere to two different sites on fibronectin. *J Cell Biol* 1987;105:489–495.
223. Miyake K, Medina KL, Hayashi S, Ono S, Hamaoka T, Kincade PW. Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J Exp Med* 1990a;171:477–488.
224. Miyake K, Underhill CB, Lesley J, Kincade PW. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med* 1990b;172:69–75.
225. Miyake K, Weissman IL, Greenberger JS, Kincade PW. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med 1991;173:599–607.*

226. Rolink A, Streb M, Melchers F. The κ/λ ratio in surface immunoglobulin molecules on B lymphocytes differentiating from D_HJ_H-rearranged murine pre-B cell clones *in vitro*. *Eur J Immunol* 1991c;21:2895–2898.
227. Ogawa M, Matzusaki Y, Nishikawa S, et al. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1991;174:63–70.
228. Kodama H, Nose M, Yamaguchi Y, et al. *In vitro* proliferation of primitive hemopoietic stem cells supported by stromal cells: evidence for the presence of a mechanism(s) other than that involving c-kit receptor and its ligand. *J Exp Med* 1992;176:351–361.
229. Grawunder U, Melchers F, Rolink A. Interferon-γ arrests proliferation and causes apoptosis in stromal cell/interleukin-7-dependent normal murine pre-B cell lines and clones *in vitro*, but does not induce differentiation to surface immunoglobulin-positive B cells. *Eur J Immunol* 1993a;23:544–551.
230. Strasser A, Wittingham S, Vaux DL, et al. Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8661–8665.
231. Rolink A, Grawunder U, Haasner D, Strasser A, Melchers F. Immature surface Ig^- B cells can continue to rearrange κ and λ L chain gene loci. *J Exp Med* 1993b;178:1263–1270.
232. Rolink AG, Reiniger L, Oka Y, Kalberer CP, Winkler TH, Melchers F. Repopulation of SCID mice with long-term *in vitro* proliferating pre-B-cell lines from normal and autoimmune disease-prone mice. *Res Immunol* 1994b;145: 353–356.
233. Hardy RR, Shinton SA, Hayakawa K. Repopulation of SCID mice with fetal-derived B-lineage cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992a;182:73–80.
234. Sprent J, Schaefer M, Hurd M, Surh CD, Ron Y. Mature murine B and T cells transferred to SCID mice can survive indefinitely and many maintain a virgin phenotype. *J Exp Med* 1991;174:717–728.
235. Reininger L, Radaszkiewicz T, Kosco M, Melchers F, Rolink AG. Development of autoimmune disease in SCID mice populated with long-term *in vitro* proliferating (NZB × NZW)F1 pre-B cells. *J Exp Med* 1992;176:1343–1353.
236. Reininger L, Winkler TH, Kalberer CP, Jourdan M, Melchers F, Rolink AG. Intrinsic B cell defects in NZB and NZW mice contribute to systemic lupus erythematosus in (NZB × NZW)F1 mice. *J Exp Med* 1996;184:853–861.
237. Oka Y, Rolink AG, Suematsu S, Kishimoto T, Melchers F. An interleukin-6 transgene expressed in B lymphocyte lineage cells overcomes the T cell-dependent establishment of normal levels of switched immunoglobulin isotypes. *Eur J Immunol* 1995;25:1332–1337.
238. Kurosawa Y, Tonegawa S. Organization, structure and assembly of immunoglobulin heavy chain diversity DNA segments. *J Exp Med* 1982;155:201–218.
239. Ichihara Y, Hayashida H, Miyazawa S, Kurosawa Y. Only D_{FL16}, D_{SP2} and D_{Q52} gene families exist in mouse immunoglobulin heavy chain diversity gene loci, of which D_{FL16} and D_{SP2} originate from the same primordial D_H gene. *Eur J Immunol* 1989;19:1849–1854.
240. Chang Y, Paige CJ, Wu GE. Enumeration and characterization of DJH structures in mouse fetal liver. *EMBO J* 1992;11:1891–1899.
241. Kaartinen M, Mäkelä O. Reading of D genes in variable frames as a source of antibody diversity. *Immunol Today* 1985;6:324–330.
242. Shimizu T, Yamagishi H. Biased reading frames of preexisting DH-JH coding joints and preferential nucleotide insertions at VH-DJH signal joints of excision products of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements. *EMBO J* 1992; 11:4869–4879.
243. Kottman AH, Brack C, Eibel H, Köhler G. A survey of protein-DNA interaction sites within the murine immunoglobulin heavy chain locus reveals a particularly complex pattern around the DQ_{52} element. *Eur J Immunol* 1992;22:2113–2120.
244. Reth MG, Alt FW. Novel immunoglobulin heavy chains are produced from DJH gene segment rearrangements in lymphoid cells. *Nature* 1984;312:418–423.
245. Tsubata T, Tsubata R, Reth M. Cell surface expression of the short immunoglobulin μ chain (D_μ protein) in murine pre-B cells is differently regulated from that of the intact μ chain. *Eur J Immunol* 1991b;21:1359–1363.
246. Cohn M, Langman RE. The protecton: the unit of humoral immunity selected by evolution. *Immunol Rev* 1990;115:7–147.
247. Gu H, Tarlinton D, Muller W, Rajewsky K, Forster I. Most peripheral B cells in mice are ligand selected. *J Exp Med* 1991a;173:1357–1371.
248. Gu H, Kitamura D, Rajewsky K. B cell development regulated by gene rearrangement: arrest of maturation by membrane-bound D_μ protein and selection of D_H element reading frames. *Cell* 1991b;65:47–55.
249. Gerstein RM, Lieber MR. Extent to which homology can constrain junctional diversity in V(D)J recombination. *Nature* 1993;363:625–627.
250. Haasner D, Rolink A, Melchers F. Influence of surrogate L chain on D_HJ_H-reading frame 2 suppression in mouse precursor B cells. *Int Immunol* 1994;6: 21–30.
251. Karasuyama H, Rolink A, Shinkai Y, Young F, Alt FW, Melchers F. The expression of V_{preB}/λ_5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B-cell deficient mutant mice. *Cell* 1994;77:133–143.
252. Sakaguchi N, Melchers F. λ_5, a new light-chain-related locus selectively expressed in preB lymphocytes. *Nature* 1986;324:579–582.
253. Kudo A, Melchers F. A second gene, V_{preB} in the λ_5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in preB lymphocytes. *EMBO J* 1987a;6: 2267–2272.
254. Melchers F, Karasuyama H, Haasner D, et al. The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today* 1993;14:60–68.
255. Karasuyama H, Melchers F, Rolink A. A complex of glycoproteins is associated with V_{preB}/λ_5 surrogate light chain on the surface of μ heavy chain-negative early precursor B cell lines. *J Exp Med* 1993;178:469–478.
256. Shinjo F, Hardy RR, Jongstra J. Monoclonal anti-λ_5 antibody FS1 identifies a 130 kDa protein associated with λ_5 and $V_{pre\text{-}B}$ on the surface of early pre-B cell lines. *Int Immunol* 1994;6:393–399.
257. Kerr WG, Cooper MD, Feng L, Burrows PD, Hendershot LM. μ heavy chains can associate with a pseudo-light chain complex (XL) in human pre-B cell lines. *Int Immunol* 1989;1:355–361.
258. Karasuyama H, Kudo A, Melchers F. The proteins encoded by the V_{preB} and λ_5 preB cell specific genes can associate with each other and with μ heavy chain. *J Exp Med* 1990;172:969–972.
259. Pillai S, Baltimore D. Formation of disulphide-linked $\mu_2\omega_2$ tetramers in pre-B cells by the 18K ω-immunoglobulin light chain. *Nature* 1987;329:172–174.
260. Tsubata T, Reth M. The products of preB cell specific genes (λ_5 and V_{preB}) and the immunoglobulin μ chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J Exp Med* 1990;172:973–976.
261. Misener V, Downey GP, Jongstra J. The immunoglobulin light chain related protein λ_5 is expressed on the surface of mouse pre-B cell lines and can function as a signal transducing molecule. *Int Immunol* 1991;3:1129–1136.
262. Brouns GS, de-Vries E, van-Noesel CJ, Mason DY, van-Lier RA, Borst J. The structure of the μ/pseudo light chain complex on human pre-B cells is consistent with a function in signal transduction. *Eur J Immunol* 1993;23:1088–1097.
263. Hombach J, Tsubata T, Leclercq L, Stappert H, Reth M. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* 1990;343:760–762.
264. Nagata K, Nakamura T, Kitamura F, et al. The Igα/Igβ heterodimer on μ-negative proB cells is competent for transucing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity* 1997;7:559–570.
265. Nomura J, Matsuo T, Kubota E, Kimoto M, Sakaguchi N. Signal transmission through the B cell-specific MB-1 molecule at the pre-B cell stage. *Int Immunol* 1991;3:117–126.
266. Kuwahara K, Kawai T, Mitsuyoshi S, et al. Cross-linking of B cell antigen receptor-related structure of pre-B cell lines induces tyrosine phosphorylation of p85 and p110 subunits and activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Int Immunol* 1996;8:1273–1285.
267. Kudo A, Pravtcheva D, Sakaguchi N, Ruddle FH, Melchers F. Localization of the murine λ_5 gene on chromsome 16. *Genomics* 1987b;1:277–279.
268. Mattei MG, Fumoux F, Roeckel N, Fougereau M, Schiff C. The human pre-B-specific λ-like cluster is located in the 22q11.2–22q12.3 region, distal to the IgCλ locus. *Genomics* 1991;9:544–546.
269. Shirasawa T, Ohnishi K, Hagiwara S, et al. A novel gene product associated with μ chains in immature B cells. *EMBO J* 1993;12:1827–1834.
270. Ohnishi K, Takemori T. Molecular components and assembly of mu.surrogate light chain complexes in pre-B cell lines. *J Biol Chem* 1994;269:28347–28353.
271. Bauer SR, Huebner K, Budarf M, et al. The human $V_{pre}B$ gene is located on chromosome 22 near a cluster of $V_{\lambda I}$ gene segments. *Immunogenetics* 1988a;28: 328–333.
272. Bauer SR, Kudo A, Melchers F. Structure and pre-B lymphocyte restricted expression of the V_{preB} in humans and conservation of its structure in other mammalian species. *EMBO J* 1988b;7:111–116.
273. Guelpa Fonlupt V, Tonnelle C, Blaise D, Fougereau M, Fumoux F. Discrete early pro-B and pre-B stages in normal human bone marrow as defined by surface pseudo-light chain expression. *Eur J Immunol* 1994;24:257–264.
274. Hollis GF, Evans RJ, Stafford-Hollis JM, Korsmeyer SJ, McKearn JP. Immunoglobulin λ light-chain-related genes 14.1 and 16.1 are expressed in pre-B cells and may encode the human immunoglobulin ω light-chain protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5552–5556.
275. Schiff C, Bensmana M, Guglielmi P, Milili M, Lefranc MP, Fougereau M. The immunoglobulin lambda-like gene cluster (14.1, 16.1 and F λ 1) contains gene(s) selectively expressed in pre-B cells and is the human counterpart of the mouse λ_5 gene. *Int Immunol* 1990;2:201–207.
276. Evans RJ, Hollis GF. Genomic structure of the human Ig lambda 1 gene suggests that it may be expressed as an Ig lambda 14.1-like protein or as a canonical B cell Ig lambda light chain: implications for Ig lambda gene evolution. *J Exp Med* 1991;173:305–311.
277. Donohoe ME, Blomberg BB. The 14.1 surrogate light chain promoter has lineage- and stage-restricted activity. *J Immunol* 1997;158:1681–1691.
278. Mårtensson IL, Melchers F. Pre-B cell-specific lambda 5 gene expression due to suppression in non pre-B cells. *Int Immunol* 1994;6:863–872.
279. Mårtensson A, Mårtensson IL. Early B cell factor binds to a site critical for lambda5 core enhancer activity. *Eur J Immunol* 1997b;27:315–320.
280. Yang J, Glozak MA, Blomberg BB. Identification and localization of a developmental stage-specific promoter activity from the murine lambda 5 gene. *J Immunol* 1995;155:2498–2514.
281. Kudo A, Thalmann P, Sakaguchi N, et al. The expression of the mouse V_{preB}/λ_5 locus in transformed cell lines and tumors of the B lineage differentiation pathway. *Int Immunol* 1992;4:831–840.
282. Lassoued K, Nunez CA, Billips L, et al. Expression of surrogate light chain receptors is restricted to a late stage in pre-B cell differentiation. *Cell* 1993;73: 73–86.
283. Meffre E, Fougereau M, Argenson JN, Aubaniac JM, Schiff C. Cell surface

expression of surrogate light chain (psi L) in the absence of mu on human pro-B cell lines and normal pro-B cells. *Eur J Immunol* 1996;26:2172–2180.

284. Sanz E, de la Hera A. A novel anti-V_{preB} antibody identifies immunoglobulin-surrogate receptors on the surface of human pre-B cells. *J Exp Med* 1996;183: 2693–2698.
285. Ghia P, ten Boekel E, Sanz E, de la Hera A, Rolink AG, Melchers F. Ordering of human bone marrow B-lineage precursors by an analysis of V_{preB} expression and of the status of immunoglobulin loci in single cells. *J Exp Med* 1996;184: 2217–2219.
286. Loffert D, Ehlich A, Muller W, Rajewsky K. Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development. *Immunity* 1996;4:133–144.
287. Grawunder U, Leu TMJ, Schatz DG, et al. Down-regulation of *RAG1* and *RAG2* gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity* 1995;3:601–608.
288. Kitamura D, Kudo A, Schaal S, Müller W, Melchers F, Rajewsky K. A critical role of λ_5 in B cell development. *Cell* 1992b;69:823–831.
289. Motoyama N, Wang F, Roth KA, et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 1995;267:1506–1510.
290. Fang W, Mueller DL, Pennell CA, et al. Frequent aberrant immunoglobulin gene rearrangements in pro-B cells revealed by a_{bcl-xl} transgene. *Immunity* 1996;4: 291–299.
291. Brodeur PH, Riblet R. The immunoglobulin heavy chain variable region (Igh-V) locus in the mouse. I. One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes. *Eur J Immunol* 1984;14:922–930.
292. Feeney AJ, Riblet R. D_{ST4}: a new, and probably the last, functional D_H gene in the BALB/c mouse. *Immunogenetics* 1993;37:217–221.
293. Kofler R, Geley S, Kofler H, Helmberg A. Mouse variable-region gene families: complexity, polymorphism and use in non-autoimmune responses. *Immunol Rev* 1992;128:5–21.
294. Winter E, Radbruch A, Krawinkel U. Members of novel V_H gene families are found in VDJ regions of polyclonally activated B-lymphocytes. *EMBO J* 1985;4:2861–2867.
295. Carlsson L, Övermo C, Holmberg D. Developmentally controlled selection of antibody genes: characterization of individual V_H7183 genes and evidence for stage-specific somatic diversification. *Eur J Immunol* 1992;22:71–78.
296. Huetz F, Carlsson L, Tornberg UC, Holmberg D. V-region directed selection in differentiating B lymphocytes. *EMBO J* 1993;12:1819–1826.
297. Reth M, Gehrmann P, Petrac E, Wiese P. A novel V_H to V_HDJ_H joining mechanism in heavy-chain-negative (null) preB cells results in heavy-chain production. *Nature* 1986;322:840–842.
298. Teale JM, Medina CA. Comparative expression of adult and fetal V gene repertoires. *Int Rev Immunol* 1992;8:95–111.
299. Wu GE, Paige CJ. V_H gene family utilization in colonies derived from B and pre-B cells detected by the RNA colony blot assay. *EMBO J* 1986;5:3475–3481.
300. Yancopoulos GD, Desiderio SV, Paskind M, Kearney JF, Baltimore D, Alt FW. Preferential utilization of the most J_H-proximal V_H gene segments in pre-B-cell lines. *Nature* 1984;311:727–733.
301. Yancopoulos GD, Malynn BA, Alt FW. Developmentally regulated and strain-specific expression of murine V_H gene families. *J Exp Med* 1988;168:417–435.
302. Perlmutter RM, Kearney JF, Chang SP, Hood LE. Developmentally controlled expression of immunoglobulin V_H genes. *Science* 1985;227:1597–1601.
303. Alt FW, Blackwell TK, Yancopoulos GD. Development of the primary antibody repertoire. *Science* 1987;238:1079–1087.
304. Malynn BA, Yancopoulos GD, Barth JE, Bona CA, Alt FW. Biased expression of J_H-proximal V_H genes occurs in the newly generated repertoire of neonatal and adult mice. *J Exp Med* 1990;171:843–859.
305. Marshall AJ, Wu GE, Paige GJ. Frequency of V_H81x usage during B cell development: initial decline in usage is independent of Ig heavy chain cell surface expression. *J Immunol* 1996;156:2077–2084.
306. Dildrop R, Krawinkel U, Winter E, Rajewsky K. V_H-gene expression in murine lipopolysaccharide blasts distributes over the nine known V_H-gene groups and may be random. *Eur J Immunol* 1985;15:1154–1156.
307. Jeong HD, Teale JM. Comparison of the fetal and adult functional B cell repertoires by analysis of V_H gene family expression. *J Exp Med* 1988;168:589–603.
308. Schulze DH, Kelsoe G. Genotypic analysis of B cell colonies by in situ hybridization. Stoichiometric expression of three VH families in adult C57BL/6 and BALB/c mice. *J Exp Med* 1987;166:163–172.
309. Sheehan KM, Brodeur PH. Molecular cloning of the primary IgH repertoire: a quantitative analysis of VH gene usage in adult mice. *EMBO J* 1989;8: 2313–2320.
310. Decker DJ, Kline GH, Hayden TA, Zaharevitz SN, Klinman NR. Heavy chain V gene-specific elimination of B cells during the pre-B cell to B cell transition. *J Immunol* 1995;154:4924–4935.
311. Decker DJ, Boyle NE, Klinman NR. Predominance of nonproductive rearrangements of V_H81X gene segments evidences a dependence of B cell clonal maturation on the structure of nascent H chains. *J Immunol* 1991;147:1406–1411.
312. Connor AM, Fanning LJ, Celler JW, Hicks LK, Ramsden DA, Wu GE. Mouse V_H7183 recombination signal sequences mediate recombination more frequently than those of V_HJ558. *J Immunol* 1995;155:5268–5272.
313. Keyna U, Beck-Engeser GB, Jongstra J, Applequist SE, Jack HM. Surrogate light chain-dependent selection of Ig heavy chain V regions. *J Immunol* 1995;155: 5536–5542.
314. ten Boekel E, Melchers F, Rolink AG. Changes in the V(H) gene repertoire of developing precursor B lymphocytes in mouse bone marrow mediated by the pre-B cell receptor. *Immunity* 1997;7:357–368.
315. Kong GH, Bu JY, Kurosaki T, Shaw AS, Chan AC. Reconstitution of Syk function by the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *Immunity* 1995;2:485–492.
316. Engel P, Zhou LJ, Ord DC, Sato S, Koller B, Tedder TF. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity* 1995;3:39–50.
317. Storb U, Engler P, Manz J, et al. Expression of immunoglobulin genes in transgenic mice and transfected cells. *Ann NY Acad Sci* 1988;546:51–56.
318. Taki S, Meiering M, Rajewsky K. Targeted insertion of a variable region gene into the immunoglobulin heavy chain locus [see comments]. *Science* 1993;262: 1268–1271.
319. Manz J, Dennis K, Witte O, Brinster R, Storb U. Feedback inhibition of immunoglobulin gene rearrangement by membrane μ, but not by secreted μ heavy chains. *J Exp Med* 1988;168:1363–1381.
320. Nussenzweig MC, Shaw AC, Sinn E, Campos-Torres J, Leder P. Allelic exclusion in transgenic mice carrying mutant human IgM genes. *J Exp Med* 1988;167: 1969–1974.
321. Iglesias A, Lamers M, Kohler G. Expression of immunoglobulin delta chain causes allelic exclusion in transgenic mice. *Nature* 1987;330:482–484.
322. Reth M, Petrac E, Wiese P, Lobel L, Alt FW. Activation of V κ gene rearrangement in pre-B cells follows the expression of membrane-bound immunoglobulin heavy chains. *EMBO J* 1987;6:3299–3305.
323. Kurtz BS, Witte PL, Storb U. Gamma 2b provides only some of the signals normally given via mu in B cell development. *Int Immunol* 1997;9:415–426.
324. Kenny JJ, Stall AM, Fisher RT, et al. Ig γ 2b transgenes promote B cell development but alternate developmental pathways appear to function in different transgenic lines. *J Immunol* 1995;154:5694–5705.
325. Reichman-Fried M, Hardy RR, Bosma MJ. Development of B-lineage cells in the bone marrow of scid/scid mice following the introduction of functionally rearranged immunoglobulin transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 2730–2734.
326. Kotloff DB, Bosma MJ, Ruetsch NR. Scid mouse Pre-B cells with intracellular mu chains: analysis of recombinase activity and IgH gene rearrangements. *Int Immunol* 1993a;5:383–391.
327. Kotloff DB, Bosma MJ, Ruetsch NR. V(D)J recombination in peritoneal B cells of leaky scid mice. *J Exp Med* 1993b;178:1981–1994.
328. Chang Y, Bosma MJ. Effect of different Ig transgenes on B cell differentiation in scid mice. *Int Immunol* 1997;9:373–380.
329. Chang Y, Bosma GC, Bosma MJ. Development of B cells in scid mice with immunoglobulin transgenes: implications for the control of V(D)J recombination. *Immunity* 1995;2:607–616.
330. Spanopoulou E, Roman CAJ, Corcoran LM, et al. Functional immunoglobulin transgenes guide ordered B-cell differentiation in RAG-1-deficient mice. *Genes Dev* 1994;8:1030–1042.
331. Young F, Ardman B, Shinkai Y, et al. Influence of immunoglobulin heavy- and light-chain expression on B-cell differentiation. *Genes Dev* 1994;8:1043–1057.
332. Papavasiliou F, Jankovic M, Nussenzweig MC. Surrogate or conventional light chains are required for membrane immunoglobulin mu to activate the precursor B cell transition. *J Exp Med* 1996;184:2025–2030.
333. Pearl ER, Vogler LB, Okos AJ, Crist WM, Lawton AR III, Cooper MD. B lymphocyte precursors in human bone marrow: an analysis of normal individuals and patients with antibody-deficiency states. *J Immunol* 1978;120:1169–1175.
334. Rolink A, Haasner D, Melchers F, Andersson J. The surrogate light chain in mouse B cell development. *Int Rev Immunol* 1996c;13:341–356.
335. Shaffer AL, Schlissel MS. A truncated heavy chain protein relieves the requirement for surrogate light chains in early B cell development. *J Immunol* 1997;159:1265–1275.
336. ten Boekel E, Melchers F, Rolink AG. Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression. *Immunity* 1998;8:199–207.
337. Hirabayashi Y, Lecerf JM, Dong Z, Stollar BD. Kinetic analysis of the interactions of recombinant human VpreB and Ig V domains. *J Immunol* 1995;155: 1218–1228.
338. Takeda S, Zou YR, Bluethmann H, Kitamura D, Muller U, Rajewsky K. Deletion of the immunoglobulin kappa chain intron enhancer abolishes kappa chain gene rearrangements in *cis* but not lambda chain rearrangements in *trans*. *EMBO J* 1993;12:2329–2336.
339. Chen J, Trounstine M, Kurahara C, et al. B cell development in mice that lack one or both immunoglobulin κ light chain genes. *EMBO J* 1993c;12:821–830.
340. Hartley SB, Cooke MP, Fulcher PA, et al. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceed in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 1993; 72:325–335.
341. Carsetti R, Kohler G, Lamers MC. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med* 1995;181:2129–2140.
342. Roth PE, Doglio L, Manz JT, Kim JY, Lo D, Storb U. Immunoglobulin gamma 2b transgenes inhibit heavy chain gene rearrangement, but cannot promote B cell development. *J Exp Med* 1993;178:2007–2021.

343. Andersson J, Melchers F, Rolink A. Stimulation by T cell independent antigens can relieve the arrest of differentiation of immature auto-reactive B cells in the bone marrow. *Scand J Immunol* 1995;42:21–33.
344. Okamoto M, Murakami M, Shimizu A, et al. A transgenic model of autoimmune hemolytic anemia. *J Exp Med* 1992;175:71–79.
345. Hardy RR, Carmack CE, Li YS, Hayakawa K. Distinctive developmental origins and specificities of murine CD5⁺ B cells. Immunol Rev 1994b;137:91–118.
346. Oldstone MB. Molecular mimicry as a mechanism for the cause and a probe uncovering etiologic agent(s) of autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989;145:127–135.
347. Coutinho A, Moller G. B cell mitogenic properties of thymus-independent antigens. *Nat New Biol* 1973;245:12–14.
348. Lang J, Jackson M, Teyton L, Brunmark A, Kane K, Nemazee D. B cells are exquisitely sensitive to central tolerance and receptor editing induced by ultralow affinity, membrane-bound antigen. *J Exp Med* 1996;184:1685–1697.
349. Scott DW, Livnat D, Pennell CA, Keng P. Lymphoma models for B cell activation and tolerance. III. Cell cycle dependence for negative signalling of WEHI-231 B lymphoma cells by anti-μ. *J Exp Med* 1986;164:156–164.
350. Scott DW, Donjerkovic D, Maddox B, Ezhevsky S, Grdina T. Role of c-myc and p27 in anti-IgM induced B-lymphoma apoptosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997;224:103–112.
351. Benhamou LE, Cazenave PA, Sarthou P. Anti-immunoglobulins induce death by apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *Eur J Immunol* 1990;20:1405–1407.
352. Hasbold J, Klaus GG. Anti-immunoglobulin antibodies induce apoptosis in immature B cell lymphomas. *Eur J Immunol* 1990;20:1685–1690.
353. Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape self tolerance. *J Exp Med* 1993;177:999–1008.
354. Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 1993;177:1009–1020.
355. Ghia P, Gratwohl A, Signer E, Winkler TH, Melchers F, Rolink AG. Immature B cells from human and mouse bone marrow can change their surface light chain expression. *Eur J Immunol* 1995;25:3108–3114.
356. Radic MZ, Zouali M. Receptor editing, immune diversification, and self-tolerance. *Immunity* 1996;5:505–511.
357. Chen C, Prak EL, Weigert M. Editing disease-associated autoantibodies. *Immunity* 1997;6:97–105.
358. Rusconi S, Köhler G. Transmission and expression of a specific pair of rearranged immunoglobulin μ and κ genes in a transgenic mouse line. *Nature* 1985;314:330–338.
359. Allman DM, Ferguson SE, Lentz VM, Cancro MP. Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J Immunol* 1993;151:4431–4444.
360. Thomas-Vaslin V, Freitas AA. Lymphocyte population kinetics during the development of the immune system. B cell persistence and life-span can be determined by the host environment. *Int Immunol* 1989;1:237–246.
361. Förster I, Rajewsky K. The bulk of the peripheral B-cell pool in mice is stable and not rapidly renewed from the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4781–4784.
362. Rajewsky K. B-cell lifespans in the mouse—why to debate what? *Immunol Today* 1993;14:40–41.
363. MacLennan I, Chan E. The dynamic relationship between B-cell populations in adults [see comments]. *Immunol Today* 1993;14:29–34.
364. Igarashi H, Kuwahara K, Nomura J, et al. B cell Ag receptor mediates different types of signals in the protein kinase activity between immature B cell and mature B cell. *J Immunol* 1994;153:2381–2393.
365. Monroe JG. Tolerance sensitivity of immature-stage B cells: can developmentally regulated B cell antigen receptor (BCR) signal transduction play a role? *J Immunol* 1996;156:2657–2660.
366. Sanchez M, Misulovin Z, Burkhardt AL, et al. Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Igα and Igβ. *J Exp Med* 1993;178: 1049–1055.
367. Teh YM, Neuberger MS. The immunoglobulin (Ig)α and Igβ cytoplasmic domains are independently sufficient to signal B cell maturation and activation in transgenic mice. *J Exp Med* 1997;185:1753–1758.
368. Reth M, Hombach J, Wienands J, et al. The B-cell antigen receptor complex. *Immunol Today* 1991;12:196–201.
369. Melamed D, Nemazee D. Self-antigen does not accelerate immature B cell apoptosis, but stimulates receptor editing as a consequence of developmental arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9267–9272.
370. Chan EYT, MacLennan ICM. Only a small proportion of splenic B cells in adults are short-lived virgin cells. *Eur J Immunol* 1993;23:357–363.
371. Clarke SH, McCray SK. V_H CDR3-dependent positive selection of murine V_H12-expressing B cells in the neonate. *Eur J Immunol* 1993;23:3327–3334.
372. Ye J, McCray SK, Clarke SH. The majority of murine V_H12-expressing B cells are excluded from the peripheral repertoire in adults. *Eur J Immunol* 1995;25: 2511–2521.
373. Ye J, McCray SK, Clarke SH. The transition of pre-BI to pre-BII cells is dependent on the VH structure of the mu/surrogate L chain receptor. *EMBO J* 1996;15:1524–1533.
374. Schubart DB, Rolink A, Kosco-Vilbois M, Botteri F, Matthias P. B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal centre formation. *Nature* 1996;383:538–542.
375. Schubart DB, Rolink A, Matthias P. 1998 (*in preparation*).
376. Oka Y, Rolink AG, Andersson J, et al. Profound reduction of mature B cell numbers, reactivities and serum immunoglobulin levels in mice which simultaneously carry the XID and CD40-deficiency genes. *Int Immunol* 1996;8: 1675–1685.
377. Khan WN, Nilsson A, Mizoguchi E, et al. Impaired B cell maturation in mice lacking Bruton's tyrosine kinase (Btk) and CD40. *Int Immunol* 1997;9:395–405.
378. Torres RM, Flaswinkel H, Reth M, Rajewsky K. Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex [see comments]. *Science* 1996;272:1804–1808.
379. Miller DJ, Hayes CE. Phenotypic and genetic characterization of a unique B lymphocyte deficiency in strain A/WySnJ mice. *Eur J Immunol* 1991;21:1123–1130.
380. Lentz VM, Cancro MP, Nashold FE, Hayes CE. Bcmd governs recruitment of new B cells into the stable peripheral B cell pool in the A/WySnJ mouse. *J Immunol* 1996;157:598–606.
381. Benatar T, Carsetti R, Furlonger C, Kamalia N, Mak T, Paige CJ. Immunoglobulin-mediated signal transduction in B cells from CD45-deficient mice. *J Exp Med* 1996;183:329–334.
382. Scher I. CBA/N immune defective mice: evidence for the failure of a B cell subpopulation to be expressed. *Immunol Rev* 1982a;64:117–136.
383. Scher I. The CBA/N mouse strain: an experimental model illustrating the influence of the X-chromosome on immunity. *Adv Immunol* 1982b;33:1–71.
384. Rolink A, Brocker T, Andersson J, Melchers F. MHC class II dependent, helper T cell independent generation of mature B cells. 1998 (*submitted*).
385. Shachar I, Flavell RA. Requirement for invariant chain in B cell maturation and function. *Science* 1996;274:106–108.
386. Ramsden DA, Wu GE. Mouse κ light-chain recombination signal sequences mediate recombination more frequently than do those of λ light chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10721–10725.
387. Streb M. *B cell development in the mouse.* Ph.D. thesis, University of Basel, Switzerland, 1992.
388. Grawunder U, Haasner D, Melchers F, Rolink A. Rearrangement and expression of κ light chain genes can occur without μ heavy chain expression during differentiation of pre-B cells. *Int Immunol* 1993b;5:1609–1618.
389. Snapper CM, Mond JJ. Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunol Today* 1993;14:15–17.
390. Rolink AG, Melchers F, Andersson J. The SCID but not the *RAG-2* gene product is required for Sμ-Sε-heavy chain class switching. *Immunity* 1996b;5:319–330.
391. Banchereau J, Rousset F. Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation. *Adv Immunol* 1992;52:125–262.
392. Burrows PD, Schroeder HW, Cooper MD. B-cell differentiation in humans. In Honjo T, Alt FW, eds. *Immunoglob Genes,* 2nd Ed. London: Academic Press Ltd., 1995, 3–31.
393. Gougeon ML, Drean G, Le Deist F, et al. Human severe combined immunodeficiency disease: phenotypic and functional characteristics of peripheral B lymphocytes. *J Immunol* 1990;145:2873–2879.
394. Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 1993;73:147–157.
395. Nunez C, Nishimoto N, Gartland GL, et al. B cells are generated throughout life in humans. *J Immunol* 1996;156:866-872.
396. Silverstein AM. *Ontogeny of the immune response: a perspective.* New York: Raven Press, 1977.
397. Uhr JW, Dancis J, Franklin EC, Finkelstein MS, Lewis EW. The antibody response to bacteriophage in newborn premature infants. *J Clin Invest* 1962;41: 1508–1513.
398. Kohler PF, Farr RS. Elevation of cord over maternal IgG immunoglobulin: evidence for an active placental IgG transport. *Nature* 1966;210:1070–1071.
399. Stein KE. Thymus-independent and thymus-dependent repsonses to polysaccharide antigens. *J Infect Dis* 1992;165:S49–S52.
400. Cooke JV, Holowach J, Atkins JE, Powers JR. Antibody formation in early infancy against diphtheria and tetanus toxoids. *J Pediatr* 1948;33:141–146.
401. Paton JC, Toogood IR, Cockington RA, Hansman D. Antibody response to pneumococcal vaccine in children aged 5 to 15 years. *Am J Dis Child* 1986;140: 135–138.
402. Rosen FS, Wedgwood RJ, Eibl MC, et al. Primary immunodeficiency diseases. Report of a WHO scientific group. *Immunodefic Rev* 1992;3:195–236.
403. Fischer A. Severe combined immunodeficiencies. *Immunodefic Rev* 1992;3: 83–100.
404. Schwarz K, Bartram CR. V(D)J recombination pathology. *Adv Immunol* 1996a;61:285–326.
405. Schwarz K, Gauss GH, Ludwig L, et al. RAG mutations in human B cell-negative SCID. *Science* 1996b;274:97–99.
406. Hitzig WH, Biro Z, Bosch H, Huser HJ. Agammaglobulinämie und Alymphocytose mit Schwund des lymphatischen Gewebes. *Helv Paediatr Acta* 1958;13: 551–585.
407. Schatz DG, Baltimore D. Stable expression of immunoglobulin gene V(D)J recombinase activity by gene transfer into 3T3 fibroblasts. *Cell 1988;53:* 107–115.

408. Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 1989;59:1035–1048.
409. Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990;248: 1517–1523.
410. Bernstein RM, Schluter SF, Lake DF, Marchalonis IJ. Evolutionary conservation and molecular cloning of the recombinase activating gene 1. *Biochemistry* 1994; 205:687–692.
411. Carlson LM, Oettinger MA, Schatz DG, et al. Selective expression of RAG-2 in chicken B cells undergoing immunoglobulin gene conversion. *Cell* 1991;64: 201–208.
412. Fuschiotti P, Fitts MG, Pospisil R, Weinstein PD, Mage RG. RAG1 and RAG2 in developing rabbit appendix subpopulations. *J Immunol* 1997;1997:55–64.
413. Greenhalgh P, Olesen CE, Steiner LA. Characterization and expression of recombination activating genes (RAG-1 and RAG-2) in Xenopus laevis. *J Immunol* 1993;151:3100–3110.
414. Ichihara Y, Hirai M, Kurosawa Y. Sequence and chromosome assignment to 11p13-p12 of human RAG genes. *Immunol Lett* 1992;33:277–284.
415. Boehm T, Gonzales-Sarmiento R, Kennedey M, Rabbits TH. A simple technique for generating probes for RNA in situ hybridization: an adjunct to genome mapping exemplified by the RAG-1/RAG-2 gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3927–3931.
416. Guy-Grand D, Vanden Broecke C, Briottet C, Malassis-Seris M, Selz F, Vassalli P. Different expression of the recombination activity gene RAG-1 in various populations of thymocytes, peripheral T cells and gut thymus-independent intraepithelial lymphocytes suggests two pathways of T cell receptor rearrangement. *Eur J Immunol* 1992;22:505–510.
417. Turka LA, Schatz DG, Oettinger MA, et al. Thymocyte expression of RAG-1 and RAG-2: termination by T cell receptor cross-linking. *Science* 1991;253: 778–781.
418. Lin W-C, Desiderio S. Regulation of V(D)J recombination activator protein RAG-2 by phosphorylation. *Science* 1993;260:953–959.
419. Lin W-C, Desiderio S. V(D)J recombination and the cell cycle. *Immunol Today* 1995b;16:279–289.
420. Schlissel M, Constantinescu A, Morrow T, Baxter M, Peng A. Double-strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5′-phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated. *Genes Dev* 1993;7:2520–2532.
421. Hoffman ES, Passoni L, Crompton T, et al. Productive T-cell receptor β-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo. *Genes Dev* 1996;10:948–962.
422. McBlane JF, van Gent DC, Ramsden DA, et al. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 1995;83:387–395.
423. Eastman QM, Leu TM, Schatz DG. Initiation of V(D)J recombination *in vitro* obeying the 12/23 rule. *Nature* 1996;380:85–88.
424. van Gent DC, Ramsden DA, Gellert M. The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. *Cell* 1996;85:107–113.
425. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992;68: 869–877.
426. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992;68: 855–867.
427. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989;5:874–879.
428. Nomdedeu JF, Lasa A, Seminago R, Baiget M, Soler J. Polymorphism in the RAG-1 gene identified by SSCP. *Leukemia* 1995;9:229–230.
429. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983;301:527–530.
430. Blunt T, Finnie NJ, Taccioli GE, et al. Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine *scid* mutation. *Cell* 1995;80:813–823.
431. Kirchgessner CU, Patil CK, Evans JW, et al. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science* 1995;267:1178–1183.
432. Peterson SR, Kurimasa A, Oshimara M, Dynan WS, Bradbury EM, Chen DJ. Loss of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase in DNA double-strand-break-repair mutant mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:3171–3174.
433. Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952;9:722–727.
434. Conley ME, Parolini O, Rohrer J, Campana D. X-linked agammaglobulinemia: new approaches to old questions based on the identification of the defective gene. *Immunol Rev* 1994;138:5–21.
435. Campana D, Farrant J, Inamdar N, Webster ADB, Janossy G. Phenotypic features and proliferative activity of B cell progenitors in X-linked agammaglobulinemia and selective immunoglobulin. *J Immunol* 1990;145:1675–1680.
436. Milili M, Le-Deist F, de-Saint-Basile G, Fischer A, Fougereau M, Schiff C. Bone marrow cells in X-linked agammaglobulinemia express pre-B-specific genes (λ-like and $V_{pre\text{-}B}$) and present immunoglobulin V-D-J gene usage strongly biased to a fetal-like repertoire. *J Clin Invest* 1993;91:1616–1629.
437. Conley ME. B cells in patients with X-linked aggamaglobulinemia. *J Immunol* 1985;134:3070–3074.
438. Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993;72: 279–290.
439. Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the *src* family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 1993;361:226–233.
440. Sideras P, Smith CIE. Molecular and cellular aspects of X-linked agammaglobulinemia. *Adv Immunol* 1995;59:135–223.
441. Khan WN, Alt FW, Gerstein RM, et al. Defective B cell development and function in *Btk*-deficient mice. *Immunity* 1995;3:283–299.
442. Kerner JD, Appleby MW, Mohr RN, et al. Impaired expansion of mouse B cell progenitors lacking Btk. *Immunity* 1995;3:301–312.
443. Currier SJ, Gallarda JL, Knight KL. Partial molecular genetic map of the rabbit V_H chromosomal region. *J Immunol* 1988;140:1651–1659.
444. Becker RS, Zhai SK, Currier SJ, Knight KL. Ig VH, DH and JH germ-line gene segments linked by overlapping cosmid clones of rabbit DNA. *J Immunol* 1989; 142:1351–1355.
445. Friedman ML, Tunyaplin C, Zhai SK, Knight KL. Neonatal V_H, D and J_H gene usage in rabbit B-lineage cells. *J Immunol* 1994;152:632–641.
446. Schneidermann RD, Hanly WC, Knight KL. Expression of 12 rabbit IgA Cα genes as chimeric rabbit-mouse IgA antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7561–7565.
447. Schneidermann RD, Lint TF, Knight KL. Activation of the alternative pathway of complement by twelve different rabbit-mouse chimeric transfectoma IgA isotypes. *J Immunol* 1990;145:233–237.
448. Spieker-Polet H, Yam PC, Knight KL. Differential expression of 13 IgA-heavy chain genes in rabbit lymphoid tissues. *J Immunol* 1993;150:5457–5465.
449. Burnett RC, Hanly WC, Zhai SK, Knight KL. The IgA heavy-chain gene family in rabbit: cloning and sequence analysis of 13 Cα genes. *EMBO J* 1989;8: 4041–4047.
450. Benammar A, Cazenave PA. A second rabbit κ isotype. *J Exp Med* 1982;156: 585–595.
451. Emorine L, Max EE. Structural analysis of a rabbit immunoglobulin κ2 J-C locus reveals multiple deletions. *Nucleic Acids Res* 1983;11:8877–8890.
452. Heidmann O, Rougeon F. Multiplicity of constant κ light chain genes in the rabbit genome: a b4b4 homozygous rabbit contains a κ-*bas* gene. *EMBO* J 1983;2: 437–441.
453. Hole NJK, Young-Cooper GO, Mage RG. Mapping of the duplicated rabbit immunoglobulin κ light chain locus. *Eur J Immunol* 1991;21:403–409.
454. Duvoisin RM, Heidmann O, Jaton JC. Characterization of four constant region genes of rabbit immunoglobulin-λ chains. *J Immunol* 1986;136:4297–4302.
455. Hayzer DJ, Duvoisin RM, Jaton JC. cDNA clones encoding rabbit immunoglobulin λ chains. *Biochem J* 1987;245:691–697.
456. Bernstein KE, Alexander CB, Mage RG. Germline V_H genes in an a3 rabbit not typical of any one V_Ha allotype. *J Immunol* 1985;134:3480–3488.
457. Gallarda JL, Gelason KS, Knight KL. Organization of rabbit immunoglobulin genes. I. Structure and multiplicity of germ-line VH genes. *J Immunol* 1985;135: 4222–4228.
458. McCormack WT, Laster SM, Marzluff WF, Roux KH. Dynamic gene interactions in the evolution of rabbit V_H genes: a four codon duplication and block homologies provide evidence for intergenic exchange. *Nucleic Acids Res* 1985; 13:7041–7054.
459. Fitts MG, Metzger DW. Identification of rabbit genomic Ig-VH pseudogenes that could serve as donor sequences for latent allotype expression. *J Immunol* 1990; 145:2713–2717.
460. Knight KL, Becker RS. Molecular basis of the allelic inheritance of rabbit immunoglobulin V_H allotypes: implications for the generation of antibody diversity. *Cell* 1990;60:963–970.
461. Knight KL, Crane MA. Generating the antibody repertoire in rabbit. *Adv Immunol* 1994;56:179–218.
462. Knight KL, Winstead CR. Generation of antibody diversity in rabbits. *Curr Opin Immunol* 1997;9:228–232.
463. Roux KH, Dhanarajan P, Gotschalk V, McCormack WT, Renshaw RW. Latent a1 VH germline genes in an a^2a^2 rabbit: evidence for gene conversion at both the germline and somatic levels. *J Immunol* 1991;146:2027–2036.
464. Short JA, Sethupathi P, Zhai SK, Knight KL. VDJ genes in V_Ha2 allotype-suppressed rabbits: limited germline V_H gene usage and accumulation of somatic mutations in D regions. *J Immunol* 1991;147:4014–4018.
465. Raman C, Spieker-Polet H, Yam PC, Knight KL. Preferential V_H gene usage in rabbit immunoglobulin-secreting heterohybridomas. *J Immunol* 1994;152: 3935–3945.
466. Oudin J. L'Allocypie de ceertains antigens proteindiques du serum. *CR Acad Sci* 1956;242:2606–2608.
467. Todd CW. Allotypy in rabbit 19S protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1963; 11:170–175.
468. Feinstein A. Character and allotypy of an immune globulin in rabbit colostrum. *Nature* 1963;199:1197–1199.
469. Hilschmann N, Craig LC. Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965;53:1403–1409.

470. Maki R, Kearney J, Paige C, Tonegawa S. Immunoglobulin gene rearrangement in immature B cells. *Science* 1980;209:1366–1369.
471. Tonegawa S, Hozumi N, Matthyssens G, Schuller R. Somatic changes in the content and context of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1977;41:Pt 2:877–889.
472. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302: 575–581.
473. Dray S, Young GO, Gerald L. Immunochemical identification and genetics of rabbit γ-globulin allotypes. *J Immunol* 1963a;91:403–410.
474. Dray S, Young GO, Nisonoff A. Distribution of allotypic specificities among rabbit γ-globulin molecules genetically defined at two loci. *Nature* 1963b;199: 52–54.
475. Becker RS, Knight KL. Somatic diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits. *Cell* 1990;63: 987–997.
476. Kelus AS, Weiss S. Mutation affecting the expression of immunoglobulin variable regions in the rabbit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4883–4886.
477. Allegrucci M, Newman BA, Young-Cooper GO, et al. Altered phenotypic expression of immunoglobulin heavy-chain variable-region (VH) genes in Alicia rabbits probably reflects a small deletion in the VH genes closest to the joining region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5444–5448.
478. DiPietro LA, Short JA, Zhai SK, Kelus AS, Meier D, Knight KL. Limited number of immunoglobulin V_H regions expressed in the mutant rabbit "Alicia". *Eur J Immunol* 1990a;20:1401–1404.
479. Chen HT, Alexander CB, Young-Cooper GO, Mage RG. V_H gene expression and regulation in the mutant alicia rabbit: rescue of V_Ha2 allotype expression. *J Immunol* 1993a;150:2783–2793.
480. Mage R, Dray S. Persistent altered phenotypic expression of allelic γG-immunoglobulin allotypes in heterozygous rabbits exposed to isoantibodies in fetal and neonatal life. *J Immunol* 1965;95:525–535.
481. Tunyaplin C, Knight KL. IgH gene rearrangements on the unexpressed allele in rabbit B cells. *J Immunol* 1997;158:4805–4811.
482. Tunyaplin C, Knight KL. Fetal VDJ gene repertoire in rabbit: evidence for preferential rearrangement of V_H1. *Eur J Immunol* 1995;25:2583–2587.
483. Hayward AR, Simons MA, Lawton AR, Mage RG, Cooper MD. Pre-B and B cells in rabbits. Ontogeny and allelic exclusion of κ light chain genes. *J Exp Med* 1978;148:1367–1377.
484. McElroy PJ, Willcox N, Catty D. Early precursors of B lymphocytes. I. Rabbit/mouse species differences in the physical properties and surface phenotype of pre-B cells, and in the maturation sequence of early B cells. *Eur J Immunol* 1981;11:76–85.
485. Gathings WE, Mage RG, Cooper MD, Lawton AR, Young-Cooper G. Immunofluorescence studies on the expression of VH a allotypes by pre-B and B cells of homozygous and heterozygous rabbits. *Eur J Immunol* 1981;11:200–206.
486. Gathings WE, Mage RG, Cooper MD, Young-Cooper GO. A subpopulation of small pre-B cells in rabbit bone marrow express κ light chains and exhibit allelic exclusion b locus allotypes. *Eur J Immunol* 1982;12:76–81.
487. Crane MA, Kingzette M, Knight KL. Evidence for limited B-lymphopoiesis in adult rabbits. *J Exp Med* 1996;183:2119–2127.
488. Hayakawa K, Hardy RR, Stall AM, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. *Eur J Immunol* 1986;16:1313–1316.
489. Harrison MR, Mage R. Allotype suppression in the rabbit. I. The ontogeny of cells bearing immunoglobulin of paternal allotype and the fate of these cells after treatment with antiallotype antisera. *J Exp Med* 1973;138:764–774.
490. DiPietro LA, Knight KL. Restricted utilization of germ-line V_H genes and diversity of D regions in rabbit splenic Ig mRNA. *J Immunol* 1990b;144:1969–1973.
491. Stepankova R, Kovaru F. *Development of lymphatic tissues in germfree and conventionally reared rabbits.* In: Malek P, Bartos V, Weissleder H, Wite MH, eds. *Proc 6th Int Cong Lymphology.* Stuttgart: Georg Thieme; Prague: Avieenum, Czech Medical Press, 1978;290–292.
492. Stepankova R, Kovaru F. Immunoglobulin-producing cells in lymphatic tissues of germfree and conventional rabbits as detected by an immunofluorescence method. *Folia Microbiol (Praha)* 1985;30:291–294.
493. Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R. Development of antibody formation in germfree and conventionally reared rabbits: the role of intestinal lymphoid tissue in antibody formation to *E. coli* antigens. *Folia Biol* 1980;26:81–93.
494. Cooper MD, Perey DY, Gabrielsen AE, Sutherland DER, McKneally MF, Good RA. Production of an antibody deficiency syndrome in rabbits by neonatal removal of organized intestinal lymphoid tissues. *Int Arch Allergy* 1968;33: 65–88.
495. Perey DY, Cooper MD, Good RA. The mammalian homologue of the avian bursa of Fabricius. *Surgery* 1968;64:614–621.
496. Morris B, Miyashka M. *Immunology of the sheep.* Basel: Editiones Roche, 1985.
497. Maddox JF, Mackay CR, Brandon MR. Ontogeny of ovine lymphocytes. II. An immunohistochemical study on the development of T lymphocytes in the sheep fetal spleen. *Immunology* 1987;62:107–112.
498. Press CMCL, Hein WR, Landsverk T. Ontogeny of leucocyte populations in the spleen of fetal lambs with emphasis on the early prominence of B cells. *Immunology* 1993;88:28–34.
499. Press CMCL, Reynolds JD, McClure SJ, Simpson-Morgans MW, Landsverk T. Fetal lambs are depleted of IgM⁺ cells following a single injection of an anti-IgM antibody early in gestation. *Immunology* 1996;88:28–34.
500. Reynolds JD, Morris B. The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *Eur J Immunol* 1983;13:627–635.
501. Gerber HA, Morris B, Trevella W. The role of gut-associated lymphoid tissues in the generation of immunoglobulin-bearing lymphocytes in sheep. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1986;64:201–213.
502. Miyasaka M, McCullagh P. The response of the foetal lamb to maternal lymphocytes. *J Reprod Immunol* 1982;4:217–230.
503. Silverstein AM, Prendergast RA, Kraner KL. Foetal response to antigenic stimulus. IV. Rejection of skin homografts by the foetal lamb. *J Exp Med* 1964;119: 955–964.
504. Schinckel PG, Ferguson KA. Skin transplantation in the foetal lamb. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1953;6:533–545.
505. Reynaud CA, MacKay CR, Muller RG, Weill JC. Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer's patches. *Cell* 1991a;64:995–1005.
506. Reynaud CA, Garcia C, Hein WR, Weill JC. Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process. *Cell* 1995;80: 115–125.
507. Renstroem HM, Press CHMCL, Trevella W, Landsverk TH. Response of leucocyte populations in the ileal Peyer's patch of fetal lambs treated with ferritin per os. *Dev Immunol* 1996;4:289–298.
508. Glick G, Chang TS, Jaap RG. The bursa of Fabricius and antibody production. *Poult Sci* 1956;35:224–225.
509. Mueller AP, Wolfe HR, Meyer J. Precipitin production in chickens. XXI. Antibody production in bursectomized chickens and in chickens injected with 19-notestosterone on the fifth day of incubation. *J Immunol* 1959;83:507–510.
510. Cooper MD, Peterson RAA, South MA, Good RA. The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J Exp Med* 1966;123:75–102.
511. Warner NL, Uhr W, Thorbecke GJ, Ovary Z. Immunoglobulins, antibodies and the bursa of Fabricius: induction of aggammaglobulinemia and the loss of all antibody-*forming capacity by hormonal buresectomy.* J Immunol 1969;103: 1317–1330.
512. Toivanen A, Toivanen P. Avian immunology basis and practice. *I.* Florida: Boca Raton, CRC Press, 1987a.
513. Toivanen A, Toivanen P. Avian immunology basis and practice. *II.* Florida: Boca Raton, CRC Press, 1987b.
514. Le Douarin N. Particularités du noyau interphasique chey la Caille japonaise (Coturnix coturnix japonica). Utilisation de ces particularitiés comme "marquage biologique" dans les recherches sur les interactions tissulaires et les migrations cellulaires u cours de l'ontogenese. *Bull Biol Fr Belge* 1969;103: 453–468.
515. Le Douarin NM, Houssaint E, Jotereau FV, Belo M. Origin of hemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:2701–2705.
516. Le Douarin N, Maclaren A. *Chimeras in developmental biology.* Orlando: Academic Press, 1984.
517. Toivanen P, Naukkarinen A, Vainio O. Bursal and post-bursal stem cells in the chicken: functional characteristics. Eur J Immunol 1987;3:585–595.
518. Dieterlen-Lièvre F, Martin C. Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Dev Biol* 1981;88:180–191.
519. Lassila O, Eskola J, Toivanen P, Martin C, Diterlen-Lièvre F. The origin of lymphoid stem cells studied in chick yolk sac-embryo chimeras. *Nature* 1978;727: 353–354.
520. Lassila O, Martin C, Dieterlen-Lievre F, Gilmour DG, Eskola J, Toivanen P. Migration of prebursal stem cells from the early chicken embryo to the yolk sac. *Scand J Immunol* 1982;16:265–268.
521. Houssaint E, Belo M, Le Douarin NM. Investigations on cell lineage and tissue interactions in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras. *Dev Biol* 1976;53:250–264.
522. Moore MA, Owen JJT. Chromosome marker studies in the irradiated chick embryo. *Nature* 1967;215:1081–1082.
523. Pink JRL, Ratcliffe MJH, Vainio O. Immunoglobulin-bearing stem cells for clones of B (bursa-derived) lymphocytes. *Eur J Immunol* 1985;15:617–620.
524. Pink JRL. Counting components of the chicken's B cell system. *Immunol Rev* 1986;91:115–128.
525. Szenberg A. Ontogenesis of the immune system in birds. In: Marchalonis JJ, ed. *Comparative immunology.* Oxford: Blackwell Science, 1976:419.
526. Pink JRL, Lassila O. B-cell commitment and diversification in the bursa of Fabricius. *Curr Top Microbiol Immunol* 1987;135:57–64.
527. Ratcliffe MJ, Ivanyi J. Allotype suppression in the chicken. IV. Deletion of B cells and lack of suppressor cells during chronic suppression. *Eur J Immunol* 1981;11:306–310.
528. Ratcliffe MJH, Lassila O, Pink JRL, Vainio O. Avian B cell precursors: surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event. *Eur J Immunol* 1986;16:129–133.
529. Reynaud CA, Anquez V, Dahan A. A single rearrangement event generates most of the chicken Ig light chain diversity. *Cell* 1985;40:283–290.
530. Reynaud CA, Anquez V, Grimal H, Weill JC. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* 1987;48:379–388.

531. Reynaud CA, Dahan A, Anquez V, Weill JC. Somatic hyperconversion diversifies the single V_h gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell* 1989;59:171–183.
532. Reynaud CA, Anquez V, Weill JC. The chicken D locus and its contribution to the immunoglobulin heavy chain repertoire. *Eur J Immunol* 1991b;21:2661–2670.
533. McCormack WT, Tjoelker LW, Carlson LM, et al. Chicken Ig_L gene rearrangement involves deletion of a circular episome and addition of single nonrandom nucleotides to both coding segments. *Cell* 1989a;56:785–791.
534. McCormack WT, Tjoelker LW, Barth CF, et al. Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development. *Genes Dev* 1989b;3:838–847.
535. Melchers F. *Introduction to the Annual Report of the Basel Institute for Immunology*. Basel: Basel Institute for Immunology, 1988.
536. Langman RE, Cohn M. A theory of the ontogeny of the chicken humoral immune system: the consequences of diversification by gene hyperconversion and immune system. The consequences of diversification by gene hyperconversion and its extension to rabbit. *Res Immunol* 1993;144:422–446.
537. Smithies O. *The genetic basis of antibody variability*. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1967;32:161–166.
538. Edelman GM, Gally JA. Somatic recombination of duplicated genes: an hypothesis on the origin of antibody diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967;57: 353–358.
539. Thompson CB, Neiman P. Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment. *Cell* 1987;48:369–378.
540. Takeda S, Masteller EL, Thompson CB, Buerstedde JM. RAG-2 expression is not essential for chicken immunoglobulin gene conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4023–4027.
541. Parvari R, Ziv E, Lantner F, Heller DK, Schechter I. Somatic diversification of chicken immunoglobulin light chains by point mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3072–3076.
542. Reynaud CA, Imhof BA, Anquez V, Weill JC. Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo. *EMBO J* 1992;12: 4349–4358.
543. Reynaud CA, Bertocci B, Dahan A, Weill JC. Formation of the chicken B-cell repertoire: ontogenesis, regulation of Ig gene rearrangement, and diversification by gene conversion. *Adv Immunol* 1994;57:353–375.
544. Houssaint E, Lassila O, Vainio O. Bu-I antigen expression as a marker for B cell precursors in chicken embryos. *Eur J Immunol* 1989;19:239–243.
545. Houssaint E, Mansikka A, Vainio O. Early separation of B and T lymphocyte precursors in chick embryo. *J Exp Med* 1991;174:397–406.
546. Mansikka A, Sandberg M, Lissila O, Toivanen P. Rearrangement of immunoglobulin light chain genes in the chicken occurs prior to colonization of the embryonic bursa of Fabricius. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9416–9420.
547. Jerne NK. The somatic generation of immune recognition. *Eur J Immunol* 1971; 1:1–9.
548. Papavasiliou F, Casellas R, Suh H, et al. V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses. *Science* 1997;278:298–301.
549. Han S, Dillon SR, Zheng B, Shimoda M, Schlissel MS, Kelsoe G. V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes. *Science* 1997;278: 301–305.
550. Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996;86:897–906.
551. Klein J. *Immunology—the science of self–nonself discrimination*. New York: John Wiley and Sons, 1982:89.
552. Carson S, Wu GE. A linkage map of the mouse immunoglobulin lambda light chain locus. *Immunogenetics* 1989;29:173–179.
553. Combriato G, Klobeck HG. V lambda and J lambda–C lambda gene segments of the human immunoglobulin lambda light chain locus are separated by 1513–1522.
554. Weill JC. Mechanisms of B cell neoplasia. Basel: Editiones Roche, 1989:16.

第 7 章　B 淋巴细胞活化

Anthonyl L. DeFranco①

B 细胞活化概述

225　B 细胞自骨髓中产生并转移到外周之后,要经过一个简短的非成熟期,其时它们非常敏感,极易因接触抗原而失活。这也是在 B 细胞中诱导免疫耐受的一种机制。在外周经过一段较短时间(不到一周)后,如果接受来自抗原或其他类型细胞的必需信号,新产生的 B 细胞就会获得一种长期的再循环表型,并且有能力产生抗体应答。抗原与特异性 B 细胞的接触可激发 B 细胞抗原受体(B-cell antigen receptor, BCR)的跨膜信号传导功能。如此又能诱导 B 细胞活化的早期事件,包括 MHC Ⅱ 类分子表达增高、细胞周期自 G_0 期进入 G_1 期,而且如果有抗原的强烈刺激存在,还会发生细胞增殖。BCR 分子在与抗原结合之后,迅速内在化,使抗原在内体或溶酶体中被摄取和降解。对蛋白质抗原来说,抗原来源的肽结合到 MHC Ⅱ 类分子的结合槽内,然后此复合物到达细胞表面,充当特异性 Th 细胞的刺激物。Th 细胞的抗原识别又诱导其与 B 细胞形成紧密而长期存在的相互作用关系,并合成 B 细胞生长和分化因子。这些细胞因子可直接分泌到相互作用的淋巴细胞间的狭窄空间内。而且,活化的 Th 细胞能表达细胞表面分子,其中最重要的是 CD40 配体(CD40L),它可与 B 细胞上的受体相作用,从而提供重要的活化信号。该途径活化的 B 细胞或者增殖并最终在淋巴器官的 T 细胞区中分化成为抗体分泌细胞(也叫浆细胞),或者在初期活化之后迁移到滤泡区并开始形成生发中心。正是在生发中心内,B 细胞激活免疫球蛋白基因的体细胞突变,然后再经过一种与抗原结合有高度亲和力的严格的选择过程,最终产生可分泌高亲和力抗体的记忆 B 细胞和浆细胞。

---

① Department of Microbiology and Immunology, University of California, San Francisco, California 94143.

一般来说，对蛋白质抗原的抗体应答需要 B 细胞与 Th 细胞相互协作，但有些抗体应答的产生并不需要 T 细胞的辅助。这些 T 细胞非依赖性(T cell-independent，TI)抗原可根据它们的特性分为 1 类或 2 类。TI-2 抗原有高度重复结构，最好的例子就是多糖，这些抗原可以特异性地激发 BCR 有效或持续的信号传导功能。相反，TI-1 抗原通常包含能有效活化 B 细胞的多克隆激活物，而这些组分还是抗原结构的一部分。在对这类抗原的免疫应答中，BCR 的功能可能首先是作为一个聚焦成分，使这些多克隆激活物集中到那些能特异性结合一个连接表位的 B 细胞的表面。对所有类别的 TI 抗原来说，B 细胞产生抗体应答都需要细胞因子参与，尽管其来源可能是非淋巴细胞类型，例如巨噬细胞。在这两种情况中，抗原的一个特殊特征可解除或降低对来自 Th 细胞的可溶性刺激物和细胞结合刺激物的需求。

B 细胞抗原活化的调节

226

BCR 在 B 细胞的产生、成熟、存活和活化中发挥关键作用。关于其结构和复杂的信号传导机制已研究得很多。近年来已开始用基因和假基因方法来阐述 BCR 是如何控制 B 细胞的命运的。但是仍有很多方面有待搞清楚。

B 细胞抗原受体结构

新生 B 细胞最初表达膜免疫球蛋白 M(mIgM)，很快接着表达 mIgM 和 mIgD。在免疫应答过程中发生的类别转换重组导致表达其他类别膜免疫球蛋白(mIg)，如 IgG、IgA 或 IgE 的记忆 B 细胞出现。mIg 的胞内结构域较短，从只有三个氨基酸残基(如 mIgM 和 mIgD 都是赖氨酸-缬氨酸-赖氨酸)到有 28 个氨基酸残基(mIgG 亚类)[1]。IgG 和 IgE 有较长的胞内结构域，可提高记忆 B 细胞应答的效率[2,3]。mIg 的跨膜部分约有 25 个氨基酸残基，且缺少在每个 T 细胞受体亚单位中可见到的潜在荷电残基。但是 mIg 的跨膜区存在与其他多肽相互作用的潜力，这是因为该区包含许多含羟基的氨基酸(如小鼠 mIgM 有 10～25 个残基)。尽管不同 mIg 重链的跨膜区顺序各异，但位于预测的 α 螺旋一侧的氨基酸是高度保守的[1]。mIg 跨膜区的这一保守表面可能在与抗原受体复合物的其他成分发生相互作用时发挥作用。

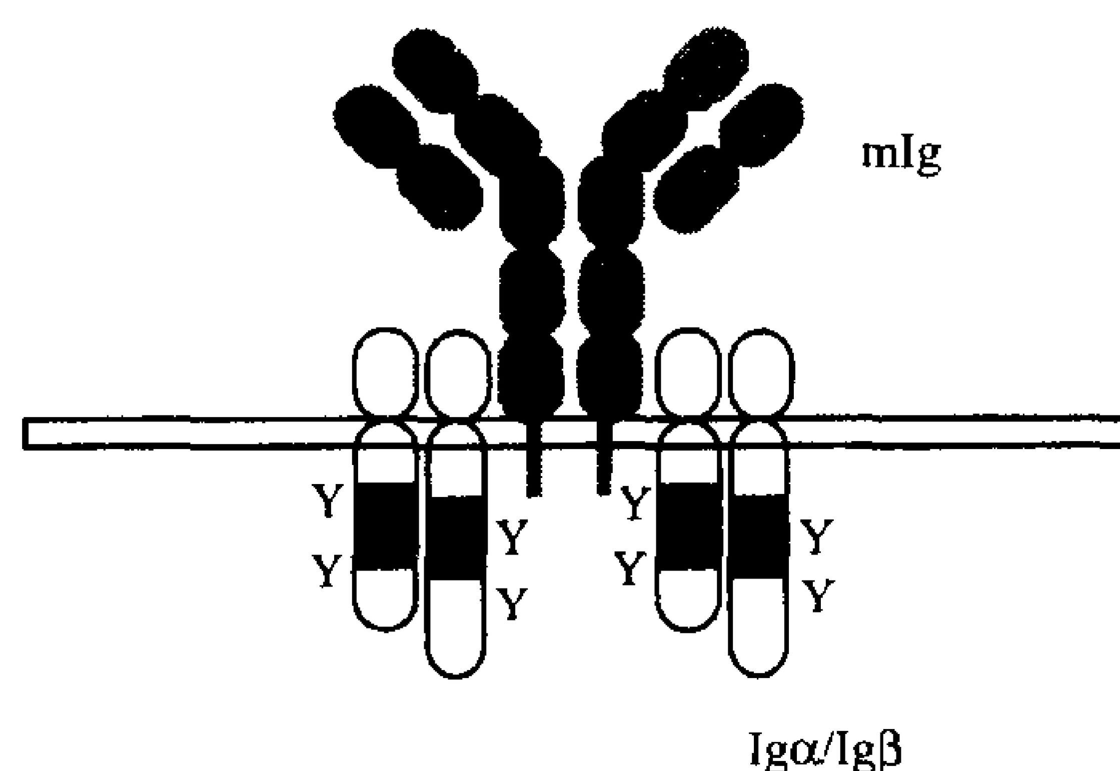


图 7.1　B 细胞抗原受体结构。BCR 含膜 Ig，包括两个重链和二硫键连接的 Igα 和 Igβ 的异二聚体。后者成分是 mIgM 转运至细胞表面所必需的。ITAM 顺序，在 Igα 和 Igβ 的胞外结构域中以方框表示，负责信号转导功能。与一个 mIg 分子相连的 Igα/Igβ 异二聚体的数量仍是未知。请注意，图示中胞内结构域的比例相对于胞外结构域是增大了的。

BCR 以复合物形式存在于 mIg 和至少其他两种跨膜多肽 Igα 与 Igβ 之间(图 7.1)。所有独特型 mIg 都能与 Igα 和 Igβ 形成复合物[4]。这种复合物只有在很温和的去垢剂中才能稳定存在{如洋地黄皂甙和 3-[(3-胆胺酰丙基)-双甲基氨酰]-1-丙磺酸内酯(CHAPS)}所以多年来都未能被人们认知。常用的非离子型去垢剂如 NP-40 和 TritonX-100 可将 mIg 自 Igα 和 Igβ 上解离下来。在非淋巴 Cos 细胞中，编码膜形式 μ 重链(μ_m)的构建物和编码轻链的构建物的表达，使 mIgM 在内质网中而非在质膜上表达[5]。引入 Igα 和 Igβ(分别是 mb-1 和 B-29 基因产物)及轻、重链的表达载体，可在细胞表面表达上述四种多肽的复合物。据认为，B 细胞表面表达 mIgM 也需要在复合物中组装入 Igα/Igβ。其他独特型的 mIg，如 mIgD，能够在缺乏附属蛋白的情况下到达细胞表面，但是必须以含 Igα 和 Igβ 的复合物形式存在于 B 细胞中。

在小鼠中，Igα、Igβ 多肽组合在一起，形成分别含 34、40kDa 多肽的二硫键连接的异二聚体[1]。少数 Igβ 分子以较小的多肽形式存在，称为 Igγ。在人类 B 细胞中，Igα 和 Igβ 的相对大小是相反的，可能是因为 Igα 的糖基化较重。Igα 和 Igβ 多肽与三个 CD3 多肽(γ、δ、ε)具有结构相似性。每个多肽都含有一个膜外 Ig 样的结构

域、一个跨膜区和一个 61 个氨基酸残基(Igα)和 48 个氨基酸残基(Igβ)的 C 端胞内结构域。这些胞内尾足以介导与信号传导元件的相互作用,并且每个都含有与 T 细胞受体亚单位和大多数 Fc 受体的胞内结构域序列同源的 YxxL/Ix7YxxL/I 顺序(x 可为任何氨基酸)。该顺序称为免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-basedactivationmotif, ITAM)[1,6],该基序在 BCR 信号传导途径中发挥关键作用,这点将在下面阐述。

mb-1 和 B29 基因最初是因为只在 B 细胞(而非 T 细胞)中表达而被分离出来。它们在前 B 细胞前体期到浆细胞期之间,以一种 B 细胞特异性方式表达,但在浆细胞期 B29 表达而 mb-1 不表达。在许多浆细胞瘤细胞中,由于缺乏 Igα,mIg 在细胞表面不表达。

在前 B 细胞中会形成一种 B 细胞充分发育所需的、相关的前 BCR 复合物,该复合物像 BCR 那样含 μ 重链和 Igα/Igβ 异二聚体,但其轻链被 λ5 和 VpreB 替代轻链所替代。如果缺乏该种复合物,就会像有些小鼠因定点突变破坏了必需组成而致该类复合物缺乏那样[7],B 细胞发育就会停在该期,没有(或极少有)B 细胞会继续发育。最可能的解释假设是:前 BCR 信号传导允许前 B 细胞发育成熟到下一期,其时 Igκ 和 λ 基因座得以重排。但目前尚不清楚前 BCR 信号传导是如何被激发的。

BCR 信号功能初始

BCR 的信号转导功能由寡聚(或多聚)抗原介导的受体交联所触发,这一事件通常用抗 Ig 抗体人工诱导,因为这样可以同时在所有的 B 细胞中触发信号传递。然而,应该注意的是,真抗原激发 BCR 信号的能力

227

可能存在重要差异。这种差异的存在可能是因为抗原的物理特性,如共价键、可延展性等,或者是因为与其他 B 细胞表面分子(见下文)相互作用的能力,还可能是因为与 mIg 相互作用的亲和力所致。

抗原受体交联之后发生的最初事件是少数蛋白质中酪氨酸磷酸化的增加,随之,这或许直接改变了这些蛋白质的活性,可能导致多蛋白信号复合物的组装[8,9]。该磷酸化可用抗磷酸化酪氨酸抗体,应用免疫斑点技术得以呈现,而且在向 B 细胞加入抗 Ig 之后 5 秒钟就能观察到。该磷酸化的增加首先是由于两类细胞内蛋白酪氨酸激酶(Syk 和 Src 家族的几个成员)的活化,以及随之而来的第三种酪氨酸激酶(Btk)的活化。

关于 BCR 交联如何激活 Syk 和 Src 家族酪氨酸激酶,有一种已被广泛接受的模型(图 7.2)。受体参与并聚集之后的最初事件,是 Igα 和 Igβ 的两个 ITAM 酪氨酸的磷酸化[9]。双磷酸化的 ITAM 可被 Syk 的 Src 同源 2 (Src-homology 2, SH2)结构域以高亲和力识别[10](图 7.3),如此使 Syk 重新加到 BCR 复合物上。结合到双磷酸化 T 细胞受体(Tcell receptor, TCR)ITAM 肽的相关 T 细胞酪氨酸激酶 ZAP-70 的结构,已经用 X 射线晶体衍射学方法得以确定,可能与 Syk 的对应区结构极为相似。ZAP-70 的 C 端 SH2 结合到 ITAM 的第一个 pYxxL/I (pY = 磷酸酪氨酸),而第二个 pYxxL/I 序列却结合到 N 端 SH2 并且有其他 SH2 参与,后者是一种非典型性排

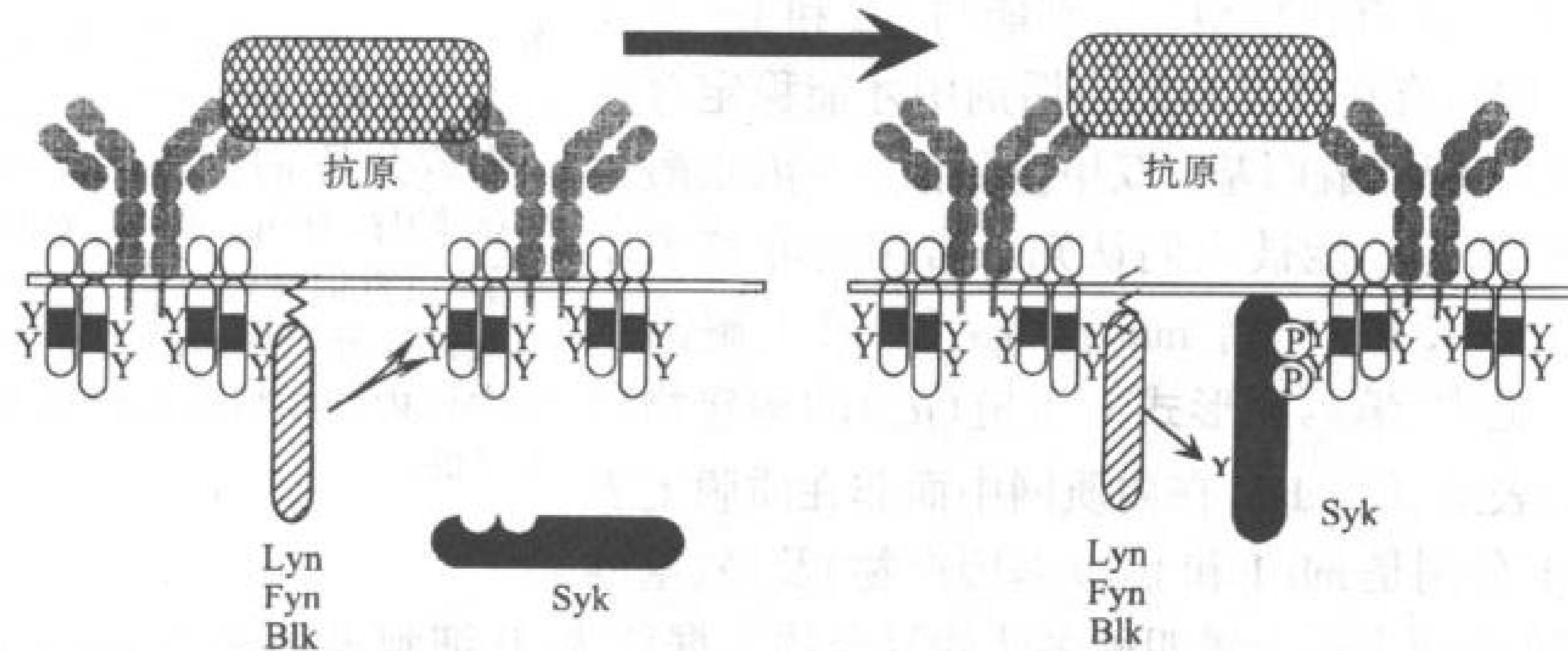


图 7.2 酪氨酸激酶因受体寡聚化而活化。抗原诱导 BCR 寡聚化,导致 ITAM 酪氨酸被 Src 家族酪氨酸激酶磷酸化,Src 可能预结合到 BCR 或只是简单的存在于质膜附近。这为受体利用 Syk 提供了一个结合位点,在那里酪氨酸激酶因共酪氨酸磷酸化而活化。该图展示了 Src 家族成员的作用,但 Syk 也能够磷酸化其他 Syk 分子。Src 家族酪氨酸激酶也能结合到磷酸化的 ITAM 并被活化。

列，因为大多数 SH2 结构域是自限性的功能单位。两个酪氨酸之间的空间对 ITAM 的信号功能是非常重要的[12]，而且从结构可见，插入肽是展开的，且一个更小些的空间不会允许结合到两端的 SH2 上。Src 家族激酶也能够结合到磷酸化的 ITAM 上，但比 Syk 要弱得多，因为它们只有一个 SH2 结构域[13]。

BCR 信号的这一特点表明了激活酪氨酸激酶的受体的信号的一个共同特点：受体本身或其他蛋白质的磷酸化促进了多蛋白信号复合物的形成。许多信号成分有负责介导蛋白质-蛋白质相互作用的蛋白质结构的可识别结构域。例如，信号蛋白的 SH2 结构域以一种依赖磷酸化和相邻氨基酸顺序的方式结合到蛋白质的酪氨酸磷酸化区[14]。如上所述，Syk 的每个 SH2 结构域都优先结合到 ITAM 的 pYxxL 或 pYxxI 顺序。其他如结合到脯氨酸富集区和普列克底物蛋白（pleckstrin，即血小板-白细胞 C 激酶底物）同源（pleckstrinhomology，PH）结构域的 Src 同源 3（SH3）结构域，有些结合到磷酸肌糖，有些亚型［也叫磷酸酪氨酸结合（PTB）结构域］则结合到独特的含磷酸酪氨酸的顺序[15]。

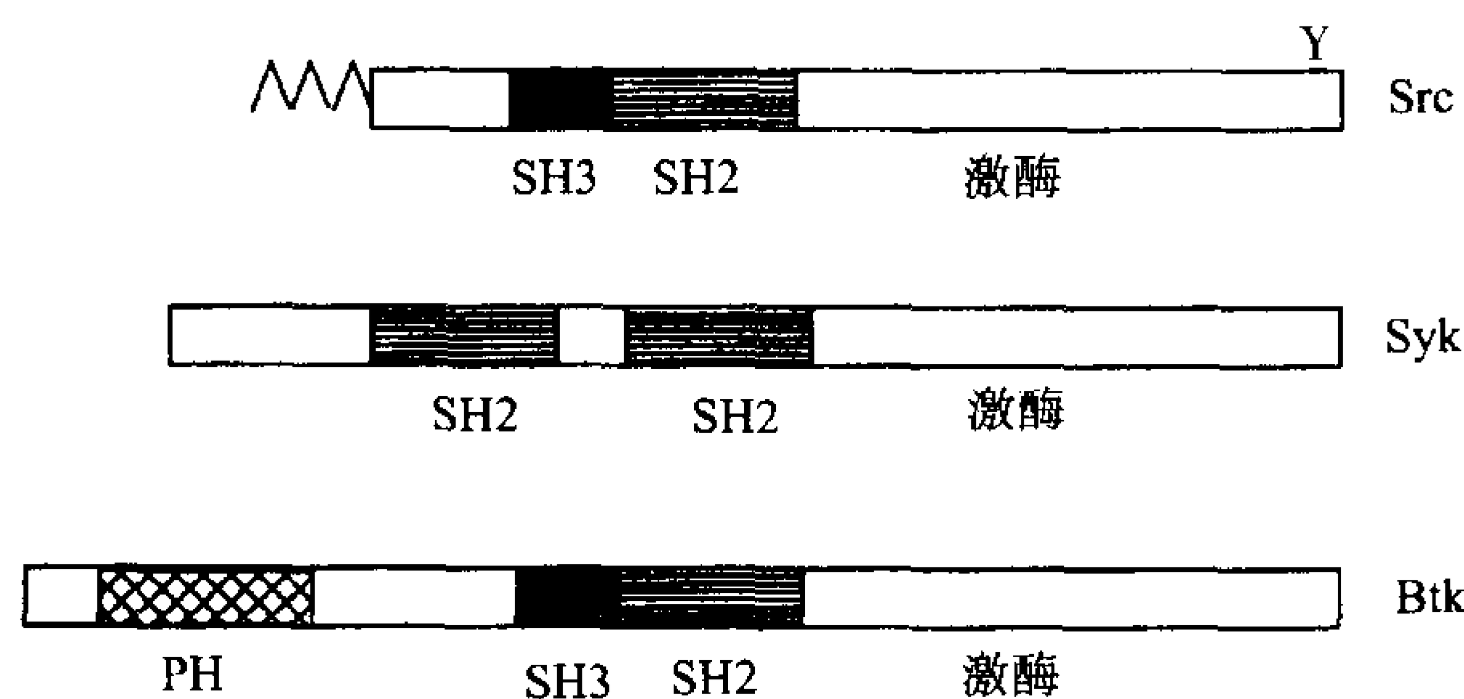


图 7.3 参与 BCR 信号的蛋白酪氨酸激酶的结构域。胞内酪氨酸激酶 Src 家族成员都有一个含阳性调节酪氨酸磷酸化位点的激酶结构域、两个其他的同源结构域［分别叫 SH2、SH3（同源），介导蛋白质-蛋白质间相互作用］、一个 C 端阴性调节酪氨酸磷酸化位点和一个独特的含十四烷基化位点的 N 端结构域（参与膜定位）。相反，Syk 和 ZAP-70 含一个激酶结构域、两个 SH2 结构域，但缺乏 SH3 结构域，十四烷基化位点和调节性 C 端酪氨酸见于 Src 家族成员。Btk 含 PH（普列克底物蛋白同源）、SH2 与 SH3 结构域，不含 C 端激酶结构域。

一旦结合到磷酸化的 ITAM，Syk 中上调其活性的激酶结构域（Y518、Y519）中的两个相邻酪氨酸就会发生磷酸化，可能至少增高十倍。Syk 与双磷酸化 ITAM 的结合会引起有利于这种活化磷酸化的构型变化[16-18]。但负责该种活化磷酸化的激酶尚不完全清楚。许多实验表明，这些磷酸化可由 Src 家族激酶或 Syk 的其他分子，以磷酸根转移反应方式提供[19~23]。这是 Syk 与其 T 细胞中的“亲戚”ZAP-70 之间的重要的调节差异，因为后者的活化必需一个 Src 家族成员参与。所以，BCR 活化比 TCR 信号更少地依赖 Src 家族酪氨酸激酶。这一调节差异可能对允许 B 细胞提高对多种物理结构抗原的应答的柔性、限制 T 细胞只对肽-MHC 复合物起反应是非常重要的。 228

虽然在 Syk 和 Src 家族酪氨酸激酶之间，明显存在协同作用，但 Syk 似乎更为重要。例如，在 DT40 鸡 B 细胞衍生物中，仍残存有一些信号功能，而在该细胞中表达的、惟一的 Src 基因——lyn 基因，已被同源重组所清除。相反，敲除 syk 基因会导致该类细胞中 BCR 信号功能的极度缺陷[24]以及小鼠 B 细胞发育阻滞[25,26]。对后者的影响可能是因为在骨髓 B 细胞发育中，前 BCR 的信号功能需要 Syk。而 DT40 鸡 B 细胞只表达 Src 家族中的 lyn 成员，哺乳动物 B 细胞则表达该家族的至少三个成员：$p53/56^{lyn}$、$p59^{fyn}$和 $p55^{blk}$。而且成熟 B 细胞还表达一些 $p58^{fgr}$和低水平 $p56^{lck}$[27]。在这些表达物中，Lyn 是优势成分，并典型地包含了所有 Src 家族中约 2/3 的激酶蛋白及活性。虽然小鼠的 *blk*、*fyn* 或 *fgr* 基因已被敲除，但其 B 细胞的 BCR 信号功能仍相对正常[28,29]，但 $lyn^{-/-}$ 小鼠的 B 细胞存在多种缺陷[30~32]。由于 Fyn 或 Blk 的水平或活性没有补偿变化，所以这些 B 细胞中 Src 家族成员的总量降低。源于 Lyn 缺陷的 B 细胞 BCR 的交联，其 Syk 的 Igα 酪氨酸磷酸化虽然高峰水平只在很小程度受到影响[32]，但与正常 B 细胞中的酪氨酸磷酸化相比，也是延迟的。相应的，一些下游信号事件（Shc 的酪氨酸磷酸化、酪氨酸磷酸蛋白总水平降低，等等）也被延迟或有所降低，但与此相反的是，有丝分裂原激活的蛋白（mitogenactivatedprotein，MAP）激酶活化却是升高的。这些结果（后者除外）可用图 7.2 的模型来解释。由于总 Src 家族激酶水平降低达三倍，所以 Syk 和 Igα 的缓慢磷酸化可能反映了 Lyn 和 Src 家族成员在极为重要的、诱发 BCR 信号级联的磷酸化作用中是多余的。另外，Lyn 在负调节 BCR 信号的下游事件中发挥一定作用，这点在下面阐述。

准确地说，BCR 参与是如何使 BCRITAM 初始磷酸化的？目前尚不完全清楚。最简单的模型是：Src 家族酪氨酸激酶与 BCR 预联结，从而交联反应允许与一个 BCR 复合物联结的激酶再去磷酸化另一个 *BCR* 复合

物中的 ITAM。每个 Src 家族蛋白激酶都与抗原受体复合物相联结[27]，但是量相当低。这些激酶可能通过其 N 端区(图 7.3)，与 Igα ITAM 的两个酪氨酸之间的顺序发生弱的相互作用，从而结合到 Igα 胞内结构域，或者通过激酶的 SH2 结构域与任一酪氨酸磷酸化的 ITAM 之间发生强相互作用[33,34]，而结合到 Igα 或 Igβ。后种结合方式需要低水平的构成磷酸化，该磷酸化可能以细胞酪氨酸激酶(首先是以 *N*-连接脂肪酸连接于膜上的 Src 家族成员)和细胞酪氨酸磷酸酯酶(如 CD45)之间持续平衡的方式发生。在任一情况下，受体簇集的关键情况是：少量激酶在一定数量的 ITAM 周围聚集，使 ITAM 有效地磷酸化并结合到 Syk 及更多的 Src 家族激酶。这样就使簇集的受体信号复合物中的酪氨酸激酶数量升高，从而导致更多能抑制磷酸酯酶活性的正反馈环中的 ITAM 磷酸化。

BCR 信号机制的主要特点是酪氨酸激酶的活化。如前述，结合到交联的受体复合物的 Syk，由于其激酶结构域中 Y518 与 Y519 的磷酸化而被活化。结合到 ITAM 的 Src 家族成员，因 SH2 与磷酸化的 BCR 胞内结构域的相互作用而同样被活化[35]。Src 家族激酶可被酪氨酸激酶 C 端附近的酪氨酸磷酸化负调节。该负调节可因 CD45 切除磷酸根而解除[36]。有相当证据表明，CD45 是 B、T 细胞抗原受体信号的重要正调节因子，其途径可能是通过 Src 家族激酶的磷酸化[36]。虽然在缺乏 Src 家族成员(如缺乏 CD45)或 Src 家族成员活性被极大抑制的条件下，仍能观察到一些 BCR 信号，但完整的 BCR 信号需要 Syk 与 Src 家族酪氨酸激酶的活性。如前所述，这可能反映了 Syk 被另一 Syk 分子磷酸化和活化的能力。

参与 BCR 信号的另一酪氨酸激酶是 Btk[37,38]。Btk 是一种有独特结构的细胞内酪氨酸激酶(图 7.3)，在 X 连锁的血丙种球蛋白贫乏症(一种 B 细胞发育严重受损、抗体产生极低的人类免疫缺陷综合征)患者中是缺陷的。Btk 基因突变也是 XID 小鼠产生的原因，该类小鼠中，B 细胞数量正常但功能受损。特别是这些 B 细胞不能对 TI-2 抗原应答而产生抗体。这些表型提示：在 B 细胞发育中、及在 B 细胞对 TI-2 抗原的活化中，Btk 在前 BCR 和 BCR 介导信号中都发挥重要作用。实际上，BCR 交联导致 Btk 的酪氨酸磷酸化并活化，而且 Btk 在 BCR 诱导的磷酸肌醇水解中都发挥了重要作用[38,39]。

BCR 触发的信号传导事件

BCR 簇集所激活的酪氨酸激酶可触发一系列早期信号事件，有些已在图 7.4 中做了描述。介导 BCR 参与的特别重要的信号途径包括磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP_2)水解、Ras 活化、磷脂酰肌醇-3 激酶(PI-3K)活化，以及 Vav 与 HS-1 的活化。这些信号反应将依次介绍。

230

磷酸肌醇水解

BCR 与免疫球蛋白抗体(抗 Ig)交联使 PIP_2 被磷脂酶 Cγ 迅速水解(图 7.5)[8]。在大多细胞类型中 PLCγ1 占优势，在 B 细胞中 PLCγ2 是主要的同种型。PLCγ1 的关键酪氨酸残基磷酸化能大大提高其内在活性。在这方面，PLCγ2 的调节可能也是相似的。而且，为了能完全有效，PLCγ 必须从细胞质中转移到质膜上(其底物位于质膜上)。对某些受体而言，该转移是通过 PLCγ 结合到酪氨酸磷酸化的受体上而介导的。但在 B 细胞中这是如何发生的，目前尚不清楚。

PIP_2 水解可得第二信使二酰基甘油和 1,4,5-三磷酸肌醇(IP_3)。二酰基甘油是一种质膜上的亲脂性复合物，能活化大多数蛋白激酶 C(proteinkinaseC，PKC)同工酶，这些同工酶也能被促肿瘤佛波酯[如醋酸肉豆蔻佛波醇(phorbolmyristateacetate，PMA)]活化。在 B 细胞中 PKC 的靶标是 MARCKS[40](一种调节肌动蛋白细胞骨架的蛋白质[41])。B 细胞中 PKC 的另一个靶标尚未得到完全确立，但 PKCβ 基因失活的小鼠有抗体应答降低的现象[42]。令人奇怪的是，PKCβ 缺陷小鼠的表型与 XID 小鼠的表型相当类似，后者的酪氨酸激酶 Btk 是有缺陷的[30]。而且，在肥大细胞中已观察到 PKCβ 与 Btk 之间的直接的相互作用[43]。所以，可能这两种信号成员协同作用，以促进 B 细胞活化。转录因子 CREB[环单磷酸腺苷(cAMP)反应元件结合蛋白]在 B 细胞中可因佛波酯刺激 PKC 而被活化[44,45]，提示它是 PKC 直接或间接的靶标。至少有另一种同种型的 PKC(PKCμ)也在 BCR 激活的 B 细胞中被活化[46]。与 PKCβ 相反，PKCμ 可能是一种负调节因子，因为它能够在体

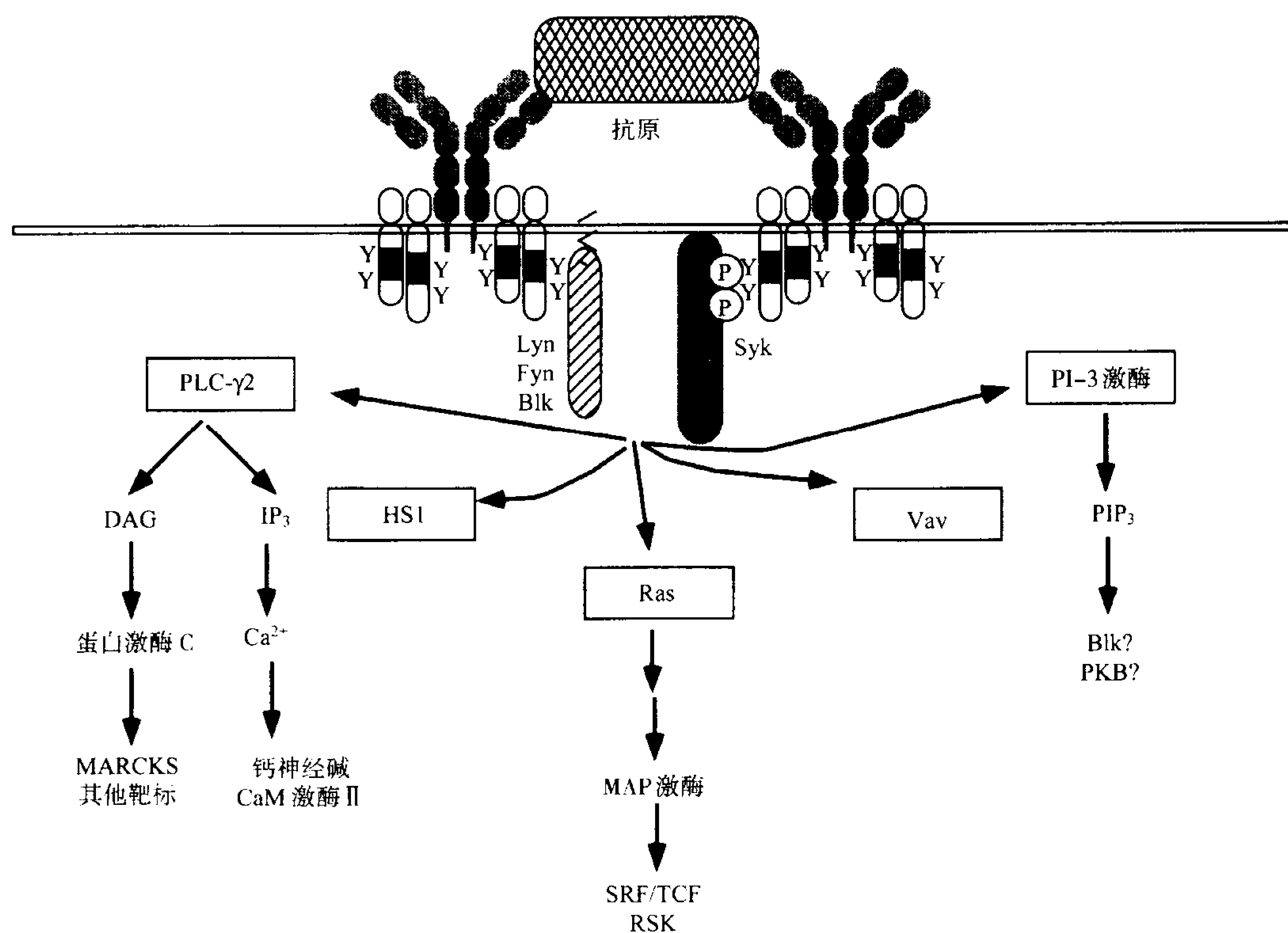


图 7.4 BCR 活化的信号途径。图中展示被 BCR 活化的主要信号途径。PLCγ2 的活化导致 PIP_2 水解，产生第二信使 DAG，DAG 又活化蛋白激酶 C 和肌醇三磷酸（IP_3），引起钙离子自细胞内释放到细胞质中。Ras 途径的活化导致 Erk1/Erk2MAP 激酶的活化。PI-3 激酶活化导致产生 PIP_3，PIP_3 可能作为含 PH 结构域的各种信号蛋白，如酪氨酸蛋白激酶 Btk、丝/苏氨酸蛋白激酶 B(PKB，也叫 c-Akt)的配体。关于 HS1 和 Vav 下游信号事件仍知之甚少，但这些信号成员缺陷的小鼠对 BCR 激活反应较差。

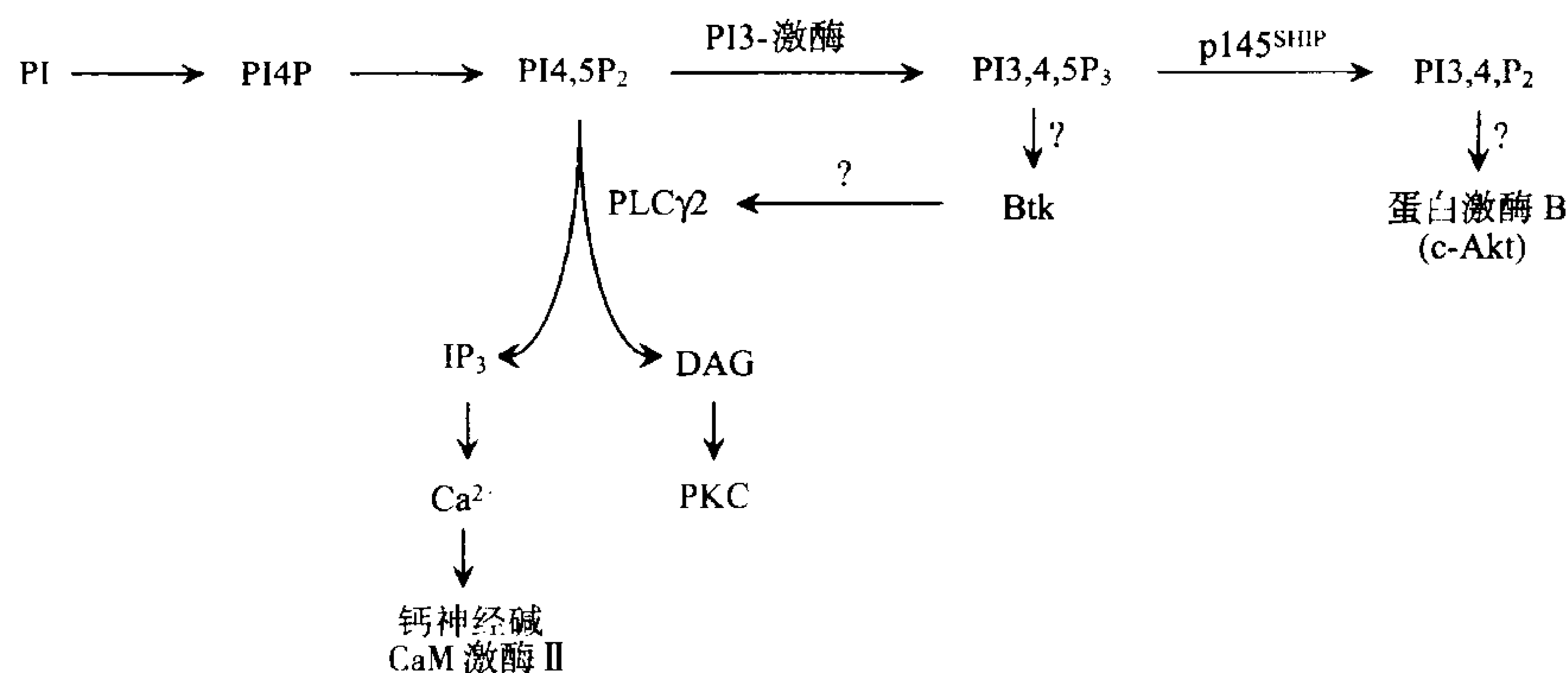


图 7.5 含肌醇的磷酸脂参与的信号途径。PI 在肌醇环的位置 4、5 磷酸化而产生 PI$(4,5)P_2$。它是 PLCγ2 的底物。PLCγ2 能将其裂解产生 DAG 和 IP_3。前者活化大多数异构体形式的蛋白激酶 C，而后者则引起钙离子自细胞内释放至细胞质中，导致钙调素依赖酶的活化。PI$(4,5)P_2$ 也是 PI-3 激酶的主要底物，该激酶磷酸化其位置 3 而产生 PIP_3。PIP_3 可能通过结合信号成员（如 Btk）的 PH 结构域而作为一个重要的第二信使。含 SH2 的肌醇磷酸酶 SHIP 将 5 磷酸根自 PIP_3 中去除，而产生 PI$(3,4)P_2$，PI$(3,4)P_2$ 是蛋白激酶 B(c-Akt)的 PH 结构域的配体。

外磷酸化 Syk 并抑制其磷酸化 PLCγ1 的能力。有意思的是,PKCμ 也能结合到 BCR,所以它正好定位在一个调控这一负反馈的位置。

PIP_2 水解释放出的另一个第二信使是 IP_3。这是一个水溶性的第二信使,可扩散到内质网,在那里与受体相作用,引起钙离子自细胞内释放。该释放是初期细胞内游离钙离子显著升高的原因。细胞内游离钙离子可用钙敏感荧光染料如 indo-1、fura-2 或 fura-3 进行检测,可从静止期的约 100nmol/L 到高峰期的 1μmol/L 或更高[47]。一旦细胞内的钙被完全释放出来,就会使质膜上的钙通道通过一种迄今尚不清楚的、被称为电容性钙离子进入的机制而开放[48,49]。这些质膜通道是钙离子水平持续升高的原因,可通过受体失敏感而终止,或切实保持一段时间,例如无反应性 B 细胞[51]。

升高的细胞内钙与钙调蛋白结合,促进丝/苏氨酸蛋白激酶(主要是钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ)[53]与丝/苏氨酸特异性蛋白磷酸酶[主要是钙神经碱(calcineurin)][53]的活化。这些下游信号酶尚不完全清楚,但钙神经碱是一种将转录因子 NFAT 家族直接磷酸化的磷酸酯酶[54]。NFAT 最初是作为 TCR 激活 T 细胞中细胞因子基因表达所需的重要的细胞因子而被发现的,但它也存在于其他细胞类型中,而且在 B 细胞中能因 BCR 刺激所活化[55]。另外一种细胞因子,Est-1,可因 BCR 刺激而以钙离子依赖方式被磷酸化[56]。钙离子水平升高也参与了其他一些转录因子(包括 NF-κB 和 ATF-20)的活化[57]。

Ras 途径

BCR 参与而触发的第二个主要信号途径就是 Ras 途径。Ras 在许多细胞类型中是一种重要的细胞生长与分化的调节因子[58]。Ras 与相关超家族成员的活性由一个结合的鸟嘌呤核苷的性质所决定。当结合鸟苷双磷酸(guanosinediphosphate,GDP)后,Ras 就失活; 但如果结合了鸟苷三磷酸(guanosinetriphosphate,GTP),Ras 就活化而且促进下游信号事件,如经典 MAP 激酶 Erk1 和 Erk2 的活化(图 7.6)。典型的是:受体诱导被称为核苷交换因子(如 mSOS1 和 mSOS2)的调节因子自细胞质中换位到质膜上,而 Ras 就存在于质膜上。交换因子又促进 GDP 自 Ras 释放,使之自由结合到 GTP。Ras 有相当缓慢的内在 GTP 酶的活性,可水解结合的 GTP

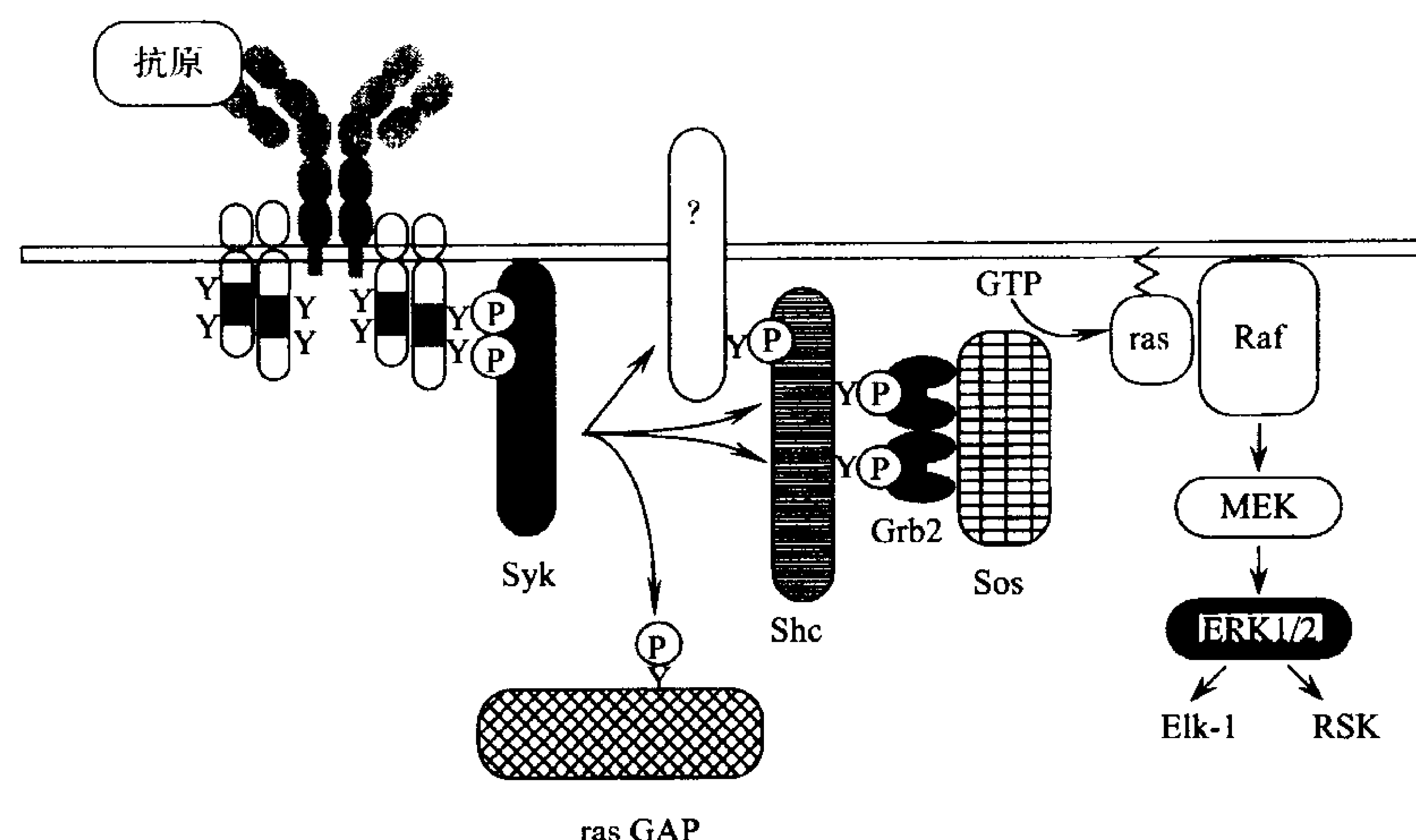


图 7.6 Ras 信号途径。Ras 以两种状态存在:结合到 GDP 的非活性状态和结合到 GTP 的活性状态。核苷交换因子(如 SOS1 和 SOS2)诱导 GDP 自 Ras/GDP 复合物上释放,使 GTP 结合,而使 Ras 活化。据认为,BCR 主要通过 Syk 磷酸化适配蛋白 Shc 而活化 Ras,然后使 Grb2 和 SOS 通过 Grb2 的 SH2 结构域而结合到 Ras。Grb2 有两个结合 SOS 脯氨酸富集区的 SH3 结构域。Shc 固定于膜上,但这是如何发生的目前并不清楚。SOS 转位至细胞膜上使其能作用于 Ras。活性 Ras 结合 Raf,然后因磷酸化而活化。Raf 磷酸化活化 MEK,MEK 然后又磷酸化活化 Erk1 和 Erk2MAP 激酶。MAP 激酶的下游靶标包括转录因子(如 Elk-1)和丝/苏氨酸蛋白激酶 RSK。BCR 信号也能够导致 GTP 酶活化蛋白和 RasGAP 的磷酸化,它们又能使 Ras 失活。

并释放出 GDP 和磷酸盐。释放出的磷酸盐又将 Ras 自活性形式转变为非活性形式。该步骤由一种叫 GTP 酶活化蛋白(GTPaseactivatingprotein,GAP)的二级分子调节,GAP 的两种主要形式分别叫 RasGAP 和神经纤维瘤素[58]。

BCR 交联使 GTP 结合 Ras 的数量迅速升高[59,60]和 Ras 重分布,这样它就在交联的 BCR 分子之下积聚[61]。BCR 激活 Ras 的机制尚不清楚,但人们倾向于一种假说,即它包括适配蛋白 Shc。BCR 激活导致 Shc 的酪氨酸快速磷酸化,一个适配蛋白结合到另一个适配蛋白 Grb-2,后者又结合到核苷交换因子 mSOS1 和 mSOS2 上(图 7.6)。这样,BCR 激活诱导过程包括 Shc、Grb-2 和 mSOS1/2 的多蛋白复合物的形成[62~65]。这一复合物表现为膜相关[62],但这种相关是如何发生的并不清楚,因为这些蛋白质都不是膜蛋白。有一种假说认为,Shc 接着又结合到一个目前尚未确定的膜蛋白上。由于佛波二酯可活化 PKC 的多数同型异构体,也能活化造血系细胞(包括 B 细胞)中的 Ras,所以 BCR 激活的 B 细胞中,Ras 活化的一部分有可能是通过 PIP_2 水解和 PKC 活化而发生的。但尚不清楚 PKC 如何促进 Ras 活化。

最后,虽然现在认为活化 Ras 的原发机制是通过激活核苷交换因子的作用,但 GAP 功能的抑制可能也是 Ras 活化所需要的。作为选择,RasGAP 转移定位到质膜上可能是限制 Ras 活化的反馈抑制事件。BCR 激活促进 RasGAP 的酪氨酸磷酸化及其与其他两个蛋白质($p62^{dok}$和 p190)的联结[66]。p190 本身是 Ras 超家族 GTP 酶中 Rac/Rho 家族的一个 GAP[67],它调节基于肌动蛋白的细胞骨架。$p62^{dok}$则表现为某种类型的适配蛋白[68,69],其作用可能是将 RasGAP 定位于活化的 Ras 附近,从而提供 Ras 的平衡抑制。有趣的是,$p62^{dok}$也结合到 Csk(一种负调节 Src 家族激酶的酪氨酸激酶)上。$p62^{dok}$-Csk 复合物的形成一定程度上由 BCR 交联、更大程度上由 BCR 与 FcγRⅡb 的接合而激活[70]。因此,$p62^{dok}$可能是一种信号抑制物,它将 rasGAP 和 Csk 带到细胞的信号发生区,从而提高了这些蛋白质负调控功能。

活化的 Ras 有多种下游效应物途径,其中人们了解得最多的是从 Raf 到 MAP 激酶的一系列蛋白激酶[71]。Raf 的活化包含其结合到活化的 Ras,随之 Raf 被一种尚不清楚的蛋白激酶磷酸化[72],然后 Raf 磷酸化并活化 MEK1 与 MEK2,后者又活化 Erk1 与 Erk2MAP 激酶(图 7.6)。这些 MAP 激酶在通过 BCR 途径激活的 B 细胞中被活化[73~75]。这些 MAP 激酶的主要靶标包括另一种丝/苏氨酸蛋白激酶 $p90^{rsk}$,以及一些转录因子,包括与血清反应因子(serumresponsefactor,SRF)协同以激活血清反应元件(serumresponseelement,SRE)转录[76]的 Ets 家族成员。能被 BCR 信号快速诱导的基因中,egr-1 是其中一种,它含多个 SRE,这些 SRE 与 Ras 介导了该基因的转录诱导[77,78]。

231

PI-3 激酶途径

BCR 参与之后活化的第三种信号途径,就是 PI-3 激酶(PI-3K)途径。该酶将一个磷酸基团加到磷酸肌醇肌醇环的位置 3(图 7.5)。BCR 激活可使 PI-3 激酶的酪氨酸快速磷酸化[79,80]和两个 PI-3 激酶产物:PI(3,4)P_2 和 PI(3,4,5)P_3[81]。PIP_3 比 PI(3,4)P_2 升高得更迅速,说明在体内 PI-3 激酶的首要底物可能是 PI(3,4)P_2 而不是 PI(4)-P。关于这一点,更加有意思的是:BCR 诱导的酪氨酸磷酸化的另一个靶标是肌醇 5-磷酸酶 SHIP(含 SH2 的肌醇磷酸酶)[82,83],它可将 PIP_3 转换为 PI(3,4)P_2[84~86],提示 PI(3,4)P_2 产生的主要路径可能是通过 PI-3 激酶与 SHIP 的组合反应(图 7.5)。

PI-3 激酶和 SHIP 产生的磷酸肌醇作为第二信使。特别是,这些分子是一些信号成员普列克底物蛋白(血小板-白细胞 C 激酶底物,pleckstrin)同源(PH)结构域的配体,可能优先表现为一种或另一种磷酸化的磷酸肌醇。例如酪氨酸激酶 Btk 的 PH 结构域(图 7.3)优先结合到 PIP_3[87],而丝/苏氨酸蛋白激酶 PKB 或 c-Akt 的 PH 结构域优先结合到 PI(3,4)P_2[88,89]。在后一种情况下,这种结合事件会提高 PKB 的活性。一种公认的假说认为,PH 结构域结合到磷酸肌醇提供了一种征募含 PH 结构域的分子到质膜上的机制。有趣的是,使 Btk 获得转化纤维原细胞的能力的突变选择可导致 Btk 的 PH 结构域中突变的孤立[90],该突变可提高 Btk 的膜联结。这一结果表明,生物活性的 Btk 存在于质膜上,可能是因为其 PH 结构域结合到 PIP_3 的缘故。

BCR 活化的其他信号反应

活化酪氨酸磷酸化的受体信号的特征是多种下游信号途径的参与,BCR 信号也不例外。因 BCR 参与而酪氨酸磷酸化并且已经得到人们的注意的三种信号成分是:Vav[91]、Cbl[92~94]和 HS1[95]。

Vav 是一种主要在淋巴细胞和其他类型血细胞中表达的原癌基因产物。有一些证据表明 Vav 调控 Ras 表达,也有证据认为 Vav 并未参与 Ras 的调控[96]。在这方面,有趣的是,Vav 有一个区域与 Db1 及其他蛋白质的结构域同源性非常高,叫 Db1 结构域。在 Db1 和其他一些蛋白质中的这一结构域有核苷交换因子活性,但并不是对 Ras(其核苷交换因子的顺序与其他蛋白质、而非 Db1 相关)的,而是针对小分子质量 GTP 结合蛋白中的 Ras 相关 Rac 家族的。可能是 Vav 中的这一结构域对 Ras 有较弱的交换因子活性,而对其他蛋白质,如 Rac 家族的成员,则有较强的交换因子活性。最近有报道认为,Vav 对这些蛋白质有交换因子活性[97,98]。可能 Vav 还有其他重要的功能活性,因为它还含有一些蛋白质-蛋白质相互作用结构域,包括一个 SH2 结构域和一个 SH3 结构域,这样就可以协助多蛋白信号复合物的组装。而 Vav 与 ZAP-70 及另一个信号成员 SLP-76 在 T 细胞活化中有重要的功能性相互作用,则更说明存在这种可能性[99,100]。

Rac、CDC42 和 Rho 蛋白组成了小分子质量 GTP 结合蛋白中 Ras 超家族中的一种主要的亚家族[101]。最近的试验证实了这些蛋白质在控制基于肌动蛋白的微丝组成中的作用[102]。例如,细胞内引入肉毒杆菌毒素会导致 ADP 核糖基化、Rho 蛋白失活和强度纤维(一种主要的微丝结构)的缺失。相反,如果引入突变的活化的 Rho,会在无血清培养细胞中诱导强度纤维的形成,否则这些细胞中基本不会有这类结构。相同的,突变的活化的 Rac-1 和突变的优势阴性 Rac-1 对皮质微丝有对抗效应,推测可能参与了管丝延伸。而且 Rac1 和 CDC42 能直接与 PAK65 家族蛋白激酶相互作用并能活化该类激酶。距这些反应更远的下游是 c-JunN 端激酶(JNK)的活化[103],该激酶因 BCR 联结而活化,如 CD40 联结,则活化效果更强[104,105]。

BCR 诱导的酪氨酸磷酸化的另一个显著的目标是 Cb1,它也是一个原癌基因。Cb1 与其他一些信号成员相作用,但其功能并未清楚。*cb1* 与 *sli-1* 的美丽线虫(Caenorhabditiselegans)同族体中的功能突变缺失被分离出来,被认为是美丽线虫功能突变部分缺失的外因诱导的基因抑制物[106]。Cb1 缺失能补偿低 Ras 功能的一个可能的解释是:Cb1 是 Ras 的负调控因子。与该观点一致的发现是,Cb1 能与 C3G 和适配蛋白 Crk 形成复合物[107,108]。C3G 是 GTP 结合蛋白 Rap1A 的鸟嘌呤核苷交换因子,Rap1A 作为 Ras 的抑制因子,其功能是通过与活化的 Ras 竞争 Ras 效应物而阻止它们的活化[109]。

最后,BCR 交联也能诱导较强的 HS1 酪氨酸磷酸化,HS1 主要在造血细胞系细胞中表达。遗传学试验表明,HS1 在 B 细胞对抗原的免疫应答中发挥重要作用,关于这一点下面将会讨论。最近,还发现 BCR 诱导的 HS1 酪氨酸磷酸化能诱导 HS1 转移定位到细胞核[110],提示它可能是 BCR 信号活化的转录因子。而且,与 HS1 相互作用的一种蛋白,HAX-1,已经被分离出来[111]。它主要定位于线粒体,可能在调节细胞凋亡中发挥一定作用,例如通过与同样是定位于线粒体的 Bcl-2/BAX 蛋白的相互作用。

BCR 信号传导靶向的选择

现在 BCR 研究的一个重要方面是试图了解一旦 BCR 交联,信号目标有效联结的机制。酪氨酸激酶生长因子受体的研究已为信号目标的有效参与建立了两种相关联的机制:含 SH2 结构域的目标通过 SH2 结构域直接结合到受体的特殊自磷酸化位点,从而连接到已结合的受体,或者通过该机制这些目标结合到适配蛋白上[15,112]。依次类推,抗原受体也可能通过此类方式有效吸引相关的信号成员。这种可能性是有限制的,可能是因为几乎所有的受体酪氨酸都存在于 ITAM 顺序中,而该顺序可能只与一种类型的、即那些结合 YxxL/I 顺序的 SH2 结构域结合[14]。BCR 诱导的酪氨酸磷酸化的靶标就属于这一类,例如适配蛋白 Shc。另一些靶标,例如 PI-3 激酶、Vav、PLCγ2,或许不能与磷酸化的 ITAM 序列很好地结合。关于这一点,有趣的发现是,BCR 和 Syk 在非淋巴细胞系 AtT20 中的表达能够重建 Shc 磷酸化和 MAP 激酶活化,但不是 PIP_2 水解或钙离子水平升高[113]。这一结果说明,Shc 的 BCR 联结,及 Ras/MAP 激酶途径的活化并不需要任何额外的淋巴特

异性信号成员的参与，而 PLCγ2 的活化则需要。Btk 基因切除能大大降低 DT-40 鸡 B 细胞中 PIP_2 水解[39]，提示 Btk 可能是所需的淋巴特异性成分。将 Btk 引入表达 BCR 和 Syk 的 DT-40 细胞不能重建 PIP_2 水解（J. Richards、P. Roth 和 A. L. DeFranco 的未发表实验结果），但是，这类附加的淋巴特异性成分也可能是需要的。

另外，还有两种据认为是 BCR 下游信号反应中重要的机制：靶标与 BCR 活化的细胞内酪氨酸激酶（如 Syk、Btk 和 Src 家族成员）相互作用，靶标 SH2 结构域与因和 BCR 相关联并因 BCR 激活而磷酸化[8]（图 7.7）的膜蛋白相互作用。这两种机制完全有可能同时发生，而且会在相关联膜蛋白、酪氨酸激酶和信号靶标之间形成大的信号复合物。由此看来，我们应该认为，大多数基于 SH2 的相互作用是有中等亲和力和相对较快的分离率的。该结合机制的一个结果就是：一个靶标会结合某位点并快速离开该结合位点。某些情况下，这种相互作用能持续足够长的时间，以使靶蛋白磷酸化。而另外一些情况下，多种相互作用可能为形成一种有效的、稳定的、有功能（如信号成分是否必须留在细胞膜上）的信号复合物所必需，这些相互作用包括 SH2 结构域磷酸酪氨酸肽相互作用，及继发的相互作用，它们或者是基于 SH2 的，或者还有其他的本身就是低（中）亲和力的机制。

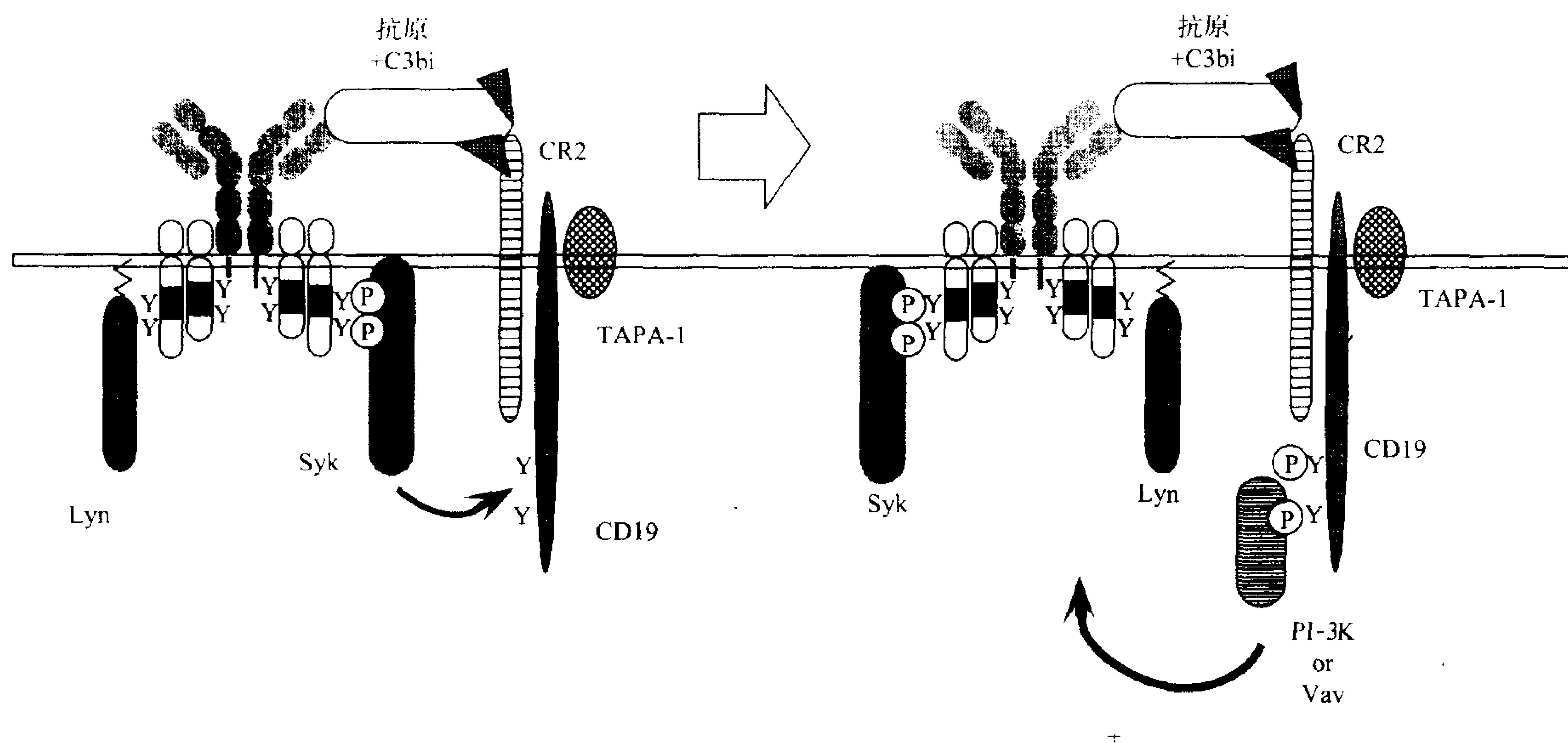


图 7.7　抗原-补体偶联物对 B 细胞的协同活化。含 C3 的抗原能结合到 BCR 和 CR2/CD19/TAPA-1 复合物，并将它们联结到一起。这能促进 CD19 胞内酪氨酸的有效磷酸化，该磷酸化的酪氨酸然后作为信号成员 PI-3 激酶和 Vav 的结合位点，这能够提高 B 细胞对抗原刺激的应答。Syk 磷酸化 CD19 的胞内区，但现仍不知这主要是 Syk 的功能，还是 Src 家族酪氨酸激酶的功能。

关于这些机制有相当多证据，因为许多信号靶标与 Syk、Lyn 及 BCR 相关膜蛋白（如 CD19 和 CD22）相关联[114~116]。例如，FLCγ2 直接与 Syk 相作用[117,118]，而 PI-3 激酶与 Lyn 和 Fyn 相作用[79]。这些相互作用所发挥的作用有待深入研究。

233

BCR 及共同受体对复合物抗原的识别

寡聚抗原与 BCR 的交联通过上述机制触发 BCRITAM 的信号功能。BCR 信号单位的复杂的结构体系，及其利用多肽进行抗原识别、激酶活性和酪氨酸激酶定位等的一个优点就在于其触发信号功能有相当稳定的柔性。酪氨酸激酶生长因子受体可能需要以一种相对较精细的方式二聚体化，以触发它们的信号功能，但是只有当其配体诱导了二聚体的可重复几何学时，才能实现该功能。但对 BCR 而言，不同抗原会诱导截然不同的依赖于抗原形状的寡聚构型。因此，为使 B 细胞对许多不同的物理实体发生适当的反应，受体寡聚化触发信号功能就应极少依赖于受体簇集的特定的几何学。

抗原受体机构的第二个、或许是更重要的一个优势在于：B 细胞能利用其他细胞表面受体(共同受体)与 BCR 相结合，通过免疫系统其他元素，来检测某个抗原的修饰。这又能够调节 BCR 信号并改变细胞免疫应答。这一原则在有 CD4 和 CD8 共同受体功能的 T 细胞中清楚可见。这些共同受体直接结合到 MHC 分子。当 TCR 结合了一个肽-MHC 复合物后，共同受体也能结合该配体而形成一个 TCR 的四通道复合物，即 TCR、共同受体、MHC 分子和结合肽。其结果是：CD4/CD8 的胞内结构域(都能以相对较高的化学计量学结合 Lck)被引导到 TCR/多肽的胞内结构域。这就使 ITAM 和 ITAM 通过 Lck 结合的 ZAP-40 高效磷酸化[119]。相反，当 TCR 结合到一个适当的配体后，没有 MHC 分子与共同受体衔接，信号会较弱。这样，CD4、CD8 共同受体会帮助 T 细胞分析它的 TCR 是否是与一个合适的配体相衔接并据此作出反应。

现在已经清楚，BCR 信号至少被两种共同受体所影响：补体受体 CR2 促进 B 细胞活化，Fc 受体 FcγRⅡb 则抑制 B 细胞的活化。B 细胞对抗原的应答可因补体系统对抗原的修饰而得以提高。就此而言，抗原或者通过补体替代途径、或者通过抗原与原已存在的低亲和力多价 IgM[120] 和经典途径间的作用而被确认为外源物质。关于该共同受体强大功能的一个显著例证来自小鼠免疫试验，该小鼠用溶菌酶或溶菌酶-C3d 融合蛋白免疫。后者在不需佐剂的情况下能诱导强烈的抗体反应，而且所需的蛋白量至少比溶菌酶单独使用少 1000 倍[121]。B 细胞对抗原的应答可因抗原特异性 IgG 抗体的过量而降低，提示再进一步的抗体应答不是必需的。该机制抑制了免疫应答，因为在编码 FcγRⅡb 的基因已失活的小鼠中表现出了升高的抗体反应，特别是对小鼠免疫之后[122]。

234

CR2 共同受体

B 细胞能表达 C3b 及其分解产物 iC3b 或 C3dg 的受体：即补体受体(Complementreceptor)1、2(CR1、CR2)。其中 CR2 主要在 B 细胞和滤泡树突细胞中表达，参与了 B 细胞活化。CR2 在细胞膜上以两种不同的复合物形式存在：一种是与 CR1 形成复合物，另一种是与 CD19 和 TAPA-1(CD81)形成复合物[123](图 7.7)。CD19 也能与 BCR 预联结，但联结的化学计量学水平相对较低。因此，抗原诱导 BCR 簇集的同时也能簇集一定数量的 CD19。但如果抗原被 C3d 片段修饰后，簇集的 CD19 数量会大大提高。CR2 或 CD19 与 BCR 的手工共交联与单独 BCR 的交联相比较，前者会致使 PIP_2 协同水解并提高 B 细胞的增殖，说明 CR2/CD19/TAPA-1 复合物能作为 B 细胞共同受体发挥积极作用[124,125]。据推测，CD19 主要对这种效应负责，因为当用 CD19 的单抗而非 CR2 或 TAPA-1 的单抗时，会产生更大的协同性。

相同，缺乏 CR2 或 CD19 基因的小鼠的表型也支持如下结论：即 CR2 和 CD19 在促进 B 细胞活化中发挥重要作用。缺乏 CR2 的小鼠存在明显的 T 细胞依赖性抗体反应低下，这主要是由于 B 细胞上丢失 CR2 所致[126~128]。CD19 缺乏小鼠与同窝出生对照小鼠相比，其对 T 细胞依赖性抗原的抗体反应同样要低 10 ~ 100 倍[129,130]。这些小鼠对 TI-2 抗原的应答是正常的或有所提高。以前对补体缺乏或补体受体功能阻断的研究认为，CR2 主要在低抗原浓度时，在 T 细胞依赖性抗体应答中发挥作用；后来有试验证实，CD19 缺乏小鼠和 CR2 缺乏小鼠不论对高剂量还是低剂量免疫，其抗体反应都表现出相同的结果：都有所下降。抗体应答缺陷的程度在 CD19 缺乏小鼠中可能更深些，但这一点需要对这些小鼠的抗体应答进行直接并排比较。如果缺陷相似，就会支持这样的论点：CD19 主要是通过参与 CR2 复合物而在抗体应答中发挥作用的。另一方面，如果 CD19 缺陷实际很严重，就会支持如下观点：即 CD19 有两个作用，一个需要 CR2 复合物，另一个则不需要。由于适量的 CD19 能直接结合到 BCR，因此可以设想，CD19 分子在不依赖补体受体的 B 细胞活化中可能发挥额外的积极作用。但也要注意到，TI-2 抗体应答在缺乏 CD19 时是正常的，而且针对 BCR 激活的体外增殖反应或者是正常的，或者只降低约 50%[129,130]。因此，CD19 并不是 BCR 信号转导或 BCR 参与 B 细胞活化的必需成分。

CR2 在体外提高针对 BCR 交联的 B 细胞应答，以及在体内提高 B 细胞对抗原的应答的机制仍未清楚。大多研究集中在 CD19 的胞内结构域，因为它最可能是 BCR 信号的阳性刺激物。该结构域含 9 个酪氨酸，而且 BCR 交联会使这些酪氨酸显著磷酸化。这些位点中有两个位点能被 PI-3 激酶的 SH2 结构域识别[114]，但

另一个位点被 Vav 的 SH2 结构域所识别[115]。因此,有个占主导地位的假说认为:CD19 或者低水平持续性地参与 BCR 信号,或者当 CR2 与 BCR 共簇集时较高水平地参与 BCR 信号,从而引起两个信号成员——Vav 和 PI-3 激酶——的重新参与,这两个信号成员能以某种方式促进 B 细胞度过阴性反应而活化。事实上,CR2 与 BCR 的共簇集的一个结果就是抑制 BCR 诱导的细胞凋亡[131]。CD19 在某种程度上也与 Lyn 和 Fyn 相联结[132,133],所以它的参与或许也能够提高最初信号事件,如 ITAM 磷酸化。但是,由于 CD19 缺陷性 B 细胞有相对正常的 BCR 诱导的酪氨酸磷酸化,所以启动酪氨酸激酶活性肯定是不需要 CD19 参与的。

除了 CR2 有能通过 BCR 促进 B 细胞活化的作用外,CR2 与多价配体的联结对已活化的 B 细胞也有生长刺激物的作用[134]。在人类,CR2 还是 Epstein-Barr 病毒的受体[135,136],能引起 B 淋巴细胞的持续增殖,导致疾病的感染性单核细胞增多症,该病在缺乏足够 CD8T 细胞免疫的情况下,能导致伯基特淋巴瘤。

FcγRⅡb 共同受体

B 细胞的第二个共同受体是 B 细胞上 IgG 的 Fc 受体(FcγRⅡb)。该受体当抗原的优势形式是溶液中游离的免疫复合物时与 BCR 共联结。这样在体外就抑制了 BCR 诱导的 B 细胞增殖[137],并促进了 B 细胞的凋亡[138]。应该注意的是,如果一个免疫复合物首先与滤泡树突细胞(folliculardendriticcell,FDC)接触,然后抗原就能通过其 Fcγ 受体与 FDC 联结,并以阳性形式呈现在 B 细胞上,例如帮助选择高亲和力的突变 B 细胞,这点后面将讨论。

FcγRⅡb 抑制 B 细胞活化的机制,已经有报道用兔抗 IgM 抗体进行了广泛的体外研究,该抗体能有效地共联结 BCR 的 IgM 形式和 FcγRⅡb。例如,加入未处理的兔 IgM 抗体能比加入同一抗体的 $F(ab')_2$ 形式导致更少的 PIP_2 分解[139]。细胞内游离钙离子浓度的升高也衰减,主要是由于钙离子内流的抑制所致[140,141]。

BCR 钙离子信号的抑制依赖于 FcγRⅡb 的胞内结构域,其中一个酪氨酸和它周围的氨基酸对该功能是关键的[141]。该区域就是免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptortyrosine-basedinhibitorymotif,ITAM)。只有当 FcR 与 BCR 共联结后,ITAM 酪氨酸才磷酸化(图 7.8)。FcR 的这个酪氨酸磷酸化区域是 3 个含 SH2 的磷酸酶的结合位点:密切相关的酪氨酸磷酸酶 SHP-1 和 SHP-2,及肌醇-5 磷酸酶 SHIP[83,142~144]。这些信号抑制物的作用目前所知仍是相互矛盾的[145]。SHP-1 缺陷小鼠(食蛾小鼠)的 B 细胞表现为丢失了一些 FcR 抑制功能[142],但有些仍保留了[146]。肥大细胞与 FcγRⅡb 共联结,能表现对 FcεRⅠ功能的同源抑制,而且即使来自

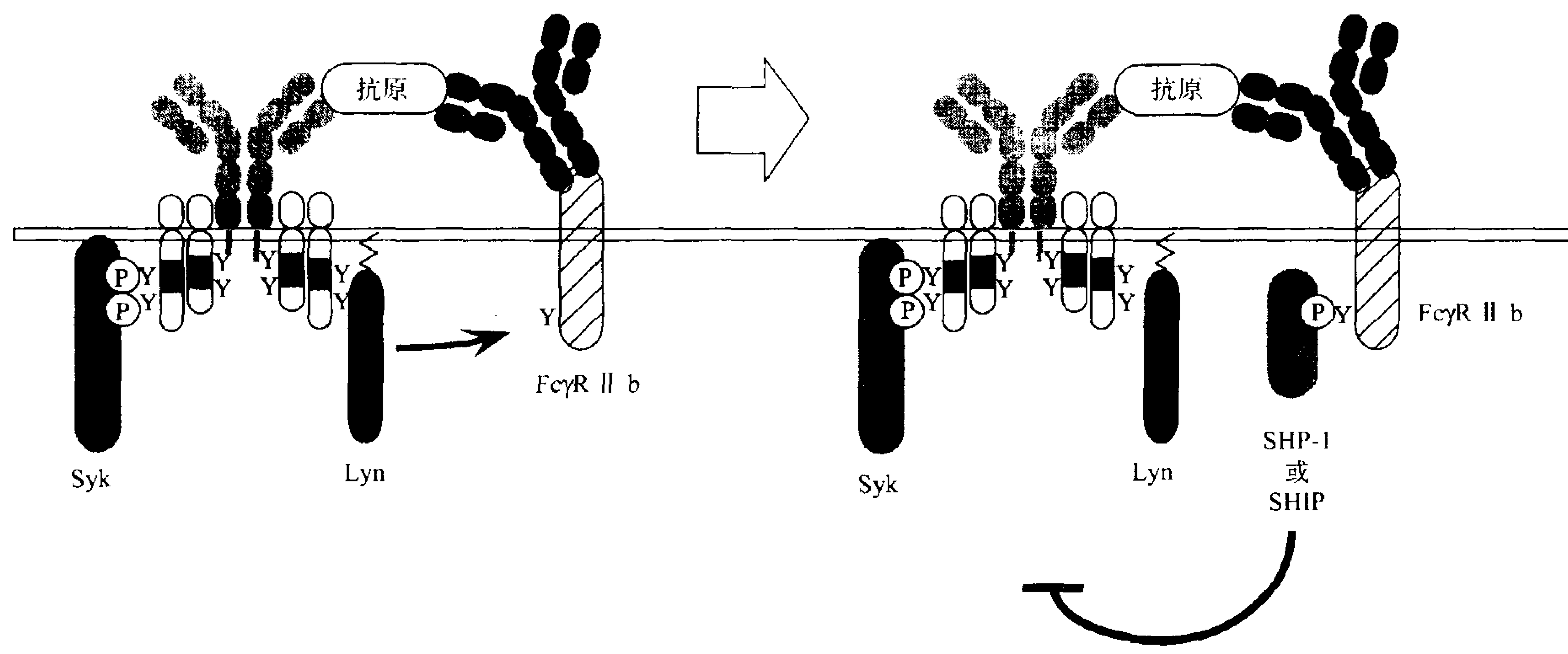


图 7.8 B 细胞活化因 FcR 参与而被抑制。如果抗原预结合到可溶性 IgG,则 FcγRⅡb1 会与 BCR 连到一起。这将导致 FcR 胞内区的 ITIM 酪氨酸磷酸化。Lyn 主要负责该磷酸化。该位点现在利用含 SH2 的肌醇磷酸酶 SHIP 和含 SH2 的酪氨酸磷酸酶 SHP-1(通过它们的 SH2 区)。所有这些组分都有抑制 BCR 信号反应的潜力,虽然 SHIP 在 BCR 信号功能中可能更为重要。

食蛾小鼠的肥大细胞，也会表现相当的抑制作用[143]。由此可得出结论认为，是 SHIP 提供这些负调控功能的。定向敲除 SHP-1 或 SHIP 基因的鸡 DT-40B 细胞系在此系统中表现出对 SHIP、而非 SHP-1 有关键作用[144]。相反，如果将 Fc 受体的胞外结构域与源自结合 SHP-1 而不结合 SHIP 的 NK 细胞的抑制受体的胞内结构域形成嵌合蛋白，我们会发现，抑制功能依赖于 SHP-1 的表达，而不依赖于 SHIP 的表达[144]。因此，可认为 SHIP 是 FcγRⅡb 所用的主要抑制物，而 SHP-1 通过抗原受体也能抑制信号功能（图 7.8），而且是通过与 NK 细胞的抑制受体相结合来完成此功能的。也有可能 SHP-1 参与了小鼠 B 细胞中 FcγRⅡb 的功能。

关于 SHIP 和（或）SHP-1 抑制 BCR 信号的机制，目前尚未完全清楚。BCR 与 FcγRⅡb 共联结会导致 FcR 胞内结构域中的关键酪氨酸磷酸化，而且在正常水平仍可见 Lyn 或 Syk 的活化，这些现象提示并不存在 BCR 信号的完全关闭[147,148]。CD19 的酪氨酸磷酸化被抑制，提示这可能是 SHP-1 的一个重要靶标[148]。如上所述，CD19 的一个功能就是 BCR 交联时募集 PI-3 激酶参与。渥曼青霉素（wortmannin，一种特异性 PI-3 激酶抑制物），也只能部分抑制 BCR 诱导的钙离子水平升高，提示 CD19 磷酸化作用的抑制可能是 FcR 抑制钙离子内流的原因。值得注意的是，SHIP 能使 PI-3 激酶的产物——PIP_3 降解（图 7.5），所以防止 PI-3 激酶活化及其产物的降解，可能都会达到同一个目的：防止 PIP_3 水平升高及其后的第二信使功能。

由于在鸡 DT-40B 细胞系中，Btk 是 BCR 诱导 PIP_2 水解所必需的，所以 FcγRⅡb 抑制的一个一体化模型可能是：CD19 募集 PI-3 激酶，导致 PIP_3 的产生，这可能又帮助募集 Btk 到质膜上，并与 Syk 和 Src 家族酪氨酸激酶合作，从而活化 PLCγ2。SHIP 可能通过将 PIP_3 转化为 $PI(3,4)P_2$ 而发挥抑制物作用，因为 $PI(3,4)P_2$ 不是 BtkPH 结构域的配体。如何防止 CD19 磷酸化，目前仍不清楚，据认为可能是 SHP-1 的作用。该模型能解释 SHP-1 或 SHIP 抑制 BCR 信号的能力，推测它们可能以不同的方式发挥作用，防止同一第二信使——PIP_3 水平的升高（图 7.5）。CD19 缺陷性 B 细胞对 BCR 交联的应答仍表现钙离子水平的增高[30,148]，但比野生型 B 细胞升高的幅度要低，而且不能被 FcγRⅡb 共联结所抑制[148]。CD19 缺陷性 B 细胞中残留钙离子水平升高可能反映存在活化 PI-3 激酶的第二机制，或者是活化 PIP_2 水解的第二机制，这些比起被 FcR 封闭的机制，都不存在定量重要性。

FcγRⅡb 与 BCR 的共联结也导致 Ras 活化，但比单纯 BCR 交联要小得多[149]。该抑制作用同时伴有 Shc-Grb2 相互作用降低和 Shc 与 SHIP 之间相互作用的大幅度提高。该相互作用至少有一部分涉及 Shc 的 PTB 结构域与 SHIP 的酪氨酸磷酸化位点的结合。一种简单的假说可将这些发现贯穿在一起：SHIP 与 FcγRⅡb 的酪氨酸磷酸化抑制模块的结合，使 SHIP 被引导到 BCR 联结的酪氨酸激酶附近，并因此导致其介导 Shc 结合的位点有效磷酸化。这样，SHIP 似乎也参与了 FcγRⅡb 抑制 BCR 诱导的 Ras 活化，可能是通过防止形成 Shc-Grb2-mSOS 复合物而实现，该复合物被认为是负责响应 BCR 联结而使 Ras 活化的（图 7.6）。PIP_2 水解和 MAP 激酶的 Ras 活化可能都参与了 BCR 诱导的增殖，如下所述，所以 FcγRⅡb 抑制这些信号事件的能力可能解释增殖的抑制。FcγRⅡb 诱导细胞凋亡可能反映了没有被该受体抑制的一个或多个额外信号事件的作用。最近发现，麻疹病毒包膜蛋白也结合人 FcγRⅡb，而且该相互作用也抑制了 B 细胞的活化[150]。

236

其他可能的 B 细胞共同受体

BCR 的信号转导功能可被至少三种 B 细胞表面的其他受体所调节：CD22、CD45 和 CD5。它们可能是 B 细胞额外的共同受体，但我们对那些可能调节这些分子对 BCR 信号的影响效果的细胞外相互作用仍所知甚少。

CD22 是一免疫球蛋白超家族成员，可识别糖蛋白或糖脂上的末端 α2,6-连接的人类涎酸或小鼠 *N*-羟乙酰神经氨酸残基[151,152]。一个 CD22 的亚群已经与 BCR 预联结，它与 BCR 交联后，会使 CD22 的 6 个胞内结构域中的某些酪氨酸残基发生磷酸化[151]。随之，这又会使 SHP-1 通过其 SH2 结构域结合到 CD22 上[151,152]。由于 SHP-1 是 BCR 信号的负调控因子[36]，上述发现说明，CD22 也是 BCR 信号的一个负调控物。有意思的是，CD22 在其结构与结合 SHP-1 的活性上都与结合 SHP-1 密切相关酪氨酸磷酸酶 SHP-2 和酪氨酸激酶生长因

子受体的一类新的、广泛表达的蛋白质极为相似，并负调控后者[153]。但是，由于 CD22 也结合正性信号成员，如 Syk、Lyn、PI-3 激酶和 PLCγ1，所以它或许并不是完全作为一个负调控因子发挥功能[116,154]。事实上，CD22 基因敲除小鼠的表型提示：CD22 不单纯是一个正调控因子或负调控因子[155~158]。在 CD22 缺陷 B 细胞中，BCR 诱导的钙离子水平得以提高，提示 CD22 在该信号反应中发挥负调控作用。BCR 诱导的 B 细胞体外增殖在缺乏 CD22 时一般要降低，而且 T 细胞依赖性抗体反应也降低。对这些结果最直接的解释是：这说明，CD22 在 B 细胞活化中发挥多种作用，有些是正性的，有些是负性的。已有试验提示：由于缺乏 CD22 抑制而发生的慢性 BCR 激活会导致 CD22 缺陷 B 细胞的无反应性表型，这又会导致对 BCR 激活的低反应性[152]。如上所述，在 CD22 缺陷 B 细胞中，因 BCR 激活而钙离子水平升高，而无反应性 B 细胞中，该反应是降低的，钙离子水平降低[51,159]。

在 Lyn 缺陷 B 细胞中，CD22 的磷酸化几乎完全不会发生，提示 CD22 是被 Lyn 所磷酸化的[32]。有意思的是，BCR 信号的另一个负调控因子，FcγRⅡb1，也是首先被 Lyn 磷酸化。FcγRⅡb1 和 CD22 的磷酸化功能缺陷，或许能解释那些来自 Lyn 缺陷小鼠的 B 细胞的超反应表型。

跨膜酪氨酸磷酸酶 CD45 在 B、T 细胞中都是抗原受体信号的正调控因子[36]。据推测，这是因为 CD45 有在 C 端的负调控酪氨酸上脱除 Src 家族酪氨酸激酶的磷酸基的能力（图 7.3）。与此观点相一致的是：不论体内、体外，CD45 缺陷小鼠均表现出对抗原的反应缺陷[160~163]。尽管 CD45 的一系列配体已得以确认，但 CD45 如何作用于 Src 家族酪氨酸激酶或其他可能的靶目标仍不清楚。

B 细胞中只有一很小的细胞亚群（也叫“B-1a 细胞亚群”）[164]，能够表达 CD45，但与在 T 细胞上的表达相比，这只是较低的水平。CD45 表现为 TcR 信号的一个负调控因子[165]。有趣的是，CD45 似乎也参与了 BCR 诱导的 B-1a 细胞的凋亡，原因是：对源自 CD45 缺陷小鼠的腹腔 B 细胞的处理，不能诱导细胞凋亡，反而会导致其增殖[166]。而且，用抗 CD45 封闭正常 B-1aB 细胞上的 CD45 分子也能够防止细胞凋亡并刺激其增殖[166]。

B 细胞被 BCR 活化的早期事件的激活

B 细胞存活的调节

每天都有大量的新生 B 细胞自骨髓中输送到外周血中，在每个 T 细胞依赖性体液免疫应答中，都会自极少的处女型 B 细胞中扩增产生许多记忆 B 细胞。这些来源的 B 细胞必须通过细胞死亡来平衡，因为 B 细胞的总量需维持在一个大致恒定的水平。新生 B 细胞中，约 80% 在一周内死亡，剩余的 20% 进入再循环 B 细胞池[167]（图 7.9）。这就是在外周 B 细胞群存在的情况下所发生的，而在其不存在时，所有这些细胞都将

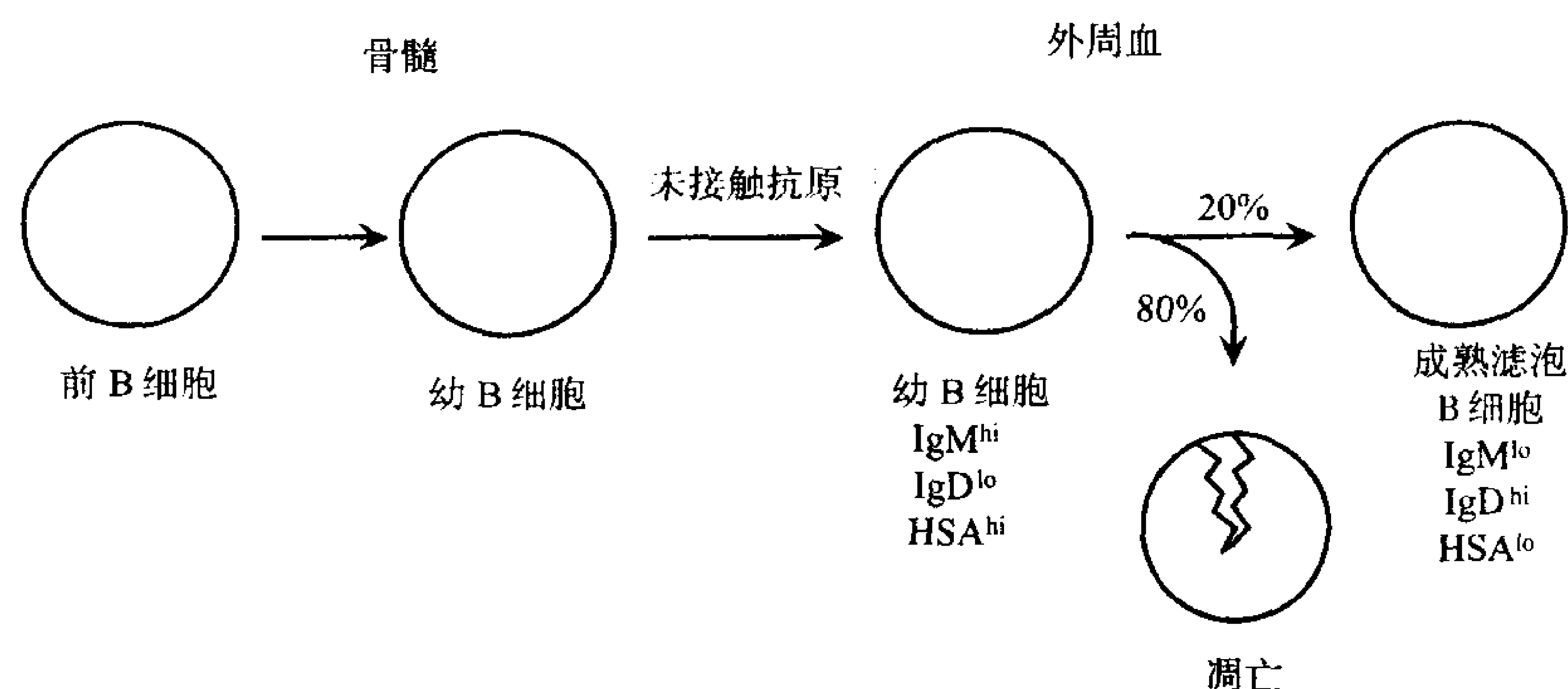


图 7.9　B 细胞成熟。在 Ig 基因成功重排后，B 细胞在骨髓内产生。在受体编辑发生时，骨髓内新生的幼 B 细胞与抗原接触引起成熟停滞并滞留在骨髓内。如果在骨髓内缺乏与抗原的接触，幼 B 细胞则进入外周，在那里其命运则明显地依赖于有合适的 BCR 参与。大多幼 B 细胞不能进入长期存活成熟滤泡 B 细胞群，并在自骨髓内游出后 1 周内逐渐凋亡而死亡，有约 20% 的 B 细胞成熟并存活。

长生。这些发现提示:进入长生的 B 细胞池涉及到某些形式的竞争(如可能竞争有限的资源),以进入淋巴组织的初级滤泡[168]。

决定哪些 B 细胞存活、哪些 B 细胞死亡的一个主要参数是:细胞存活有赖于来自 BCR 的某种低水平信号。关于此观点,相关证据来自对表达抗溶菌酶 Ig 轻链和重链转基因 B 细胞的研究。这些 B 细胞通常在缺乏溶菌酶时进入存活细胞池,在存在高亲和力配体溶菌酶时进入无反应性耐受状态。将该基因引入 CD45 功能突变缺失小鼠,会导致低 B 细胞存活率(除非引入溶菌酶),该种状态下可获得正常表型的长生 B 细胞[169]。由于 CD45 的缺失会降低 BCR 信号(CD45 使 Src 家族酪氨酸激酶中的一个负调节磷酸酪氨酸去磷酸化),所以这些发现提示,由于 BCR 与作为低亲合力配体的自身成分间的相互作用而引发的 BCR 信号,是 B 细胞成熟并进入长生状态所必需的,该信号在信号功能降低的 CD45 突变 B 细胞中缺如。加入溶菌酶会在 CD45 突变状态下恢复此低水平信号,从而恢复 B 细胞的存活,而在 CD45 功能正常的 B 细胞中,溶菌酶诱导更强的信号,从而诱导细胞无反应性而非细胞存活。而且,在成熟 B 细胞中,IgH 基因座的诱导删除会使这些细胞因凋亡而快速死亡,提示大多数外周 B 细胞持续地、或间歇地需要某种来自 BCR 的信号,以在外周存活,即使在进入长生 B 细胞池之后[170]。最后,记忆 B 细胞似乎也需要诱导抗原而存活。

非活化 B 细胞的存活与抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达密切相关[171]。骨髓来源的未成熟 B 细胞很少表达或不表达 Bcl-2,而且寿命较短,除非被选择进入长生的外周 B 细胞池。成熟 B 细胞表达一定水平的 Bcl-2,但生发中心 B 细胞例外,该 B 细胞会关闭 Bcl-2 的表达。这些细胞在生发中心经过对 BCR 抗原亲和力的严格选择后,许多细胞因凋亡而死亡。浆细胞一般不表达 Bcl-2,而且大多数细胞在最终分化后几天内就死亡了,例外情况是存在于骨髓和肠道内的浆细胞,它们可以存活几个星期。Bcl-2 敲除小鼠的造血功能还算正常,但在出生后,存在外周淋巴细胞的灾难性缺乏,提示 Bcl-2 的表达是外周 B 细胞和外周 T 细胞存活所必需的[172,173]。相反,Bcl-2 用 IgH 增强子驱动的转基因的增强表达,会使外周 B 细胞水平增高、长生浆细胞长期分泌抗体、记忆 B 细胞在过继输入后缺乏抗原时仍能存活[171]。活化刺激物经常会使 Bcl-2 表达下调及密切相关抗凋亡蛋白 Bcl-X_L 表达上调[174]。尽管其他 Bcl-2 抗凋亡/促凋亡家族成员的表达需要更深入地研究,但已明确,Bcl-2 的表达在静息 B 细胞存活中起关键作用。

BCR 诱导的体外增殖

静息脾 B 细胞经抗 IgM 和抗 IgD 处理可使其进入细胞周期的 G_1 期,细胞体积增大和 RNA 合成增加支持该发现。这些活化的 B 细胞如果用高浓度抗 Ig 多抗或高亲和力抗 Ig 单抗刺激,要经过至少一轮的复制[175,176]。尽管存在抗凋亡蛋白 Bcl-X_L 的诱导表达,培养的 B 细胞生存能力仍会轻度增强或无变化[177]。这可能反映了不断升高的 Bcl-X_L 水平与不断降低的 Bcl-2 水平之间的一种平衡。在无额外激活物存在时,被抗 Ig 诱导的细胞增殖是短命的。大多数细胞完成一个时期,但许多细胞不再继续细胞周期。一些不同的细胞因子能通过 BCR 促进体外激活的 B 细胞的增殖反应,特别是在人类 B 细胞中[178]。对鼠 B 细胞而言,最好的共刺激物是 IL-4。

IL-4 在体内能强烈增强鼠 B 细胞的生存能力。它是如何做到这一点的并不清楚,因为它不诱导 Bcl-X_L 的表达升高[177]。IL-4 能提高对 BCR 的应答,因此现在较低剂量的抗 Ig 试剂就足够诱导 2~3 种细胞分裂的强增殖反应[179,180]。

IL-4 促进 B 细胞的早期活化,但其在传统意义上不是一种生长因子。用 IL-4 预处理静息 B 细胞,能缩短刺激 BCR 以诱导 B 细胞进入细胞周期的 S 期所需的时间。相反,B 细胞用抗 Ig 预处理后,仅与 IL-4 共培养,就不会增殖。因此,不应考虑 IL-4 为 B 细胞的一种生长因子,B 细胞生长因子 I 的原始命名用词不当。最近对控制细胞周期的蛋白表达的研究也支持该观点。静息 B 细胞的 BCR 激活导致细胞周期蛋白(cydin) D2、D3 和与这些细胞周期蛋白相互作用的细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 cdk4 和 cdk6 的快速诱导表达[181~183]。IL-4 也能诱导细胞周期蛋白 D2、D3 的表达,但与抗 Ig 相比,这是短暂的,也是低水平的[181]。与对

抗 Ig 的反应相比，IL-4 不能显著地提高这些蛋白质的表达。抗 Ig 的刺激也会导致 cdk 抑制物 $p27^{Kip1}$ 的表达相当程度的降低。有意思的是，该降低是非常短暂的，在此后的时间内会回复，此时增殖结束。$p27^{Kip1}$ 基因敲除的小鼠表现出淋巴增生，提示该蛋白质是一种重要的调控因子[184,185]。 *238*

因 BCR 交联而诱导的周期蛋白 D/cdk4 或 cdk6 复合物，对 B 细胞通过 G_1 期是非常重要的(图 7.10)。在抗 Ig 激活的 B 细胞中，周期蛋白 E 和 cdk2 的表达也被诱导产生。据认为，该复合物对诱导细胞进入 S 期是非常重要的。细胞进一步通过细胞周期由细胞周期蛋白 A/cdk2 和细胞周期蛋白 B/cdc2 诱导，该复合物的表达也是被诱导的，并与增殖反应相关[181]。

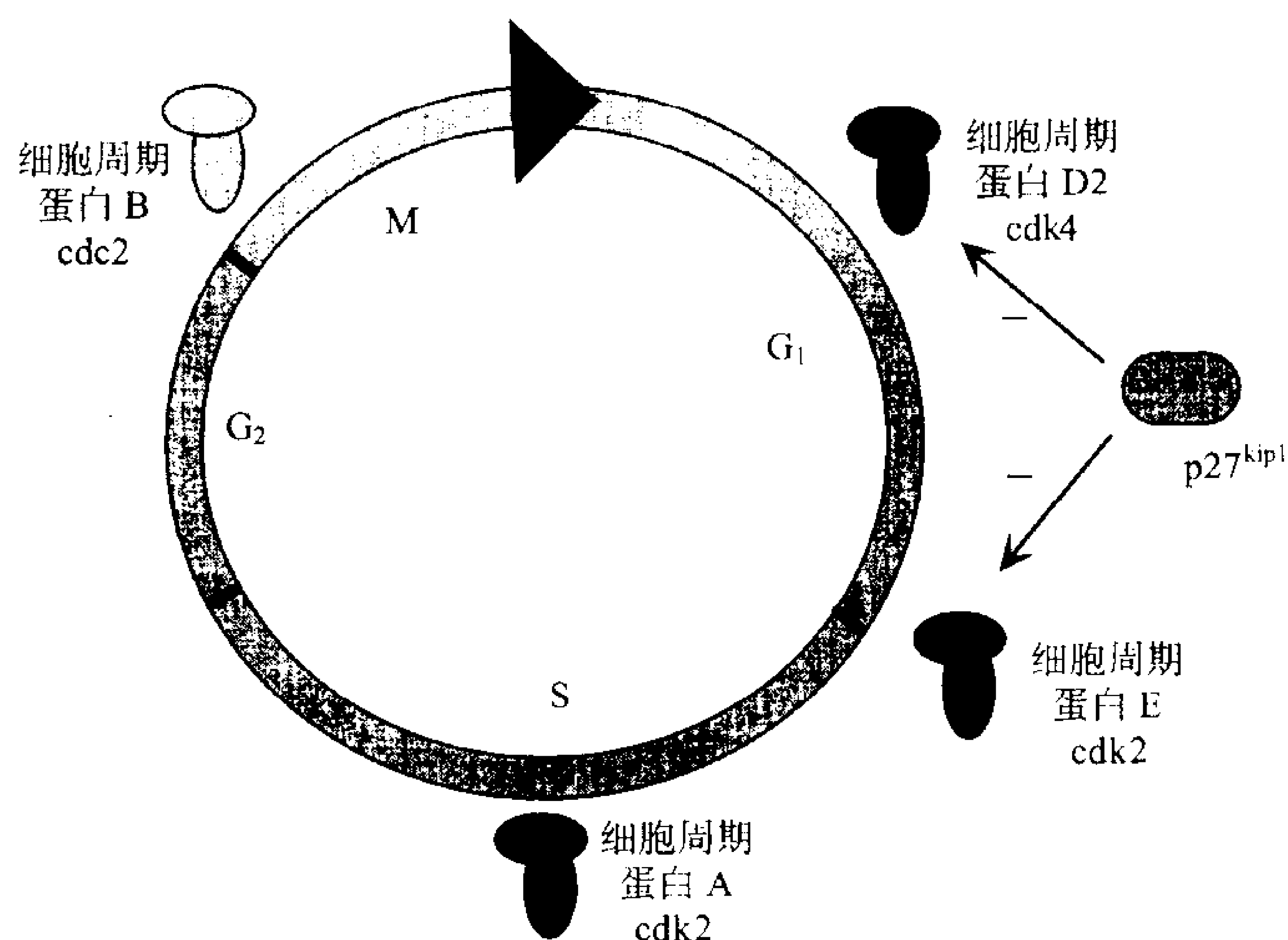


图 7.10 B 细胞周期调节。BCR 激活静息成熟 B 细胞诱导调节细胞周期的蛋白质的合成。不同对的细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶调节不同部分的细胞周期，这已经在其他哺乳细胞类型中得以证实。BCR 激活首先诱导细胞周期蛋白 D2 和 cdk4 的表达，其次是程度稍低的周期蛋白 D3 和 cdk6 的表达，这又能促进细胞进入 G_1 期。BCR 激活也能导致 cdk 抑制物 $p27^{kip1}$ 的消失。在后期，另外的细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶会出现。

人们对 BCR 信号事件如何促进这些关键的存活、发育能力，及在其中存在何种细胞周期调控事件了解不多。酪氨酸激酶抑制物(tyrphostin)通过 mIg 阻断 B 细胞活化，提示蛋白质的酪氨酸磷酸化(BCR 信号的关键机制)对该反应是很重要的[186]。

对 BCR 诱导的 B 细胞活化，研究得最为透彻的信号反应是那些涉及 PIP_2 水解的信号事件。B 细胞自 G_0 期进展到 G_1 期及其增殖反应，均可被佛波酯(活化 PKC)和钙离子载体(提高细胞内游离钙)联合激活，但单独其中一种刺激物则不能。在某些试验中，这种刺激首先诱导纯化的静息 B 细胞进入细胞周期的 G_1 期，而不增殖[187]。加入 IL-4 会导致强烈的增殖反应，就像用低剂量的抗 Ig 和 IL-4 刺激的结果[188]。也有一些研究人员只用药理学激活剂也观察到强烈的增殖反应，可能是模拟了用高剂量抗 IgM 所获得的应答[189]。诱导细胞周期蛋白 D4 和 cdk4 需要同时用佛波酯和钙离子载体刺激，就像刺激 B 细胞增殖所见的现象[183]。相应的，PKC 抑制物在早期阻断 B 细胞的活化[187]。通过基因靶向技术删除了 PKC 的 β 异构体的小鼠，其 B 细胞被 BCR 诱导增殖的能力大为降低[42]。由此可见，PKCβ 在 BCR 诱导的 B 细胞增殖反应中发挥重要作用。而且，环孢菌素 A 和 FK-506 能阻止抗 Ig 诱导的增殖反应[190]，提示通过钙神经碱等信号途径的钙离子信号的功能重要性。

相同的，对应抗 Ig 的 Bcl-X_L 诱导反应被细胞外钙离子水平降低或者因环孢菌素 A 通过钙神经碱信号途径抑制钙离子信号而阻断[177]。通过离子载体而提高细胞内钙离子水平并不足以诱导 Bcl-X_L 的表达，但如果佛波酯与钙离子载体合用则可达到目的。因此，钙/钙神经碱信号事件必须与佛波酯刺激的信号事件(PKC 活化、Ras 活化)相结合，以诱导 Bcl-X_L 的表达并促进 B 细胞的生长、发育。

Ras 信号途径能被抗 Ig 和佛波酯所活化，并被认为是促进多种类型细胞增殖的重要信号途径。事实上，用抑制剂 PD098059 抑制 Ras/MAP 激酶途径后，能抑制中间酶 MEK-1(图 7.6)的活化，抑制抗 Ig 诱导的细胞增殖反应(J. Richards 和 A. L. DeFranco)。相反，在 Lyn 缺乏的小鼠 B 细胞中，大多数 BCR 信号反应似乎有些缓慢和衰减，但 MAP 激酶活化则得以提高[32]。这些 B 细胞的增殖加快，提示在脾 B 细胞中，Erk1 和 Erk2MAP 激酶的功能可能局限于细胞增殖反应。总的来看，这些结果说明，Ras/MAP 激酶途径对 BCR 诱导

的 B 细胞增殖是极为重要的。

在缺乏信号成员 Vav 和 HS1 的小鼠 B 细胞中，抗 Ig 诱导的细胞增殖会降低几倍，说明这些成员也参与了 B 细胞应答 BCR 交联而发生的增殖反应[191~193]。有意思的是，被脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）或 CD40L 诱导的细胞增殖在着两种情况下却是正常的，因此看来，这些信号成员的功能仅限于 BCR 激活。

基因表达的 BCR 调控

因与抗原接触而发生的 B 细胞存活和增殖反应的调节，可能很大程度上依赖基因转录的变化，如编码 Bcl-X_L 和细胞周期蛋白 D2。而且，BCR 参与触发一些基因表达的变化，这些变化对促进 B 细胞与 Th 细胞间的相互作用非常重要，如 MHCⅡ类分子、B7-2 的表达水平升高、黏附分子如 ICAM-1（CD54）、CD44、CD18（LFA-1β 链）、LFA-3 等的表达升高等[194]。但现在我们对 BCR 如何指导基因表达的变化，所了解的还只是片段性的知识。

如同被其他受体激活的其他一些类型细胞一样，BCR 诱导的基因表达变化是对不断表达的转录因子信号反应（参与早期应答基因的转录）的效果、以及由那些本身是转录因子的早期应答基因所介导的继发转录事件所叠加的综合事件（图 7.11）。事实上，现在所被关注的大多数早期应答基因是转录因子，所以许多对 B 细胞存活、增殖及与 Th 细胞相互作用等功能非常重要的下游基因，可能就依赖被这些早期应答基因所诱导的基因转录。NF-AT、NF-κB、SRF/TCF 和 CREB 是一些原已存在的、被信号事件直接调控的转录因子，下面将逐一讨论。

NF-AT 是活化的 T 细胞的核因子，最初是以其是调节 IL-2 基因转录中发挥关键作用的转录因子而被发

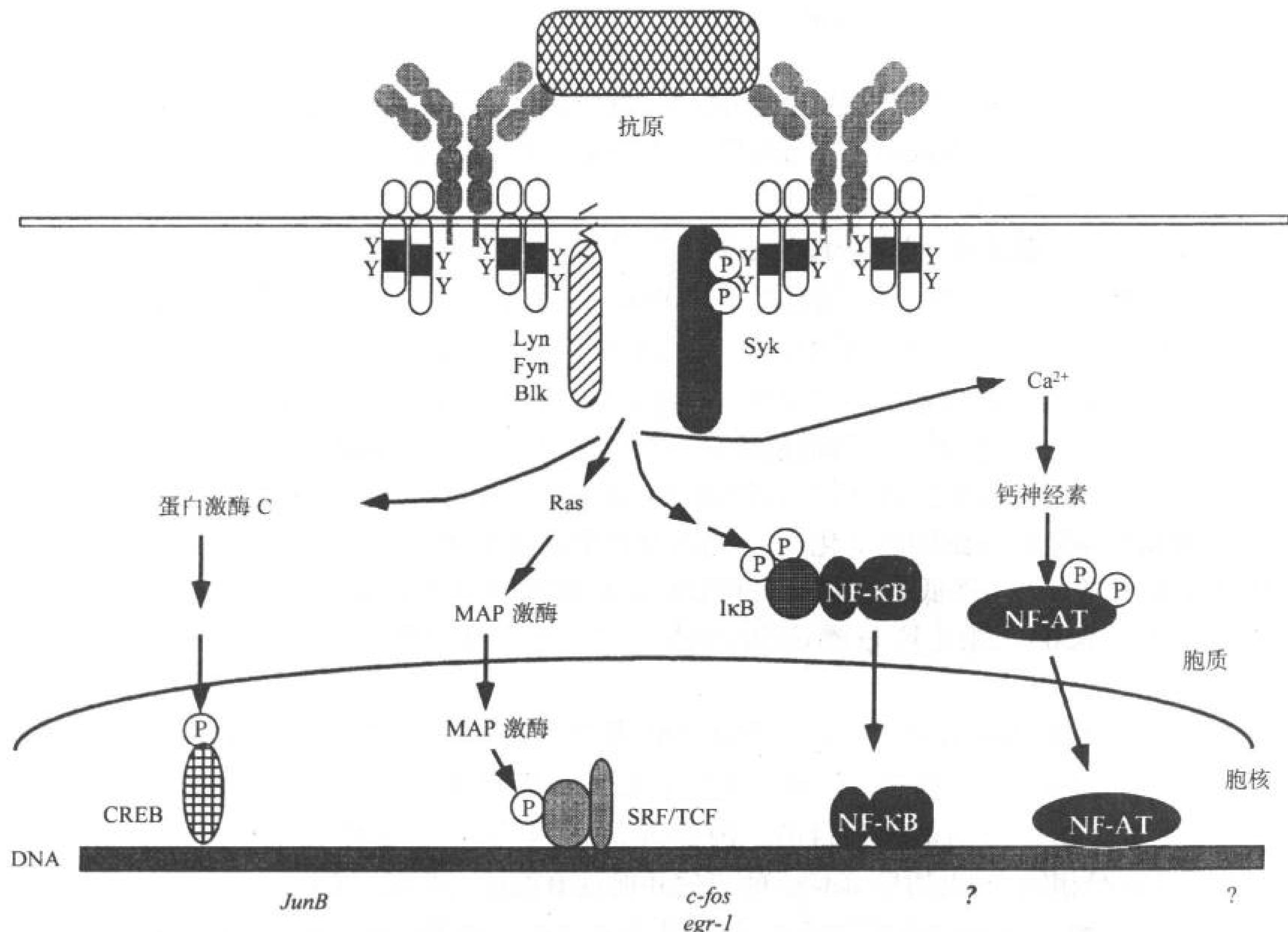


图 7.11　BCR 信号活化转录因子。BCR 调节转录以两种方式发生。首先，原已存在的转录因子（包括 NF-AT、NF-κB、SRF/TCF、CREB，如图示）的活化。这些转录因子在激活 1 小时左右就活化一系列基因的转录。这些早期反应基因大多是转录因子，如 *junB*、*c-fos*、*egr-1*。这些被诱导的转录因子又触发 B 细胞活化所需的重要的额外基因的表达。

现的。在 IL-2 启动子上最初定义的 NF-AT 位点，现在被认为是结合 AP-1 转录因子复合物和现在定义的 NF-AT 转录因子的综合位点，NF-AT 在未激活的细胞中，以一种无活性的磷酸化形式在细胞质内表达。抗原受体激活 T 细胞或 B 细胞能使 NF-AT 快速脱磷酸化，据分析可能是 Ca^{2+}/钙调蛋白活化的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶钙神经碱的直接反应，该脱磷酸化使 NF-AT 转运至细胞核并结合 DNA[54]。NF-AT 的活化仅依赖细胞质内游离钙的升高，其继续活化需要钙离子水平持续升高。IL-2 启动子 NF-AT 位点的转录活化也需要占据该位点的 AP-1 部分，并且 AP-1 表达与功能依赖其他信号事件，所以自 NF-AT 位点的转录一般需要多信号事件同时发生。

对许多受体诱导的生物学反应的调节，存在这么一种共识，即受体诱导多信号事件，这些事件通常协同作用引起细胞的变化。如果该生物学反应依赖信号事件，细胞可能需要两种不同的受体参与，每种受体只能提供一种亚基。作为选择，单独一种受体可能提供所有需要的信号事件，但具体到单个信号事件，可能被细胞的其他受体所调节，这或许对特殊反应单元有主要影响。

NF-AT 的四个不同异构体分别是 NF-AT1(NF-ATp)、NF-AT2(NF-ATc)、NF-AT3 和 NF-AT4。淋巴细胞表达除 NF-AT3 中的三种。NF-AT4 与 NF-AT1 和 NF-AT2 相比似乎有些不同的 DNA 结合特异性。在 T 细胞中，NF-AT 对大多细胞因子(包括 CD40L 和 FasL)的诱导转录非常重要[54]。在 B 细胞中，BCR 激活导致细胞内游离钙离子升高及随之发生的 NF-AT 活化[55]，但目前仍不清楚 NF-AT 调控哪些基因。免疫抑制物环孢菌素 A 和 FK-506 通过抑制钙神经碱而发挥作用，NF-AT 是这些物质的主要(但不是惟一)靶目标。由于这些免疫抑制物阻断 BCR 诱导的 B 细胞增殖[190]，所以认为 NF-AT 在调控对 B 细胞增殖极为关键的一种或多种基因中发挥重要作用。

240

BCR 激活也会使转录因子 NF-κB 活化[195,196]。NF-κB 最初是因其结合 Igκ 基因座内的基因内区增强子的 κB 位点的能力而被发现的，但后来发现，它在许多免疫反应和应激反应中发挥关键作用[197]。许多转染的 B 细胞系表达高水平的 NF-κB 结合活性，最初认为该转录因子在该细胞系内持续表达以促进轻链基因表达。但是，又发现静息脾 B 细胞也像其他细胞一样，存在低水平的活性 NF-κB 并有相当数量的非活性 NF-κB 池。而且，BCR 激活会活化该池 NF-κB。在非激活状态，NF-κB 以二聚体形式存在于细胞质内，大多以一个 p50 亚基和一个 c-Rel 或 RelA(p65)所形成的异二聚体形式存在。这些二聚体结合到 IκB 抑制性亚基上。IκB 结合到 NF-κB 的 c-Rel 或 RelA 亚基，并在细胞质内形成复合物，抑制其 DNA 结合活性。细胞激活导致 IκB 蛋白激酶的活化[198]，该激酶对 IκB 的两个相邻丝氨酸残基磷酸化，然后又触发一个蛋白酶体介导的该抑制物的降解。这样游离了 NF-κB 使之转运至细胞核，结合 DNA，通过 c-Rel/RelA 亚基提供的相互活化功能而活化转录(图 7.11)。

NF-κB 的不同同种型表现出不同的功能，因为 c-Rel 缺陷小鼠的 B 细胞几乎完全失去了应答 BCR 交联而增殖的能力[199]。在这些 B 细胞中，NF-κB 的 p50/RelA 形式仍被 BCR 交联活化，明显比野生型细胞所需量大。缺乏 RelA 的 B 细胞表现较少的缺陷，但仍对 BCR 参与的增殖应答能降低几倍[200]。对这些结果最直接的解释是：p50/c-Rel 和 p50/RelA 复合物至少有部分功能截然不同，或许是其通过促进细胞完全增殖所需的不同基因的活化而表现。奇怪的是，缺乏 p50 的 B 细胞仅表现适度的增殖降低，并表现 BCR 诱导的 NF-κBDNA 结合能力，而后者似乎应该是 c-Rel 和 RelA 的二聚体的功能。由于这些亚基包含 NF-κB 的相互活化区，它们在缺乏 p50 时的功能应该不是特别奇怪。

BCR 激活也活化转录因子 CREB，CREB 最初是因为其在介导第二信使 cAMP 诱导的转录事件中所发挥的作用而被发现的。CREB 持续性表达和存在，并结合到其 DNA 同源位点[cAMP 结合反应元件，(cAMP response element，CRE)]。在许多细胞中，cAMP 水平升高会活化蛋白激酶 A，后者接着又使 CREB 的 Ser133 磷酸化，从而使 CREB 与转录共活化蛋白 CBP 相互作用[201]。CREB 并不是只由 cAMP 调控，在某些情况下它也能因细胞质内游离钙离子水平升高而活化。在 B 细胞中，因为一些不明原因，CREB 似乎对 cAMP 水平升高无应答，但却会应答 BCR 激活而活化。该活化状态也涉及到 Ser133 的磷酸化，而该磷酸化是依赖 PKC 的[44]。在 JunB 基因启动子区发现了一个 CRE 位点，该基因是 BCR 激活 B 细胞内的一个早期反应基因。

CREB 的显性、阴性形式阻断，是基于 JunB 启动子的报告基因的诱导，所以 CREB 有可能参与了该早期反应基因的活化[202]。

B 细胞和其他类型细胞内，Ras/MAP 激酶途径的下游是血清反应元件(serum response element, SRE)转录的活化。SRE 位点结合两个转录因子：固定地结合 SRE 的血清反应因子(serum response factor, SRF)和结合功能依赖 SRF 的三重复合物因子(ternary complex factor, TCF)。目前已确定两种形式的 TCF：Elk-1 和 SAP-1a，这两者都是转录因子 Ets 家族的成员。Elk-1 和 SAP-1a 都是 Erk1/Erk2MAP 激酶的磷酸化靶目标，而且磷酸化是转录活性所需要的[76]。SRF 被磷酸化正调控，可能是通过丝/苏氨酸蛋白激酶 RSK，该激酶能直接被 Erk1/Erk2 活化。因此，SRE 元件是被 Ras/MAP 激酶途径活化的。

SRE 元件是在 BCR 活化的早期反应基因 *egr-1* 和 *c-fos*(本身就是转录因子)中发现的。*egr* 基因在其启动子区有 6 个 SRE 样元件，它们是 BCR 诱导转录所必需的[78]。而且用 Ras 的优势阴性突变体抑制 Ras 途径能阻断 Egr-1 的诱导，这一点与 MAP 激酶是结合 SRE 的转录因子的关键活化物的发现相符。如果存在一系列应答 BCR 交联而发生的基因诱导，则 Egr-1 对 BCR 诱导的编码细胞间黏附分子 ICAM-1 和 CD44 基因的诱导是非常重要的[203,204]。

另一系列基因诱导可能源自转录因子 Fos/Jun 家族成员的诱导表达。静息 B 细胞不表达这些家族的成员，但 JunB、JunD、c-Fos、FosB 和 Fra-1 是应答 BCR 交联诱导的早期反应基因。在所有这些情况下，家族成员必须通过亮氨酸拉链的蛋白结构区二聚体化才会有活性，并参与到叫作 TPA/PMA 反应元件(TPA/PMA response element, TRE)的 DNA 位点。家族中 Jun 相关成员可同二聚体化，即与其他 Jun 成员二聚体化，或异二聚体化，即与 Fos 家族成员二聚体化，但 Fos 家族成员只能与 Jun 家族成员发生异二聚体化。BCR 激活 2 小时内，就会有包括 JunB、JunD、c-Fos 和 FosB 的二聚体化现象；8 小时后能检测到更高水平的这些二聚体[205]。我们已知，这些不同的二聚体在与其他转录因子共同参与基因表达调控中有明显不同的特性[206]。

转录因子 Fos/Jun 家族的一个有趣特征是，每个家族成员的表达调控都是不同的。如上所述，JunB 在其启动子区有一 CRE 位点，并被 PKC 所活化的 CREB 所调控。相反，c-fos 主要由 SRE 和 Ras/MAP 激酶途径所调控。因此，Fos/Jun 二聚体的本质可用 BCR 活化的不同信号反应的相对力量确定。这样，人们就能设想，这些不同的信号事件的调控(如通过辅助受体参与，或通过活化 Erk1 和 Erk2 的磷酸酶表达水平)可能极大地影响 B 细胞的应答。

241

另一个重要的转录因子，也是 BCR 诱导的早期反应基因，就是 *c-myc*。该基因产物与固有表达蛋白 Max 形成一个非共价异二聚体。该复合物是一个转录活化物，在诱导细胞增殖反应中起作用[207]。

BCR 激活也能诱导 MHC Ⅱ类基因的转录。MHC Ⅱ类基因表达升高对 B 细胞活化是很重要的，因为这提供了新合成的 MHC 分子，它们能进入内体并在其中遇到内在化的处理好的抗原。这些新合成的 MHC Ⅱ类分子结合抗原来源肽，然后到达细胞表面并与抗原识别 Th 细胞特异性作用[208]。MHC Ⅱ类基因的表达可用佛波酯或钙离子载体诱导，提示磷脂酰肌醇途径在该类基因表达种发挥一定作用[187]。钙离子水平升高对 BCR 激活的后续事件是必需的[209]。持续低水平的 BCR 信号可能至少是 MHC Ⅰ类和Ⅱ类分子基础水平表达的部分原因[170]。

抗原受体激活也能使细胞因子和黏附分子受体的表达发生变化。例如，抗 Ig 处理的静息 B 细胞诱导 IL-4 受体表达升高[210]。抗 Ig 也能在 B 细胞内诱导 IL-2 受体 α 链的低水平表达。将活化 T 细胞的上清液加入抗 Ig 激活的 B 细胞能诱导高亲和力 IL-2 受体及其应答 IL-2 而增殖的能力。抗原受体激活也提高了 B7-2 的表达，该分子是 Th 细胞上 CD28 的配体，作为抗原呈递的部分功能，为 T 细胞提供了重要的共刺激信号[212]。总之，抗 Ig 处理 B 细胞能导致 B 细胞内的许多变化，有可能影响 B 细胞对细胞因子的反应能力及与 Th 细胞相互作用的能力。

抗体反应的独特类型

对真抗原的抗体应答，就其机制来说，是异源性的。抗原至少可分为四类。如对某些抗原的应答需要成

熟 T 细胞的存在，这种抗原称为 T 细胞依赖性(tcelldependent, TD)抗原，而对某些抗原的应答不需要成熟 T 细胞的存在，这种抗原称为 T 细胞非依赖性(tcellindependent, TI)抗原。但这并不能反映 B 细胞的抗原特异性，只能反映其他抗原的特性，如这些抗原的物理结构、与 B 细胞上其他受体相互作用的能力等。例如 TNP-右旋糖酐(一种半抗原)能在裸鼠(缺乏成熟 T 细胞)体内诱导抗 TNP 的强抗体应答，但 TNP-SRBC(绵羊红细胞)只能诱导弱抗体应答，而且 TNP-蛋白抗原根本不能诱导任何应答。后两种抗原都是 TD 抗原，不同的是，在需要 T 细胞辅助以启动抗体应答方面存在差异，至少在体外是这样(这点后述)。TI 抗原一般可分为两类：TI-1 抗原和 TI-2 抗原。

T 细胞非依赖性(TI)抗原的抗体反应

对许多感染源最初的 IgM 类抗体应答，可能很大程度上基于 T 细胞非依赖性抗体反应。如下面所述，许多细菌细胞壁成分属于 TI-1 类和 TI-2 类抗原。而且对乙肝病毒、前庭口腔炎病毒和多瘤病毒颗粒的初始抗体应答是 T 细胞非依赖性的[213~215]。

应当指出的是，T 细胞非依赖性抗体应答的证据主要来自对小鼠的研究。而对人类抗体产生的平行机制，目前证据极少[216]。但一些应用疫苗和免疫缺陷进行的研究表明，T 细胞非依赖性抗体应答对人类体液免疫反应，可能像对小鼠的一样，也非常重要。例如，在鼠类，TI-2 应答的一个特征是，其在小鼠出生后出现得非常缓慢[217]。3~6 周龄的小鼠完全有能力产生 TD 抗体应答，但不能产生 TI-2 应答。人类也可见同样现象。最初 b 型嗜血流感病毒疫苗是多糖胶囊，对小鼠而言是 TI-2 型抗原。该疫苗只能在 2 年龄的儿童中诱导产生强抗体应答，而将该多糖连接到一个免疫载体蛋白上，则可对年龄更小的儿童(2 月龄或更大些)有效，而该群体对嗜血流感病毒感染非常敏感[218]。对该现象最可能的解释是：蛋白成分为 Th 细胞提供了表位，因而使 TD 抗体应答成为可能，而原疫苗要启动 TI-2 应答(对低龄儿童无效)。

最初，T 细胞非依赖性抗原之所以再分为 TI-1、TI-2 亚类，分别是基于这些抗原是否能够在另一种类型的免疫缺陷小鼠[X-连锁免疫缺陷(*xid*)小鼠]中诱导抗体应答。现在知道，这些小鼠编码细胞内酪氨酸激酶 Btk(参与 BCR 信号转导)的基因内，发生了功能缺失的错义突变。这些小鼠对许多 TD 抗原和某些 TI 抗原的应答相对正常，但它们应答大多数多糖抗原的免疫而产生抗体的能力却严重缺陷。但应注意的是，某些情况下，在 *xid* 小鼠中可见到对 TI-2 抗原(以其他标准认为是 TI-2 抗原)的抗体应答，所以，就这点来看，并没有绝对的经验性标准，可将 TI-1、TI-2 抗原区分开。但是将 TI 抗原分为这两类是很有用的，并几乎肯定反映了对这两类抗原的抗体应答的、重要的、机制上的差别。

TI-1 抗原

TI-1 抗原有多克隆 B 细胞活化物的显著特性。多克隆 B 细胞活化物，顾名思义，不管其抗原特异性如何，对小鼠 B 细胞都有直接致有丝分裂作用，并诱导细胞分化为抗体分泌细胞(图 7.12)。这些化合物很多是细菌细胞壁的成分(LPS、肽聚糖、脂蛋白、膜孔蛋白等)，而且多细胞生物体对它们的识别和应答，可能反映了对细菌免疫应答的进化的一面[219,220]。事实上，对 LPS 的宿主防御应答存在于像果蝇、鲨等非脊椎动物及脊椎动物中[221,222]。这些化合物中，研究的最为透彻的是 LPS(革兰氏阴性菌外膜外叶的主要组成部分)。在低于能够诱导多克隆 B 细胞增殖和抗体产生的 LPS 剂量时，半抗原化 LPS(如 TNP-LPS 等)能诱导特异性抗半抗原抗体产生。对该现象的一种解释是：如果需要局部浓缩以结合 B 细胞的低亲合力 LPS 受体，然后再驱动 B 细胞活化，那么半抗原特异性 B 细胞会结合半抗原化的抗原并因此而凝聚 LPS。而且，有可能 BCR 信号与来自多克隆 B 细胞活化物的信号相协同而增效。

242

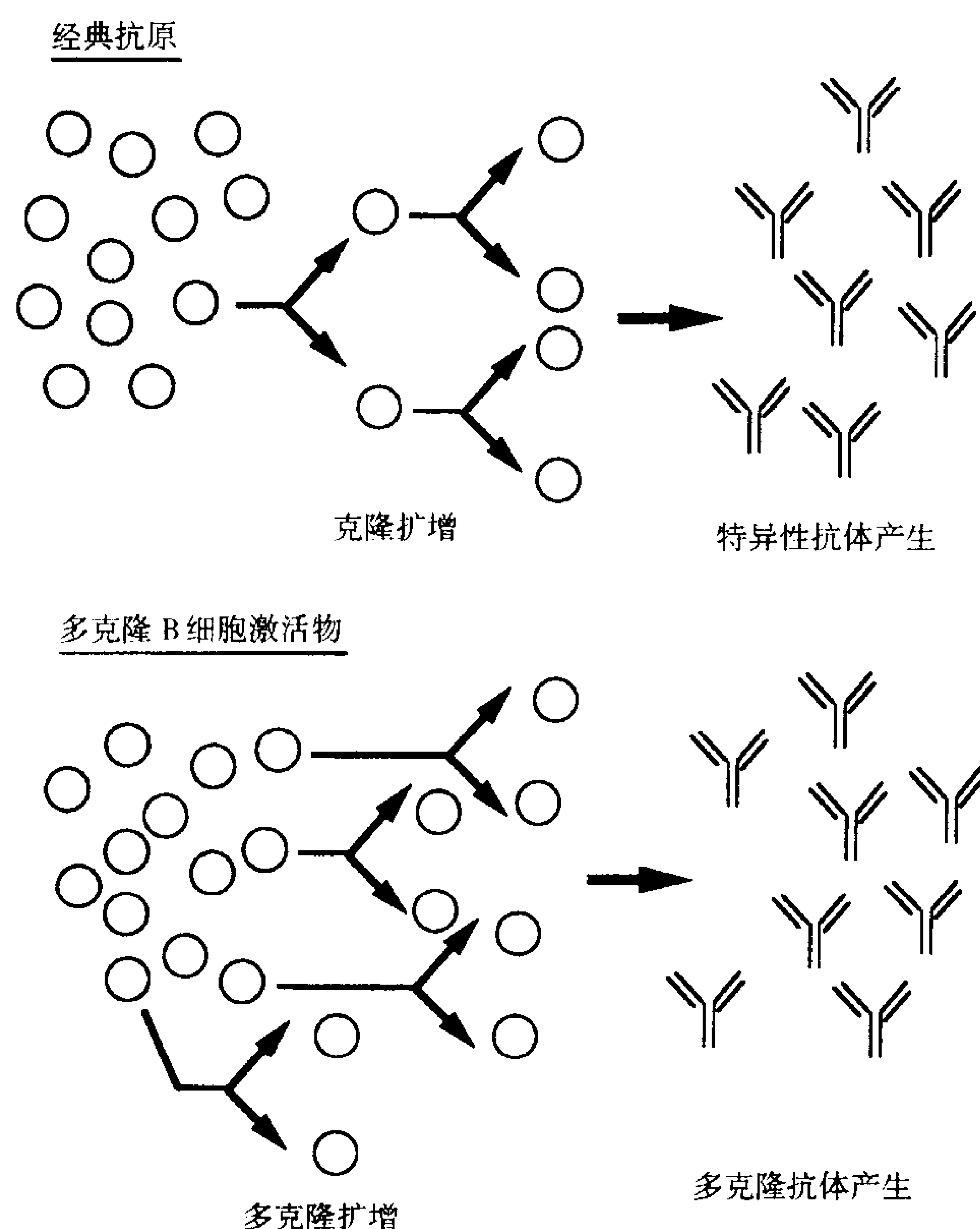


图 7.12 多克隆 B 细胞活化物的作用模式。在对典型抗原的抗体应答中,抗原特异性 B 细胞被活化、增殖并产生抗体。相反,多克隆 B 细胞活化物(如 LPS)能活化相当部分的 B 细胞(有 1/3)增殖并分化为抗体分泌细胞。当活化物浓度低时,通过 mIg 结合活化物的 B 细胞可能更有利于产生高度特异性的抗体。

虽然对巨噬细胞识别 LPS 的机理研究已经取得了很大进展,但 B 细胞上的 LPS 的特性仍令人难解。巨噬细胞通过下列途径产生对 LPS 的应答:产生细胞因子 IL-1、IL-6、TNF-α 和 IFN-α;分泌化学因子 IL-8 和巨噬细胞炎性蛋白 1、2;释放前列腺素等烷类介质[223,224]。这些巨噬细胞来源的介质可能辅助对 LPS 和其他 TI-1 抗原的抗体应答[225]。巨噬细胞对 LPS 的应答与 B 细胞相比,所需 LPS 浓度低得多,约 1ng/mlLPS 即能产生强烈反应,而 B 细胞需约 10μg/ml 才能产生多克隆 B 细胞应答。在敏感性上的这些差异是因为巨噬细胞表面 CD14 表达的问题,CD14 能结合被血清 LPS 结合蛋白转移到细胞表面的 LPS 单体[226]。CD14 是一个糖基酰-磷酸酰肌醇连接的蛋白质,没有跨膜和细胞内区。它不能传递信号至细胞内部。而且,缺乏 CD14 的巨噬细胞仍能对 LPS 应答,只是需要更高的 LPS 浓度[226]。如此就有假说认为,巨噬细胞和 B 细胞都表达相同的低亲和力 LPS 受体。高浓度 LPS 能直接结合到这个低亲和力受体,并激活 B 细胞增殖和分化为抗体分泌细胞:这就是多克隆 B 细胞活化物现象。相反,低浓度的 LPS 只能激活巨噬细胞或 B 细胞,前提是如果存在另外一个受体:对巨噬细胞而言是 CD14,对 B 细胞而言,是能结合 LPS 上的一个表位的特异性 mIg(图 7.13)。该第二受体能够以高亲和力与 LPS 相作用,这样使低亲和力信号受体结合并诱导生物学反应:对巨噬细胞而言,是细胞因子和其他一些介质的产生;对抗原特异性 B 细胞而言,是细胞增殖和分化。在这一特定情节,半抗原与 BCR 的结合有可能触发亦能够促进 B 细胞活化的 BCR 信号反应。虽然这是一个很有意思的模型,但关于 LPS 如何活化 B 细胞的分子细节仍所知很少。令人奇怪的是,虽然 LPS 是人和小鼠巨噬细胞的强有力的活化物,但它却只活化小鼠 B 细胞。其他细菌的细胞壁成分也是小鼠和人类的多克隆 B 细胞活化物。例如,革兰氏阳性金黄葡萄球菌 Cowan Ⅰ株的细胞壁是人 B 细胞有力的多克隆活化物。该反应需要金黄葡萄球菌颗粒表面的蛋白 A,但也需要其他细胞壁成分[216]。

243

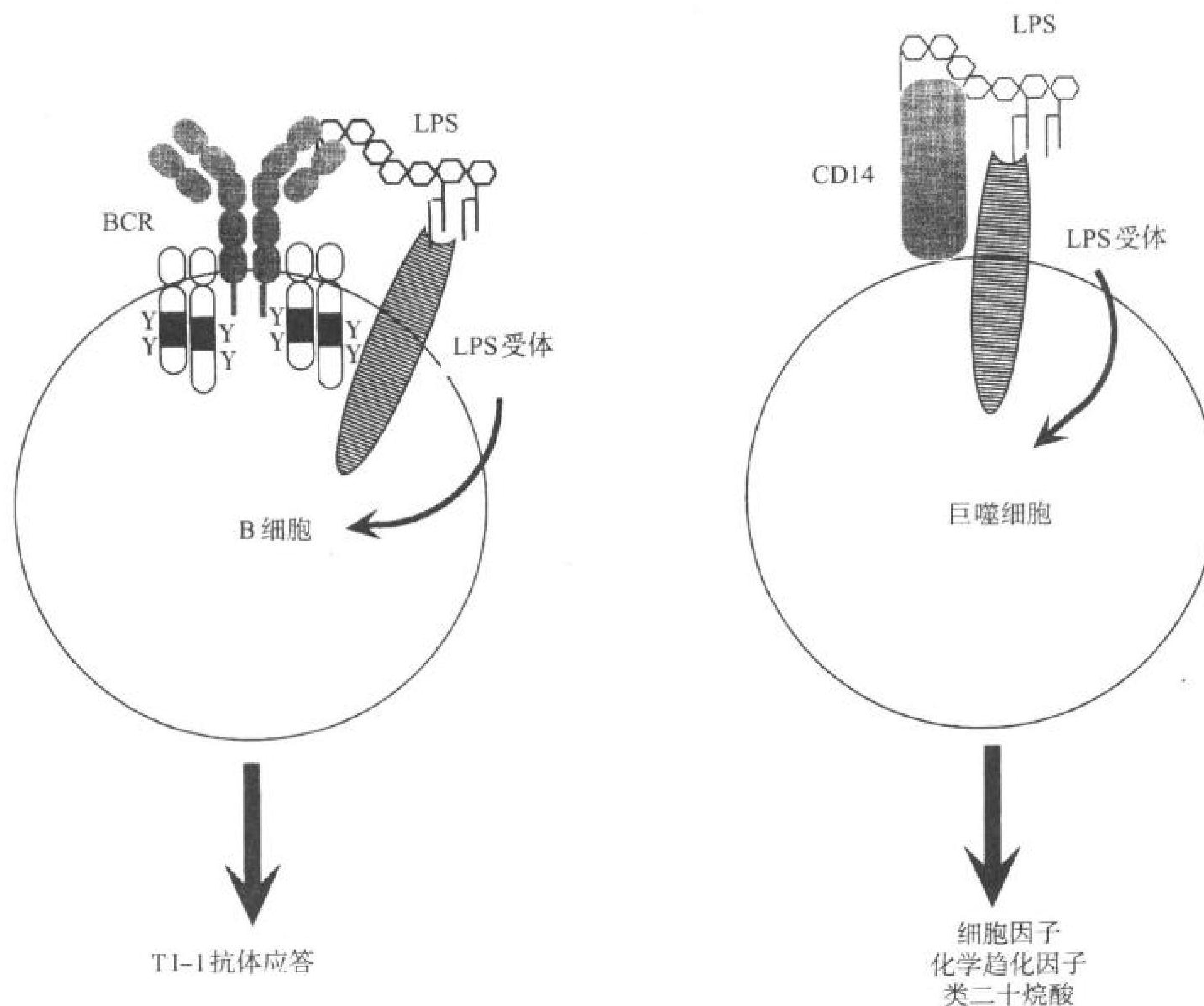


图 7.13 TI 抗体应答中的受体协同作用。巨噬细胞通过用 CD14 以高亲和力结合 LPS 而应答低浓度 LPS。据认为,CD14 不是信号受体,原因是其所有蛋白都在细胞外,并通过共价交联脂质只联附到细胞膜。一个公认的 LPS 受体,可以低亲和力结合 LPS,但能促进对低浓度 LPS 的应答(如果 LPS 被 CD14 有效地固定到细胞膜上)并提高其有效浓度。依次类推,LPS 上的表位特异性的膜 Ig 可能是在 TI-1 抗体应答中,以高亲和力结合 LPS 而有效产生抗体的原因,并允许低亲和力 LPS 受体更有效地结合 LPS 和活化 B 细胞。

TI-2 抗原

T 细胞非依赖性 2 类(TI-2)抗原是典型的重复多聚体(如多糖抗原),并缺乏 TI-1 抗原的内在多克隆 B 细胞活化特性。细菌细胞壁含多克隆 B 细胞活化分子和重复夹膜多糖,因而是 TI-1、TI-2 抗原的合成物。病毒颗粒也有高度重复的抗原表位,或许这就是它们能够在免疫反应早期诱发 TIIgM 应答的原因[227]。

TI-2 抗原的物理特性对其诱导抗体应答的能力极为重要。例如,对半抗原化的聚丙烯酰胺抗原的抗体应答。需每个分子有至少 12~16 个恰当安排的半抗原,才能在体诱导强 TI 抗体应答[228]。这些结果表明,抗原分子的一个免疫元件和 BCR 分子的一个寡聚簇在 B 细胞表面形成,而且该复合物是有效诱导 TI-2 抗体应答所必需的。如果多聚体表位太少则会诱导耐受,即使是在对半抗原化的蛋白(TD)抗原的进行性应答之中[229]。

高度半抗原化的蛋白质可能含有与 TI-2 抗原相同数目的表位,但仍是 TD 抗原,提示该类抗原的物理构型是 TI-2 抗原的重要特征。多糖骨架的柔性特征可使抗原结合的 BCR 分子簇集,成为对产生细胞内信号反应极为有效的结构。对膜结合病毒颗粒而言,病毒膜蛋白在病毒膜上移动的能力,可能同样促进有效诱导 BCR 信号簇的形成。

人们将抗 IgM 和抗 IgD 连接到右旋糖酐分子,以刺激 TI-2 抗原并研究其活化 B 细胞的机制。这些试剂诱导 B 细胞增殖和 BCR 信号事件(如磷酸肌醇衰减、钙离子水平升高)的能力明显比可溶性抗 Ig 强(约 244

10 000倍)[230]。通过抗 Ig-右旋糖酐激活的 B 细胞诱导抗体产生,与 TI-2 抗原体外激活的 B 细胞的功能所需的条件是相同的,这也支持该方法是 TI-2 抗原有效模型的观点[217,219]。有丝分裂浓度的可溶性抗 Ig 抗体能迅速给所有细胞表面的 BCR 加帽。后续的信号和 B 细胞活化,依赖能迅速与少量在细胞表面表达的 BCR 复合物结合、并诱导其信号反应的高亲和力抗 Ig 的存在[175,176]。相反,只与小部分 BCR 结合的抗 Ig-右旋糖酐偶联物的剂量足以致有丝分裂,但并不下调 BCR 的表达。因此,抗 Ig-右旋糖酐-BCR 复合物能长时间有效传递信号,并缓慢内在化。如此,TI-2 抗原的一个关键特征可能是它们诱导持续、有效的 BCR 信号复合物在细胞表面形成的能力。所以,TI-2 抗原不依赖 T 细胞活化 B 细胞的能力,可能反映了它们诱导 BCR 信号反应的高级能力(图 7.14)。许多 TI-2 抗原能结合补体(通过替代途径或通过结合低亲和力天然抗体),所以可能会将 CR2/CD19/CD81 复合物与 BCR 在细胞表面结合在一起。如上所述,该复合物能提高 B 细胞活化。但也应该注意,CD19 表达缺陷的小鼠 TI-2 应答升高,而非降低,提示 TI-2 应答并不依赖 CD19。

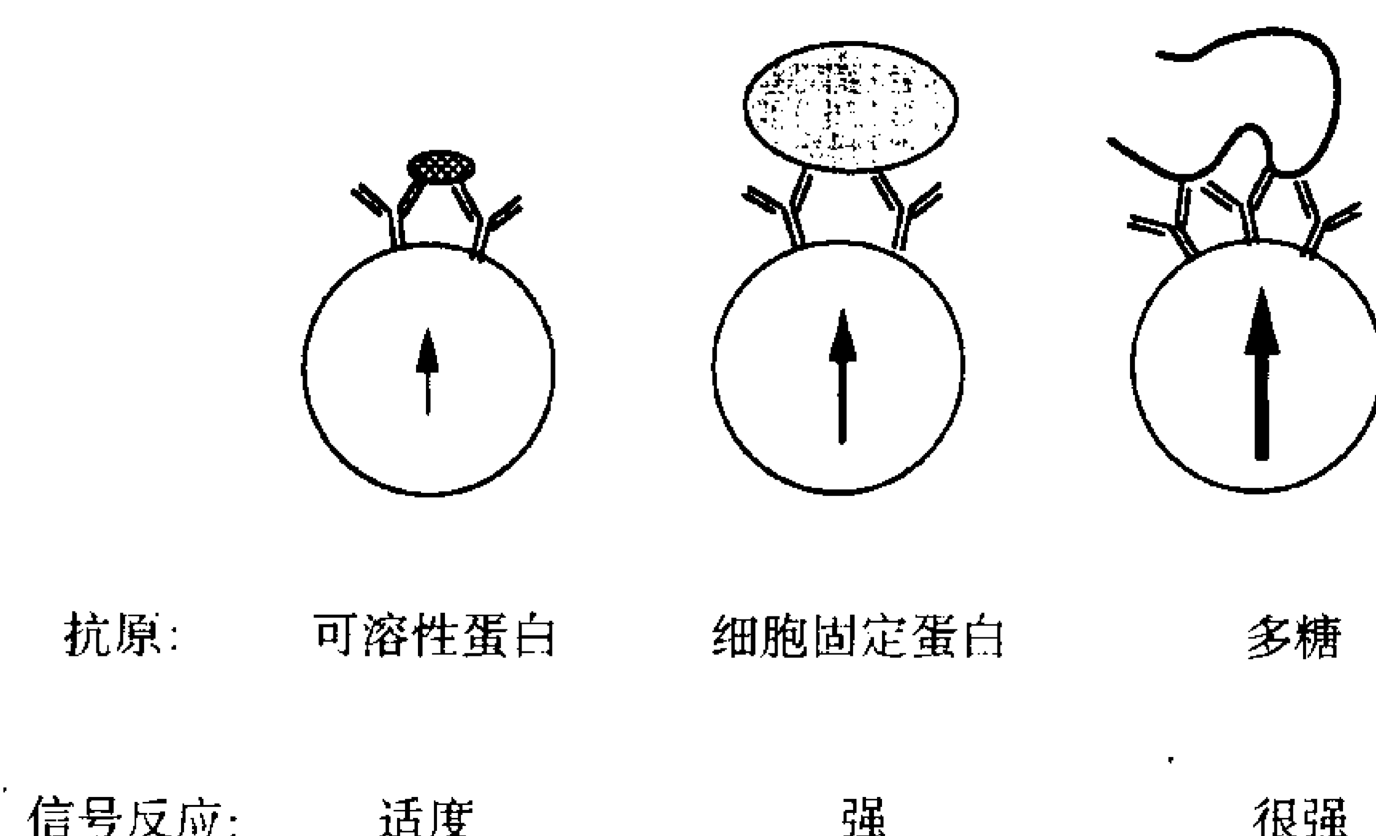


图 7.14 抗原结构对 BCR 信号功能的重要性。解释产生抗体应答不同需要的一种假说是:某些抗原比其他一些抗原在通过 BCR 触发信号功能方面更加有效。特别是,该假说提出,可溶性蛋白抗原只能诱导适度的信号,而细胞固定抗原(或者通过其多价特性,或者通过参与细胞间黏附分子)能诱导强信号功能。多糖抗原的柔性、重复性特性可能使其特别有利于触发抗原受体信号功能,用交联到右旋糖酐的抗 Ig 进行的试验也提示这点。这些抗原可典型地展示来自 Th 细胞或巨噬细胞的额外信号的最为需要。

用 TI-2 抗原或抗 Ig-右旋糖酐偶联物体外刺激高度纯化的静息 B 细胞,不能诱导抗体产生,提示这些应答还有其他需要。加入细胞因子能促进强抗体应答[217,219],其中以 IL-2、IFN-γ、IL-3、GM-CSF 尤其重要,尽管这些是并不需要的。IL-5 也能体外促进对 TI-2 抗原的抗体应答。关于这方面,一个有意思的发现是,抗 Ig-右旋糖酐能诱导 B 细胞上 IL-5 受体的表达[232]。在这些体外应答中,IFN-γ 也能促进向 IgG3 型抗体应答的转换,IgG3 是小鼠 TI-2 抗原应答中常见的优势 IgG 亚型,提示它参与了体内大多数抗体应答。这些细胞因子的体内来源仍未完全建立,但已知 NK 细胞是一个有意义的可能(特别是在病毒应答中)[219]。在正常动物中,对附近其他抗原的 T 细胞应答也可能是这些细胞因子的来源。

对 TI-2 抗原和抗 Ig-右旋糖酐偶联物的体外抗体应答,也可被一些低浓度的多克隆 B 细胞活化物强有力的激活,这些 B 细胞多克隆活化物包括 LPS、膜孔蛋白、脂蛋白和细菌 DNA[219]。在这种情况下,多克隆 B 细胞活化物在亚致有丝分裂浓度时是有活性的,并且该应答需要和抗 Ig-右旋糖酐偶联物那样的强势 BCR 交联,原因是可溶性抗 IgM 不能替代。

细菌 DNA 与内源性哺乳动物 DNA 在含非甲基化 CpG 二核苷酸的顺序频率方面明显不同[233]。对脊椎动物,其 CpG 顺序中胞核嘧啶的甲基化是一个重要的基因调控策略。由于非甲基化 CpG 顺序主要存在于表达基因的上游区结构域,所以其在哺乳动物 DNA 中的频率是比较低的。这样,大量非甲基化的 CpG 顺序的存在是细菌感染的一个特点,通过激活 TI-2 应答,它(及不同的细菌细胞壁结构)能够促进对附近 TI-2 抗原的初始免疫应答。如此,含重复多糖和多克隆 B 细胞活化物的细菌细胞壁,就能够通过下面两种方式的结合,以极强有力的方式激活 B 细胞活化,这两种方式是:抗原特异性 B 细胞的 BCR 激活 TI-2 强信号功能和多克隆 B 细胞活化物成分诱导的末端分化。

负责 TI-2 应答的 B 细胞

脾是对小鼠、大鼠和人类产生抗多糖抗原的抗体应答的能力非常重要的脏器[217,234],可能也反映了边缘区 B 细胞在产生这些应答中的一个特别重要的功能。边缘区 B 细胞位于脾白髓和红髓之间的边缘,与大多

数 B 细胞不同,存在于滤泡中。边缘区包括随时与多糖抗原结合的一种特别的巨噬细胞和属 $CD23^-$、IgM^{hi} IgD^{lo}的非循环细胞的边缘区 B 细胞。在放射照射后重新分群的基础上,有人提出,边缘区 B 细胞代表能够独特地累积 TI-2 应答的 B 细胞的一个特别亚群[234,235]。但由于体外对抗 Ig-右旋糖酐偶联物和细胞因子的抗体应答,能被滤泡表型的细胞及边缘区表型的细胞有效累积[236],所以该假说缺乏直接证据。而且,令人奇怪的是,边缘区 B 细胞的表型和数量与自骨髓最新产生的 B 细胞相同[167]。边缘区 B 细胞可能是这些新生细胞和长生的特殊 B 细胞的混合物,这些细胞相对固定并含有一些记忆细胞[234,235]。

245

B-1B 细胞:一种独特的 B 细胞亚群

大多数外周 B 细胞属于长生的再循环滤泡型 B 细胞群体,但可能也有其他一些亚群的 B 细胞。如下所述,新生 B 细胞在对耐受诱导高度敏感方面,功能存在明显不同。而且,这些细胞在产生后一周内就全部死亡,除非它们被选择进入长生滤泡池[167]。目前了解的较少的是脾边缘区内的 B 细胞的亚型。最后,还有一定数量的 B 细胞亚群,称为 B-1 亚型。这些细胞表达高水平 IgM、低水平 IgD 和 Mac1(CD11b/CD18),不表达 CD23。这些细胞中,有些细胞表达低水平的 CD5,但其他一些则不表达;前者称为 B-1a 细胞,后者称为 B-1b 细胞[237]。B-1 细胞主要在胎儿期和新生儿期产生,其特征是限制性 IgH 基因重排[164]。重排主要用一些定位于 D_H 附近的 V_H 基因,它们一般不含 N 区添加物[238]。这样它们的功能就比常规 B 细胞局限得多。而且,B-1B 细胞主要定位于腹膜腔和胸膜腔内。虽然可在脾内发现少量细胞,约占脾 B 细胞总量的 2% ~ 3%,但它们不存在于淋巴结内。令人奇怪的是,脾脏 B-1 细胞不表达 Mac-1,虽然它们的表型与腹膜腔内 B-1 细胞相同[239]。相当数量的脾 B-1 细胞是 IgM 分泌型的浆细胞,而且其抗体主要是血清 IgM。而且相当数量的肠内 IgA 分泌型浆细胞可能源自 B-1 细胞[240]。B-1 细胞的功能目前仍不清楚,目前最具吸引力的观点是:它们能产生抵抗无处不在的细菌的保护性抗体,并因此在正常过继免疫应答充分有效之前,提供生命早期的免疫防御。将腹腔 B-1 细胞过继输入 SCID 小鼠,可以重建抗多种肠道细菌的 IgA 分泌[240],该发现支持上述观点。

B-1 细胞的一个独特的特点是,它们可在体内几乎是无限的增殖、扩增。关于 B 细胞活化,它们能产生 TD 抗体应答,但不能参与生发中心的反应[239,241]。

在 B-1 细胞的特殊性质基础上,有人认为,B-1 细胞代表了 B 细胞的一个单独的细胞系,并且此观点有相当的实验支持。例如,用源自胎肝或网膜的前体细胞过继输入,能重建 B-1 细胞群,但用源自成人骨髓的前体细胞过继输入,能重建常规 B 细胞,但不能重建 B-1 细胞[164,239]。因此,不论从 Ig 的能力方面,还是表型特性方面,生命早期的 B 细胞前体成为 B-1 细胞系,而晚些时期的 B 细胞前体则成为多样性的滤泡 B 细胞。

虽然某些 B 细胞前体成为 B-1 细胞系,但基于抗原的刺激物对新生的 B-1 细胞长生是非常重要的,这点就像常规 B 细胞那样[239]。这种可能性最初是由体外试验所提出的,该试验用抗 Ig 抗体和 IL-6 刺激脾 B 细胞,发现能诱导获得 B-1 样细胞表型[242]。而且,不同的转基因小鼠或者表现 B-1 细胞表型,或者根本不表现,该结果与 B-1 细胞产生或存活所需的 BCR 信号几乎一致。例如,抗溶菌酶 Ig 转基因小鼠几乎没有 B-1 细胞,但将该转基因转入食蛾小鼠则会产生很多 B-1 细胞[243]。食蛾生存是酪氨酸激酶 SHP-1 功能突变部分缺失的结果。SHP-1 抑制 BCR 信号,所以 BCR 信号在这些突变小鼠中得以提高。最简单的解释是:某些内源性配体与抗溶菌酶 BCR 相互作用,足以使常规 B 细胞进入长生滤泡细胞池,但不足以使 B-1 倾向前体细胞进入长生 B-1 细胞池;但是,当 BCR 信号得以提高时,就会发生 B-1 细胞越过阈值和阳性选择而进入 B-1 细胞池。因此,对常规 B 细胞和 B-1 细胞,存在多种不同的阳性选择的信号阈值。该假说与下述事实相一致,即 B-1 细胞在编码 Btk、Vav、CD19 等信号成分的小鼠中发生优先缺失,并被定向基因删除而去除[38]。所有上述信号成分可能参与了 BCR 信号,但如缺乏这些成分,B 细胞也能发育,可能是因为这些细胞需要较低水平的信号事件。对阴性选择可能也存在不同的信号阈值,这可能解释 B-1 细胞群中可见的频繁低亲和力自身反应性现象[239]。

T 细胞依赖性(TD)抗原的抗体反应

TD 应答概述

大多数蛋白质抗原的抗体应答均有赖 Th 细胞。例如,去胸腺的"裸鼠"被免疫后,这些应答大多不会发生,因为这些鼠几乎没有 T 细胞。长生的、未接触抗原的 B 细胞在血液和淋巴结中循环,直至接触到特异性抗原,这一般在脾脏或淋巴结的 T 细胞区发生。抗原被巨噬细胞和(或)树突细胞从外周位点引导到该位置。与抗原的接触使 B 细胞停止迁移并滞留在 T 细胞区[244,245]。特异性 B 细胞通过 BCR 复合物而内在化抗原,并处理成为能与 MHCⅡ类分子结合的多肽,然后在细胞表面呈现多肽-MHCⅡ类分子复合物。未受刺激的抗原特异性 Th 细胞也在该位置被活化,可能通过抗原呈递性的、相互错杂的树突细胞。这些活化的 Th 细胞寻找并发现呈递抗原的 B 细胞。T 细胞的抗原识别导致与抗原呈递 B 细胞形成稳定的偶联物,随之传递可溶性的膜结合辅助信号,这点下面有述。这些信号诱导 B 细胞增殖并最终分化为抗体分泌细胞。该反应最初在 T 细胞区发生,并是原发性抗体应答中首次大量产生 IgM 的原因。某些由该种方式激活的 B 细胞迁移到滤泡区,并发动生发中心反应,而不是原位终末分化。该途径需要 T 细胞 CD40 配体的诱导表达,并且该信号应被 B 细胞上 CD40 所接收。相关分子 OX40(T 细胞上的)和 OX40 配体(B 细胞上的)可能促进非生发中心途径[246]。生发中心途径涉及 B 细胞的免疫球蛋白基因迅速增殖和的体细胞突变。体细胞突变之后,生发中心 B 细胞经过严格选择,只有那些表达高亲和力 mIg 分子的细胞能够存活。在生发中心 B 细胞中,也存在优势级别转换为其他 Ig 重链独特型的现象。最后,生发中心 B 细胞或者最终分化为浆细胞,或者成为静息的记忆细胞。虽然生发中心产生的浆细胞能迁移至肠道和骨髓,在那里它们能存活 20 多天并分泌抗体,但大多数浆细胞在开始凋亡之前只能存活几天时间。

246

B 细胞呈递抗原给 Th 细胞

大多数抗体应答需要抗原特异性 B 细胞与 Th 细胞间的直接相互作用。该相互作用以 Th 细胞遇到呈现在 B 细胞表面的、合适的抗原肽-MHCⅡ类分子复合物开始。如果 B 细胞上的 BCR 能结合可疑抗原,则该抗原被受体介导的细胞内吞作用摄取,而且抗原特异性 Th 细胞被高效活化。如果该抗原不结合 BCR,则它就被液相胞饮作用低效率摄取。在后一种情况下,需要更高(10^3 ~ 10^4 倍)的抗原浓度以活化 T 细胞[247]。这样,BCR 就在介导抗原摄取、及因此而促进抗原特异性 B 细胞与(识别交联抗原决定簇的)Th 细胞间的相互作用中,发挥有力的作用(图 7.15)。

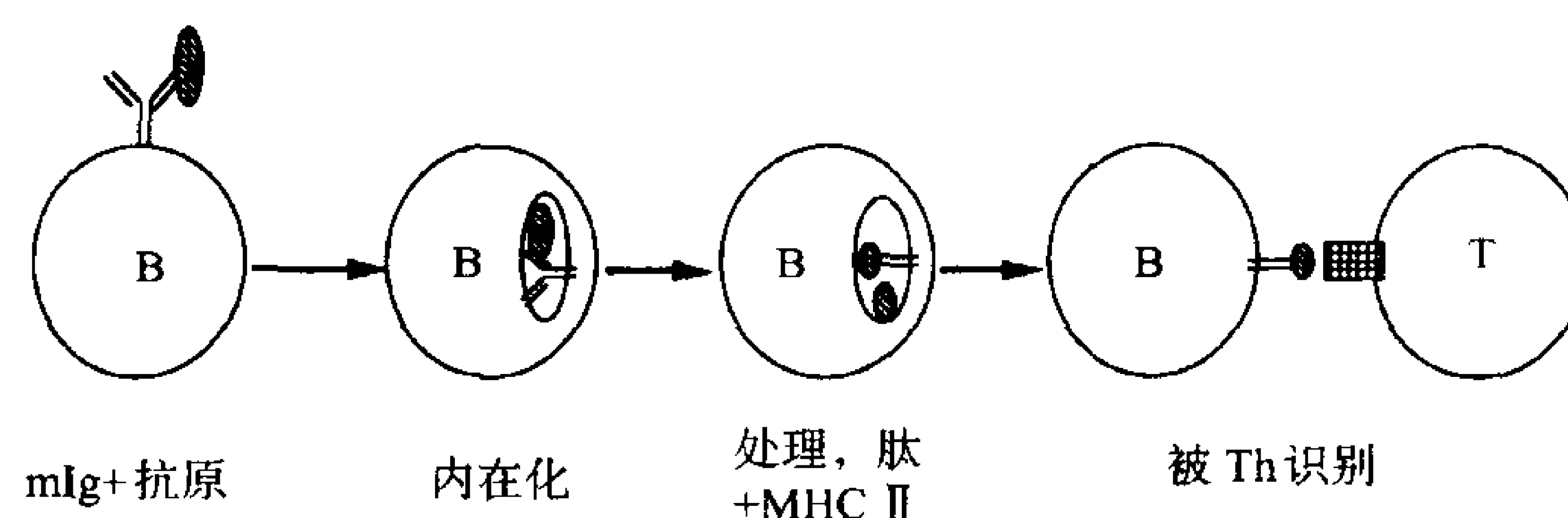


图 7.15 B 细胞抗原呈递。通过 BCR 结合特殊抗原的 B 细胞能有效地内在化该抗原。内在化的蛋白抗原然后在晚期内体或溶酶体内被蛋白水解处理。合适的抗原来源的肽能与 MHCⅡ分子结合,然后在到达细胞表面之前导入晚期内体。MHC-肽复合物一旦形成,就能到达细胞表面,作为抗原特异性 Th 细胞的识别结构。

BCR 的抗原摄取可能是 BCR 在细胞表面和膜内内体之间,持续不断的往复循环的结果。在对一个抗原特异性 EBV 转染的 B 细胞系的研究中,发现在任一时段,几乎一半的 BCR 复合物存在于内体中[248]。当把单价抗原(破伤风毒素)加入这些细胞后,抗原内在化,其半寿期约为 8.5 分钟。该内在化的发生伴随有不同大小的配体。有意思的是,当游离 BCR 复合物内在化后,在回到细胞表面之前,它们之中几乎没有被降解的。相比之下,当破伤风毒素结合的 BCR 分子内在化后,某些分子会返回到细胞表面,而另一些则降解了。抗原和 mIg 的蛋白质溶解作用非常明显。关于配体结合的 BCR 分子优先降解的机制仍不清楚。

尽管认为抗原受体信号促进抗原内在化和(或)mIg-抗原复合物的靶向溶蛋白处理途径是较有吸引力的

观点，但最近的研究证据并不支持该说法。虽然 BCR 交联通常是信号转导所需的，但它并不是抗原内在化或有效抗原呈递所必需的[248,249]。而且，μ 链跨膜区突变产生信号功能正常的 mIg 分子，但呈递特异性抗原的功能则缺陷[250]。这些分子内在化抗原，但不能将其运至合适的亚细胞小室，在这些小室中，MHCⅡ类分子的多肽装载最为高效[251]。

BCR 呈递抗原需要 Igα/Igβ 结合到 mIg，而且该功能包含在 Igα 和 Igβ 的胞内结构域内[252,253]。但该功能与 ITAM 的功能截然不同，因为 Igβ 内酪氨酸的突变不能消除(含 Igβ 胞内结构域的)嵌合分子的抗原呈递功能[252]。有趣的是，含 Igα 和 Igβ 胞内结构域的嵌合分子能诱导结合的抗原交流到不同的亚细胞小室内，提示这些胞内结构域有不同功能[253]。Igα 将结合抗原运至富含新合成 MHCⅡ类分子的亚细胞小室内，可能在该小室内发生大多数多肽装载的事件(见第 9 章)。相反，Igβ 将结合抗原优先运至含转铁蛋白受体的内体内。关于这两种不同的靶信号在未活化 BCR 中如何协同工作，目前仍不清楚。而且，就 mIgG 而言，γ 重链的胞内尾对抗原呈递也有靶向信号功能[254]，所以 IgG^+ 记忆 B 细胞的 BCR 有三种抗原呈递的靶向信号。

虽然 BCR 信号可能并不参与抗原摄取，但它确实以其他方式促进 Th 细胞-B 细胞间的相互作用。抗 Ig 活化的 B 细胞与静息 B 细胞相比，有很强的在各细胞水平上向 $CD4^+$ T 细胞呈递抗原的能力[255]。这可能部分反映了 B7-2 分子的诱导作用，该分子通过 CD28 为 T 细胞提供共刺激信号[256]。而且，用抗 Ig 或 PMA[磷脂酰肌醇第二信使模拟剂，活化 PKC 和离子霉素(钙离子载体)]激活静息 B 细胞，可导致 B 细胞向克隆化 Th 细胞簇集的快速增高[257]。该簇集可能涉及 LFA-1 和 ICAM-1 黏附分子对，因为佛波酯能通过这些分子迅速增高 B 细胞系的同型细胞间相互作用。用抗 Ig 处理 B 细胞，也能提高基于 LFA-1/ICAM-1 的细胞-细胞黏附[258]。可能 BCR 信号能调节这些黏附分子的亲和力，但其分子机制仍不清楚。如上所述，BCR 信号反应提高 MHCⅡ类分子的表达，这也有可能提高 B 细胞的抗原呈递，特别是因为新合成的 MHCⅡ类分子在内体中主要负责结合多肽[208]。总之，BCR 在抗原呈递中发挥两个作用：高效内在化抗原，指导其进入相关的亚细胞小室；激活提高黏附和 MHCⅡ类分子与 B7-2 分子表达的信号转导事件(图 7.16)。这些及其他可能的事件能提高抗原识别 B 细胞呈递该抗原至特异性 Th 细胞的能力。

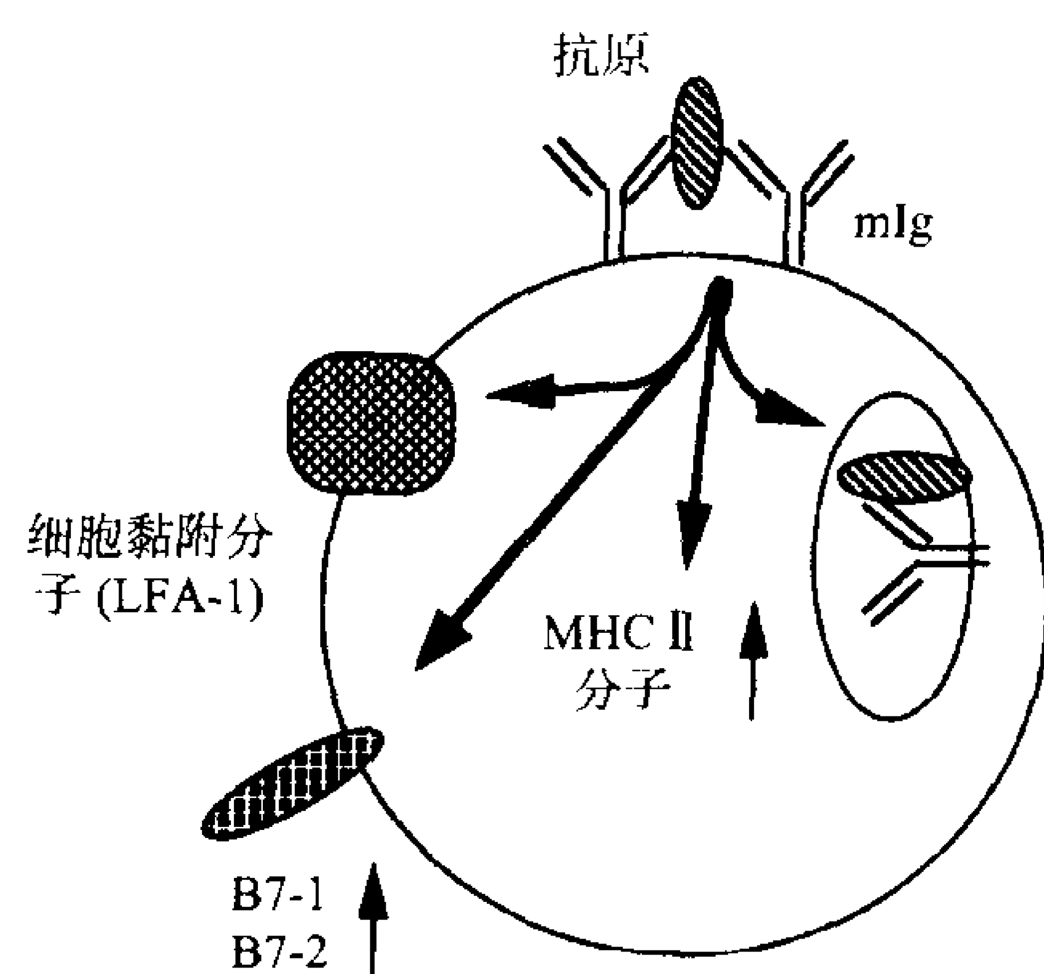


图 7.16 BCR 在向 Th 细胞呈递抗原中的作用。除图 7.15 中所描述的抗原摄取外，抗原结合到 BCR 也触发信号转导反应。这些反应诱导 MHCⅡ基因表达，这向后期的内体提供了更多的 MHCⅡ分子与抗原来源的肽结合。而且，BCR 信号调节 B 细胞表面的细胞-细胞黏附分子的亲和力，并诱导 B7-2 的表达，并因此促进与 Th 细胞的有效作用。

模型 TD 抗体应答

有三种类型的抗体应答模型主要被应用于评价来自 Th 细胞促进 B 细胞活化的信号的本质。其中研究得最为透彻的一种模型是应用可溶性抗 Ig 代替抗原。低浓度的抗 Ig 诱导静息 B 细胞自静息 G_0 期状态进入 G_1 期。高浓度的高亲和力抗 Ig 能诱导 B 细胞增殖，但不产生抗体。将活化的 T 细胞的培养上清加入到抗 Ig 激活的 B 细胞中，能提高其增殖并有力地诱导抗体产生[259,260]。生化纯化法确定的 IL-4 是负责提高抗 Ig 激活的 B 细胞增殖的重要的细胞因子[261]。IL-2 对人类(非小鼠)B 细胞也有这种活性，IFN-γ 也能提高抗 Ig 诱导的增殖反应。

有证据表明，IL-4 在 B 细胞增殖反应中，不是作为与 IL-2 促进 T 细胞增殖的作用类似的一个生长因子而发挥作用，而是作为一个动因，提高 BCR 激活的应答反应并促进 B 细胞的生长发育。例如，抗 Ig 必须持续存在以刺激增殖反应，而 IL-4 作用需要其早期存在而不是晚期存在[179,180]。这与 T 细胞中的情况完全不同，在 T 细胞中，TCR 激活后，诱导 IL-2 产生和 IL-2 受体的表达，后者又在缺乏更深入的 TCR 激活的情况下，驱动 T 细胞增殖。

用抗 Ig 处理静息 B 细胞产生 IgM 的反应需要 IL-4、IL-5 和一个晚期作用因子(可以是 IL-2 或 IL-6)(图

7.17)[262]。在该反应中，IL-4 在促进 B 细胞增殖中发挥一定作用，IL-2 和 IL-6 促进 B 细胞分化，因为后者能在细胞培养的最后 18 小时加入培养基，并完全有效。最近发现，IL-6 诱导细胞周期抑制蛋白 p18[INK4c] 的表达，该蛋白质与细胞周期蛋白 D/cdk4 或 cdk-6 复合物结合并抑制之，提示这就是它如何诱导细胞终止分化前的生长停滞的机理[263]。诱导终末分化可能还需要其他遗传学事件。对 IL-2 而言，控制分化的一个关键分子事件是转录调控因子 Blimp-1 的表达。该分子在分化进行中的 B 细胞中表达上调，在转染进入 B 细胞后，能诱导末端分化[264,265]。

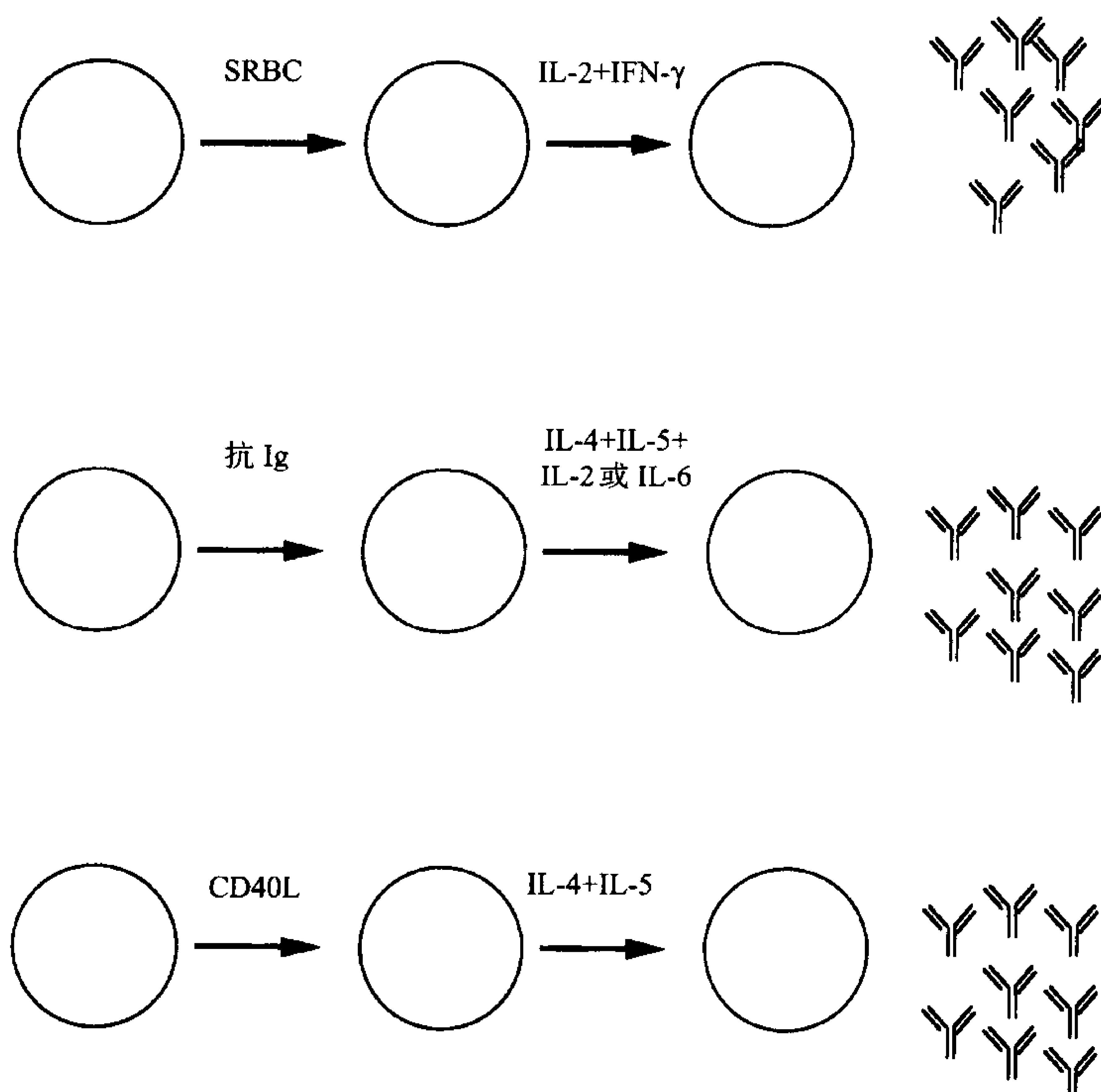


图 7.17　模型 TD 抗体应答。如文中所描述，三种 TD 抗体应答模型是：抗 SRBC 应答、抗可溶性抗 Ig 的多克隆抗体应答和抗 CD40L 应答。三种模型中，细胞因子皆促进细胞增殖并诱导终末分化。

在这些抗体应答中，IL-5 的作用仍不清楚。它虽然能促进某些 B 细胞系和 B-1 细胞的增殖[266,267]，但不提高抗-Ig 和 IL-4 激活的 B 细胞的增殖。IL-5 的作用之一是诱导 IL-2 受体[268]。例如，静息 B 细胞应答 IL-4、IL-5 的刺激而被诱导表达 IL-2 受体的 α 和 β 链[269]。在 BCL_1 白血病 B 细胞系中，IL-5 和 IL-2 能协同诱导该细胞分泌抗体。在该系统中，IL-5 诱导 IL-2 受体，IL-2 负责活化某些分化的分泌细胞基因（如基因编码 J 链）的表达[270]。IL-5 本身可能也促进细胞分化，因为在某些情况下，IL-4 和 IL-5 足以促进有力的抗体产生，例如，当抗 Ig 在末端分化之前被从培养液中去除时[271]。

关于这些发现，一个重要的事件是哪些抗原行为如同抗 Ig 一样活化 B 细胞。在一项研究中，半抗原特异性 B 细胞被分离出来，并在体外用不同的半抗原化的抗原和 IL-4 活化。一个半抗原化的 TI-2 抗原能诱导 B 细胞增殖，而一个半抗原化的蛋白质抗原则不能[272]，提示许多蛋白质抗原在有 IL-4 + IL-5 + IL-2 或 IL-6 存在时，不能诱导足够的 BCR 信号以支持强抗体应答。相反，如同抗 Ig-右旋糖酐偶联物刺激那样，BCR 的有力参与在有上述细胞因子存在时确实能促进抗体应答。但是，可溶性蛋白能诱发重要的 BCR 信号，如蛋白酪氨酸磷酸化增高、磷脂酰肌醇分解、钙离子水平升高、*c-myc* 在抗原特异性 B 细胞中诱导等[159,273~275]。

第二个研究得较多的模型系统是用半抗原化的 SRBC 作为抗原。该抗原是第一个能被成功地用于体外诱导抗体应答的蛋白质，而且发现该应答需要 T 细胞参与，而且可以被活化的 Th 细胞的上清液所替代[276]。这些上清在该分析方法中被分离出来并检测其活性。而且还发现 IL-2 与 IFN-γ 联合能替代 Th 细胞来源的上清[277]。有意思的是，加入 IL-2 与 IFN-γ 后，用金黄葡萄球菌 Cowan Ⅰ 株（SAC，表面表达免疫球蛋白结合蛋白 A 的革兰氏阳性菌）激活的人类 B 细胞能产生多克隆抗体[278]，提示这两个细胞因子有助于对多个不同类

248

型抗原的抗体应答。相同,抗 Ig 右旋糖酐偶联物激活的 B 细胞在加入 IL-2 与 IFN-γ 后,也产生抗体,但可溶性抗 Ig 激活的 B 细胞则不能,提示该应答需要强 BCR 信号[219]。

IL-2 在促进抗体应答中发挥重要作用,而 IFN-γ 在其中的影响却更加复杂。许多情况下,IFN-γ 抑制抗体反应,而有些情况下(如上面所列),IFN-γ 激活抗体产生。特别是 IFN-γ 经常被用于拮抗 IL-4 对 B 细胞的影响[219]。

这两个模型系统有一个令人奇怪之处,即 SRBC 系统需要 IL-2 和 IFN-γ,它们是 Th 细胞 Th1 亚群的产物;而抗 Ig 系统需要 IL-4、IL-5 和 IL-6,它们是 Th 细胞 Th2 亚群(而非 Th1)的产物。当 IL-2 被替换为 IL-6 时,抗 Ig 系统也抑制抗体产生。Th 细胞的第三个亚群(Th0)产生 IL-2、IL-4、IL-5 及其他一些细胞因子。这样,第一个模型系统可能代表通过 Th2 或 Th0 细胞的 B 细胞活化,而第二个模型系统则可能表示 B 细胞通过 Th1 细胞活化的路径。

与上述两种模型 TD 抗体应答结果相反,对可溶性蛋白抗原的抗体应答需要与 Th 细胞的接触[280]。这样,SRBC 和抗 Ig 为 B 细胞活化提供了可溶性蛋白抗原所不能提供的信号。最可能的解释是:这种差别是一定量而非定性的结果,即抗 Ig 和 SRBC 是 BCR 信号反应的相对较强诱导物,而可溶性蛋白质抗原是这些信号反应的相对较弱诱导物(图 7.14)。

在许多模型系统中,活化的 Th 细胞能活化向它们呈递抗原的 B 细胞[280]。通常,如果 BCR 信号反应也被触发,则 B 细胞活化可显著提高。例如,对溶酶特异性 Ig 转基因 B 细胞的研究中,同种抗原的特异性 Th 细胞能对抗体产生提供帮助,但如果加入溶酶则抗体产生大大提高[159]。在这些试验中,Th 细胞提供的信号不能由来自 T 细胞的可溶性细胞因子提供,但能由分离出的活化的 T 细胞的质膜所提供,也即是因为细胞结合分子的缘故。

用活化的 Th 细胞的细胞膜免疫动物,可获得能阻断 Th 细胞结合信号的单克隆抗体。几乎在同时,CD40 配体被克隆出来,并发现能被这些抗体所识别[281]。而且,发现一个可溶性 CD40-Ig 嵌合蛋白能阻断活化 Th 细胞质膜的活性,诱导 B 细胞进入细胞周期的 G_1 期。一个相关的嵌合蛋白也能阻断被活 Th 细胞诱导的 B 细胞的增殖[282]。对这些结果最可能的解释是:这些嵌合物结合 T 细胞上 CD40 的配体,该结合阻止该配体与 B 细胞上 CD40 的相互作用,以这种方式阻断活化(图 7.18)。

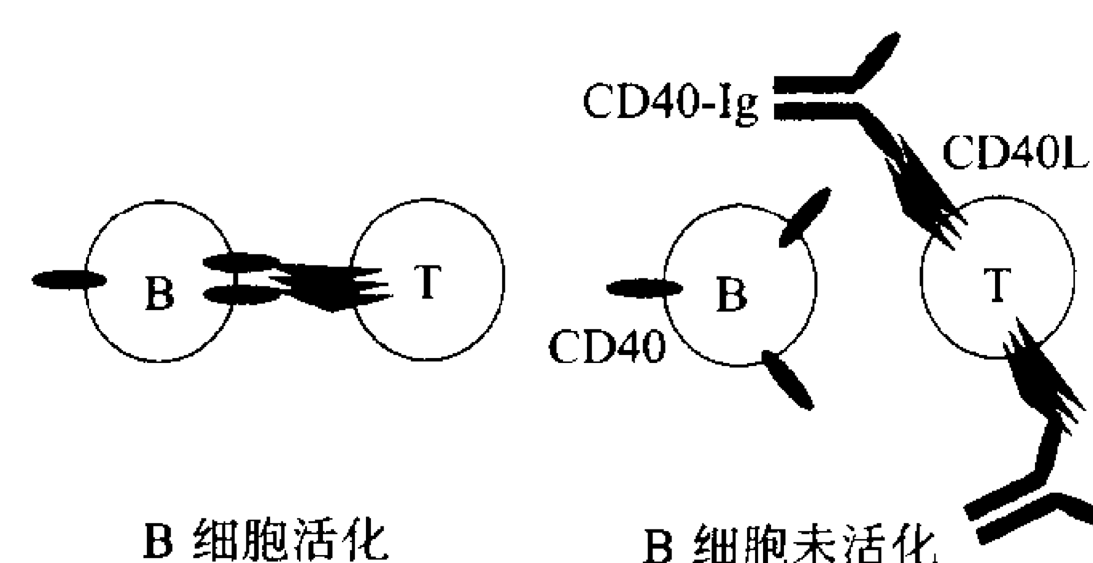


图 7.18 可溶性 CD40L-Ig 介导的 B 细胞活化抑制。B 细胞被活化的 Th 细胞以 CD40L 依赖方式激活。在 B 细胞活化依赖与 Th 细胞(左)接触的多种系统中,在 CD40 的胞外区和 IgG (CD40-Ig)的 Fc 部分之间加入一个融合蛋白会阻断这种活化(右),原因是该融合蛋白竞争与 CD40L 的结合,并因此而阻止活化信号经 CD40 向 B 细胞传递。

249

后续试验证实了下述结论,即活化 Th 细胞与 B 细胞接触而发生的主要信号涉及到与 B 细胞上 CD40 相互作用的 Th 细胞上的 CD40L(也叫糖蛋白 gp39 和 CD154)。CD40L 主要由活化的 $CD4^+$ T 细胞表达,但其他某些细胞也能表达[283]。TCR 激活后,在 1~2 小时内诱导 CD40L 的合成和表达,4~8 小时达高峰水平。向 Th 细胞呈递抗原的 B 细胞能形成至少是这样长时间的细胞-细胞间的接触[279],因此可认为,能够通过 CD40 分子(持续表达)接收 CD40L 的信号。

用寡聚、交联或固定不动等形式的 CD40L 激活纯静息 B 细胞,能诱导其增殖,该增殖可被一些细胞因子(特别是 IL-4)所提高。CD40L 单独激活不能诱导细胞终末分化为浆细胞,但加入细胞因子能较强的诱导抗体产生,其中,IL-4 + IL-5 通常是最佳组合方式(图 7.17)[284]。在缺乏 IL-2 或 IL-6 时,对 IL-4 和 IL-5 响应的能力也可见于对抗 Ig 的应答中(如果抗 Ig 在反应晚期被去除);否则,必须有 IL-2 或 IL-6 参与[271]。如同用抗 Ig 激活那样,IL-2 + IFN-γ 在 CD40L 激活的 B 细胞中不会诱导强抗体应答[285]。

令人奇怪的是,静息 B 细胞上 CD40L 的某些功效与可溶性抗 Ig 激活 BCR 的效果密切平行。这样,该 Th 接触依赖的信号就能部分地提供一个信号,替代温和的 BCR 信号。CD40L 活动的这个方面可能对响应那些只能诱导相当弱的 BCR 信号的可溶性蛋白抗原而产生的抗体应答是非常重要的。但是,同样重要的是

CD40L 信号与 BCR 信号的不同的方式。例如，CD40L 诱导 B 细胞 Fas 的表达及对 FasL 杀灭的敏感性。BCR 信号不诱导 Fas，而且实际上能保护 B 细胞免被 FasL 杀灭（如果 CD40L 已经诱导了 Fas）（图 7.19）[286]。这种相互影响对防止无反应性 B 细胞的抗体应答非常重要。相同，CD40L 信号是初始生发中心反应所必需的，但 BCR 信号则不足以诱发该反应，而且如果 T 细胞不存在，生发中心反应就会极大地缺乏 TI 应答。

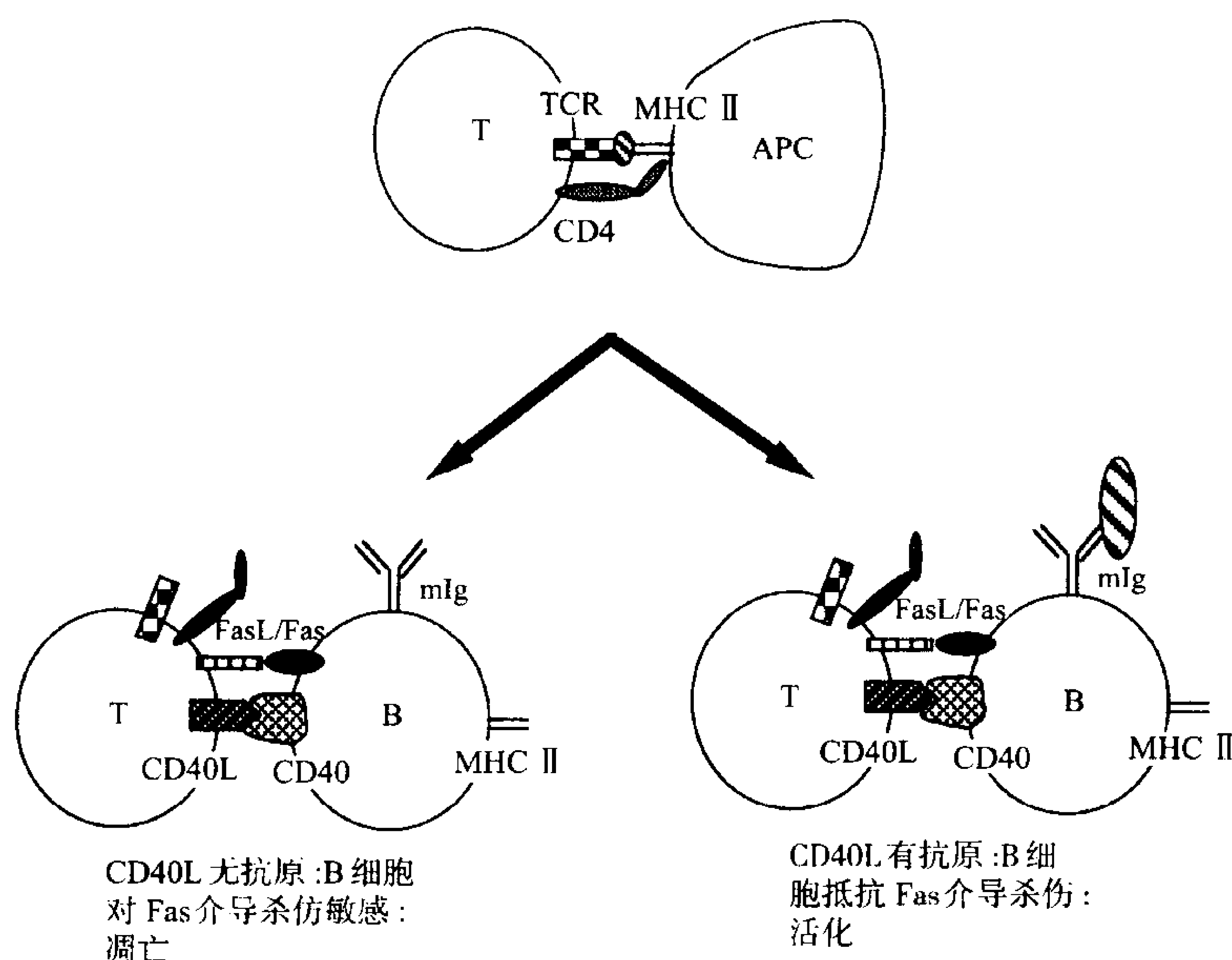


图 7.19　经 CD40 激活的 B 细胞的 Fas 敏感性。一个 Th 细胞的活化（上）引起其快速诱导表达 CD40L 和缓慢诱导表达 FasL。活化 Th 细胞与一个缺乏 BCR 信号时呈递抗原的 B 细胞（下左）间的接触，导致该 B 细胞经 CD40 的瞬时活化和细胞因子激活，但同时该 B 细胞上调表达 Fas，并对 Fasl 诱导的杀伤变得敏感。其结果是细胞凋亡，而非活化，这也是向 Th 细胞呈递抗原的失能 B 细胞的命运。活化的 T 细胞与经本身 BCR 接受信号的呈递抗原的 B 细胞（下右）间的接触，导致活化，原因是 BCR 信号使 B 细胞抵制 FasL 介导的杀伤。

通过应用阻断抗体、基因敲除小鼠、或人类自然发生的 CD40L 突变，可使 CD40L-CD40 间的相互作用被阻断，这样会导致 TD 抗体应答大为降低[284]。CD40L 的基因位于 X 染色体上，而 D40L 分子缺陷的人会得一种 X 连锁高 IgM 综合征。这些病人的 IgG、IgA、IgE 滴度很低，但 IgM 滴度增高。而后者可能是因为这些病人经历过众多、过量的感染而发生 TI 应答的原因。缺乏 CD40 或 CD40L 的小鼠也表现相同的表型，但其 IgM 水平并未增高。这些小鼠对 TD 抗原刺激基本不产生 IgG、IgA 或 IgE 类抗体应答，而且其 IgM 类应答也显著降低，但如果用完全弗氏佐剂乳化抗原则是例外情况，因为完全弗氏佐剂的成分内含多克隆 B 细胞活化物。有意思的是，体内对 SRBC 的 IgM 类应答也大为降低（约 20 倍），提示在体内，对 SRBC 的抗体应答非常需要 CD40L 并因此与抗原特异性 Th 细胞相接触[287]。对多糖抗原和半抗原化的 LPS 的抗体应答正常，表示 TI 抗原不需要通过 CD40 激活。

人们观察到一个矛盾的现象，即 Th 细胞能向不呈现肽/MHCⅡ类分子复合物的 B 细胞提供帮助，而该肽-MHCⅡ类分子复合物由这些 T 细胞所识别：如果 Th 细胞能活化任何 B 细胞，那么抗体应答的抗原特异性是如何得以保持的呢？如前所述，如果缺乏来自 BCR 的信号，则 CD40L 不仅激活 B 细胞，而且还使之对 Fas 介导的死亡变得敏感。而且，在一个真正的体内免疫应答中，Th 细胞有可能通过特异性摄取并呈递抗原，而优先与表达适当的识别单位的 B 细胞相作用。这至少部分是因为 Th 细胞最初（表达 CD40L 前）只与抗原呈递 B 细胞先形成强而持续的细胞结合物[288,289]。

在该初始时期，如果 B 细胞表达恰当的抗原肽、MHCⅡ类分子复合物，B 细胞与 Th 细胞间的相互作用会导致稳定细胞-细胞结合物的形成[288,289]。T 细胞上的 TCR、CD4 和 LFA-1 分子聚集到细胞-细胞接触区。这些分子可能通过它们 B 细胞上相应配体，或通过 T 细胞骨架成分而滞留在该位置。有趣的是，骨架蛋白（踝蛋白）也聚集到 T 细胞的该区域，而且微管结构组织也指向该接触区的中心点[289]。一般认为微管介导细胞内细胞器的活动。有意思的是，还发现淋巴因子分泌也指向 T 细胞与抗原呈递细胞的接触区域[290]。

B 细胞和 Th 细胞表面的一些分子参与了细胞-细胞间的相互作用[291]。当然，TCR 和 CD4 与 B 细胞表面的 MHCⅡ分子相互作用。而且，黏附分子 LFA-1 和 ICAM-1 在 B、T 细胞皆存在，有能力发生双向的相互作

用，需要指出的是，这些分子的黏附特性是被受体信号事件所调控的[258,292]。另外的相互作用分子对包括：活化的（而非静息的）B细胞上的B7-2分子、T细胞上的CD28分子、T细胞上的CD40L分子以及B细胞上的CD40分子（图7.20）。

这些相互作用分子对参与了关键信息的转移。B7-2与CD28的相互作用对Th细胞活化至关重要。如果Th细胞通过TCR识别抗原-MHCⅡ分子复合物，而不通过CD28识别B7，那么它就进入了一个无反应性状态而不能被活化[212]。相同，关于CD40L与B细胞上CD40的相互作用的重要性，前面已有描述。

除了向T细胞呈递抗原的功能外，B细胞上的MHCⅡ类分子也可接收来自Th细胞的活化信号。例如，MHCⅡ类分子的抗体能向已被抗Ig或抗Ig+IL-4活化的B细胞提供强增殖反应信号[293,294]。抗MHCⅡ类分子抗体诱导静息B细胞中cAMP水平升高[295]。有观点认为，通过MHCⅡ类分子的激活，可以在Th细胞-B细胞相互作用之间发生，与此观点一致的是，将固定的、活化的Th细胞加入静息B细胞中，能诱导cAMP水平的迅速升高[296]。有意思的是，用抗Ig预处理过的B细胞中，抗MHCⅡ类分子抗体诱导磷脂酰肌醇降解和某种形式的酪氨酸磷酸化，它们与抗IgM诱导的形式不可区分[297]。因为cAMP水平升高通常对B细胞活化是抑制性的，通过MHCⅡ类分子的信号可能反映了降低未识别抗原的B细胞活化，同时，提高已接触抗原的B细胞活化的另一种机制。

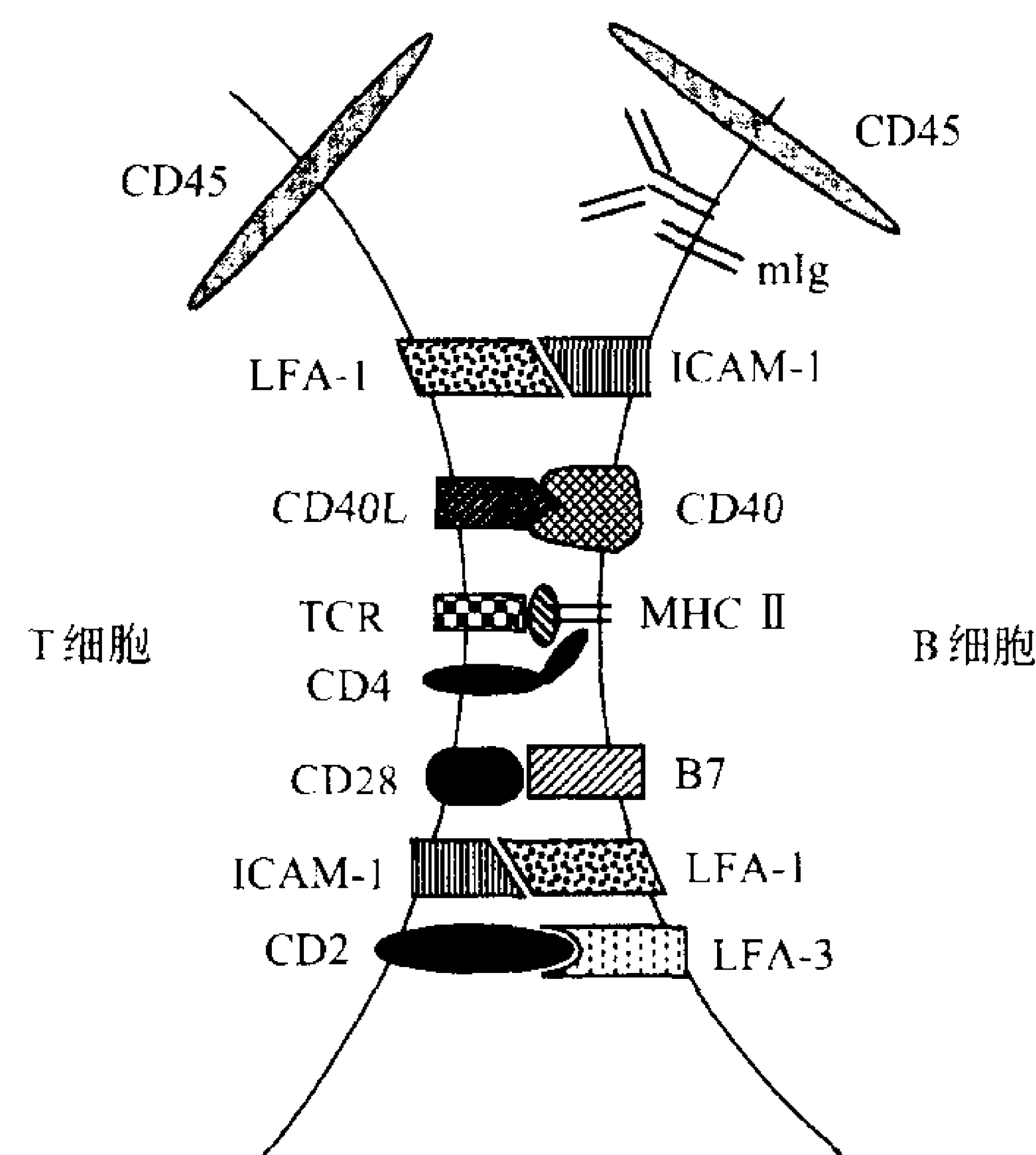


图7.20 参与B-Tb细胞间相互作用的细胞表面分子。B细胞上广泛的表面分子能与Th细胞上的表面分子相互作用。这些包括抗原呈递和抗原识别结构（MHCⅡ和TCR+CD4），参与活化Th细胞的分子（B7-2和CD28），及细胞-细胞黏附的分子。据认为CD45分子与其他细胞上的分子（如B细胞上的CD22）有相互作用，或与同一细胞上的其他表面分子有相互作用。

CD40结构与信号功能

251

CD40和CD40L属于受体/配体对的大家族，该家族包括TNF受体和TNF、Fas和FasL、CD30和CD30配体[298]。该家族的两个配体（TNF-α和淋巴毒素）的三维结构已得到确定，是三聚体。CD40L与这些分子的同源性使人们认为它肯定也是以三聚体配体形式自然存在。该家族的配体诱导受体寡聚化，并以该方法活化相应受体的信号功能。这些受体的一个亚型，包括TNF受体Ⅱ和CD40，可能主要通过结合到被叫做TNF受体相关因子（TNF receptor-associatedfactor，TRAF）的适配分子家族成员而传递信号。迄今已确定6个TRAF。受体寡聚化诱导TRAF异二聚体或同聚体的结合。对CD40而言，TRAF2和TRAF3结合到受体细胞内结构域的位点，对应于氨基酸246～269[299]。TRAF2对转录因子NF-κB的活化非常关键，而TRAF3对CD40的独特型转换诱导特性非常重要[198,300]。而且，近N端细胞内结构域的第二个区域（氨基酸残基230～245）是TRAF6的一个完全不同的结合位点，它也能活化NF-κB[301]。

关于TRAF如何活化下游信号事件，目前仍不清楚，但在该领域正在取得迅速的进展。如上所述，NF-κB的活化涉及IκB中两个丝氨酸的磷酸化，这使其功能靶向为泛素介导的破坏作用。这样释放出p50/p65和相关异二聚体到细胞核内，结合DNA，并活化转录。最近IκB激酶的两个亚基得以确定[198]，而且一个参与IκB激酶活化的上游蛋白激酶NIK也得到了确定。有意思的是，NIK能结合到TRAF，提示在TRAF结合到受体和NIK与IκB的活化（细节仍不清楚）之间有直接的相关（图7.21）。

CD40信号也可能涉及细胞内蛋白酪氨酸激酶（如Lyn和Btk）的活化，但其活化机制仍不清楚[284]。CD40胞内结构域缺乏ITAM，而且激活之后，其酪氨酸也不明显磷酸化。有趣的是，编码Btk的基因有功能缺失的*xid*B细胞，其对CD40L的体外应答降低[302]，这与Btk在CD40信号功能中的作用可能相一致。但该影响可

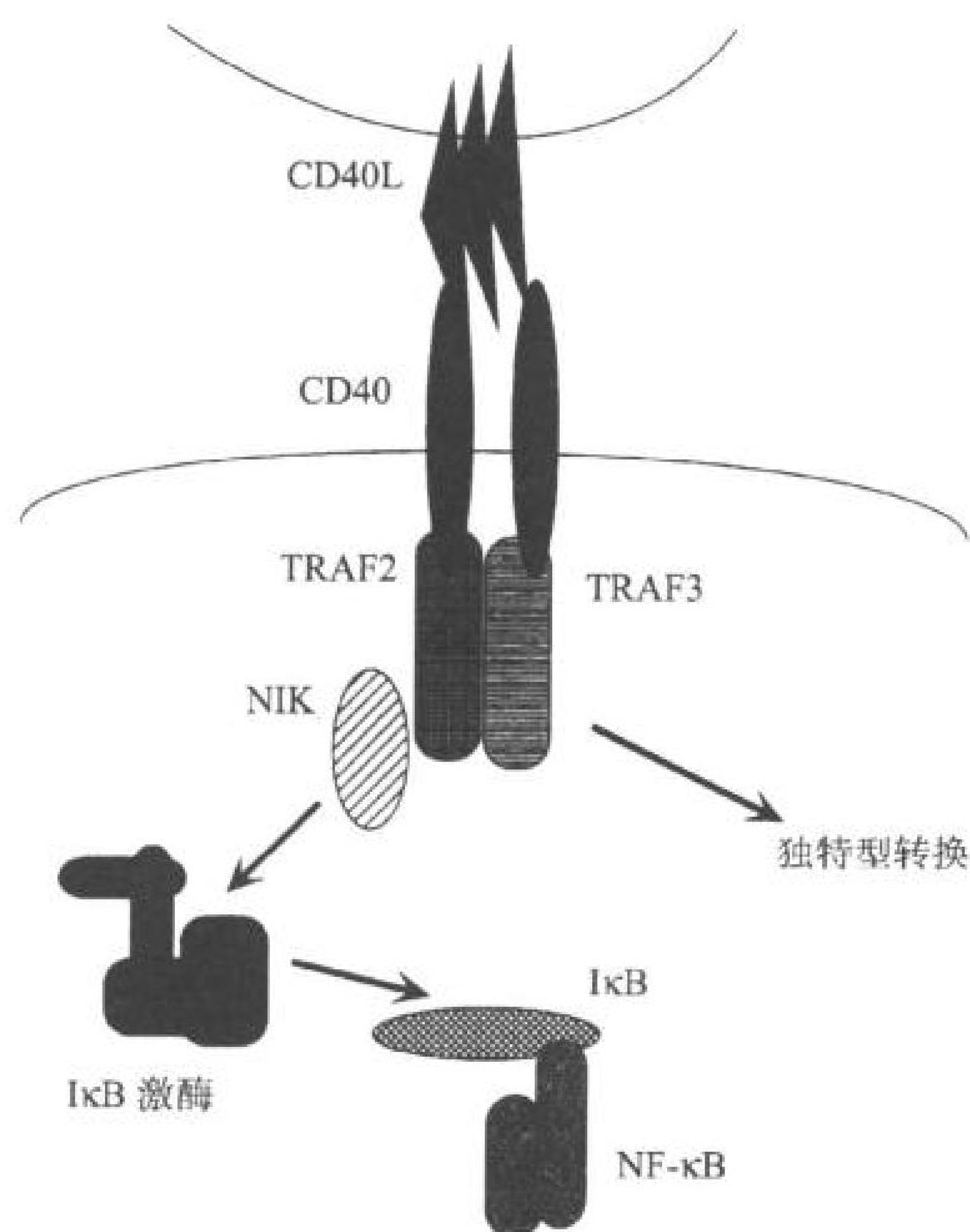


图7.21　CD40信号途径。Th细胞(上面的细胞)上的CD40L介导的CD40寡聚化(下面的细胞)导致TRAF家族成员中一个寡聚复合物的组装,并与簇集CD40分子的胞内区相关。图示为TRAF2和TRAF3的异二聚体。TRAF3通过一种未知机制促进独特型转换重组,而TRAF2(及结合到CD40胞内尾独特位点的TRAF6,未展示)结合到丝/苏蛋白激酶NIK,该激酶磷酸化活化IκB激酶。IκB激酶又磷酸化相邻丝氨酸残基上的IκB,如此为泛素和蛋白酶体介导的IκB降解提供信号。这样释放出异二聚体NF-κB复合物进入细胞核内,其在核内结合到DNA的靶位点并活化转录。

能是间接的,而且*xid*小鼠的TD抗体应答只有部分代偿,肯定比缺乏CD40的B细胞的应答更低,所以关于Btk是否直接参与CD40信号,目前仍不清楚。CD40活化也是两种类型的MAP激酶、c-jun N端激酶JNK-1和JNK-2、p38MAP激酶,甚至还有Erk1/Erk2MAP激酶的强活化物[104,303]。就该方面来说,它是对BCR信号功能的补充,BCR信号活化Erk1/Erk2MAP激酶较强,活化JNK-2和p38MAP激酶能力较弱[105],但CD19的参与能增加后者的应答[304]。

免疫球蛋白独特型表达的调控

Th细胞释放的细胞因子除参与B细胞活化的功能外,也影响B细胞的免疫球蛋白类别转换重组[305]。在小鼠,IL-4促进B细胞转换到IgG1和IgE。体内外阻断IL-4的抗体的效果强烈提示,IL-4是转换至IgE所需的,但转换至IgG1则不需IL-4也能发生。对缺乏IL-4基因的小鼠的研究也达到相同的结论[306]。虽然某些情况下IL-5促进IgA应答,但IL-4似乎主要负责调节Th2细胞表达Ig独特型。IL-5的该效应明显反映了已经转换至IgA类别的B细胞的作用,而TGF-β是促进B细胞类别转换至IgA的主要细胞因子。Th1细胞促进其他Ig独特型的产生。特别是IFN-γ促进类别转换至IgG2a,并干预IL-4类别转换调节的作用。这一点在第24章有详述。

B细胞细胞因子的产生

B细胞的主要效应功能是产生抗体,但B细胞也参与和免疫系统其他成分(如Th细胞、滤泡树突细胞)的细胞-细胞间相互作用。这样就不奇怪B细胞被激活后能产生一些细胞因子。活化的B细胞产生有效数量的IL-1、TNF-α、淋巴毒素-α和GM-CSF,或许还有其他细胞因子[307]。这些物质可以作用于邻近细胞,或以自分泌方式作用于B细胞。实际上,记忆B细胞产生神经生长因子(nerve growth factor,NGF),而且这可以促进该细胞的存活[308]。生发中心B细胞产生G-CSF,该因子可以自分泌方式作用于这些细胞。

252

TD应答的体内要求

最初研究TD抗体应答的努力是基于体外试验,应用克隆的Th细胞系或体外激活的CD4⁺T细胞。正常T细胞用抗原刺激几天后,会获得大量分泌细胞因子的能力。将这些激活的T细胞与不同的细胞因子共孵育,能使其获得一种Th1样、Th2样或Th0样的表型[309,310]。这些效应T细胞能向B细胞提供帮助,就像上述向Th细胞克隆提供帮助那样。抗体产生对细胞因子的需要的研究,是通过应用细胞因子或其受体的阻断抗体进行的[311~313]。对Th0样和Th1样效应T细胞的抗体应答可通过阻断IL-2而受到相当程度的抑制,或通过阻断IL-6而被抑制(程度低些)。Th1细胞不产生任何能够检测到的IL-5,而且对该细胞因子的抗体在此处也无效果,但可以抑制对Th0细胞的应答,抑制程度达50%。Th1样细胞能产生少量IL-4,有趣的是,此处IL-4的抗体能抑制该应答达2/3。令人奇怪的是,在存在Th2样细胞时,抗IL-4不抑制抗体应答,而抗IL-5却有相当强的抑制效果。这些试验加深了这种认识,即参与B细胞活化的细胞因子有重复现象,而且,对细胞

因子的需要是复杂的,是根据情况而变化的。

阻断抗体和最近的基因敲除被用于试图详细研究体内抗体应答的需要。迄今得到的结果虽然在某些程度上与体外应答的需要一致,但仍是令人奇怪的。如上所述,体内 TD 应答几乎都依赖 CD40/CD40L 的相互作用。这反映了 CD40 信号对 B 细胞活化的正性作用,可能也反映了 CD40/CD40L 相互作用对 Th 细胞活化的效果。例如,CD40 信号能诱导 B7-2 分子的表达,后者又能导致 Th 细胞产生更多的细胞因子[284]。而且,CD40L 参与也向 Th 细胞送去了直接活化信号[314]。虽然有证据表明该家族的其他成员,包括 TNF 受体和 CD30,也能参与 B 细胞活化,但 CD40 却明确地向 TD 抗体应答提供了一个独特而重要的元件。

研究细胞因子在体内 B 细胞活化中的作用的努力有点不那么成功。对 IL-4 和 IFN-γ 在调节独特型转换中的作用研究得较清楚,如上所述。虽然 IL-2 和 IL-4 在各种体外抗体应答中的重要作用有些证据,但这些基因的基因删除并没有实质地影响系统性 TD 抗体应答中所产生抗体的数量[315]。在 IL-4 缺陷小鼠,发现其对黏膜免疫的抗体应答存在缺陷[316]。IL-4 基因敲除的研究结果的解释,必须将如果缺乏 IL-4,则 Th 细胞都会以 Th1 型表型结束的事实考虑在内。很明显,Th1 细胞如果不产生高水平的 IFN-γ(能抑制抗体应答),则会是抗体应答的良好细胞。关于哪些细胞因子是 Th1 细胞驱动的抗体应答的关键,目前还不清楚,特别是因为 IL-2 + IFN-γ 对 CD40L 激活的 B 细胞不是一种有效的组合方式[285]。而且,IFN-γ 的抗体,或者 IFN 或 IFN-γ 受体的基因敲除,都对抗体应答的总体水平影响甚小[317]。

如果 Th1、Th2 细胞都有足够的活性和能力成为良好的 Th 细胞,可能创建这两种途径都被破坏以抑制 TD 抗体应答的突变小鼠是非常重要的。目前已经有对此方向的努力:建立了一种 IL-2、IL-4 双敲除的小鼠系,还发现该鼠有这个正常的抗体应答[315]。或许这意味着是 Th1 细胞,而非 IL-2,产生足够的细胞因子与 CD40L 协同驱动体内抗体应答。对这些结果的解释因为与 IL-2 和 IL-4 极相似的两个细胞因子(IL-15 和 IL-13)的存在,而变得非常复杂。这些细胞因子与 IL-2 和 IL-4 共同使用细胞因子受体多肽(分别是 IL-2Rβ 链和 IL-4Rα 链),所以用细胞因子受体基因敲除对此进行试验研究可能有用。

关于细胞因子在抗体应答中的重要性的一些更明确的证据来自 IL-6 或 IL-5 基因敲除的动物。对病毒和蛋白质的 TDIgG 抗体应答在 IL-6 缺陷小鼠中降低 5 ~ 10 倍,提示该因子对 B 细胞体内外的末端分化是非常重要的[316]。有趣的是,在这些小鼠中,对 VSV 感染的 TIIgM 应答是正常的。同样有意思的是 IL-5 基因敲除小鼠的试验结果。这些小鼠中 T 细胞应该非常正常地分化为 Th1 和 Th2 效应细胞,但因为 Th2 效应细胞缺乏 IL-5,因此有人认为某些体内抗体应答受到了影响。在 IL-5Rα 链突变小鼠也有相同情况。对该鼠的最初研究表明,其血清 IgM 和 IgG3 水平降低 2 ~ 3 倍,提示其 TI-2 应答存在部分缺陷[318]。事实上,对 TNP-Ficoll 的体外抗体应答发现:如不加细胞因子应答,会降低约 5 倍,加入 IL-5 后会降低 20 倍。B 细胞对 LPS 或抗 Ig + IL-4 的刺激而发生的体外增殖反应都是正常的。很明显,在这些小鼠中进行的体内抗体应答研究是很有价值的,特别是当抗体应答主要是反映 Th2 应答的 IgG1 和 IgE 独特型时。细胞因子或其受体基因敲除正向人们提供不同细胞因子在 TD 和 TI 应答中所发挥作用的重要信息,但还需要更深入的研究,以期能获得更全面、更广泛的信息。

B 细胞记忆与生发中心反应

当 B 细胞接触相应抗原后,就会结束其在最近的次级淋巴器官的 T 细胞区内的再循环[244,245]。活化的 Th 细胞能识别由抗原呈递 B 细胞所呈递的抗原肽-MHC 复合物,并促进其活化。某些 B 细胞在原位活化、增殖、形成中心,然后分化为抗体分泌细胞状态。其他活化的 B 细胞迁移到邻近的滤泡区,并在此开始形成生发中心(图 7.22)。生发中心是因应 TD 抗原刺激而发生 B 细胞增殖的主要区域,并与亲和力成熟和记忆 B 细胞产生相关联。

253

最近认为,活化的 B 细胞自 T 细胞区迁移到滤泡区,是由结合 7-转膜受体 BLR1 的趋化因子[可能是新发现的趋化因子 B 淋巴细胞化学吸引物(B lymphocyte chemo-attractant, BLC)]所影响的[319,319a],并且也需要激活 B 细胞的 Th 细胞通过其 CD40L 分子接收信号[314]。生发中心可由一个或一些(可能多至 10 个)抗原特异

性B细胞所组成[320]。在这里，活化的B细胞增殖极快，约6～7小时增殖一代，几天内就能扩增到10^4细胞[320,321]。在该期，中心母细胞Ig基因开始体细胞突变，并继续增殖，同时伴随细胞自细胞周期退出和这些细胞（现在叫中心细胞）移动到邻近区域（叫做明区）。中心母细胞增殖的区域叫暗区，在大多数物种（除小鼠）反映了其组织学表现。明区被滤泡树突细胞（follicular dentritic cell，FDC）紧密包裹，中心细胞与其紧密接触。FDC是与T细胞区相互交叉的树突细胞不同的一种特殊细胞类型。其最令人注目的一个特点是其能够将加工后抗原保存在其细胞表面很长时间（可超过一年）的能力。据认为它们是通过FcγR和CR2而完成该功能的。被FDC保存的抗原几乎肯定是发生在生发中心的选择事件的关键，该选择事件发生在生发中心，目的是选择能够产生高亲和力抗体的B细胞。

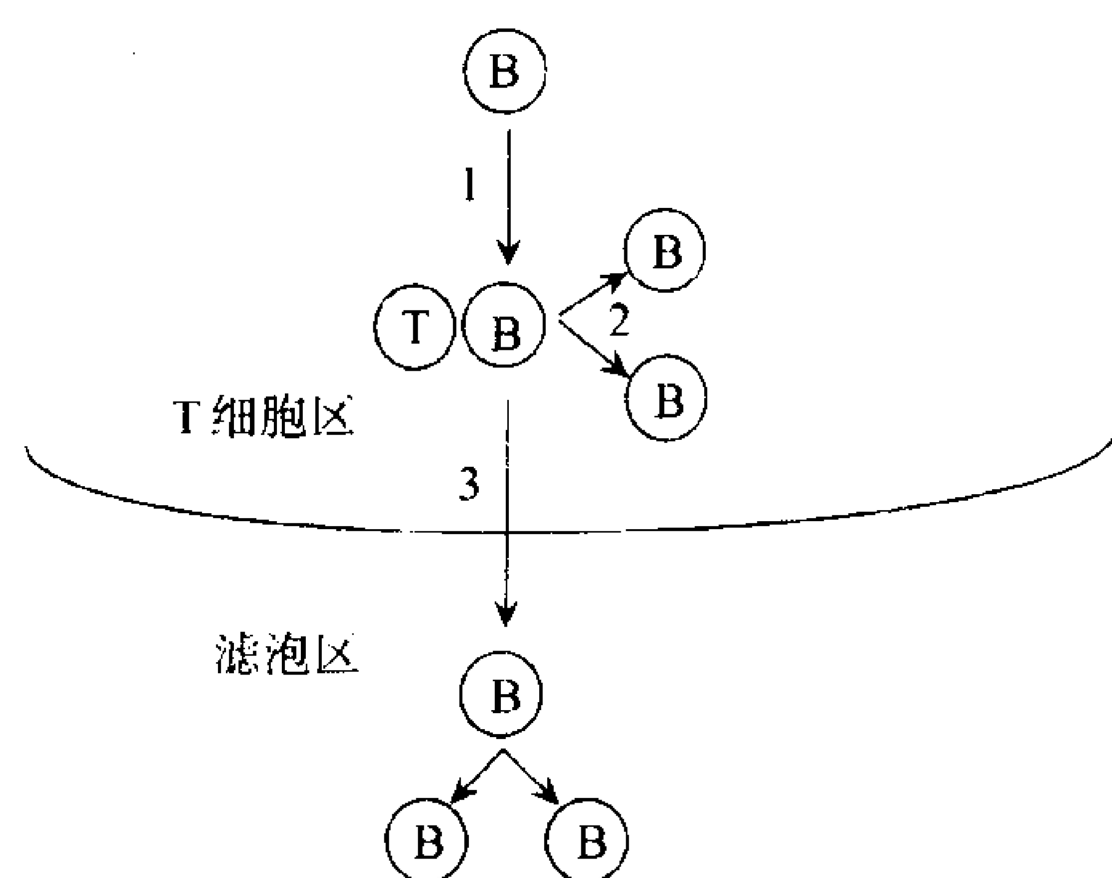


图7.22　B细胞的T细胞依赖活化途径。接触抗原的B细胞进入淋巴器官的T细胞区（1）并停留在那里，其表面的MHCⅡ/肽复合物被Th细胞作为样本。在缺乏与特异性Th细胞的相互作用时，B细胞可能在该位置死亡，但如果与抗原识别Th细胞相互作用，B细胞会被活化，并在原位增殖和分化（2），或者迁移到滤泡区（3）并初始生发中心反应。该种反应需要CD40L/CD40相互作用，部分是因为其对Th细胞的影响结果；而T细胞区内的活化（T细胞依赖原发应答中初始IgM产生原因）据认为需要B细胞上OX40配体与Th细胞上OX40间的相互作用。

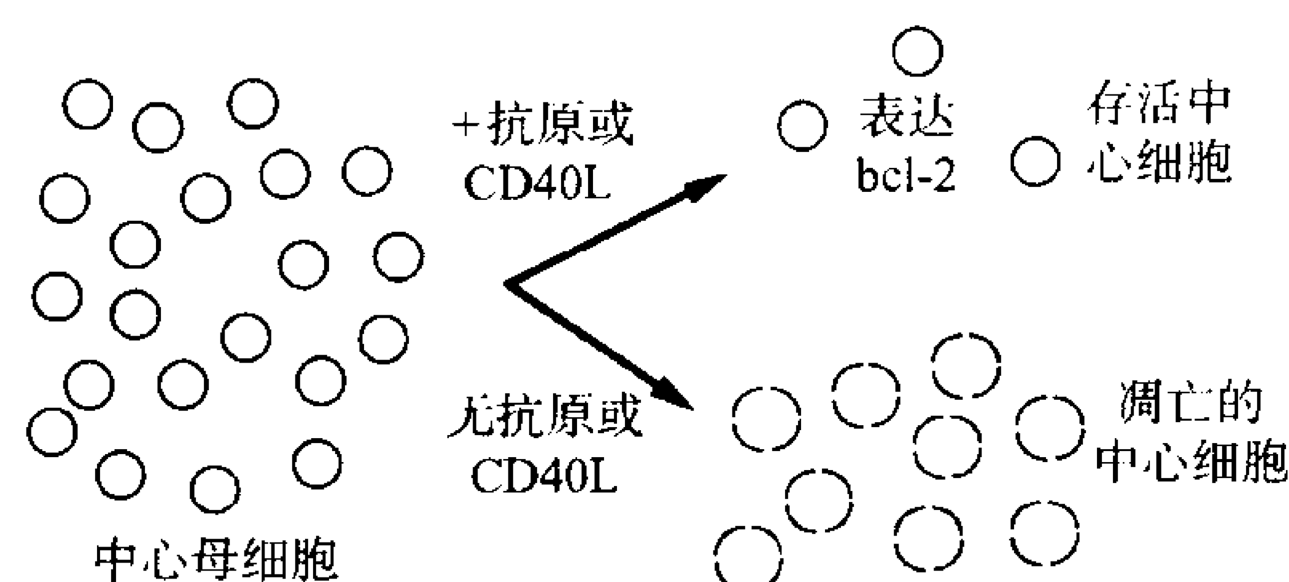


图7.23　生发中心B细胞抗原依赖性存活。在生发中心内，B细胞快速分化（中心母细胞），其Ig基因广泛体细胞突变。含较弱地结合抗原的突变mIg的增殖后中心细胞凋亡，而含较好地结合抗原的突变mIg的细胞能自BCR或CD40接受信号。这些信号诱导bcl-2基因产物的表达，并导致细胞存活。亲和力突变仍能在bcl-2转基因存在时发生，提示存活信号必须以其他方式促进存活。

在亲和力成熟过程中，抗体产生的平均亲和力在免疫应答过程中得以提高，首先涉及免疫球蛋白基因的随机突变，然后是选择突变能提高抗体亲和力的B细胞。体细胞超突变极大地（如果不是完全地）局限于生发中心[322,323]并定向于Ig基因的V区。其在每代细胞中的发生率约为1/1000至1/100[324]。该过程产生原始抗体（一般亲和力较低或适中）的许多变化物。因为高亲和力的抗体产生在抗体应答的晚期，并多是体细胞突变所引起的变化的结果，生发中心反应被认为是在免疫应答过程中提高抗体亲和力的关键。

体细胞突变过程推动在Ig基因的V区发生随机突变簇集[324]。大多数这类突变可能是有害的，只有极少数能提高Ig对抗原的亲和力。但是，在继发免疫应答中，平均抗体亲和力提高了。这样，就可能存在一种强有力的机制，选择那些有益突变的细胞和选掉那些有害突变的细胞。这种选择发生在中心细胞期。中心母细胞表达很少的膜Ig，但中心细胞在其BCR分子中表达已突变的Ig分子。而且，中心细胞对细胞凋亡高度敏感。生发中心的明区内有许多内含颗粒状物的巨噬细胞，它们是这些巨噬细胞内吞的凋亡细胞残存物。分离出的中心细胞体外培养，如果不用抗Ig抗体、或抗CD40或CD40L刺激，将很快死亡。用抗Ig抗体刺激能阻止细胞短期内凋亡，抗CD40或CD40L刺激能向细胞提供更长时间的保护（图7.23）[321,325]。这样看来，如果没有BCR信号和BCR摄取抗原和呈递抗原给Th细胞，中心细胞将注定要死亡。使抗原结合力降低的Ig突变的这些中心细胞，会优先因凋亡而死亡。很明显，必须结合的抗原是被FDC呈递的抗原，因为在生发

中心反应高峰时将可溶性抗原注入，将使许多生发中心 B 细胞快速凋亡[326~328]。如此，FDC 与中心细胞间的接触是中心细胞存活的一个重要元素。B 细胞也必须呈递抗原给生发中心的那些抗原特异性 CD4⁺ T 细胞[321]。该抗原呈递使 Th 细胞表达 CD40L，Th 细胞向 B 细胞提供了重要的存活信号。调节中心细胞存活的分子机制还不清楚。虽然中心细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调，但在有 Ig 重链增强子驱动的持续 Bcl-2 产生和 Fas 存在时，亲和力突变仍能发生[329,330]。 254

过继输入 SCID 小鼠后，能诱导生发中心产生的那些细胞，能表达低水平的热稳定抗原（被单抗 J11D 识别的 HAS 或 CD24），而同样有着高水平该标志蛋白的 B 细胞却主要产生 IgM 型抗体应答，而非生发中心[331]。近来关于这是否反映了存在单独一个亚群的 B 细胞，它们能产生生发中心应答而不产生初始 IgM 应答，还是反映了一个亚群中细胞趋向的分布（即成熟再循环滤泡 B 细胞和它们的未成熟前体），一直存在争议。

中心细胞以其能够以足够亲和力结合抗原的能力而在亮区内存活，这些细胞最终必须或者成为抗体分泌细胞，或者成为记忆 B 细胞。前者迁移到骨髓或肠道，在那里能存活 3～6 周时间，可能使是因为这些环境中促进存活的影响[332]。将中心细胞与分离自生发中心的 Th 细胞体外共培养，导致快速获得记忆 B 细胞表型（$CD44^{+}$ $CD23^{-}$ $CD77^{-}$）[325]。记忆 B 细胞的群聚需要向 B 细胞持续输送 CD40L 信号，而终末分化可能需要该信号在合适的点终止[333]。来自人 T 细胞、得以确定的 B 细胞生长因子——高分子质量 BCGF（IL-14），刺激 B 细胞的增殖并抑制其分化，提示它可能也参与记忆 B 细胞和终末分化细胞之间的选择。

在原发免疫应答过程中，一旦记忆 B 细胞产生，它们就能持续以非增殖状态长期存在[335]。该生存需要抗原持续存在，或者通过微生物持续的低水平复制，或者通过 FDC 细胞表面的抗原储留。例如，将纯化 B 细胞过继输入新宿主，会导致继发抗体应答能力的迅速缺失。对此的解释是：由于在输入过程中脱离了抗原的持续刺激，而使抗原特异性记忆 B 细胞缺失。有意思的是，当该试验是在含转 *bcl-2* 基因的小鼠 B 细胞（*bcl-2* 基因在其中持续表达）中进行时，记忆 B 细胞的存活不需要抗原的持续存在[336]。该发现提示 B 细胞也会进行凋亡，而且 mIg 与抗原之间的接触会诱导 *bcl-2* 基因表达，并促进记忆 B 细胞的存活。IgG^{+} 或 IgA^{+} 记忆 B 细胞产生神经生长因子（NGF），用特异性抗体中和该因子引起记忆 B 细胞的快速凋亡和 Bcl-2 的消失[308]。而相同的抗体对 IgM^{+} IgD^{+} B 细胞无影响，这些 B 细胞主要是处女型 B 细胞，提示 NGF 是 B 细胞（而非处女型 B 细胞）所需的一个自分泌存活因子。一个较有吸引力的假说是：抗原接触致使 NGF 产生，NGF 然后又促进记忆 B 细胞的存活。NGF 的产生或许还以其他方式别调控，例如通过与二级淋巴器官的滤泡中 FDC 细胞接触，该事件可能代表限制体内记忆 B 细胞总量的一种机制。

有趣的是，*bcl-2* 转基因小鼠在免疫之后也表现大为延长的抗体分泌。该发现表明，抗体分泌细胞的正常命运是死亡，而非回到静息 B 细胞池。在 *bcl-2* 转基因小鼠中，转基因的表达可能阻止该细胞死亡。由于表达 *bcl-2* 转基因的抗体分泌细胞不经历凋亡，所以它们继续分泌抗体，最终结果是自身免疫[337]。

B 细胞活化与失活

除了应对异源入侵物而产生抗体应答的需要之外，免疫系统必须防止对自身成分产生抗体应答。有一些完全不同的机制作用到 B 细胞的水平，以限制自身抗体的产生。首先，在骨髓 B 细胞的成熟时有一基本检查点。紧接着在 Ig 轻链基因重排之后，新生的未成熟 B 细胞表达其 BCR，如果该 BCR 接触了抗原，就会使成熟中止、rag-1 和 rag-2 再表达和轻链基因座重排的重获。该过程有可能删除最初已成功重排的轻链基因，并建立一个新的重排轻链基因，这可能有助于产生一个非自反应性的 BCR。正因为此，该调控事件被叫做受体编辑[338]。据推测，已缺失自身反应性的未成熟 B 细胞现在可成熟并离开骨髓。

在骨髓中，一个对自身抗原不发生强烈反应的 B 细胞可进一步成熟并离开骨髓。该未成熟的 B 细胞进入循环，但是一个寿命不长的细胞，对抗原诱导的凋亡非常敏感[339~341]。在发育的此期，可在外周表达的抗原识别 B 细胞中（但不能在骨髓中）诱导耐受。强烈 BCR 刺激导致死亡，也叫克隆缺失，而弱的 BCR 信号导致失控状态，也叫克隆无反应性[342,343]。克隆缺失和克隆无反应性都可在 Ig 转基因小鼠（几乎在所有 B 细胞上

表达一种抗自身 mIg)中发现。目前,在已研究过的、有限的一些事例中,可溶性抗原诱导克隆无反应性,而膜结合蛋白抗原诱导克隆缺失[344]。这种克隆缺失和无反应性也能在无 Th 细胞辅助的情况下,通过抗原与成熟 B 细胞接触而诱导。如上所述,抗原接触引起 B 细胞在二级淋巴器官的 T 细胞区中停止迁移。在没有 T 细胞辅助的前提下,这些停滞的细胞比再循环 B 细胞更快地死亡,可能是由于缺乏滤泡微环境所提供的存活信号[168]。

虽然克隆缺失明显消除了 B 细胞产生抗体的可能性,但如果抗原形式比无反应细胞自身抗原更能诱导更强 BCR 信号,则无反应 B 细胞也能被活化。例如,可溶性鸡蛋溶酶体(henegglysozyme,HEL)在表达高亲和力抗溶酶 BCR 的 B 细胞中诱导无反应性,这些无反应 B 细胞在 HEL 存在时,不能被自反应 Th 细胞(对 B 细胞的 MHC 反应)所活化,而初始抗溶酶体 B 细胞能以此种方式活化[159]。除自反应 Th 细胞外,加入膜结合形式的 HEL 导致无反应 B 细胞活化。这种差别反应可能反映了 BCR 与可溶性抗原的慢性接触能够导致慢性低水平信号功能,及降低 BCR 信号能力的现象[51,159]。这在 B7-2 的诱导中得以证明:将 HEL 加入原始抗原特异性 B 细胞,导致诱导产生足够的 B7 共刺激分子,以支持 Th 细胞的活化,而 HEL 刺激无反应 B 细胞则不能达此效果[345]。BCR 信号功能缺陷在 FasL 诱导的 B 细胞凋亡中也是明确的。CD40L 刺激 B 细胞诱导 Fas 表达,并使 B 细胞对 FasL 诱导的杀伤敏感。BCR 刺激这些 B 细胞使其抵抗 Fas 杀伤[286]。加入可溶性 HEL 也不能使 HEL 特异性无反应 B 细胞获得这种抵抗力。无反应 B 细胞的这种缺陷的生理学重要性,在对 Fas 基因或 CD40L 基因突变的动物的免疫应答研究中得以揭示。在仅缺乏(而非清除)Fas 的小鼠中,无反应 B 细胞被活化并分泌抗体。如果没有 CD40L,无反应 B 细胞不会清除,但活化也不会发生[346,347]。

255

因此,对 T 细胞而言,自身反应 B 细胞的耐受以中心耐受方式(对 B 细胞而言发生在骨髓)和外周耐受方式发生(图 7.24)。B 细胞的外周耐受源自与抗原以不促进完全活化的方式的接触,原因可能是 B 细胞仍未成熟,并因此对 B 细胞活化途径反应低下,或者是因为 B 细胞在缺乏 T 细胞辅助时接触了 TD 抗原。如果抗原接触比较弱,B 细胞就会变为无反应状态,并只能对较强形式的抗原反应。以病毒颗粒或细菌细胞表面结构的一部分存在的交联反应抗原。或许能刺激这些无反应 B 细胞产生抗体。产生的抗体可能对抵抗病原体有效,但也可

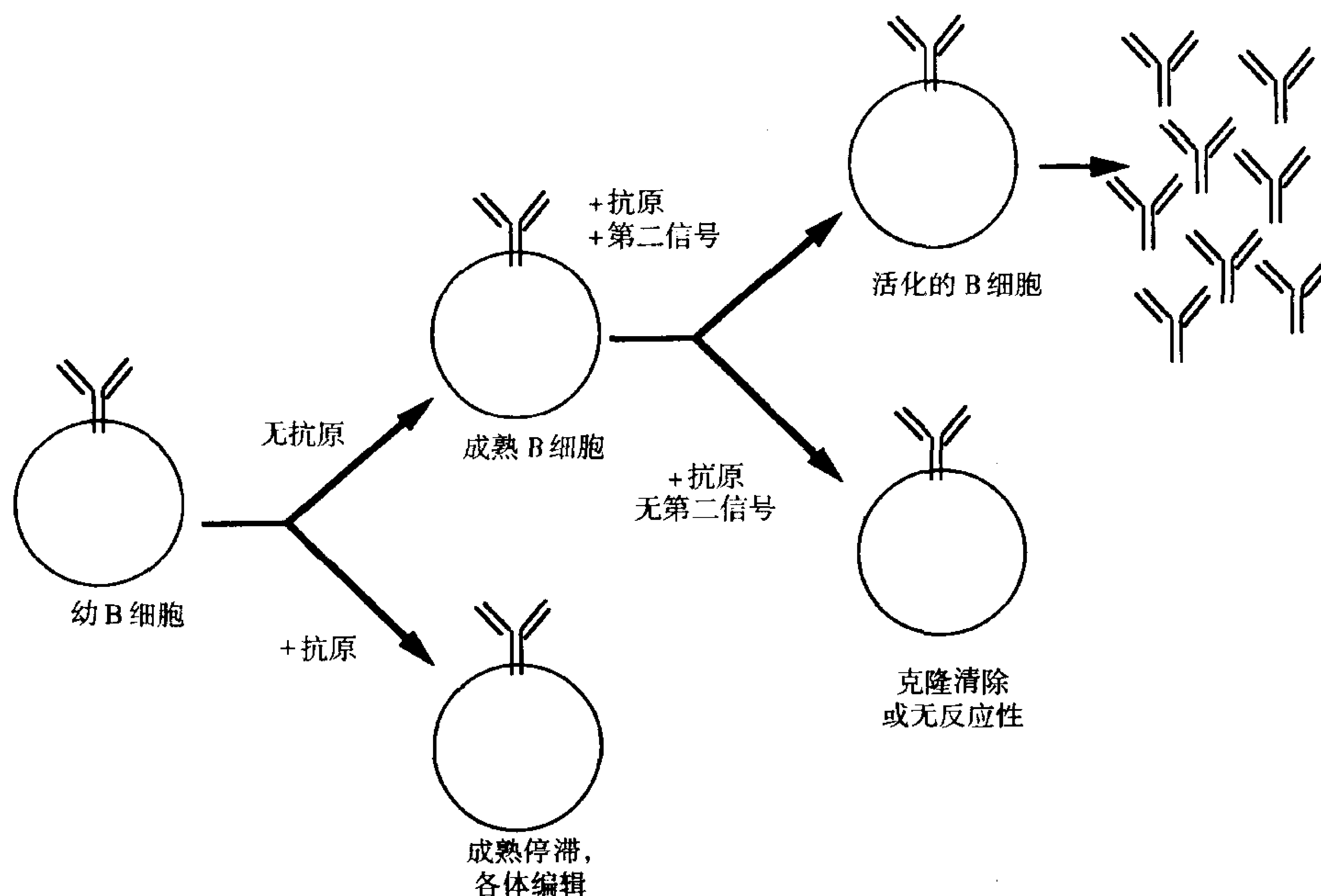


图 7.24 B 细胞活化与失活。B 细胞可在多个阶段因与抗原接触而失活。如果幼 B 细胞在骨髓内接触抗原,会导致成熟停滞和受体编辑,以试图改变 BCR 的特异性。一旦幼 B 细胞存在于骨髓中,就会在一段短时间内保持未成熟,并对耐受诱导高度敏感。成熟的 B 细胞进入长期存活池,或者被活化,或者因接触抗原而失活,取决于第二信号(可因接触不同类型抗原而不同)的可行性。接受合适第二信号的细胞产生抗体应答,而缺乏第二信号时接触抗原的细胞失活(无反应性)或被诱导自杀。

能有自身反应性。人类自身免疫疾病的一个特点是慢性产生自身抗体，所以自身抗体产生的短期激增与免疫应答并不一定造成严重病理损害。自身免疫性疾病可能需要免疫应答更加违反常规以使其得以大大延长。

小结

抗体产生以多种、复杂的方式得以调节。这种复杂性反映出 B 细胞必须能对大量抗原产生抗体应答。这些抗原的物理特性通过其诱导 BCR 信号转导事件的量的能力，以及可能是向 B 细胞提供额外信号（如 T 细胞辅助、结合 C3b 片段、多克隆活化物）的重要决定因素，从而对 B 细胞发生复杂的影响。成功的抗体应答除经 BCR 传递的信号外，还需要第二信号，该需要非常重要，正因为此，B 细胞对异物而非自身成分产生抗体，否则就会产生自身免疫破坏。

（石统东 译）

参考文献

1. Reth M. Antigen receptors on B lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 1992;10: 97–121.
2. Kaisho T, Schwenk F, Rajewsky K. The roles of γ1 heavy chain membrane expression and cytoplasmic tail in IgG1 responses. *Science* 1997;276:412–415.
3. Achatz G, Nitschke L, Lamers MC. Effect of transmembrane and cytoplasmic domains of IgE on the IgE response. *Science* 1997;276:409–411.
4. Venkitaraman AR, Williams GT, Dariavach P, Neuberger MS. The B cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. *Nature* 1991;352:777–781.
5. Williams GT, Venkitaraman AR, Gilmore DJ, Neuberger MS. The sequence of the mu transmembrane segment determines the tissue specificity of the transport of immunoglobulin M to the cell surface. *J Exp Med* 1990;171:947–952.
6. Ravetch JV. Fc receptors: Rubor redux. *Cell* 1994;78:553–560.
7. Roth PE, DeFranco AL. Lymphocyte development: Intrinsic checkpoints for maturation. *Curr Biol* 1995;5:349–352.
8. DeFranco AL. The complexity of signaling pathways activated by the BCR. *Curr Opin Immunol* 1997;9:296–308.
9. DeFranco AL. Transmembrane signaling by antigen receptors of B and T lymphocytes. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:163–175.
10. Chen T, Repetto B, Chizzonite R, et al. Interaction of phosphorylated FcεRIγ immunoglobulin receptor tyrosine activation motif-based peptides with dual and single SH2 domains of $p72^{syk}$. Assessment of binding parameters and real time binding kinetics. *J Biol Chem* 1996;271:25308–25315.
11. Hatada MH, Lu X, Laird ER, et al. Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* 1995;377:32–38.
12. Sefton BM, Taddie JA. Role of tyrosine kinases in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 1994;6:372–379.
13. Law DA, Chan VWF, Datta SK, DeFranco AL. B-cell antigen receptor motifs have redundant signalling capabilities and bind the tyrosine kinases PTK72, Lyn and Fyn. *Curr Biol* 1993;3:645–657.
14. Songyang Z, Cantley L. Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *Trends Biochem Sci* 1995;20:470–475.
15. Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature* 1995;373:573–580.
16. Rowley RB, Burkhardt AL, Chao HG, Matsueda GR, Bolen JB. Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J Biol Chem* 1995;270:11590–11594.
17. Shiue L, Zoller MJ, Brugge JS. Syk is activated by phosphotyrosine-containing peptides representing the tyrosine-based activation motifs of the high affinity receptor for IgE. *J Biol Chem* 1995;270:10498–10502.
18. Kimura T, Sakamoto H, Appella E, Siraganian RP. Conformational changes induced in the protein tyrosine kinase $p72^{syk}$ by tyrosine phosphorylation or by binding of phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif peptides. *Mol Cell Biol* 1996;16:1471–1478.
19. Kurosaki T. Molecular mechanisms in B cell antigen receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 1997;9:309–318.
20. Kolanus W, Romeo C, Seed B. T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* 1993;74:171–183.
21. Chu DH, Spits H, Peyron JF, Rowley RB, Bolen JB, Weiss A. The Syk protein tyrosine kinase can function independently of CD45 or Lck in T cell antigen receptor signaling. *EMBO J* 1996;15:6251–6261.
22. Zoller KE, MacNeil IA, Brugge JS. Protein tyrosine kinases Syk and ZAP-70 display distinct requirements for Src family kinases in immune response receptor signal transduction. *J Immunol* 1997;158:1650–1659.
23. El-Hillal O, Kurosaki T, Yamamura H, Kinet JP, Scharenberg AM. syk kinase activation by a src kinase-initiated activation loop phosphorylation chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1919–1924.
24. Takata M, Sabe H, Hata A, et al. Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca^{2+} mobilization through distinct pathways. *EMBO J* 1994;13:1341–1349.
25. Turner M, Mee PJ, Costello PS, et al. Perinatal lethality and a block in the development of B cells in mice lacking the tyrosine kinase p72syk. *Nature* 1995;378: 298–302.
26. Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 1995;378: 303–306.
27. Bolen JB. Protein tyrosine kinases in the initiation of antigen receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 1995;7:306–311.
28. Sillman AL, Monroe JG. Surface IgM-stimulated proliferation, inositol phospholipid hydrolysis, Ca^{2+} flux, and tyrosine phosphorylation are not altered in B cells from $p59^{fyn-l}$-mice. *J Leukoc Biol* 1994;56:812–816.
29. Lowell CA, Soriano P. Knockouts of Src-family kinases: Stiff bones, wimpy T cells, and bad memories. *Genes Dev* 1996;10:1845–1857.
30. Hibbs ML, Tarlinton DM, Armes J, et al. Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice culminating in autoimmune disease. *Cell* 1995;83: 301–311.
31. Nishizumi H, Taniuchi I, Yamanashi Y, et al. Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in lyn-deficient mice. *Immunity* 1995;3:549–560.
32. Chan VWF, Meng F, Soriano P, DeFranco AL, Lowell CA. Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and downregulation. *Immunity* 1997;7:69–81.
33. Clark MR, Johnson SA, Cambier JC. Analysis of Ig-alpha-tyrosine kinase interaction reveals two levels of binding specificity and tyrosine phosphorylated Ig-alpha stimulation of Fyn activity. *EMBO J* 1994;13:1911–1919.
34. Pleiman CM, Abrams C, Gauen LT, et al. Distinct $p53/56^{lyn}$ and $p59^{fyn}$ domains associate with nonphosphorylated and phosphorylated Ig-alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4268–4272.
35. Johnson SA, Pleiman CM, Pao L, Schneringer J, Hippen K, Cambier JC. Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J Immunol* 1995;155: 4596–4603.
36. Neel BG. Role of phosphatases in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 1997;9:405–420.
37. Rawlings DJ, Witte ON. The Btk subfamily of cytoplasmic tyrosine kinases: Structure, regulation and function. *Semin Immunol* 1995;7:237–246.
38. Tarakhovsky A. Xid and Xid-like immunodeficiencies from a signaling point of view. *Curr Opin Immunol* 1997;9:319–323.
39. Takata M, Kurosaki T. A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2. *J Exp Med* 1996;184: 31–40.
40. Hornbeck P, Nakabayashi H, Fowlkes B, Paul W, Kligman D. A major myristylated substrate of protein kinase C and protein kinase C itself are differentially regulated during murine B- and T-lymphocyte development and activation. *Mol Cell Biol* 1989;9:3727–3735.
41. Aderem A. The MARCKS brothers: A family of protein kinase C substrates. *Cell* 1992;71:713–716.
42. Leitges M, Schmedt C, Guinamard R, et al. Immunodeficiency in protein kinase C beta-deficient mice. *Science* 1996;273:788–791.
43. Yao L, Kawakami Y, Kawakami T. The pleckstrin homology domain of Bruton tyrosine kinase interacts with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9175–9179.
44. Xie H, Rothstein TL. Protein kinase C mediates activation of nuclear cAMP response element-binding protein (CREB) in B lymphocytes stimulated through surface Ig. *J Immunol* 1995;154:1717–1723.
45. Xie H, Wang Z, Rothstein T. Signaling pathways for antigen receptor-mediated induction of transcription factor CREB in B lymphocytes. *Cell Immunol* 1996; 169:264–270.

46. Sidorenko SP, Law C-L, Klaus SJ, et al. Protein kinase C μ (PKCμ) associates with the B cell antigen receptor complex and regulates lymphocyte signaling. *Immunity* 1996;5:353–363.
47. Cambier JC, Ransom JT. Molecular mechanisms of transmembrane signaling in B lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 1987;5:175–199.
48. Gelfand EW, MacDougall SL, Cheung RK, Grinstein S. Independent regulation of Ca^{2+} entry and release from internal stores in activated B cells. *J Exp Med* 1989;170:315–320.
49. Penner R, Fasolato C, Hoth M. Calcium influx and its control by calcium release. *Curr Opin Neurobiol* 1993;3:368–374.
50. Cambier J, Chen Z-Z, Pasternak J, Ransom J, Sandoval V, Pickles H. Ligand-induced desensitization of B-cell membrane immunoglobulin-mediated Ca^{2+} mobilization and protein kinase C translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:6493–6497.
51. Healy JI, Dolmetsch RE, Timmerman LA, et al. Different nuclear signals are activated by the B cell receptor during positive versus negative signaling. *Immunity* 1997;6:419–428.
52. Valentine MA, Czernik AJ, Rachie N, et al. Anti-immunoglobulin M activates nuclear calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in human B lymphocytes. *J Exp Med* 1995;182:1943–1949.
53. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992;13:136–142.
54. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: Regulation and function. *Ann Rev Immunol* 1997;15:707–747.
55. Venkataraman L, Francis DA, Wang Z, Liu J, Rothstein TL, Sen R. Cyclosporin-A sensitive induction of NF-AT in murine B cells. *Immunity* 1994;1:189–196.
56. Fisher CL, Ghysdael J, Cambier JC. Ligation of membrane Ig leads to calcium-mediated phosphorylation of the proto-oncogene product Ets-1. *J Immunol* 1991;146:1743–1749.
57. Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. *Nature* 1997;386:855–858.
58. McCormick F. Activators and effectors of ras p21 proteins. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:71–76.
59. Lazarus AH, Kawauchi K, Rapoport MJ, Delovitch TL. Antigen-induced B lymphocyte activation involves the $p21^{ras}$ and RasGAP signaling pathway. *J Exp Med* 1993;178:1765–1769.
60. Harwood AE, Cambier JC. B cell antigen receptor cross-linking triggers rapid protein kinase C independent activation of $p21^{ras}$. *J Immunol* 1993;151: 4513–4522.
61. Graziadei L, Riabowol K, Bar-Sagi D. Co-capping of ras proteins with surface immunoglobulins in B lymphocytes. *Nature* 1990;347:396–400.
62. Saxton TM, van Oostveen I, Bowtell D, Aebersold R, Gold MR. B cell antigen receptor cross-linking induces phosphorylation of the $p21^{ras}$ oncoprotein activators SHC and mSOS1 as well as assembly of complexes containing SHC, GRB-2, mSOS1 and a 145-kDa tyrosine-phosphorylated protein. *J Immunol* 1994;153: 623–636.
63. Lankester AC, van Schijndel GM, Rood PM, Verhoeven AJ, van Lier RA. B cell antigen receptor cross-linking induces tyrosine phosphorylation and membrane translocation of a multimeric Shc complex that is augmented by CD19 co-ligation. *Eur J Immunol* 1994;24:2818–2825.
64. Smit L, deVries-Smits AMM, Bos JL, Borst J. B cell antigen receptor stimulation induces formation of a Shc-Grb2 complex containing multiple tyrosine-phosphorylated proteins. *J Biol Chem* 1994;269:20209–20212.
65. Harmer SL, DeFranco AL. Shc contains two Grb2 binding sites needed for efficient formation of complexes with SOS in B lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1997; 17:4087–4095.
66. Gold MR, Crowley MT, Martin GA, McCormick F, DeFranco AL. Targets of B lymphocyte antigen receptor signal transduction include the p21ras GTPase-activating protein (GAP) and two GAP-associated proteins. *J Immunol* 1993;150: 377–386.
67. Settleman J, Albright CF, Foster LC, Weinberg RA. Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature* 1992;359:153–154.
68. Yamanashi Y, Baltimore D. Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein Dok. *Cell* 1997;88:205–211.
69. Carpino N, Wisniewski D, Strife A, et al. p62dok: A constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell* 1997;88:197–204.
70. Vuica M, Desiderio S, Schneck JP. Differential effects of B cell receptor and B cell receptor-FcgammaRIIB1 engagement on docking of Csk to GTPase-activating protein (GAP)-associated p62. *J Exp Med* 1997;186:259–267.
71. Marshall CJ. Ras effectors. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:197–204.
72. Morrison DK, Cutler RE. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:174–179.
73. Casillas A, Hanekom C, Williams K, Katz R, Nel AE. Stimulation of B-cells via the membrane immunoglobulin receptor or with phorbol myristate 13-acetate induces tyrosine phosphorylation and activation of a 42-kDa microtubule-associated protein-2 kinase. *J Biol Chem* 1991;266:19088–19094.
74. Gold MR, Sanghera JS, Stewart J, Pelech SL. Selective activation of p42 MAP kinase in murine B lymphoma cell lines by membrane immunoglobulin crosslinking. Evidence for protein kinase C-independent and -dependent mechanisms of activation. *Biochem J* 1992;286:269–276.
75. Tordai A, Franklin RA, Patel H, Gardner AM, Johnson GL, Gelfand EW. Cross-linking of surface IgM stimulates the Ras/Raf-1/MEK/MAPK cascade in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 1994;269:7538–7543.
76. Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:205–215.
77. McMahon SB, Monroe JG. A ternary complex factor-dependent mechanism mediates induction of egr-1 through selective serum response elements following antigen receptor crosslinking in B lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1995;15: 1086–1093.
78. McMahon SB, Monroe JG. Activation of the p21ras pathway couples antigen receptor stimulation to induction of the primary response gene egr-1 in B lymphocytes. *J Exp Med* 1995;181:417–422.
79. Yamanashi Y, Fukui Y, Wongsasant B, et al. Activation of Src-like protein-tyrosine kinase Lyn and its association with phosphatidylinositol 3-kinase upon B-cell antigen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 1118–1122.
80. Gold MR, Chan VWF, Turck CW, DeFranco AL. Membrane Ig cross-linking regulates phosphatidylinositol 3-kinase in B lymphocytes. *J Immunol* 1992;148: 2012–2022.
81. Gold MR, Aebersold R. Both phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 4-kinase products are increased by antigen receptor signaling in B cells. *J Immunol* 1994;152:42–50.
82. Crowley MT, Harmer SL, DeFranco AL. Activation-induced association of a 145-kDa tyrosine-phosphorylated protein with Shc and Syk in B lymphocytes and macrophages. *J Biol Chem* 1996;271:1145–1152.
83. Chacko GW, Tridandapani S, Damen JE, Liu L, Krystal G, Coggeshall KM. Negative signaling in B lymphocytes induces tyrosine phosphorylation of the 145-kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase, SHIP. *J Immunol* 1996;157: 2234–2238.
84. Damen JE, Liu L, Rosten P, Humphries RK, Jefferson AB, Majerus PW, Krystal G. The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetraphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1689–1693.
85. Lioubin MN, Algate PA, Tsai S, Carlberg K, Aebersold A, Rohrschneider LR. $p150^{ship}$, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. *Genes Dev* 1996;10:1084–1095.
86. Kavanaugh WM, Pot DA, Chin SM, et al. Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase form signaling complexes with Shc and Grb2. *Curr Biol* 1996;6:438–445.
87. Salim K, Bottomley MJ, Querfurth E, et al. Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J* 1996;15:6241–6250.
88. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 1997;275: 665–668.
89. Klippel A, Kavanaugh WM, Pot D, Williams LT. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol* 1997;17:338–344.
90. Li T, Tsukada S, Satterthwaite A, et al. Activation of Bruton's tyrosine kinase (BTK) by a point mutation in its pleckstrin homology (PH) domain. *Immunity* 1995;2:451–460.
91. Bustelo XR, Barbacid M. Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product in activated B cells. *Science* 1992;256:1196–1199.
92. Cory GO, Lovering RC, Hinshelwood S, MacCarthy-Morrogh L, Levinsky RJ, Kinnon C. The protein product of the c-cbl protooncogene is phosphorylated after B cell receptor stimulation and binds the SH3 domain of Bruton's tyrosine kinase. *J Exp Med* 1995;182:611–615.
93. Hartley D, Meisner H, Corvera S. Specific association of the beta isoform of the p85 subunit of phosphatidylinositol-3 kinase with the proto-oncogene c-cbl. *J Biol Chem* 1995;270:18260–18263.
94. Kim TJ, Kim YT, Pillai S. Association of activated phosphatidylinositol 3-kinase with p120cbl in antigen receptor-ligated B cells. *J Biol Chem* 1995;270: 27504–27509.
95. Yamanashi Y, Okada M, Semba T, et al. Identification of HS1 protein as a major substate of proetin-tyrosine kinase(s) upon B-cell antigen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3631–3635.
96. Bonnefoy-Berard N, Munshi A, Yron I, et al. Vav: Function and regulation in hematopoietic cell signaling. *Stem Cells* 1996;14:250–268.
97. Olson MF, Pasteris NG, Gorski JL, Hall A. Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases. *Curr Biol* 1996;6:1628–1633.
98. Crespo P, Schuebel KE, Ostrom AA, Gutkind JS, Bustelo XR. Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* 1997;385:169–172.
99. Wu J, Motto DG, Koretzky GA, Weiss A. Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* 1996;4:593–602.
100. Wu J, Zhao Q, Kurosaki T, Weiss A. The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J Exp Med* 1997;185: 1877–1882.
101. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: Conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991;349:117–127.

102. Tapon N, Hall A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:86–92.
103. Kyriakis JM, Avruch J. Sounding the alarm: Protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* 1996;271:24313–24316.
104. Berberich I, Shu G. Siebelt F, Woodgett JR, Kyriakis JM, Clark EA. Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases. *EMBO J* 1996;15:92–101.
105. Sutherland CL, Heath AW, Pelech SL, Young PR, Gold MR. Differential activation of the ERK, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor. *J Immunol* 1996;157:3381–3390.
106. Yoon CH, Lee J, Jongeward GD, Sternberg PW. Similarity of sli-1, a regulator of vulval development in *C. elegans*, to the mammalian proto-oncogene c-cbl. *Science* 1995;269:1102–1105.
107. Smit L, van der Horst G, Borst J. Sos, Vav, and C3G participate in B cell receptor-induced signaling pathways and differentially associate with Shc-Grb2, Crk, and Crk-L adaptors. *J Biol Chem* 1996;271:8564–8569.
108. Ingham RJ, Krebs DL, Barbazuk SM, et al. B cell antigen receptor signaling induces the formation of complexes containing the Crk adapter proteins. *J Biol Chem* 1996;271:32306–32214.
109. McCormick F, Wittinghofer A. Interactions between Ras proteins and their effectors. *Curr Opin Biotechnol* 1996;7:449–456.
110. Yamanashi Y, Fukuda T, Nishizumi H, et al. Role of tyrosine phosphorylation of HS1 in B cell antigen receptor-mediated apoptosis. *J Exp Med* 1997;185: 1387–1392.
111. Suzuki Y, Demoliere C, Kitamura D, Takeshita H, Deuschle U, Watanabe T. HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HS1, a substrate of Src family tyrosine kinases. *J Immunol* 1997;158: 2736–2744.
112. Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Ann Rev Biochem* 1993;62:453–481.
113. Richards JD, Gold MR, Hourihane SL, DeFranco AL, Matsuuchi L. Reconstitution of B cell antigen receptor-induced signaling events in a nonlymphoid cell line by expressing the Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1996;271:6458–6466.
114. Tuveson DA, Carter RH, Soltoff SP, Fearon DT. CD19 of B cells as a surrogate kinase insert region to bind phosphatidylinositol 3-kinase. *Science* 1993;260: 986–989.
115. Weng W-K, Jarvis L, LeBien TW. Signaling through CD19 activates Vav/mitogen-activated protein kinase pathway and induces formation of a CD19/Vav/ phosphatidylinositol 3-kinase complex in human B cell precursors. *J Biol Chem* 1994;269:32514–32521.
116. Law CL, Sidorenko SP, Chandran KA, et al. CD22 associates with protein tyrosine phosphatase 1C, Syk, and phospholipase C-gamma(1) upon B cell activation. *J Exp Med* 1996;183:547–560.
117. Sillman AL, Monroe JG. Association of p72syk with the src-homology-2 (SH2) domains of PLC-γ1 in B lymphocytes. *J Biol Chem* 1995;270:11806–11811.
118. Law CL, Chandran KA, Sidorenko SP, Clark EA. Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol Cell Biol* 1996;16:1305–1315.
119. Weiss A, Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 1994;76:263–274.
120. Chen X, Kearney JF. Generation and function of natural self-reactive B lymphocytes. *Semin Immunol* 1996;8:19–27.
121. Dempsey PW, Allison MED, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: Bridging innate and acquired immunity. *Science* 1996;271:348–350.
122. Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch JV. Augmented humoral and anaphylactic responses in FcγRII-deficient mice. *Nature* 1996;379:346–349.
123. Matsumoto AK, Kopicky-Burd J, Carter RH, Tuveson DA, Tedder TF, Fearon DT. Intersection of the complement and immune systems: A signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19. *J Exp Med* 1991;173:55–64.
124. Carter RH, Spycher MO, Ng YC, Hoffman H, Fearon DT. Synergistic interaction between complement receptor type 2 and membrane IgM on B lymphocytes. *J Immunol* 1988;141:457–463.
125. Carter RH, Fearon DT. CD19: Lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 1992;256:105–107.
126. Ahearn JM, Fischer MB, Croix D, et al. Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity* 1996;4:251–262.
127. Molina H, Holers VM, Li B, et al. Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3357–3361.
128. Croix D, Ahearn JM, Rosengard AM, et al. Antibody response to a T-dependent antigen requires B cell expression of complement receptors. *J Exp Med* 1996; 183:1857–1864.
129. Engel P, Zhou LJ, Ord DC, Sato S, Koller B, Tedder TF. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity* 1995;3:39–50.
130. Rickert RC, Rajewsky K, Roes J. Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature* 1995;376: 352–355.
131. Kozono Y, Duke RC, Schleicher MS, Holers VM. Co-ligation of mouse complement receptors 1 and 2 with surface IgM rescues splenic B cells and WEHI-231 cells from anti-surface IgM-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 1995;25: 1013–1017.
132. van Noesel CJM, Lankester AC, van Schijndel GMW, van Lier RAW. The CR2/CD19 complex on human B cells contains the src-family kinase Lyn. *Int Immunol* 1993;5:699–705.
133. Uckun FM, Burkhardt AL, Jarvis L, et al. Signal transduction through the CD19 receptor during discrete developmental stages of human B-cell ontogeny. *J Biol Chem* 1993;268:21172–21184.
134. Erdei A, Melchers F, Schulz T, Dierich M. The action of human C3 in soluble and cross-linked form with resting and activated murine B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1985;15:184–188.
135. Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT. Epstein-Barr virus receptor of human B-lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:4510–4514.
136. Nemerow GR, Wolfert R, McNaughton ME, Cooper NR. Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *J Virol* 1985;55:347–351.
137. Phillips NE, Parker DC. Fc-dependent inhibition of mouse B cell activation by whole anti-μ antibodies. *J Immunol* 1983;130:602–606.
138. Ashman RF, Peckham D, Stunz LL. Fc receptor off-signal in the B cell involves apoptosis. *J Immunol* 1996;157:5–11.
139. Bijsterbosch MK, Klaus GGB. Crosslinking of surface immunoglobulin and Fc receptors on B lymphocytes inhibits stimulation of inositol phospholipid breakdown via the antigen receptor. *J Exp Med* 1985;162:1825–1836.
140. Choquet D, Partiseti M, Amigorena S, Bonnerot C, Fridman WH, Korn H. Crosslinking of IgG receptors inhibits membrane immunoglobulin-stimulated calcium influx in B lymphocytes. *J Cell Biol* 1993;121:355–363.
141. Muta T, Kurosaki T, Misulovin Z, Sanchez M, Nussenzweig MC, Ravetch JV. A 13-amino acid motif in the cytoplasmic domain of FcγRIIB modulates B-cell receptor signaling. *Nature* 1994;368:70–73.
142. D'Ambrosio D, Hippen KH, Minskoff SA, et al. Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by FcγRIIB1. *Science* 1995;268:293–297.
143. Ono M, Bolland S, Tempst P, Ravetch JV. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature* 1996;383:263–266.
144. Ono M, Okada H, Bolland S, Yanagi S, Kurosaki T, Ravetch JV. Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell* 1997;90: 293–301.
145. Scharenberg AM, Kinet JP. The emerging field of receptor-mediated inhibitory signaling: SHP or SHIP? *Cell* 1996;87:961–964.
146. Nadler MJS, Chen B, Anderson JS, Wortis HH, Neel BG. Protein-tyrosine phosphatase SHP-1 is dispensable for FcgammaRIIB-mediated inhibition of B cell antigen receptor activation. *J Biol Chem* 1997;272:20038–20043.
147. Sarkar S, Schlottmann K, Cooney D, Coggeshall KM. Negative signaling via FcgammaRIIB1 in B cells blocks phospholipase Cgamma2 tyrosine phosphorylation but not Syk or Lyn activation. *J Biol Chem* 1996;271:20182–20186.
148. Hippen KL, Buhl AM, D'Ambrosio D, Nakamura K, Persin C, Cambier JC. FcγRIIB1 inhibition of BCR-mediated phosphoinositide hydrolysis and Ca^{2+} mobilization is integrated by CD19 dephosphorylation. *J Immunol* 1997;130: 602–606.
149. Tridandapani S, Chacko GW, Van Brocklyn JR, Coggeshall KM. Negative signaling in B cells causes reduced Ras activity by reducing Shc-Grb2 interactions. *J Immunol* 1997;158:1125–1132.
150. Ravanel K, Castelle C, Defrance T, et al. Measles virus nucleocapsid protein binds to FcγRII and inhibits human B cell antibody production. *J Exp Med* 1997; 186:269–278.
151. Tedder TF, Tuscano J, Sato S, Kehrl JH. CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Ann Rev Immunol* 1997; 15:481–504.
152. O'Rourke L, Tooze R, Fearon DT. Co-receptors of B lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1997;9:324–329.
153. Kharitonenkov A, Chen Z, Sures I, Wang H, Schilling J, Ullrich A. A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. *Nature* 1997; 386:181–186.
154. Tuscano JM, Engel P, Tedder TF, Agarwal A, Kehrl JH. Involvement of p72syk kinase, p53/56lyn kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in signal transduction via human B lymphocyte antigen CD22. *Eur J Immunol* 1996;26: 1246–1252.
155. O'Keefe TL, Williams GT, Davies SL, Neuberger MS. Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. *Science* 1996;274:798–801.
156. Otipoby KL, Andersson KB, Draves KE, et al. CD22 regulates thymus-independent responses and the lifespan of B cells. *Nature* 1996;384:634–637.
157. Sato S, Miller AS, Inaoki M, et al. CD22 is both a positive and negative regulator of B lymphocyte antigen receptor signal transduction: Altered signaling in CD22-deficient mice. *Immunity* 1996;5:551–562.
158. Nitschke L, Carsetti R, Ocker B, Kohler G, Lamers MC. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* 1997;7:133–143.
159. Cooke MP, Heath AW, Shokat KM, et al. *Immunoglobulin signal transduction*

guides the specificity of B cell-T cell interactions and is blocked in tolerant self-reactive B cells. *J Exp Med* 1994;179:425–438.
160. Justement LB, Campbell KS, Chien NC, Cambier JC. Regulation of B cell antigen receptor signal transduction and phosphorylation by CD45. *Science* 1991; 252:1839–1842.
161. Kishihara K, Penninger J, Wallace VA, et al. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* 1993;74:143–156.
162. Benatar T, Carsetti R, Furlonger C, Kamalia N, Mak T, Paige CJ. Immunoglobulin-mediated signal transduction in B cells from CD45-deficient mice. *J Exp Med* 1996;183:329–334.
163. Byth KF, Conroy LA, Howlett S, et al. CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of $CD4^+CD8^+$ thymocytes, and in B cell maturation. *J Exp Med* 1996;183: 1707–1718.
164. Kantor AB, Herzenberg LA. Origins of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol* 1993;11:501–538.
165. Tarakhovsky A, Kanner SB, Hombach J, et al. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* 1995;269:535–537.
166. Bikah G, Carey J, Ciallella JR, Tarakhovsky A, Bondada S. CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science* 1996:274:1906–1909.
167. Allman DM, Ferguson SE, Lentz VM, Cancro MP. Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immune developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J Immunol* 1993;151:4431–4444.
168. Cyster JG, Goodnow CC. Antigen-induced exclusion from follicles and anergy are separate and complementary processes that influence peripheral B cell fate. *Immunity* 1995;3:691–701.
169. Cyster JG, Healy JI, Goodnow CC. Regulation of B lymphocyte negative and positive selection by tyrosine phosphatase CD45. *Nature* 1996;381:325–328.
170. Lam K-P, Kuhn R, Rajewsky K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 1997;90:1073–1083.
171. Cory S. Regulation of lymphocyte survival by the Bcl-2 gene family. *Ann Rev Immunol* 1995;13:513–543.
172. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993;75:229 240.
173. Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, et al. Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science* 1993;261:1584–1588.
174. Boise LH, Thompson CB. Hierarchical control of lymphocyte survival. *Science* 1996;274:67–68.
175. Goroff DK, Stall A, Mond JJ, Finkelman FD. In vitro and in vivo B lymphocyte-activating properties of monoclonal anti-delta antibodies. I. Determinants of B lymphocyte-activating properties. *J Immunol* 1986;136:2382–2392.
176. Mongini PKA, Blessinger CA, Dalton JP. Affinity requirements for induction of sequential phases of human B cell activation by membrane IgM-cross-linking ligands. *J Immunol* 1991;146:1791–1800.
177. Anderson JS, Teutsch M, Dong Z, Wortis HH. An essential role for Bruton's tyrosine kinase in the regulation of B-cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:10966–10971.
178. Callard RE. Cytokine regulation of B-cell growth and differentiation. *Br Med Bull* 1989;45:371–388.
179. Rabin EM, Ohara J, Paul WE. B-cell stimulatory factor 1 activates resting B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:2935–2939.
180. Oliver K, Noelle RJ, Uhr JW, Krammer PH, Vitetta ES. B-cell growth factor (B-cell growth factor I or B-cell stimulating factor, provisional 1) is a differentiation factor for resting B cells and may not induce cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:2465–2467.
181. Solvason N, Wu W, Kabra N, Wu X, Lees E, Howard M. Induction of cell cycle regulatory proteins in anti-immunoglobulin-stimulated mature B lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184:407.
182. Tanguay D, Chiles T. Regulation of the catalytic subunit (p34PKS-J3/cdk4) for the major D-type cyclin in mature B lymphocytes. *J Immunol* 1996;156:539.
183. Reid S, Snow EC. The regulated expression of cell cycle-regulated proteins as B lymphocytes enter and progress through the G1 cell cycle stage following delivery of complete versus partial activation stimuli. *Mol Immunol* 1996;33: 1139–1151.
184. Fero ML, Rivkin M, Tasch M, et al. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 1996;85:733–744.
185. Nakayama K, Ishida N, Shirane M, et al. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 1996;85:707–720.
186. Padeh S, Levitzki A, Gazit A, Mills GB, Roifman CM. Activation of phospholipase C in human B cells is dependent on tyrosine phosphorylation. *J Clin Invest* 1991;87:1114–1118.
187. Monroe JG, Kass MJ. Molecular events in B cell activation. I. Signals required to stimulate Go to G1 transition of resting B lymphocytes. *J Immunol* 1985;135: 1674–1682.
188. Paul WE, Mizuguchi J, Brown M, et al. Regulation of B-lymphocyte activation, proliferation, and immunoglobulin secretion. *Cell Immunol* 1986;99:7–13.
189. Rothstein TL, Baeker TR, Miller RA, Kolber DL. Stimulation of murine B cells by the combination of calcium ionophore plus phorbol ester. *Cell Immunol* 1986; 102:364–373.
190. Sigal NH, Dumont FJ. Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Ann Rev Immunol* 1992;10:519–560.
191. Tarakhovsky A, Turner M, Schaal S, et al. Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. *Nature* 1995;374:467–470.
192. Zhang R, Alt FW, Davidson L, Orkin SH, Swat W. Defective signalling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the vav proto-oncogene. *Nature* 1995;374:470–473.
193. Taniuchi I, Kitamura D, Maekawa Y, Fukuda T, Kishi H, Watanabe T. Antigen-receptor induced clonal expansion and deletion of lymphocytes are impaired in mice lacking HS1 protein, a substrate of the antigen-receptor-coupled tyrosine kinases. *EMBO J* 1995;14:3664–3678.
194. White MW, McConnell F, Shu GL, Morris DR, Clark EA. Activation of dense human tonsilar B cells. Induction of c-myc gene expression via two distinct signal transduction pathways. *J Immunol* 1991;146:846–853.
195. Rooney JW, Dubois PM, Sibley CH. Cross-linking of surface IgM activates NF-κB in B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1991;21:2993–3008.
196. Liu J, Chiles TC, Sen R, Rothstein TL. Inducible nuclear expression of NF-κB in primary B cells stimulated through the surface Ig receptor. *J Immunol* 1991; 146:1685–1691.
197. Lenardo M, Baltimore D. NF-κB: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 1989;58:227–229.
198. Stancovski I, Baltimore D. NF-κB activation: The IκB kinase revealed? *Cell* 1997;91:299–302.
199. Kontgen F, Grumont RJ, Strasser A, et al. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev* 1995;15:1965–1977.
200. Doi TS, Takahashi T, Taguchi O, Azuma T, Obata Y. NF-kappa B RelA-deficient lymphocytes: normal development of T cells and B cells, impaired production of IgA and IgG1 and reduced proliferative responses. *J Exp Med* 1997;185: 953–961.
201. Montminy, M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Ann Rev Biochem* 1997;66:807–822.
202. Amato SF, Nakajima K, Hirano T, Chiles TC. Transcriptional regulation of the junB promoter in mature B lymphocytes. Activation through a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-like binding site. *J Immunol* 1996;157:146–155.
203. Maltzman J, Monroe JG. Transcriptional regulation of the Icam-1 gene in antigen receptor and phorbol ester stimulated B lymphocytes: Role for transcription factor EGR1. *J Exp Med* 1996;183:1747–1759.
204. Maltzman J, Monroe JG. A role for EGR1 in regulation of stimulus-dependent CD44 transcription in B lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1996;16:2283–2294.
205. Chiles TC, Liu J, Rothstein TL. Crosslinking of surface Ig receptors on murine B lymphocytes stimulates the expression of nuclear tetradecanol phorbol acetate-response element-binding proteins. *J Immunol* 1991;146:1730–1735.
206. Karin M, Liu ZG, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:240–246.
207. Grandori C, Eisenman RN. Myc target genes. *Trends Biochem Sci* 1997;22: 177–181.
208. Davidson HW, Reid PA, Lanzavecchia A, Watts C. Processed antigen binds to newly synthesized MHC class II molecules in antigen-specific B lymphocytes. *Cell* 1991;67:105–116.
209. Dennis GJ, Mizuguchi J, McMillan V, Finkelman FD, Ohara J, Mond JJ. Comparison of the calcium requirement for the induction and maintenance of B cell class II molecule expression and for B cell proliferation stimulated by mitogens and purified growth factors. *J Immunol* 1987;138:4307–4312.
210. Ohara J, Paul W. Receptors for B-cell stimulatory factor-1 expressed on cells of haematopoietic lineage. *Nature* 1987;325:537–540.
211. Suzuki T, Cooper M. Comparison of the expression of IL-2 receptors by human T and B cells: Induction by the polyclonal mitogens, phorbol myristate acetate, and anti-μ antibody. *J Immunol* 1985;134:3111–3119.
212. Liu Y, Linsley PS. Costimulation of T-cell growth. *Curr Opin Immunol* 1992;4: 265–270.
213. Bachmann M, Hengartner H, Zinkernagel R. T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: Role of antigen patterns in B cell induction? *Eur J Immunol* 1995;25:3445–3451.
214. Milich D, McLachlan A. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-independent antigen. *Science* 1986;234:1398–1401.
215. Szomolanyi-Tsuda E, Welsh RM. T cell-independent antibody-mediated clearance of polyoma virus in T cell-deficient mice. *J Exp Med* 1996;183:403–411.
216. Jelinek DF, Lipsky PE. Regulation of human B lymphocyte activation, proliferation, and differentiation. *Adv Immunol* 1987;40:1–59.
217. Mond JJ, Lees A, Snapper C. T cell-independent antigens type 2. *Ann Rev Immunol* 1995;13:655–692.
218. Ahonkhai VI, Lukacs LJ, Jonas LC, Calandra GB. Clinical experience with PedvaxHIB, a conjugate vaccine of Haemophilus influenzae type b polysaccharide–Neisseria meningitidis outer membrane protein. *Vaccine* 1991;9(suppl):38–41.
219. Snapper CM, Mond JJ. A model for induction of T cell-independent humoral im-

munity in response to polysaccharide antigen. *J Immunol* 1996; 157:2229–2233.
220. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997;91:295–298.
221. Ip YT, Levine M. Molecular genetics of Drosophila immunity. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:672–677.
222. Muta T, Iwanaga S. Clotting and immune defense in Limulidae. *Prog Mol Subcell Biol* 1996;15:154–189.
223. Morrison DC, Ryan JL. Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv Immunol* 1979;28:293–450.
224. Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Ann Rev Med* 1987;38:417–432.
225. Corbel C, Melchers F. Requirement for macrophages or for macrophage- or T-cell-derived factors in the mitogenic stimulation of murine B lymphocytes by lipopolysaccharides. *Eur J Immunol* 1983;13:528–533.
226. Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Ann Rev Immunol* 1995;13:437–457.
227. Bachmann MF, Zinkernagel RM. Neutralizing antiviral B cell responses. *Ann Rev Immunol* 1997;15:235–270.
228. Dintzis HM, Dintzis RZ, Vogelstein B. Molecular determinants of immunogenicity: The immunon model of immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:3671–3675.
229. Symer DE, Reim J, Dintzis RZ, Voss EW Jr, Dintzis HM. Durable elimination of high affinity, T cell-dependent antibodies by low molecular weight antigen arrays in vivo. *J Immunol* 1995;155:5608–5616.
230. Brunswick M, June CH, Finkelman FD, Dintzis HM, Inman JK, Mond JJ. Dextran conjugated anti-Ig antibody stimulates B cells by repetitive signal transduction: A model for T cell independent B cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6724–6728.
231. Sato S, Steeber DA, Tedder TF. The CD19 signal transduction molecule is a response regulator of B-lymphocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11558–11562.
232. Allison KC, Strober W, Harriman GR. Induction of IL-5 receptors on normal B cells by cross-linking surface Ig with anti-Ig-dextran. *J Immunol* 1991;146: 4197–4203.
233. Pisetsky DS. Immune activation by bacterial DNA: A new genetic code. *Immunity* 1996;5:303–310.
234. MacLennan I, Gray D. Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. *Immunol Rev* 1986;91:61–85.
235. MacLennan I, Gray D, Kumararatne D, Bazin H. The lymphocytes of splenic marginal zones: A distinct B-cell lineage. *Immunol Today* 1982;3:305–307.
236. Snapper CM, Yamaguchi H, Moorman MA, Mond JJ. An in vitro model for T cell-independent induction of humoral immunity. A requirement for NK cells. *J Immunol* 1994;152:2884–4892.
237. Kantor AB. The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells). *Immunol Today* 1991;12:389–391.
238. Kantor AB. V-gene usage and N-region insertions in B-1a, B-1b and conventional B cells. *Semin Immunol* 1996;8:29–35.
239. Stall AM, Wells SM, Lam K-P. B-1 cells: Unique origins and functions. *Semin Immunol* 1996;8:45–59.
240. Krose FGM, de Waard R, Bos NA. B-1 cells and their reactivity with the murine intestinal flora. *Semin Immunol* 1996;8:11–18.
241. Yin XM, Vitetta ES. The lineage relationship between virgin and memory B cells. *Int Immunol* 1992;4:691–698.
242. Cong YZ, Rabin E, Wortis HH. Treatment of murine CD5⁻ B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5: Two B-cell activation pathways. *Int Immunol* 1991;3:467–476.
243. Cyster JG, Goodnow CC. Protein tyrosine phosphatase 1C negatively regulates antigen receptor signaling in B lymphocytes and determines thresholds for negative selection. *Immunity* 1995;2:13–24.
244. Kelsoe G, Zheng B. Sites of B-cell activation in vivo. *Curr Opin Immunol* 1993; 5:418–422.
245. Liu Y-J. Sites of B lymphocyte selection, activation, and tolerance in spleen. *J Exp Med* 1997;186:625–629.
246. Stuber E, Strober W. The T cell-B cell interaction via OX40-OX40L is necessary for the T cell-dependent humoral immune response. *J Exp Med* 1996;183: 979–989.
247. Lanzavecchia A. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II restricted T lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 1990;8:773–793.
248. Davidson HW, West MA, Watts C. Endocytosis, intracellular trafficking, and processing of membrane IgG and monovalent antigen/membrane IgG complexes in B lymphocytes. *J Immunol* 1990;144:4101–4109.
249. Tony H-P, Phillips NE, Parker DC. Role of membrane immunoglobulin (Ig) crosslinking in membrane Ig-mediated, major histocompatability-restricted T cell-B cell cooperation. *J Exp Med* 1985;162:1695–1708.
250. Shaw AC, Mitchell RN, Weaver YK, Campos-Torres J, Abbas AK, Leder P. Mutations of immunoglobulin transmembrane and cytoplasmic domains: Effects on intracellular signaling and antigen presentation. *Cell* 1990;63:381–392.
251. Mitchell RN, Barnes KA, Grupp SA, et al. Intracellular targeting of antigens internalized by membrane immunoglobulin in B lymphocytes. *J Exp Med* 1995; 181:1705–1714.
252. Patel KJ, Neuberger MS. Antigen presentation by the B cell antigen receptor is driven by the α/β sheath and occurs independently of its cytoplasmic tyrosines. *Cell* 1993;74:939–946.
253. Bonnerot C, Lankar D, Hanau D, et al. Role of B cell receptor Ig alpha and Ig beta subunits in MHC class II-restricted antigen presentation. *Immunity* 1995;3: 335–347.
254. Knight AM, Lucocq JM, Prescott AR, Ponnambalam S, Watts C. Antigen endocytosis and presentation mediated by human membrane IgG1 in the absence of the Ig(alpha)/Ig(beta) dimer. *EMBO J* 1997;16:3842–3850.
255. Casten LA, Lakey EK, Jelachich ML, Margoliash E, Pierce SK. Anti-immunoglobulin augments the B-cell antigen-presentation function independently of receptor-antigen complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:5890–5894.
256. Lenschow DJ, Sperling AI, Cooke MP, et al. Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. *J Immunol* 1994;153:1990–1997.
257. Kearse KP, Cassatt DR, Kaplan AM, Cohen DA. The requirement for surface Ig signaling as a prerequisite for T cell:B cell interactions. *J Immunol* 1988;140: 1770–1778.
258. Dang LH, Rock KL. Stimulation of B lymphocytes through surface Ig receptors induces LFA-1 and ICAM-1-dependent adhesion. *J Immunol* 1991;146: 3273–3279.
259. Kishimoto T, Ishizaka K. Regulation of antibody response in vitro. IX. Induction of secondary anti-hapten IgG antibody response by anti-immunoglobulin and enhancing soluble factor. *J Immunol* 1975;114:585.
260. Parker DC, Fothergill JJ, Wadsworth DC. B lymphocyte activation by insoluble anti-immunoglobulin: Induction of immunoglobulin secretion by a T cell-dependent soluble factor. *J Immunol* 1979;123:931–941.
261. Howard M, Farrar J, Hilfiker M, et al. Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med* 1982;155:914–923.
262. Nakanishi K, Howard M, Muraguchi A, et al. Soluble factors involved in B cell differentiation: Identification of two distinct T cell-replacing factors (TRF). *J Immunol* 1983;130:2219–2224.
263. Morse L, Chen D, Franklin D, Xiong Y, Chen-Kiang S. Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18(INK4c) and IL-6. *Immunity* 1997;6:47–56.
264. Turner CA Jr, Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 1994;77:297–306.
265. Schliephake DE, Schimpl A. Blimp-1 overcomes the block in IgM secretion in lipopolysaccharide/anti-mu F(ab')2-co-stimulated B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1996;26:268–271.
266. Wetzel GD. Interleukin 5 regulation of peritoneal Ly-1 B lymphocyte proliferation, differentiation, and autoantibody secretion. *Eur J Immunol* 1989;19:1701–1707.
267. Takatsu K. Interleukin-5. *Curr Opin Immunol* 1992;4:299–306.
268. Takatsu K, Takaki S, Hitoshi Y. Interleukin-5 and its receptor system: Implications in the immune system and inflammation. *Adv Immunol* 1994;57:145–190.
269. Loughnan MS, Nossal GJV. Interleukins 4 and 5 control expression of IL-2 receptor on murine B cells through independent induction of its two chains. *Nature* 1989;340:76–79.
270. Blackman M, Tigges MA, Minie ME, Koshland ME. A model system for peptide hormone action in differentiation: interleukin 2 induces a B lymphoma to transcribe the J chain gene. *Cell* 1986;47:609–617.
271. Phillips C, Klaus GGB. Soluble anti-μ monoclonal antibodies prime resting B cells to secrete immunoglobulins in response to interleukins-4 and -5. *Eur J Immunol* 1992;22:1541–1545.
272. Stein P, Dubois P, Greenblatt D, Howard M. Induction of antigen-specific proliferation in affinity-purified small B lymphocytes: Requirement for BSF-1 by type 2 but not type 1 thymus-independent antigens. *J Immunol* 1986;136:2080–2089.
273. Grupp SA, Snow EC, Harmony JAK. The phosphatidylinositol response is an early event in the physiologically relevant activation of antigen-specific B lymphocytes. *Cell Immunol* 1987;109:181–191.
274. Snow EC, Fetherston JD, Zimmer S. Induction of the c-myc protooncogene after antigen binding to hapten-specific B cells. *J Exp Med* 1986;164:944–949.
275. Myers CD, Kriz MK, Sullivan TJ, Vitetta ES. Antigen-induced changes in phospholipid metabolism in antigen-binding B lymphocytes. *J Immunol* 1987;138: 1705–1711.
276. Swain SL, Wetzel GD, Soubiran P, Dutton RW. T cell replacing factors in the B cell response to antigen. *Immunol Rev* 1982;63:111–128.
277. Leibson HJ, Gefter M, Zlotnik A, Marrack P, Kappler JW. Role of interferon in antibody producing responses. *Nature* 1984;309:799–801.
278. Jelinek DF, Splawski JB, Lipsky PE. The role of interlukin 2 and interferon-γ in human B cell activation, growth and differentiation. *Eur J Immunol* 1986;16:925.
279. Vitetta ES, Fernandez-Botran R, Myers CD, Sanders VM. Cellular interactions in the humoral immune response. *Adv Immunol* 1989;45:1–105.
280. Noelle RJ, Snow EC. Cognate interactions between helper T cells and B cells. *Immunol Today* 1990;11:361–368.
281. Foy TM, Durie FH, Noelle RJ. The expansive role of CD40 and its ligand, gp39, in immunity. *Semin Immunol* 1994;6:259–266.
282. Armitage RJ, Fanslow WC, Stockbine L, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 1992;347:80–82.
283. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Ann Rev Immunol* 1994;12:881–922.

284. Clark LB, Foy TM, Noelle RJ. CD40 and its ligand. *Adv Immunol* 1996;63:43–78.
285. Snapper CM, Rosas F, Moorman MA, et al. IFN-gamma is a potent inducer of Ig secretion by sort-purified murine B cells activated through the mIg, but not the CD40, signaling pathway. *Int Immunol* 1996;8:877–885.
286. Rothstein TL, Wang JK, Panka DJ, et al. Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells. *Nature* 1995;374:163–165.
287. Xu J, Foy TM, Laman JD, et al. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* 1994;1:423–431.
288. Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, Vitetta ES. A single antigen-specific B cell can conjugate to either a type 1 or a type 2 helper T cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7724–7728.
289. Kupfer A, Singer SJ. Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: Immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples. *Ann Rev Immunol* 1989;7:309–337.
290. Poo W-J, Conrad L, Janeway CA Jr. Receptor-directed focusing of lymphokine release by helper T cells. *Nature* 1988;332:378–380.
291. Clark EA, Ledbetter JA. How B and T cells talk to each other. *Nature* 1994;367:425–428.
292. Dustin ML, Springer TA. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Ann Rev Immunol* 1991;9:27–66.
293. Baluyut AR, Subbarao B. The synergistic effects of anti-IgM and monoclonal anti-Ia antibodies in induction of murine B lymphocyte activation. *J Mol Cell Immunol* 1988;1:45.
294. Cambier JC, Lehmann KR. Ia mediated signal transduction leads to proliferation of primed B cells. *J Exp Med* 1989;170:877–886.
295. Cambier JC, Newell MK, Justement LB, McGuire JC, Leach KL, Chen ZZ. Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes. *Nature* 1987;327:629–632.
296. Pollok KE, O'Brien V, Marshall L, Olson JW, Noelle RJ, Snow EC. The development of competence in resting B cells: The induction of cyclic AMP and ornithine decarboxylase activity after direct contact between B and T helper cells. *J Immunol* 1991;146:1633–1641.
297. Lane PJL, McConnell GM, Schieven GL, Clark EA, Ledbetter JA. The role of class II molecules in human B cell activation: Association with phosphatidylinositol turnover, protein tyrosine phosphorylation and proliferation. *J Immunol* 1990;144:3684–3692.
298. Armitage RJ. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 1994;6:407–413.
299. Kuhne MR, Robbins M, Hambor JE, et al. Assembly and regulation of the CD40 receptor complex in human B cells. *J Exp Med* 1997;186:337–342.
300. Xu Y, Cheng G, Baltimore D. Targeted disruption of TRAF3 leads to postnatal lethality and defective T-dependent immune responses. *Immunity* 1996;5:407–415.
301. Ishida T, Mizushima SI, Azuma S, et al. Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol Chem* 1996;271:28745–28748.
302. Hasbold J, Klaus GGB. B cells from CBA/N mice do not proliferate following ligation of CD40. *Eur J Immunol* 1994;24:152–157.
303. Sakata N, Patel HR, Terada N, Aruffo A, Johnson GL, Gelfand EW. Selective activation of c-Jun kinase mitogen-activated protein kinase by CD40 on human B cells. *J Biol Chem* 1995;270:30823–30828.
304. Tooze RM, Doody GM, Fearon DT. Counterregulation by the coreceptors CD19 and CD22 of MAP kinase activation by membrane immunoglobulin. *Immunity* 1997;7:59–67.
305. Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Ann Rev Immunol* 1990;8:303–333.
306. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241–251.
307. Pistoia V. Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol Today* 1997;18:343–350.
308. Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, et al. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 1996;85:345–356.
309. Swain SL, Bradley LM, Croft M, et al. Helper T-cell subsets: Phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. *Immunol Rev* 1991;123:115–144.
310. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St. Groth B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992;176:1091–1098.
311. Croft M, Swain SL. B cell response to T helper cell subsets. II. Both the stage of T cell differentiation and the cytokines secreted determine the extent and nature of helper activity. *J Immunol* 1991;147:3679–3689.
312. Croft M, Swain SL. B cell response to fresh and effector T helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4, and IL-6. *J Immunol* 1991;146:4055–4064.
313. Croft M, Swain SL. Analysis of CD4+ T cells that provide contact-dependent bystander help to B cells. *J Immunol* 1992;149:3157–3165.
314. Gray D, Bergthorsdottir S, van Essen D, Wykes M, Poudrier J, Siepmann K. Observations on memory B-cell development. *Semin Immunol* 1997;9:249–254.
315. Bachmann MF, Schorle H, Kuhn R, et al. Antiviral immune responses in mice deficient for both interleukin-2 and interleukin-4. *J Virol* 1995;69:4842–4846.
316. Kopf M, Le Gros G, Coyle AJ, Kosco-Vilbois M, Brombacher F. Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6 deficient mice. *Immunol Rev* 1995;148:45–69.
317. Huang S, Hendriks W, Althage A, et al. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 1993;259:1742–1745.
318. Yoshida T, Ikuta K, Sugaya H, et al. Defective B-1 cell development and impaired immunity against Angiostrongylus cantonensis in IL-5R alpha-deficient mice. *Immunity* 1996;4:483–494.
319. Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 1996;87:1037–1047.
319a. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* 1998;391:799–803.
320. Kelsoe G. Life and death in germinal centers (redux). *Immunity* 1996;4:107–111.
321. MacLennan I. Germinal centers. *Ann Rev Immunol* 1994;12:117–139.
322. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 1991;354:389–392.
323. Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 1991;67:1121–1129.
324. Wabl M, Steinberg C. Affinity maturation and class switching. *Curr Opin Immunol* 1996;8:89–92.
325. MacLennan ICM, Casamayor-Palleja M, Toellner KM, Gulbranson-Judge A, Gordon J. Memory B-cell clones and the diversity of their members. *Semin Immunol* 1997;9:229–234.
326. Shokat KM, Goodnow CC. Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses. *Nature* 1995;375:334–338.
327. Pulendran B, Kannourakis G, Nouri S, Smith KG, Nossal GJ. Soluble antigen can cause enhanced apoptosis of germinal-centre B cells. *Nature* 1995;375:331–334.
328. Han S, Zheng B, Dal Porto J, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. IV. Affinity-dependent, antigen-driven B cell apoptosis in germinal centers as a mechanism for maintaining self-tolerance. *J Exp Med* 1995;182:1635–1644.
329. Smith KG, Weiss U, Rajewsky K, Nossal GJ, Tarlinton DM. Bcl-2 increases memory B cell recruitment but does not perturb selection in germinal centers. *Immunity* 1994;1:803–813.
330. Smith KG, Nossal GJ, Tarlinton DM. FAS is highly expressed in the germinal center but is not required for regulation of the B-cell response to antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11628–11632.
331. Klinman NR. The cellular origins of memory B cells. *Semin Immunol* 1997;9:241–247.
332. Merville P, Dechanet J, Desmouliere A, et al. Bcl-2+ tonsillar plasma cells are rescued from apoptosis by bone marrow fibroblasts. *J Exp Med* 1996;183:227–236.
333. Arpin C, Dechanet J, Van Kooten C, et al. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 1995;268:720–722.
334. Ambrus JL Jr, Chesky L, Stephany D, McFarland P, Mostowski H, Fauci AS. Functional studies examining the subpopulation of human B lymphocytes responding to high molecular weight B cell growth factor. *J Immunol* 1990;145:3949–3955.
335. Schittek B, Rajewsky K. Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature* 1990;346:749–751.
336. Nunez G, Hockenbery D, McDonnell TJ, Sorensen CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature* 1991;353:71–73.
337. Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, et al. Enforced Bcl-2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8661–8665.
338. Radic MZ, Zouali M. Receptor editing, immune diversification, and self-tolerance. *Immunity* 1996;5:505–511.
339. Monroe JG. Tolerance sensitivity of immature-stage B cells. Can developmentally regulated B cell antigen receptor (BCR) signal transduction play a role? *J Immunol* 1996;156:2657–2660.
340. Carsetti R, Kohler G, Lamers MC. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med* 1995;181:2129–2140.
341. Klinman NR. The "clonal selection hypothesis" and current concepts of B cell tolerance. *Immunity* 1996;5:189–195.
342. Nossal GJV. Cellular mechanisms of immunologic tolerance. *Ann Rev Immunol* 1983;1:33–62.
343. Goodnow CC. Transgenic mice and analysis of B-cell tolerance. *Ann Rev Immunol* 1992;10:489–518.
344. Hartley SB, Crosbie J, Brink R, Kantor AB, Basten A, Goodnow CC. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* 1991;353:765–769.
345. Ho WY, Cooke MP, Goodnow CC, Davis MM. Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med* 1994;179:1539–1549.
346. Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, et al. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature* 1995;376:181–184.
347. Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA, Goodnow CC. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 1996;87:319–329.

第三篇　T淋巴细胞

第8章　主要组织相容性复合体

David H. Margulies[①]

前言

免疫系统依赖于很多调节机制，这些机制控制免疫系统对感染因子和肿瘤组织的应答，但是没有任何一个机制像主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，*Mhc*）控制这么多的复杂生物体系的细胞和分子。*Mhc* 是一组连锁基因，位于人6号染色体、小鼠17号染色体和大鼠20号染色体上。它最初是由于其对肿瘤和皮肤移植免疫应答而鉴定的[1,2]。*Mhc* 在对抗感染和对许多自身免疫性疾病的易感性方面也有重要作用。免疫应答的 *Mhc* 连锁控制的早期观察[3~6]已经成为过去20多年来许多详细研究的基础，并且在免疫系统中遗传编码的细胞识别关键细节的分子水平的了解达到极点。虽然移植和其他免疫应答的控制是 *Mhc* 编码分子功能的表型结果，但是如果我们从分子和细胞水平上来考虑的话，我们将会更好地理解 *Mhc*。MHC分子是细胞表面受体，可以结合抗原片段并可将其呈递给免疫系统中的各种细胞，最重要的是含 αβ 受体的T细胞[7~9]。自然杀伤（natunral killer，NK）细胞也通过同MHC分子的相互作用而受到影响[10,11]，表达 γδ 受体的T细胞也是如此[12]。最近几年，我们有幸目睹我们认识的转变，即从机制不清但有显著免疫学功能和遗传学定位的神秘实体向有已知的结构、生物合成途径、相互作用的生物物理参数和在细胞间和细胞内传送特异信号的瞬时表达的特异分子的转变，以及向染色体的精确区域图谱的转变。因此，*Mhc* 的研究也已从 263

① D. H. Margulies: Molecular Biology Section, Laboratory of Immunology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892.

遗传学和细胞免疫学向详细的分子机制转变。在这一章节，我们希望提供读者一个机会以理解只适合于本蛋白编码系统的基本原理，探索遗传学、细胞生物学和分子生物化学的机制性细节。

过去几年来我们知识的主要进步是由于许多综合因素：近交和重组小鼠的广泛应用、已鉴定的可特异而有效地鉴定细胞表面标志的单克隆抗体库、源于多个不同种类的 *Mhc* 编码蛋白的基因组和 cDNA 克隆、基于黏粒和人工染色体克隆的高解析度遗传图、*Mhc* 基因在转染细胞系和转基因小鼠中控制性表达的方法、特定基因座定点突变的敲除小鼠、产生大量同源可溶性 MHC 分子类似物的表达系统和高解析度的 MHC 分子及相关蛋白的 X 射线结晶学结构。另外，计算机可利用的数据库的应用使获取核苷酸和氨基酸序列的最新信息及其三维结构成为可能，同时也使 *Mhc* 的研究变得特别令人兴奋和富有挑战性。

264 本章的重点是 *Mhc*、目前对其结构和功能的理解等，目标是描述分子组成总的法则和编码 MHC 分子的遗传区域和功能性细胞表面分子的功能。

术语注释

学生对 *Mhc* 的一个最迷惑的话题是它的术语。就像语言一样，术语也在进化，而我们在标准化方面的努力不可避免地没有完全成功。随着新发现的出现，其他的复杂性也已被认识，更高精确性的需要渐渐使过去较简单的系统不能适应。目前使用的术语在物种和物种之间、杂志和杂志之间以及作者和作者之间都各不相同，但是，仍存在见多识广的科技工作者所应明白的标准。对于小鼠 *Mhc*，这些标准可在多种出版物中找到：《遗传变异体和实验小鼠系》[13]，现在是第三版；Jackson 实验室主页（http://www. informatics. jax. org/nomen）。对于人类 *Mhc*，有一个标准的世界卫生组织（World Health Orgnization，WHO）术语，它们被定期地评价和修改[14]。一般遗传区域和在其中的一些编码基因的使用标准和术语在这里进行综述。一般惯例是基因或基因座用斜体字来表示，编码的蛋白质产物或表型的描述用标准字体来显示。对于人类 *Mhc* 基因，这个惯例常被忽视，而对于小鼠和其他物种的基因则经常遵守这个惯例。我们将打算通过使用斜体字来区别基因及其编码的蛋白质，我们也会特别说明讨论是集中在基因、基因座还是编码蛋白上。小鼠 *Mhc* 称为 H-2 是因为它是参与控制由 Gorer 鉴定的红细胞抗原表达的第二个基因座[15,16]。现在知道，*Mhc* 含很多基因座，这种扩大的遗传区域称为复合体；适用于所有物种的总的名称是 *Mhc* 或 MHC（主要组织相容性复合体）。（使用数据库和计算机化的图谱时，有避免使用连字符的趋势，所以 *H-*2 演变成 *H*2，但我们在这里将使用更常用的 *H*-2。）大鼠中的 *Mhc* 称为 RT_1，事实上，其他物种的所有 *Mhc* 都可看着是人类白细胞抗原（human leukocyte antigen，*HLA*）的变体。因此，我们称黑猩猩的为 *ChLA*，狗的为 *DLA*，豚鼠的为 *GPLA*，猪的为 *SLA*，兔的为 *RLA*，恒河猴的为 *RhLA*。

由于 *Mhc* 被鉴定的第一个基因是编码可通过抗体和移植反应来检测的细胞表面分子，这些基因称为 *Mhc* 基因。现在我们知道了超过 400 个定位于人或小鼠 *Mhc* 的基因，虽然学术上它们都是 *Mhc* 基因，但 MHC 分子明确地分为 MHC Ⅰ 和 MHC Ⅱ 类分子，它们在结构和功能上相互关联。其他有着不同结构和功能的 *Mhc* 编码分子都有其更特殊的名字。

特异 *Mhc* 基因用一个或多个表示位置的字母来指明（如小鼠中的 *H-*2*K*、*H-*2*D*、*H-*2*L*、*H-*2*IA*；人的 *HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-C*、*HLA-DR*）。等位基因（和其表达的细胞表面蛋白产物）在小鼠中用另外的上标来表示（如 $H\text{-}2K^b$ 和 $H\text{-}2K^d$ 是同一基因座上的不同等位基因），在人类中，加一个数字或一个数字加一个字母来表示（*HLA-A2* 和 *HLA-A3* 是等位基因；*HLA-B8* 和 *HLA-B27* 也是等位基因）。人类基因的精确命名由基因座后的四位数字表示（如 *HLA-A* * 0101 和 *HLA-DRB*1 * 0101）。更清楚地理解人类 *Mhc* 命名需要使用近期的 DNA 分型术语来校准基于血清学的老术语的转换表（表 8.1 和表 8.2）。

对于 *Mhc* Ⅱ 基因，人类的命名是 *HLA-D*，而在小鼠中则为 *H-2IAa*、*H-2IAb*、*H-2IEa* 和 *H-2IEb*，经常分别简写为 *IAa*、*IAb*、*IEa* 和 *IEb*。*a* 和 *b* 分别指 *a* 或 α（*alpha*）和 *b* 或 β（*beta*），分别表示链编码基因。目前倾向于用罗马字母表示基因名称，希腊字母表示编码的蛋白链。MHC Ⅱ 分子通常指 IA 或 IE，用一个上标表示单体型（如 IA^b、IA^d 或 IE^d）。另一个需要精确使用基因和编码蛋白名称的复杂因素是特定同源遗传区域内的

基因数可能在品系与品系或个体与个体之间是不同的。在小鼠中，一些品系在 D 基因座只有一个基因(如 $H\text{-}2D^{b}$)，而其他品系却可能在同源区有多达 5 个基因($H\text{-}2D^{d}$，$H\text{-}2D2^{d}$，$H\text{-}2D3^{d}$，$H\text{-}2D4^{d}$ 和 $H\text{-}L^{d}$[17])。

一个重要的经常用到的名词是单体型(haplotype)，它指不同基因座上的特异等位基因的连锁，它们在亲本染色体上以群体形式出现[18]。单体型的概念人类 *HLA* 基因座的分型中非常重要，一个亲本的一条染色体的连锁 *Mhc* 基因通常以连锁群的形式分离而传给其后代。小鼠 *Mhc* 个体的单体型用一个小写字母上标表示如 $H\text{-}2^{b}$、$H\text{-}2^{d}$ 或 $H\text{-}2^{k}$。所以 $H\text{-}2^{k}$ 单体型指整套的连锁基因——$H\text{-}2K^{k}$、$H\text{-}2IA^{k}$、$H\text{-}2IE^{k}$、$H\text{-}2D^{k}$，Q 和 T 区基因也是如此[19]。(一些单体型如 $H\text{-}2^{a}$ 表示自然重组，因此含有来自于一个单体型的一些连锁基因，其余则来自另一个单体型。)不同品系小鼠所代表的相似 *H*-2 单体型是显著不同的，特别在 *Mhc* 1*b* 基因的数量和等位基因同一性方面，所以有必要精简这些术语[20]，表 8.3 为常见品系小鼠单体型的综述。

同基因命名法系统相平行，另一个侧重于表达蛋白质的系统也已形成，其主要研究蛋白质结构和功能的差异。MHC 分子的主要不同是 MHC Ⅰ 和 MHC Ⅱ 分子间的不同。[MHC Ⅲ 也已形成一组，但它们是血清分子，参与补体系统(C4)或那些在遗传连锁基因座编码的分子。]现已有人提议将位于 *Mhc* Ⅲ 远侧端但靠近 *Mhc*Ⅰ的区域称为 *Mhc* Ⅳ 区[21]。

所有 MHC Ⅰ 分子都含有一条重链(也称为 α 链)，它同一条轻链即 β_2 微球蛋白(β_2m，由 B_2m 基因编码)非共价结合。MHC Ⅰ 分子再分为 MHC Ⅰ a 和 MHC Ⅰ b 两组，这是基于它们的氨基酸序列和基因定位的不同[22]。MHC Ⅱ 也是异源二聚体，有一条 α 链和与之非共价结合的 β 链。异源 二聚体通常由编码两条链的连锁基因的组装产物组成。在小鼠中，*IAa*(也就是 *IAα*)和 *IAb* (或 *IAβ*)基因产物组装形成 IA 异源二聚体；类似地，*IEa*(*IEα*)和 *IEb*(*IEβ*)基因产物组装成 IE。IA 和 IE 通常称为同种型。等位基因形式通常称为 IA^{b}、IA^{d} 或 IA^{k}。有些情况下，可见混合异二聚体，它们可能有免疫学重要性[23~27]。因此，如果是指一个含一条 IE^{d} 的 α 链和 IA^{d} 的 β 链的混合异二聚体，你必须用更精确和繁琐的描述，即 $IA\beta^{d}E\alpha^{d}$($IAb^{d}Ea^{d}$)。在人类中，特别在提及 MHC Ⅱ 分子时，一定要区分用抗体鉴定和用 DNA 测序分型鉴定的分子(见表 8.1 和表 8.2)。血清学定义的不同之外主要在于 β 链。

表 8.1　HLA-Ⅰ类等位基因列表

HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-E		HLA-G	
血清学	等位基因	血清学	等位基因	血清学	等位基因	血清学	等位基因	血清学	等位基因
A1	A*0101,0102	B7	B*0702-706	Cw1	Cw*0102,0103	—	E*0101-0104	—	G*01011-0104
A2	A*0201-217	B8	B*0801-803	Cw2	Cw*02021,02022				
A3	A*0301,0302	B13	B*1301-303	Cw3	Cw*0302-304				
A11	A*1101-103	B14	B*1401,1402	Cw4	Cw*0401-403				
A23(9)	A*2301	B15	B*1501-531	Cw5	Cw*0501				
A24(9)	A*2402-410	B18	B*1801-803	Cw6	Cw*0602				
A25(10)	A*2501	B27	B*2701-710	Cw7	Cw*0701-705				
A26(10)	A*2601-608	B35	B*3501-518	Cw8	Cw*0801-803				
A29(19)	A*2901,2902	B37	B*3701-702	—	Cw*12021-203				
A30(19)	A*3001-004	B38(16)	B*3801-802	—	Cw*1301				
A31(19)	A*31012	B39(16)	B*39011-909	—	Cw*1402,1403				
A32(19)	A*3201	B40	B*40011-008	—	Cw*1502-505				
A33(19)	A*3301-303	B41	B*4101,4102	—	Cw*1601,1602				
A34(10)	A*3401,3402	B42	B*4201,4202	—	Cw*1701,1702				
A36	A*3601	B44(12)	B*4402-407						
A43	A*4301	B45(12)	B*4501						
A66	A*6601,6602	B46	B*4601						
A68(28)	A*68011-803	B47	B*4701						
A69(28)	A*6901	B48	B*4801,4802						
A74(19)	A*7401	B49(21)	B*4901						
—	A*8001	B50(21)	B*5001						

续表

HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-E		HLA-G	
血清学	等位基因	血清学	等位基因	血清学	等位基因	血清学	等位基因	血清学	等位基因
		B51(5)	*B* * 5101-107						
		B52(5)	*B* * 52011,52012						
		B53	*B* * 5301						
		B54(22)	*B* * 5401						
		B55(22)	*B* * 5501-503						
		B56(22)	*B* * 5601,5602						
		B57(17)	*B* * 5701-704						
		B58(17)	*B* * 5801,5802						
		B59	*B* * 5901						
		B67	*B* * 67011,67012						
		B73	*B* * 7301						
		B78	*B* * 7801,7802						
		—	*B* * 8101						
		—	*B* * 8201						

本表总结了人 MHC Ⅰ HLA 基因产物基于血清学和核苷酸序列(也可由此推断氨基酸)的命名。本表摘自 McCluskey 文章中的相应表格[262]。HLA 等位基因及其序列调整的经常性更新列表参见:http://www.icnet.uk/axp/tia。血清学命名在"血清学"栏给出,相应的老的数字列在圆括弧内。显而易见,最近鉴定的等位基因(特别是 HLA-E 和 HLA-G 的等位基因)没有用血清学进行分型。

表 8.2　HLA-Ⅱ类等位基因列表

HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
血清学	等位基因	血清学	等位基因	血清学	等位基因
α 链					
	DRA * 0101-0102		*DQA1* * 0101-0105		*DPA1* * 0103-0104
			DQA1 * 0201		*DPA1* * 0201-0202
			DQA1 * 0301-0303		*DPA1* * 0301
			DQA1 * 0401		*DPA1* * 0401
			DQA1 * 0501-0503		
			DQA1 * 0601		
β 链					
DR1	*DRB1* * 0101-0104	DQ5(1)	*DQB1* * 0501-0504	DPw1	*DPB1* * 0101
DR15(2)	*DRB1* * 1501-1505	DQ6(1)	*DQB1* * 0601-0611	DPw2	*DPB1* * 0202-0202
DR16(2)	*DRB1* * 1601-05	DQ2	*DQB1* * 0201-0203	DPw3	*DPB1* * 0301
DR3	*DRB1* * 0301-0308	DQ3	*DQB1* * 0301-0306	DPw4	*DPB1* * 0401-0402
DR4	*DRB1* * 0401-0423	DQ4	*DQB1* * 0401-0402	DPw5	*DPB1* * 0501
DR11(5)	*DRB1* * 1101-1127			DPw6	*DPB1* * 0601
DR12(5)	*DRB1* * 1201-1204			—	*DPB1* * 0801-4101
DR13(6)	*DRB1* * 1301-1312			—	*DPB1* * 4401-6501
DR14(6)	*DRB1* * 1401-1425				
DR7	*DRB1* * 0701				
DR8	*DRB1* * 0801-0813				
DR9	*DRB1* * 0901				
DR10	*DRB1* * 1001				
	DRB3 * 0101				
DR52	*DRB3* * 0201-0205				
	DRB3 * 0301				
DR53	*DRB4* * 0101-103				
	DRB4 * 01011-02*N*				
DR51	*DRB5* * 0101-0105				
	DRB5 * 0201-0203				

HLA 等位基因和正常更新与调整的序列列表参见 TAL 主页:http://www.icnet.uk/axp/tis。

如本表所示,HLA-Ⅱ类分子的血清学分类并不总是同 DNA 命名一致。HLA-DR 分子的血清学分类主要由 DRB1 基因产物决定,而 DQ 分子的分类则反映 DQA1 和 DQB1 基因产物的血清学类型。由于 DR 和 DQ 新的等位基因被鉴定,分类已经被"分裂"。因此,DR2 分为 DR15 和 DR16,DR5 分为 DR11 和 DR12 等等。"w"(对于 HLA-C 和 HLA-DP)表示"workshop"意思,因为血清学分类是不精确的。

表 8.3　常用小鼠品系：*H-2* 单体型[a]

品系	单体型	*H-2* 复合体							
		K	*Ab*	*Aa*	*Eb*	*Ea*	*D*	*Oal*	*Tla*
普通品系									
129/J	bc	b	b	b	b	—	b		
AKR/J	k	k	k	k	k	k	k	b	b
A.SW/Sn	s	s	s	s	s	—	s	b	b
BALB/cJ	d	d	d	d	d	d	d	b	c
C3H/HeJ	k	k	k	k	k	k	k	b	b
CBA/J	k	k	k	k	k	k	k	b	b
C57BL/6	b	b	b	b	b	—	b	b	b
C57BL/10	b	b	b	b	b	—	b	b	b
C57BR	k2	k	k	k	k	k	k	a	a
DBA/2J	d	d	d	d	d	d	d	b	c
NZB/BINJ	d2	d	d	d	d	d	d	a	a
P/J	p	p	p	p	p	p	p	a	e
RIIIS/J	r	r	r	r	r	r	r	c(r)	b
SJL	s2	s	s	s	s	—	s	a	a
同类系									
B10.BR	k2	k	k	k	k	k	k	a	a
B10.D2	d	d	d	d	d	d	d	b	c
B10.S	s	s	s	s	s	—	s		
BALB.B	b	b	b	b	b	—	b	b	
BALB.K	k	k	k	k	k	k	k	b	b
C3H.SW	b	b	b	b	b	—	b		
重组系									
A	a	k	k	k	k	k	d		
A.TL	t1	s	k	k	k	k	d		
B10.A	a	k	k	k	k	k	d		
B10.A(1R)	h1	k	k	k	k	k	b		
B10.A(2R)	h2	k	k	k	k	k	b		
B10.A(3R)	i3	b	b	b	b/k	k	d		
B10.A(4R)	h4	k	k	k	k/b	—	b		
B10.A(5R)	i5	b	b	b	b/k	k	d		
B10.T(6R)	y2	q	q	q	q	—	d		
B10.S(7R)	t2	s	s	s	s	—	d		
B10.S(8R)	as1	k	k	k	k/s	—	s		
B10.S(9R)	t4	s	s	s	s/k	k	d		
B10.HTT	t3	s	s	s	sd/k	k	d		

[a]—表示在该基因座的基因没有正常表达，虽然不同品系小鼠中的精确机制是不同的[270]。有多个名称如 *bc*、*s2* 和 *k2*，参见 Lindahl 文章[19]以弄清在一些远 MHC 基因座远侧的基因型差别。

MHC 分子的功能

Mhc 编码分子的主要功能是帮助特异分子片段以易于被免疫效应细胞如 T 淋巴细胞识别的排列方式呈现在细胞表面。MHC Ⅰ 和 MHC Ⅱ 类分子是这些细胞表面的糖蛋白，它们实际上起着结合和识别作用，而其他定位于 *Mhc* Ⅰ 或 *Mhc* Ⅱ 基因区的基因则以其他不同的方式对抗原进行加工和呈递。MHC 分子通过其两

个不同的分子功能来实现其免疫学作用:结合肽(有时是非肽分子)和同 T 细胞相互作用,通常通过 $\alpha\beta$ T 细胞受体(T cell receptor,TCR)。MHC Ⅰ 和 MHCⅡ类分子结合肽是选择性的,这允许表达 MHC 分子的细胞[抗原呈递细胞(antigen-presenting cell,APC)]能够对自身蛋白(对于 MHC Ⅰ)或附近胞外环境中摄入的蛋白质(对于 MHCⅡ)采集样本。特别是,细胞表面 MHCⅠ类糖蛋白从细胞的生物合成途径中获取蛋白质片段,然后将它们呈递到细胞表面。这些蛋白质来自感染的病毒、胞内寄生虫、自身分子等,它们可以是正常表达的,也可是由于肿瘤的形成过程中而受到错误调节而生成的[7,9,28]。这样,APC 上的 MHCⅠ-肽复合体就展示给 T 细胞。MHCⅠ类分子的第二个特性是同 TCR 相互作用的能力,其允许带有 MHC-肽复合物的 APC 结合适当的 $\alpha\beta$ TCR,作为一个细胞程序性活化的第一步,可导致 APC 作为靶细胞而被裂解和(或)使 T 细胞分泌淋巴因子。同 TCR 的相互作用既取决于肽,也取决于 MHC 分子。通常,特异 TCR 不会同单独的 MHC 分子或与不相关肽结合的 MHC 分子相结合。有些人提出,这一系统发展的主要进化基础是机体要区别对待那些被病毒或其他胞内寄生虫感染的宿主细胞[28]。所以,这样一个最开始是为了鉴别被病毒或胞内寄生虫危害的细胞而进化的系统,现在也能够鉴别肿瘤细胞的特异抗原[29]。对于 MHCⅠ限制性抗原,通常这些肽是在合成 MHCⅠ分子的同一细胞中产生的。一般来讲,这些肽从胞质蛋白而来,胞质蛋白被有多种蛋白裂解活性的蛋白酶体降解成小肽。所产生的肽在事先存在的膜转运体即抗原加工相关转运蛋白(transporter associated with antigen processing,TAP)的帮助下,从胞质转运至内质网,并在那里被装入新合成的 MHCⅠ分子中[30]。

266

利用相似的分子机制,MHCⅡ分子结合表达 MHCⅡ分子的 APC 摄入的蛋白降解而来的肽,然后将它们展示在细胞表面以利于特异 T 细胞识别。MHCⅡ抗原呈递途径是基于 MHCⅡ $\alpha\beta$ 异二聚体首先同一个双功能分子结合。这种双功能分子就是恒定链(invariant chain,Ii),它的一个功能是作为一个分子伴侣指导 $\alpha\beta$ 异二聚体到酸性蛋白加工场所的内体,并在那里同抗原肽相作用;Ii 的另一个功能是保护 MHCⅡ分子的抗原结合位点,以保证它优先同位于内体-溶酶体的抗原肽相结合[31,32]。MHCⅡ装载抗原肽的过程依赖于源自 Ii 的 CLIP 肽,在人类也部分依赖于 MHCⅡ样分子 HLA-DM[33,34],然后导致 MHC-肽复合物的细胞表面表达。识别 MHCⅡ的 T 细胞然后分泌淋巴因子,也可能被诱导而增生。虽然这些细胞表面 MHC 分子是由于它们在肿瘤和遗传障碍引起的组织移植中的强烈效应而命名,但它们的细胞和分子功能实际上要全面得多,也许称 MHCⅠ和 MHCⅡ为 APC 上的肽受体更为合适。

267

MHCⅠ和 MHCⅡ分子,由于它们蛋白质结构的不同和它们从合成到成熟的胞内移行区间不同,从而对用以作为抗原进行呈递的蛋白质来源有强烈的倾向性[35,36]。MHCⅠ类抗原呈递途径可认为是内源性途径,细胞本身所合成分子的蛋白质片段被转运并在 MHCI 分子生物合成期间结合到 MHCⅠ类分子上。相对而言,MHCⅡ类抗原呈递途径则显然是外源性途径,摄入的蛋白质在内体-溶酶体中被酶解并被转至此部位的 MHCⅡ分子上[37]。这些过程见图 8.1 所示,更详细细节见本书其他地方。参与从大分子中产生抗原肽的生化步骤统称为抗原加工,而抗原片段与 MHC 分子的结合和 MHC-肽复合物在细胞表面的展示过程则称为抗原的呈递。通常,抗原加工和呈递途径在实验上被描述为从蛋白质中产生抗原肽片段,加工是关于误调节或外源性蛋白的鉴定及其蛋白酶解成短肽。呈递包括肽片段和 MHCⅠ和 MHCⅡ分子的结合,以及随后的向细胞表面的运动并展示给胞外环境。

268

除了不同抗原呈递途径之外,MHCⅠ和 MHCⅡ分子也显示出对 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞的限制性。CD8 结合到 MHCⅠ分子的非多态性 $\alpha3$ 区[38~41],而 CD4 则结合 MHCⅡ分子的近膜区[42~44]。CD8 和 CD4 分子作为 T 细胞表面的共受体,提供黏附(亲合力增加)和特异的活化信号,后者以一种时间依赖的方式调节 T 细胞的亲和力[45]。表 8.4 总结了 MHCⅠ和 MHCⅡ类分子的相似点和不同点。

由于已经研究出高解析度的 *Mhc* 图谱,现在已知道许多分子位于 *Mhc* 区域,它们的功能同抗原的呈递有关,但并非完全必要。这包括小鼠的 H-2M 和人的 HLA-DM 分子,它们有 MHCⅡ样的氨基酸序列,但在 APC 的内体或溶酶体中可显著促进肽与 MHCⅡ分子的结合[46]。TAP1 和 TAP2 基因编码同 ATP-结合盒转运体家族相关分子[47],它们在将胞质中产生的肽转到新生的已和其轻链 β_2m 装配好的 MHCⅠ分子上有重要作用。

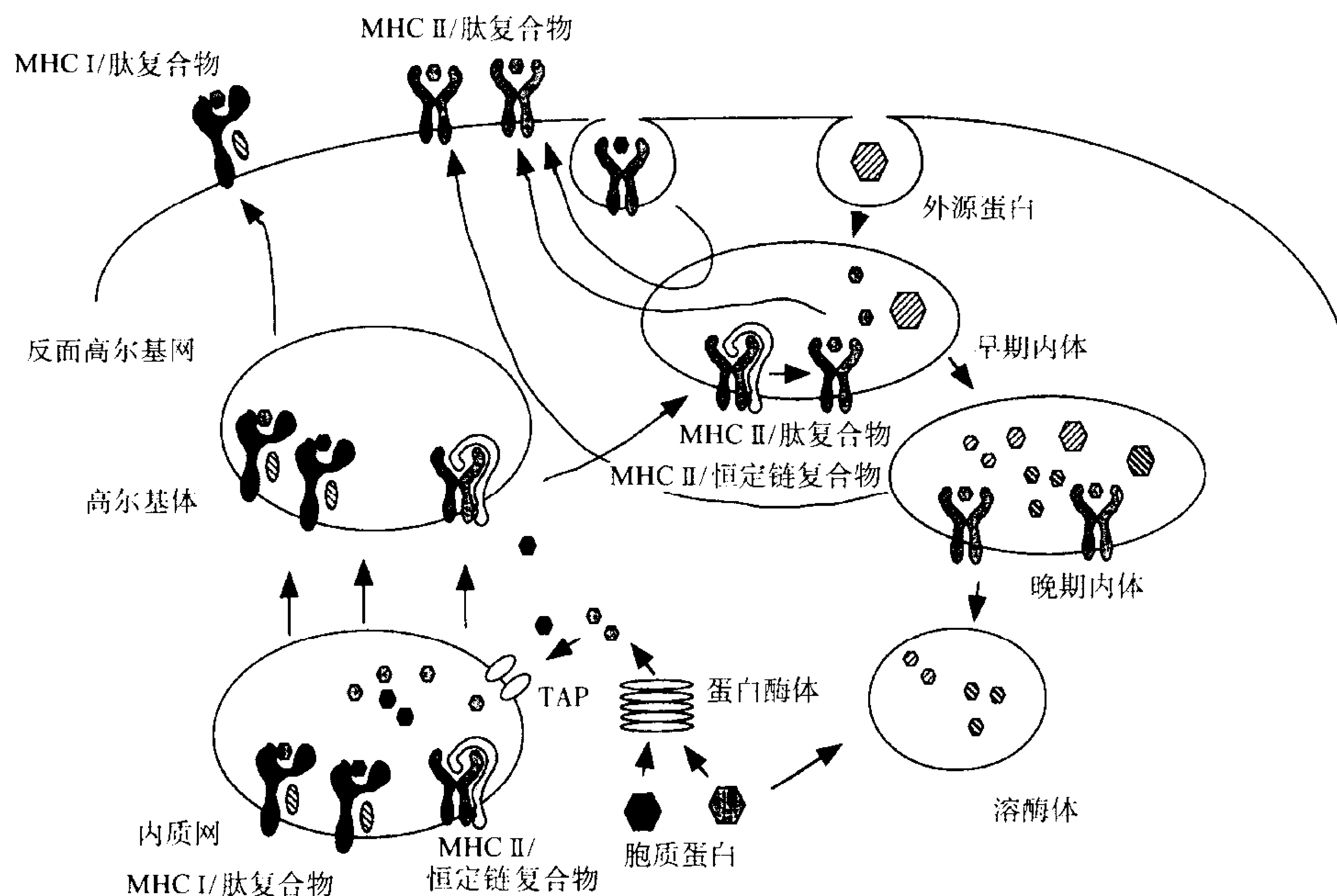


图 8.1　抗原加工与呈递。本图显示加工与呈递的主要途径。胞质蛋白(带阴影的六边形)被蛋白酶体降解成肽片段,然后由 TAP 转入内质网,并在那里同 MHC/β_2m 复合物组装。然后通过高尔基体和反面高尔基网至细胞表面。外源蛋白(条带状六边形)进入内体途径,在早期或晚期内体或溶酶体中,它们被降解成肽片段。在早期和晚期内体中,MHC Ⅱ/恒定链复合物(从内质网先期到达此处)在 HLA-DM 的催化帮助下转变成装配有肽的 MHC Ⅱ/CLIP 复合物。这些 MHC Ⅱ/肽复合物然后进入细胞表面。(本图从参考文献[37]、[146]编辑而来。)

表 8.4　MHC Ⅰ 和 MHC Ⅱ 分子的比较

	MHC Ⅰ a 和 MHC Ⅰ b	MHC Ⅱ
遗传学	多重重链基因座,大多同 MHC 轻链连锁,β_2m 在遗传上不连锁	多个重链和轻链基因座彼此连锁的,α、β 链基因
组织特异表达	MHC Ⅰ a,广泛存在	存在于 B 细胞、巨噬细胞、DC、LC(小鼠中);在人类,也见于 T 细胞和许多活化的细胞上
分子结构	重链和轻链形成异二聚体,为细胞表面分子。重链有三个胞外结构域,α1、α2 和 α3。$\alpha 1/\alpha 2$ 形成肽结合位点;α3 和 β_2m 形成 Ig 样结构。只有重链和膜结合,β_2m 是非共价结合的。	α 和 β 链形成有四个结构域的异二聚体;$\alpha 1/\beta 1$ 形成肽结合位点;α2 和 β2 为 Ig 样。两链都是膜结合的。新生 MHC Ⅱ 和 Ii 链相结合
肽获取位点	①生物合成期间在内质网; ②当暴露给外源性肽时,在细胞表面。	在内体或溶酶体,在那里所摄取蛋白的降解产物同其相结合;肽的结合有 H-2M(小鼠)或 HLA-DM(人)。
肽结合本质	MHC Ⅰ a 倾向于 8-10 聚体;虽然更长的肽也可结合。个别 MHCⅠ类分子的"基序"残基能结合脂质抗原的 CD1	可接受更长的肽
T 细胞识别 相关分子	主要为 $CD8^+$ β_2m TAP tapasin calnexin	主要为 $CD4^+$ Ii 恒定链 H-2M,(HLA-DM)
其他功能	同 NK 受体相结合像 nFcR,结合 Fc	同 NK 受体相作用

不直接同 T 细胞识别相关的 MHC 分子的另一个功能在最近几年已被认识到。这是作为自然杀伤细胞(NK)信号转导的一个元件。NK 细胞是非淋巴细胞,能够通过已知的自然杀伤过程裂解一些肿瘤靶细胞和一些胞内病原体感染的细胞。在某些情况下,MHC Ⅰ 类分子在靶细胞中的表达可以保护靶细胞不被 NK 效

应细胞所杀伤；而正常 MHC Ⅰ类分子表达缺陷的靶细胞则对这种 NK 细胞的裂解敏感[11,48]。在另一些情况下，NK 细胞上的受体可以同 MHC Ⅰ类分子相作用从而使 NK 细胞被激活。研究已经显示在人、大鼠和小鼠中存在多个活化型和抑制型受体。这些 NK 受体，除了可粗分为活化性受体和抑制型受体两大类外，还可根据它们的结构分为属于免疫球蛋白超基因家族和属于 C 型外源凝集素家族的两大类分子[49]。

主要组织相容性复合体

Mhc 遗传图谱

269

MHC 是基因组的一个大的区域，全长约四百万个碱基对(basepairs, bp)，位于人的 6 号染色体短臂上的 6p21.31 和 6p21.32 之间。在小鼠中，MHC 占 17 号染色体的从 18.0～20.0cM 约 2cM 的中心区。虽然在小鼠中此区尚未绘制出完整的物理图谱，但其可能有相似的长度[19]。基因组制图和测序已经在此区鉴定出了大量的基因，其中许多基因的功能主要与 MHC Ⅰ 或 MHC Ⅱ 蛋白的功能相关，其他的基因功能也与免疫相关。然而，此区许多基因在免疫学功能方面似乎很少有共同点。图 8.2 是人、小鼠和大鼠 *Mhc* 的一些主要基因的示意图谱，包括编码 MHC Ⅰ 和 MHC Ⅱ 蛋白的那些基因。这些比较图谱不是按比例绘制的，也没有显示此区的所有已鉴定的基因。三个标志，Ke3、Bat1 和 Mog，用以说明这三个物种 MHC 总的线性对应[50]，尽管一个物种内的品系与个体间和物种与物种间都有明显的巨大差异。人类现在可利用的图谱信息比小鼠的更广泛，而大鼠则落后于前两者。人 *Mhc* 数据库可通过万维网使用(http://www.hgmp.mrc.ac.uk)[51]。显示小鼠 17 号染色体和人的 6 号染色体的同源性图谱可参见(http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Homology/mouse17.html)，人 *MhcI* 区的 YAC 图谱见(http://chimera.biotech.washington.eda/UWGC/projects/hla-1/HLAyacs.htm)。有一个表格中计有已经鉴定过的 451 个基因座上的 212 个基因。随着人类基因组计划的持续进展，我们可以期待人 *Mhc* 的 4000kb 全序列将测序完毕，其中的可读框(open reading frame, ORF)也将被精确地识别。基于作为模

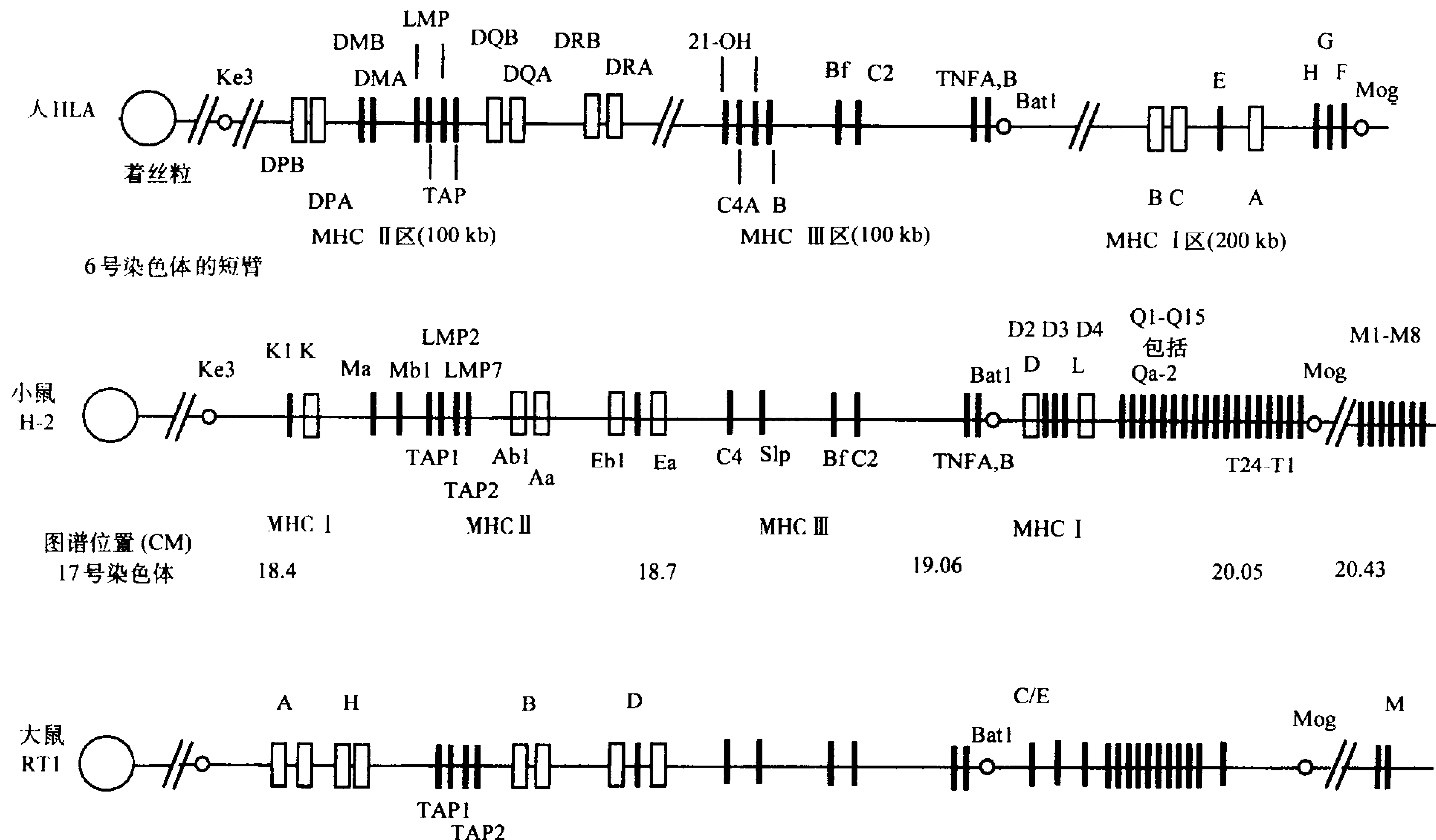


图 8.2 *Mhc* 遗传图谱。人、小鼠和大鼠 MHC 比较图谱。本示意图谱不完整，且不成比例。本图来自万维网[51]和以前已发表的图谱[21,50,262]。着丝粒和主要基因如图所示。

式系统的重要性，小鼠 *Mhc* 的线性序列也即将完成。

人类 MHC 图谱可以大致分为一个占 1 000 kb 的 *Mhc* Ⅱ区、一个 *Mhc* Ⅲ区和一个 *Mhc* Ⅰ区(见图 8.2)的基因簇。*HLA-DP* 基因(*DPA* 编码 α 链，*DPB* 编码 β 链)靠近染色体短臂上着丝粒，并同编码 HLA-DM 分子(*DMB* 和 *DMA*)的相关基因相连锁。在这些基因和 *DQ* 基因间是 *LMP* 基因(编码低分子质量蛋白[52~55])和 *TAP*[56~60](编码抗原加工相关转运体)基因。*LMP* 和 *TAP* 基因分别编码参与胞质中肽的产生和肽通过内质网(ER)膜转运分子。TAP 基因编码一个两条链的内在膜蛋白，它们位于所有细胞的 ER 中，并以 ATP 依赖的方式将胞质中产生的肽泵入内质网腔中[47]。目前认为 LMP 是多重催化裂解功能蛋白酶复合体的亚基，可调节蛋白的裂解特异性，故能调节可适用于 MHCⅠ限制性的抗原呈递的肽库[61,62]。大鼠细胞质中产生的肽有不同的 TAP 选择性转运证明表达于细胞表面的 MHC/肽复合物的谱型会因为抗原呈递途径的不同而有显著性的改变[60~65]。现已鉴定出在小鼠 *Mhc* 中有一个 基因座，它控制由转基因编码的 HLA-B27 分子呈递的肽，显示其同多变的大鼠 *TAP* 等位基因有一个相似的表型[66]。

270

人的其他主要 *Mhc* Ⅱ 基因是 *HLA-DRA* 和 *HLA-DRB*，它们编码组成 HLA-DR 分子的肽链，一个主要的抗原呈递成分。有多个理由证明 MhcⅢ区对免疫学来说是很重要的：多个补体成分的结构基因定位于此；21-羟化酶的结构基因也位于此[67,68]，此酶在糖皮质激素的生物合成中是一个关键酶，如此基因缺乏则将导致遗传性类固醇 21-羟化酶缺乏症。连锁在 *Mhc* Ⅲ区的是肿瘤坏死因子 A 和 B 的结构基因(TNF-A 和 TNF-B)，它们是由活化的 T 细胞产生的淋巴因子[69,70]。TNF-B 也称淋巴毒素 α。

Mhc 的远侧区编码其他 MHC 分子。在人类，主要 *Mhc* Ⅰ基因簇就位于此，包括编码 HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-A、HLA-H、HLA-G 和 HLA-F 的基因。HLA-A、HLA-B 和 HLA-C 是人的主要 MHCⅠ分子(表 8.1 给出了这些分子的血清学和遗传学鉴定的总汇)。HLA-C 分子的血清学鉴定非常困难和不精确，但它们在同 NK 细胞上的受体相作用方面却特别的重要[71]。HLA-E、HLA-F 和 HLA-G 的确切功能还不清楚。HLA-E 在氨基酸序列和肽结合基序方面同小鼠 MHCⅠb 分子 Qa-Ⅰ[72,73]有一些相似性。现在有一些证据提示 HLA-E、-F 和-G[74]有抗原呈递功能，HLA-G[75,76]的组织限制性表达提示这个分子可能参与胎儿的母亲免疫耐受。*HLA-H*[77]是位于此区域的一个假基因，但不应和 *HLA-HFE* 相混淆，后者是一个 *Mhc* Ⅰ *b* 基因，控制遗传性血色病，同 *Mhc* Ⅰ基因的关系更疏远，但曾被一些作者误称为 *HLA-H*[78~80]。

小鼠和大鼠 *Mhc* 图谱同人的图谱相比较显示了多个有趣之处[81,82]。小鼠和大鼠靠近中部的 *Mhc* 基因属于 *Mhc* Ⅰ类家族，而不是 *Mhc* Ⅱ类家族。这种图谱提示染色体内发生了重组，使本来位于远中位置的 *Mhc* Ⅰ类基因移至近中点。审视目前人类、小鼠和大鼠的图谱会清晰地发现在 *Mhc* Ⅱ、*Mhc* Ⅲ和 *Mhc* Ⅰ的相关位点其他的相似性。主要的大鼠 MHCⅠ分子是 RT1.A。各种基因的扩增和缩减也是显而易见的。特别是，小鼠的 *Q* 和 *T* 区明显地扩增了 *Mhc* Ⅰ基因库，这在人和大鼠中是很少见的。异系同基因小鼠品系的早期研究将多个基因定位于 *Q* 和 *T* 区[83~85]，而且有证据提示在不同品系中此区的基因数目存在着巨大的差异。小鼠有一些 *Ib* 类基因，这似乎是本物种相关的独特功能有关。特别是 *H-2M3* 基因(不要同 *Mhc*-Ⅱ *H-2Ma* 和 *H-2Mb* 基因混淆，这两种基因编码人 HLA-DMA 和 HLA-DMB 蛋白的类似物)，它定位于 *Q* 和 *T* 区的远侧端，编码一种蛋白质，这种蛋白质表现出有结合含 *N*-甲酸基 N 端修饰肽的倾向，这是一种与细菌、原生动物和线粒体抗原有关的抗原呈递功能[86~90]。

271

Mhc 多态性

Mhc 在免疫应答中的功能也体现在其基因的多态性中。多态性是指在特定时间内一个群体中出现比预期更多的遗传变异体数目的现象。由于群体变迁和进化，我们预期会出现遗传变异体，但由于一些遗传标志功能的限制，所以只有相对少量的这些遗传变异体能够持久存在。我们通常认为，多态性是指在任何时间，一个基因座有超过 1% 的等位基因就是变异体。一个多态性基因座或基因是一个拥有高频(不是指数量)遗传突变株的基因或基因座[2]。一个基因座是相对不变的，它常常被用相当不精确的词——单态性来称谓。*HLA* 基因表现出高度的多态性，对于此多态性的产生和维持现在已有许多不同的解释。其中之一是一系列

抗原呈递元件的的选择优势，这些抗原呈递元件允许源自大量不同环境病原体的抗原肽的结合与呈递。有限的多态性将使整个群体对一个机会感染病原体敏感，这种病原体将使所有个体都不能应答；而广泛多态性正是所期待的，这样就允许至少群体的一部分能有效地结合和呈递来自侵入的病原体的抗原。

人类 *Mhc* Ⅰ和 *Mhc* Ⅱ基因明显是多态性的，在每个已经鉴定的每个 *HLA-A*、*HLA-B* 和 *HLA-DRB* 基因座上有 50 个以上的等位基因[91]。在实验动物中，在这样的群体遗传水平更难证明其多态性，虽然野生小鼠的分型已经证实了从纯系及其突变株的分析中得到的这种印象[92]。*Mhc* Ⅰ和 *Mhc* Ⅱ基因的多态性在人和小鼠中已很明显，这种多态性也已在棘鳍类热带淡水鱼和从数亿年前定向于哺乳动物品系中分支而来的动物中的分析中得到了证明[93,94]。

Mhc 进化机制

由于一个扩展的基因区和一组基因有许多属于 Ig 超家族[95,96]，*Mhc* 现已作为促成一个多基因家族进化和增加经典 MHC 分子显性特征多态性的解释与理解原型[82]。小鼠中突变（主要是 *Mhc* Ⅰ基因）的分析已产生引起多态性机制的解释。基于大量动物的同胞皮肤移植的筛选，在小鼠中的突变已经鉴定。影响皮肤移植的接受或排斥的诱导和自发突变已经被鉴定，其中许多已定位至 *Mhc*。总的重组时间已经被证实[97,98]；同时更精细的突变也已得到证实，其中许多是在蛋白质中占相对小部分的多个氨基酸的替换，这种突变似乎来自单向交叉。这种出现在短序列中的单向重组事件就是常说的基因转换，因为相似的现象也出现在酵母中[99~105]。

小鼠中基因转换的机制现在已经比较清楚，因为核苷酸序列分析和寡核苷酸特异的杂交已用于检测已出现的突变和鉴定突变序列所在的 Mhc 基因。虽然精确的酶学细节还不太清楚，我们现在理解基因转换是一个遗传事件，它允许一个短序列从一个供体基因向一个受体的拷贝或转位。一些已经鉴定的多态性明显是点突变[106]。表 8.5 总结了大多数 *H-2* 突变和已经鉴定了的供体基因。除了这些小鼠突变体外，许多体细胞变异体和突变株也已有所记述，一些是由于较多的缺失或调节缺陷，其他则明显是结构基因的点突变[107]，$H2K^b$ 基因的三个突变株提示没有单个的供体基因可被鉴定是这些突变，这三种突变是在更大的 DNA 区域的复合突变。鉴定受体基因的 $H2K^{bm3}$、$H2K^{bm23}$ 和 $H2D^{bm23}$ 突变的实验证实这些复合突变一定是由于至少两个不同的供体基因所引起的[108]，它们先后起作用或有协同效应。

表 8.5　H-2 突变株

突变	改变的氨基酸	供体基因
K^{bm1}	E152A	*Q10*
	R155Y	
	L156Y	
K^{bm3}	D77S	
	A89K	
K^{bm4}	K173E	
	N174L	
K^{bm5}	F116Y	
K^{bm16}	F116Y	
K^{bm6}	F116Y	*Q4*
	C121R	
K^{bm7}	F116Y	
	C121R	
K^{bm9}	F116Y	*Q4*
	C121R	
K^{bm8}	F22Y	
	I23M	
	E24S	
K^{bm10}	T163A	*K1*

续表

突变	改变的氨基酸	供体基因
	V165M	
	W167S	
	K173E	
	N174L	
K^{bm11}	D77S	D^b
	T80N	
D^{bm28}	Q97W	
	S99Y	
$H\text{-}2^{dm1}$	D^d/L^d 重组	
$H\text{-}2^{dm2}$	L^d 缺失	

氨基酸替换和供体基因命名见参考文献[2]、[102]。

Mhc 和移植

272

虽然早期 *Mhc* 基因的描述是基于参与肿瘤和同种移植排斥的基因座的鉴定,以及这些 基因在这些复杂现象中所起的明显作用,但现在 *Mhc* 基因在免疫学中的功能的理解并不需要去理解移植本身。移植的早期历史已在许多书刊中有大量的记载[1,2],反映了在肿瘤免疫学和异系同基因小鼠品系的研究进展中的兴趣。对肿瘤、组织和器官移植研究得最广泛的物种是小鼠,所以对一些相关原理作一个简单的描述是顺理成章的。详细的手册和综述也可查阅[109]。一个小鼠品系通过兄妹间反复交配后,得到一个纯系小鼠,它们所有基因座基因都相同。关于兄妹交配所产生的所有基因座的纯系性过程的更完整描述可见于其他文献[1,2]。所有基因座的定置概率(P_{fix})作为世代数(n)的一个函数,可如下表示:$P_{fix} = 1-(7/8)^{n-1}$。所以,兄妹交配 5 代以后,所有基因座都相同的概率是 0.414;10 代后为 0.7;15 代后为 0.85;20 代后为 0.91。

异系同基因小鼠品系,也叫异系同基因抵抗或 CR 品系,是由两个组织相容性表型不同(如对可移植的肿瘤的抵抗或排斥皮肤移植物的能力)的纯系交配而来的。第一次交配后,这些动物连续与其中一个亲本回交,就使得抵抗表型保存下来。至少 10 次回交后(N10), 选择品系的基因$(1/2)^9 = 0.002$ 概率应该出现,这些新品系由兄妹交配而得以繁殖。通过这样的饲养方案,得到了大量的对 *Mhc* 的遗传研究很关键的品系。多个相关的纯系小鼠品系和 CR 品系,以及它们的 *H*-2 命名列于表 8.3。因为由兄妹交配所维系的品系可以因自发突变而在品系中积累遗传漂移,所以非常有必要记录这些动物所来自的祖先及其繁殖的代数,且不能同建系祖先进行回交。这在近年来特别受关注,因为来自不同品系[129]的各种不同胚胎干细胞系已经被用于遗传操作(基因敲除实验),而且在组织相容性方面有着显著的不同[111]。

早期移植准则是观察可移植的肿瘤或同种移植物(通常来自于皮肤)在特定纯系小鼠品系宿主中存活的能力。移植物排斥现象是一个特别敏感和特异的生物检测方法,它允许小至 MHC 蛋白中单个氨基酸的遗传差异得以鉴定。它在评价自发性和诱导性突变株(见上述讨论)和保持作为组织相容性的绝对实验方法方面特别重要。

Mhc 和疾病

除了移植物接受的控制和免疫应答,*Mhc* 在人体中许多疾病病因学方面的作用很多年前就已经被认识到,其中许多疾病是天然的自身免疫性疾病[112,113]。人类的多个疾病与 *Mhc* Ⅲ 类基因有关,因为一些酶的结构基因定位于本区域[114],这些酶参与肾上腺类固醇的生物合成途径(即 21-羟化酶)。超过 40 种疾病已经确定是同 *Mhc* 基因连锁[113,135],最重要的总结在表 8.6 中。大多数这些疾病同特定 *Mhc* 单体型的关系的精确的潜在机制还不清楚,但已经提出了多个模型,包括微生物的抗体同特定 MHC 分子的交叉反应[116],和 T 细胞对病毒抗原分子模拟为自身抗原[117~120]。一些同某些 *HLA* 基因相关疾病非常高的发生率有助于诊断和对病人及其家庭的个别指导。多个这种疾病值得特别注意,因为 100%的嗜眠发作病人有 *HLA-DR2*(*HLA-DQB1**

0602[121,122])，如疑为这种疾病则可用 HLA 分型来证实。强直性脊椎炎是同 *Mhc* Ⅰ类等位基因 *HLA-B27* 和一些细菌病原体的存在特别相关，以致现在普遍认为一些强直性脊椎炎是由于 HLA-B27 呈递的细菌抗原激活了特异的 T 细胞，这些 T 细胞然后启动了一个炎症性级联反应。*HLA-HFE*（人的一种 *MhcIb* 基因）的特异突变等位基因同家族性血色病（一种铁超负荷疾病）强烈相关[123]。虽然这些显然突变的 *HLA-HFE* 等位基因同这种疾病病原体之间的精确的关系还不清楚，但是对于一种诱导的 β_2m 缺陷的纯合小鼠，鼠 HLA-HFE 同源体的表达可能也是缺陷的，且也有血色素沉着病，这一点非常有趣[124,125]。因此，两条证据直接指向在避免出现铁超负荷中起关键作用的 β_2m 组装和表达于细胞表面的分子。虽然同胰岛素依赖型糖尿病相关的不同 *HLA*-Ⅰ和 *HLA*-Ⅱ类等位基因的数目明显显示这种相对普通的疾病有一个复杂的病因学，但是在突变的非肥胖性糖尿病（nonobese diabetic，NOD）小鼠中[126~130]的一个新型 *Mhc* Ⅱ单体型的鉴定和特异 TCR 可以导致疾病[131]的识别，提示对一个普通的自身或环境抗原的交叉反应可能在这种疾病的病因学中也有重要作用。

表 8.6 HLA 疾病相关性

疾病	抗原	种族	频率[a]	
			病人	对照
嗜眠发作	HLA-DR2	C	1.0	0.22
		O	1.0	0.34
强直性脊椎炎	HLA-B27	C	0.89	0.09
		O	0.81	0.01
		N	0.58	0.04
Reiter 氏病	HLA-B27	C	0.47	0.10
胰岛素依赖型糖尿病	HLA-B8	C	0.40	0.21
	HLA-B15	C	0.22	0.14
	HLA-DR3	C	0.52	0.22
	HLA-DR4	C	0.74	0.24
	HLA-DR2	C	0.04	0.29
	HLA-DRB1*0301	C	0.54	0.27
	HLA-DRB1*0401	C	0.59	0.25
	HLA-DQA1*0301	C	0.85	0.35
	HLA-DQB1*0302	C	0.81	0.23
风湿性关节炎	HLA-DR4	C	0.68	0.25
		O	0.66	0.39
		N	0.44	0.10
霍奇金病	HLA-A1	C	0.40	0.32
	HLA-DRB1*1104[b]	C	0.058	0.013
血色沉着病	HLA-A3	C	0.76	0.28
银血病	HLA-Cw6	C	0.87	0.33
乳糜泻	HLA-DR3	C	0.79	0.26
多发性硬化症	HLA-DR2	C	0.59	0.26

C，白种人；O，亚洲人；N，黑人。

[a]给出的频率是至少有一个拷贝的指定等位基因的所有个体总的基因型频率。包括纯合和杂合个体。

[b]在这种情况下，频率是基于等位基因频率，而不是基因型频率。

摘自文献[113]。

H-2 基因座突变

在过去 25 年间，*H-2* 基因座的突变已大量的通过皮肤移植来筛选的动物中得到鉴定[132,133]。通过同胞之间尾部皮肤移植实验，鉴定了自发或诱导的突变动物，它们表现出获得、丢失或获得加丢失移植表型。获

得型突变动物表达一个新的移植抗原,所以它们的皮肤被其未突变同胞排斥;丢失型突变丢失了一个移植抗原,所以它们会识别其同胞皮肤为异物而加以排斥;获得加丢失型突变在这两方面都有影响,它们排斥同胞皮肤,而自己的皮肤也会被同胞排斥。在跨越很长一段时间的一系列杰出实验中,Melvold、Kohn 及其同事筛选了大量的小鼠后代。纯合的同系和 F_1 代动物被用于检测,在 *K*、*D*、*L*、*Ab* 基因座鉴定了总共 25 个突变,另外在非 *H-2* 组织相容性基因上发现了 80 个突变。虽然早期研究提示所有 *H-2* 基因可能是高突变的,但是可使用数据更完整的回顾性评价显示除了 $H\text{-}2K^b$ 基因外,其他 *H-2* 基因的自发突变率同非 *H-2* 基因相比不相上下[134]。这些突变动物的检测首先是基于 H-2 蛋白的肽图和氨基酸序列[135~138],后来则基于克隆的 cDNA 或基因的核苷酸序列[101,102]。这些突变动物的检测提供了一些随后的结构和功能研究以及基因进化的机制研究赖以为基础的基本生化信息。

273

MHC 分子表达

MHC 分子在 ER 中合成并表达到细胞表面,在其作为可用于同 T 细胞或 NK 细胞相互作用的受体而完成其最后定位前要在很多个步骤中受到调控。MHC Ⅰ类分子应被看作是三聚体,含有多态性重链、轻链(β_2m)和装配好的自身肽。MHC Ⅰ类分子的生物合成中有许多步骤,调控几乎可以在每一步施加影响。另外,由于脊椎生物的免疫系统和能快速适应的感染性病原体间不间断的斗争,Ⅰ类分子生物合成和表达中的许多步骤都可以被病毒编码的蛋白质所抑制。

MHC Ⅰ表达的一级水平的控制是基因控制,即一条特定链的基因一定要以三聚体的形式表达呈现。当然,这对 β_2m 是最适合的,因为它是复合体必需的轻链。诱导的 β_2m 缺陷的动物 ($B_2m^{o/o}$)[139~141] 缺少正常水平的 MHC Ⅰ的表达,虽然其他一些分子可被检测出。

MHC Ⅰ表达控制的二级水平是转录,而 IFN-γ 的调节特别重要[142]。通常,MHC Ⅰa 类分子被广泛表达,而更限制性的组织特异的 MHC Ⅰb 表达的基础则仅仅刚开始探究[143~145]。其在胎儿的母亲耐受中潜在的作用,使人们对胎盘中 HLA-E 和 HLA-G 的表达调控有很大的兴趣。

剩下的 MHC Ⅰ类生物合成途径是依赖于蛋白酶体产生合适的胞质蛋白、由 TAP 将其转运至 ER、在 ER 中适当的核心糖基化、通过高尔基体转运和抵达质膜[146]。许多顽固的病毒已经进化出了破坏此途径的机制。单纯疱疹病毒编码一个蛋白质,ICP47,它封阻 TAP 活性[147~149]。人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)编码的两个蛋白质,US2 和 US11,可导致 MHC Ⅰ蛋白分子的快速降解;另外一个 HCMV 蛋白,US18,同 MHC Ⅰ分子有序列相似性,可通过限制 β_2m 的有效使用而影响正常 MHC Ⅰ的功能。US18 效应的精确机制目前还存在争论。多个病毒,包括鼠 CMV[150]、腺病毒 2[151] 和 HCMV 也有能阻断折叠并已组装的 MHC Ⅰ类分子从 ER 到高尔基体的转运功能的基因。

274

MHC Ⅱ分子也对多步骤的调节敏感。MHC Ⅱ表达的明显组织依赖性——MHC Ⅱ类分子通常位于细胞表面,这些细胞有特异的抗原呈递功能,如巨噬细胞、树突细胞、朗格汉斯细胞、胸腺上皮细胞、B 细胞和人或大鼠活化的 T 细胞上——提示转录调节可能扮演着重要作用。*Mhc* Ⅱ基因启动子活性的大量研究已经确定了许多特异转录调节序列[152]。考虑到 MHC Ⅱ类分子在不同组织中的差异表达、MHC Ⅱ类分子缺陷性疾病如裸淋巴细胞综合征[153~156] 和目前 Th1 和 Th2 T 淋巴细胞亚群平衡作用的观点,导致一个挑战性的假说:MHC Ⅱ的差异表达和 Th1 与 Th2 所产生的淋巴因子的平衡对自身免疫性疾病的控制非常关键[157]。

MHC Ⅱ调节的一个特点是需要避免其肽结合位点在 ER 中结合自身肽,并需要运行到酸性内体区域,在那里获得由外源性蛋白降解而来的抗原肽。这两种功能由 II 型膜蛋白 Ii[32,158,159] 提供,它们形成九亚基复合体[含 3 个 Ii 和 3 个($\alpha\beta$)MHC 异型二聚体]。Ii 保护 MHC Ⅱ肽结合槽的区域是 CLIP,它是由 Ii 大量裂解而来,并最终在内体中由 HLA-DM 的帮助与在其中产生的肽交换从而从沟槽中释放出来。Ii 在调节 MHC Ⅱ表达中的重要作用通过诱导的缺少正常 Ii 的突变小鼠[160~162] 的特征而得到证实,这种小鼠表现出 MHC Ⅱ类功能和表达的严重缺陷。

MHC 分子结构

因为 MHC 分子的结构反映了它可以简单而完美地作为肽受体和 TCR 配体，我们将系统地描述 MHC Ⅰ和 MHC Ⅱ分子的已知结构，然后对其功能作一个详细的讨论。

氨基酸序列

在 *Mhc* 基因克隆前，人 MHC Ⅰ类分子、HLA-A2 和 HLA-B7，以及小鼠分子 H2-K^{b}[163,164] 的生化纯化和氨基酸序列测定提示 MHC 分子同免疫球蛋白在近胞膜区有相似性。早期研究主要集中于鉴定等位基因产物间的差异和不同基因座编码的蛋白质间的差异。随着 MHC Ⅰ类分子[99,165~167] 和随后的 MHC Ⅱ分子[168~171] 的 *cDNA* 和基因组的克隆，许多物种大量 MHC 分子的氨基酸编码序列迅速变为可以利用的资源。基因和 cDNA 结构的比较说明了基因内含子-外显子结构组成，并解释了 MHC 分子的进化，这种进化源自于一个单 Ig 结构域为一个单位的原始的单域结构（如轻链 β_2m），这些结构域再复制出 MHC Ⅱ链的基本单位（两个胞外结构域）和 MHC Ⅰ链（3 个胞外结构域）[82]。这种基因-外显子结构见图 8.3。因此，标准的 MHC Ⅰ分子有一条重链，其本质是Ⅰ型整合膜蛋白；含有分别称为 α1、α2 和 α3 的氨基端结构域；其疏水的跨膜结构域埋入胞膜；而羧基端尾部则伸入胞质。β_2m 是 MHC Ⅰ分子的轻链，是一个单结构域分子。（虽然 β_2m 不应认为是多态性分子，但在纯系和野生小鼠群体中确实已鉴定出了多个 β_2m 的等位基因[172]。）MHC Ⅱ分子有插入胞膜的两条链组成，α 链和 β 链，两链分别含两个主要的胞外结构域：α1、α2 和 β1、β2；这两条链分别同一个跨膜区和胞质区相连。所以，MHC Ⅰ和 MHC Ⅱ分子都是非共价结合的异型二聚体，各含四个胞外区；两个近膜区（MHC Ⅰ为 α3 和 β_2m；MHC Ⅱ为 α2 和 β2）为 Ig 样，另两个氨基端结构域为远膜端（MHC Ⅰ为 α1 和 α2，MHC Ⅱ为 α1 和 β1），非 Ig 样。MHC Ⅰ和 MHC Ⅱ的 α1 区缺少链内其他胞外结构域特征的二硫键。MHC Ⅰ分子的胞质结构域可以通过剪接和磷酸化来调节，可能对细胞表面的稳定性和分子循环入胞内有作用[173~176]。MHC Ⅱ跨

275

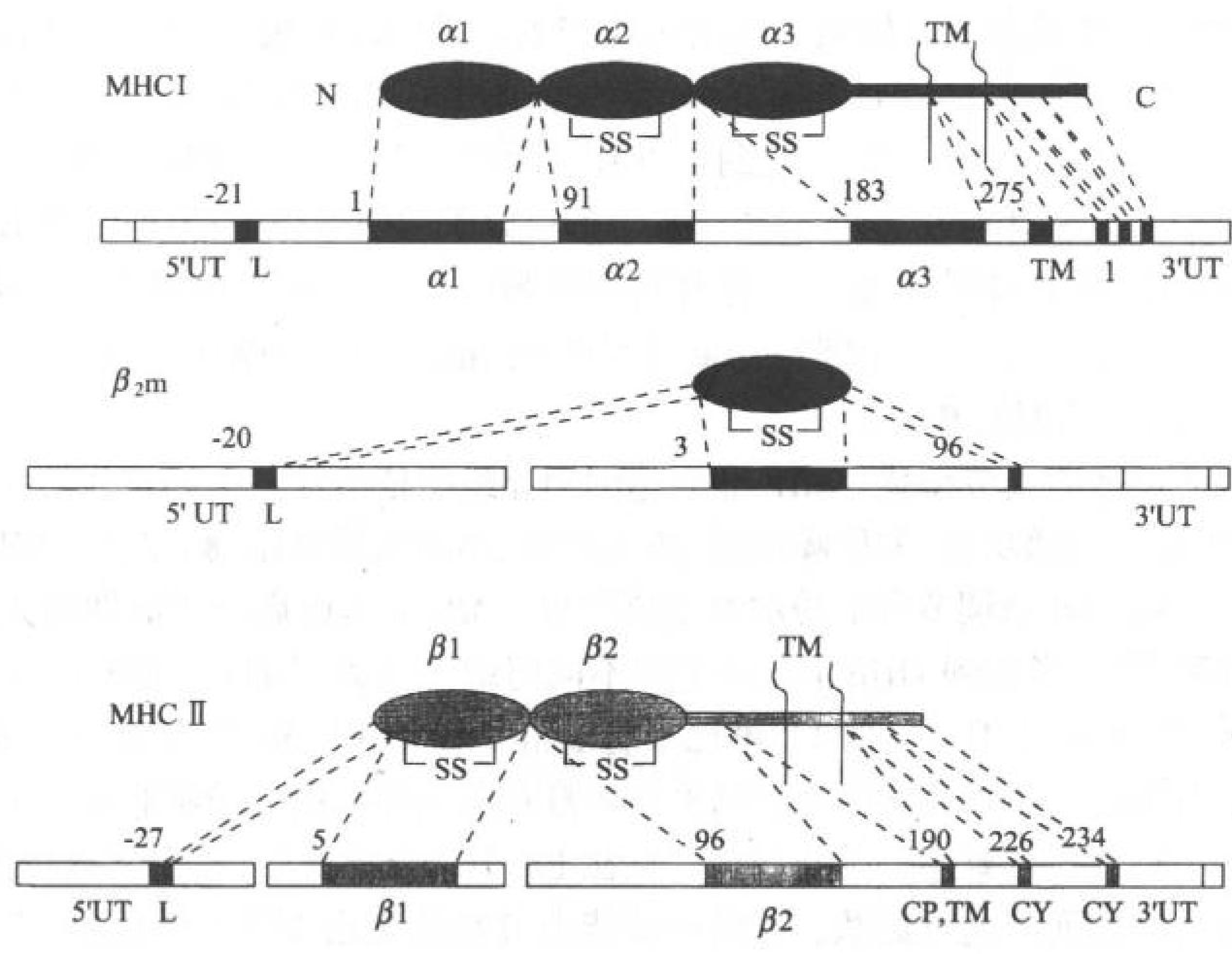


图 8.3　*Mhc* 基因和蛋白质的基因-外显子对应关系。图中显示了 MHC Ⅰ重链、β_2m 和 MHC Ⅱ β 链和其对应的基因结构区域的关系。上面显示蛋白质，下面显示 5′非翻译区（5′UT）下游的基因。重链的 α2 和 α3 结构域、β_2m 和 MHC Ⅱ β 链内有二硫键。（MHC Ⅱ α 链的 α1 结构域内没有二硫键）。（改编自参考文献[263]。）

膜和胞质区对细胞表面表达水平、抗原呈递效率、胞膜分子的侧向扩散速率有明显的作用[177]。MHCⅠ和MHCⅡ蛋白的氨基酸序列排列,特别是人的MHC分子,有许多数据库可以利用(http://histo.cryst.bbk.ac.uk/; http://immuno.bme.nwu.edu/)。

意识到MHC分子由标准外显子结构所编码后,许多实验室开始探索通过在体外制备含有编码基因的各种重组体来转染适当的细胞,然后分析所表达的蛋白质以研究MHC分子的结构与功能的关系。

这些早期研究使血清学表位[178,179]、单克隆抗体识别位点的作图,以及各种MHC限制性应答的作图成为可能,如allospecific或抗原特异的CTL的识别[180,181]。这些实验总的结果是MHC分子的膜外侧端,也就是MHCⅠ分子的$\alpha1$和$\alpha2$结构域,一起形成一个用于被T细胞识别的功能性元件。用木瓜蛋白酶从组织培养细胞裂解而纯化出来的MHCⅠ分子如HLA-A2三维结构的确定,可以对这些发现的重要意义有一个更清楚的理解[182,183]。

图8.3显示了编码MHCⅠ或MHCⅡ分子的基因同所编码蛋白质之间典型关系。对于*Mhc*Ⅰ基因,只有一个转录单位(外显子)编码5′-非翻译区和表示蛋白质将运往ER腔的信号肽。这个外显子被拼接到编码蛋白的第一胞外区编码区。这个第一胞外区外显子约270个核苷酸,编码第一区($\alpha1$结构域),约90各氨基酸残基的长度。第三外显子编码第二胞外结构域($\alpha2$结构域),第四外显子编码第三胞外区(结构域$\alpha3$结构域)。*Mhc*Ⅰ基因的跨膜外显子编码MHC蛋白的跨膜区,其余基因编码多个小外显子,它们有不同的拼接方式,可能是磷酸化位点以及在MHC分子循环到细胞表面的过程中起作用。

类似地,*Mhc*Ⅱ基因显示了一个相应的外显子结构域,只是MHCⅡ分子的每一条多肽链有两个细胞外结构域[α(或a)链的$\alpha1$和$\alpha2$区;β(或b)链的$\beta1$和$\beta2$区],两条链均有跨膜区。

MHC分子结合肽的鉴定

多年来许多不同的证据合并在一起证实了MHC分子通过结合肽而起作用。功能性实验显示对蛋白抗原的MHCⅡ限制性T细胞应答是依赖于肽片段的[184]。MHC-肽相互作用的第一个直接证据为纯化的MHCⅡ蛋白能以一种特异的、可饱和的、稳定的方式和适度的亲和力结合合成肽[185,186]。对于MHCⅠ分子,这些结果在最开始不是很清楚,但后来实验显示,一些缺失MHCⅠ分子表面表达的细胞系在暴露于适当的肽后可被诱导出较高水平的表面MHCⅠ分子的表达[187,188],就产生了直接测量MHCⅠ肽结合的方法[189]。

多个实验室已成功地开发出同MHCⅠ分子共纯化的肽的部分纯化和鉴定方法。鉴定源于一个病毒、可由MHCⅠ分子H-2K^{b}结合的肽的一个方法是,从感染的细胞中获取MHC分子,用细胞毒性T细胞实验鉴定一个功能性生物活性峰,然后再用放射化学技术确定所获得肽的氨基酸序列[190]。另一个通过独特的MHCⅠ分子来鉴定病毒源性肽和自身肽基序的方法是,首先用合适抗体分离大量去污剂增溶的MHCⅠ分子,洗脱结合肽,RP-HPLC部分纯化,最后用经典的Edman降解法确定结合肽的氨基酸序列[191~193]。对这些衍生于MHCⅠ的肽的研究所得出的没有料到和另人惊讶的结果是:特定氨基酸残基对肽序列的特定位置有倾向性,这取决于从其中获得肽的MHCⅠ分子;结合肽的长度是确定的,并且很短,8~10个氨基酸残基长度范围。通过这些实验,鉴定出了结合到特定MHCⅠ分子和等位基因产物上的肽的大量肽基序。更精细的方法学包括应用质谱仪来鉴定个别的肽及其序列[194]。其他用来鉴定肽基序的替代方法包括用可溶性MHCⅠ分子类似物来简化肽的纯化[195,196],或用肽展示文库来鉴定可结合到MHC分子的肽[197]。表8.7给出了MHCⅠ肽基序的简要概括。正式的网上数据库为http://wehih.wehi.edu.au/mhcpep/[198,199]。基于目的蛋白的氨基酸序列预测MHCⅠ限制性肽候选物的运算法则在网上可以利用(http://www-bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla-ind/index.html)[200]。MHC限制性肽基序残基和锚着残基间有重要差别。基序指基于已显示能结合某个MHC分子或同其共纯化的自身性或抗原性肽的序列而鉴定出的氨基酸残基。锚定指同MHC分子自身的某个特殊部分相互作用的特定氨基酸残基的生物物理学功能。因此,作为一个锚点的一个基序残基的排列定位需要X射线结晶学的结构证实或基于一套替换的合成肽而进行的广泛的结合研究。

表 8.7 一些 MHC Ⅰ 分子的肽结合基序[a]

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
HLA-A*0101		DE							Y
HLA-A*0201		LM							V
HLA-A*0301		LM							YK
HLA-A*1101									K
HLA-A*3101		LVYF	FLYW			LFVI			R
HLA-B*0701		P							LF
HLA-B*0801			KR		KR			L 或	LI
HLA-B*2702		R							FY
HLA-B*2705		R							LFK
HLA-B*5301		P							LIVMYF
H-2Kb			,Y	FY				LMIV	
H-2Kd		V							IL
H-2Kk		ED							LFM
H-2Db		M			N				MIL
H-2Dd		G	P						LIF
H-2Ld		P							FLM
Qa-2							H		LIF
H-2M3	*N*-甲基-蛋氨酸								

[a]表中所示 MHC Ⅰ 分子的肽结合基序用单氨基酸编码表示。位置代码表示肽序列中离氨基端的氨基酸位置。表中只显示最常用的残基。这些基序更详细的综述请见参考文献[271]。

276

通过应用于 MHC Ⅰ 分子的生化方法对 MHC Ⅱ 结合的自身或抗原性肽的鉴定是很困难的,因为 MHC Ⅱ 分子似乎不需要像 MHC Ⅰ 分子那样对结合肽的氨基端和长度有严格的要求。MHC Ⅰ 分子结合在特定位点有特定基序残基的肽,从而甚至在肽混合物中能在 Edman 降解某一步鉴定出优势残基。但是 MHC Ⅱ 分子结合末端参差不齐的肽,所以从对混合肽的测序中很少能获得有用的信息[201~204]。用噬菌体展示技术可以鉴定 MHC Ⅱ 肽结合基序[205]。同 MHC Ⅱ 分子呈递源于外源性途径的肽的观点一致,很多同 MHC Ⅱ 分子共纯化的肽是来自于培养细胞的胞外环境。表 8.8 给出了 MHC Ⅱ 肽基序的简要概括。

表 8.8 一些 MHC-Ⅱ 分子的肽结合基序[a]

位置[b]	i (P1)	i+1	i+2	i+3 (P4)	i+4	i+5 (P6)	i+6	i+7	i+8 (P9)	i+9
DRB1*0101	FYWLVI			LM		SAG			LAVI	
DRB1*0301	IYLVFM		AI	NQEDK		KIRHEQ			YLF	
DRB1*0401	YFWMVL			MALV		TSVLIM	LQMN [KR]		[DERK]	
DRB1*0405/B4*0101	Y					VT			D	
DQA1*0501/B1*0301	FYIMLV				VLIMY	FLYMYLA			VY1	
IAb	NQD						P			
IAd	VILA	Q				ASG				
IAs	ITVF	TSA					HR			
IEb	Y	LV	YI					RK	RH	YF
IEd	H 或	R 或	R	HR	DERK	RK				
IEk	ILWV	疏水	疏水	ATQEN					KR	

[a]MHC Ⅱ 肽结合基序。这些数据来自更详细综述文献[271]。

[b]如上所示,肽的位置是相对的,i 为应位于口袋 P1, i+1, P2 等中的氨基酸残基。

高解析度结晶学结构

MHC Ⅰ类分子

Bjorkman 及同事制作了 MHC 分子的组成和功能关系的示图[182,183]，他们通过 X 射线结晶学方法确定了人类 MHC Ⅰ分子——HLA-A2 的三维结构。这些分子是通过用木瓜蛋白酶裂解组织培养细胞表面分子的胞外区部分而纯化出来的，这在当时并没有受到足够的重视，不管是分子组装体中肽的作用，还是 TCR 识别的 MHC 分子本质。在解释电子密度图中最重要发现是，哪部分密度，也就是哪部分结构，是由于 MHC 分子紧密结合的肽的异源结合引起的；这种密度不能基于已知的 HLA-A2 氨基酸序列来建模。彩图 8.1 对此有图解。图 A 显示 MHC Ⅰ分子俯瞰分子表面图像（蓝色），没有另外的结合肽的密度；图 B 显示同样表面图像，但有结合肽所赋予的密度（红色）。

277

这种最初的 MHC Ⅰ分子结构澄清了 MHC Ⅰ分子执行其肽结合功能的机制的多个重要方面的情况。MHC Ⅰ重链的氨基端结构域（α1 和 α2）形成肽结合位点。这包含由 8 条反向平行的 β 片层形成的一个层面，它支撑着两个 α 螺旋，其中一个由 α1 结构域形成，另一个由 α2 结构域形成，且它们是反向平行排列的。近膜区的 α3 结构域有着同免疫球蛋白结构域类似的折叠，并同 β_2 微球蛋白分子的免疫球蛋白结构域非对称地配对。通过比较那些在 T 细胞识别中为重要组成部分的已鉴定过的氨基酸残基的位置、显著相关的等位基因产物的残基和已鉴定负责 H-2K^b 系列突变体的移植排斥的氨基酸残基[206]，对 T 细胞的识别本质有重要的提示。负责 T 细胞识别的 MHC Ⅰ分子的氨基酸残基可分成两类，或功能有重叠：一些残基位于 MHC 分子上面，暴露于溶剂，用于同 TCR 直接作用；另一些残基的侧链指向肽结合沟槽，可能在特定 MHC 分子的肽结合特异性中有重要功能。最初的研究报告是基于 3.5Å 分辨率所确定的结构，主要关注 MHC 分子的结构轮廓。图 8.4 显示了 α1/α2 结构域肽结合单元的 α 碳原子的位置和编号。HLA-A2 带状图侧面观（彩图 8.2A）和俯瞰图（彩图 8.2B）显示了这种分子的整个结构是怎样构成的：肽结合位点由 β 片层层面所支撑，后者又由两个免疫球蛋白样结构域所支撑。

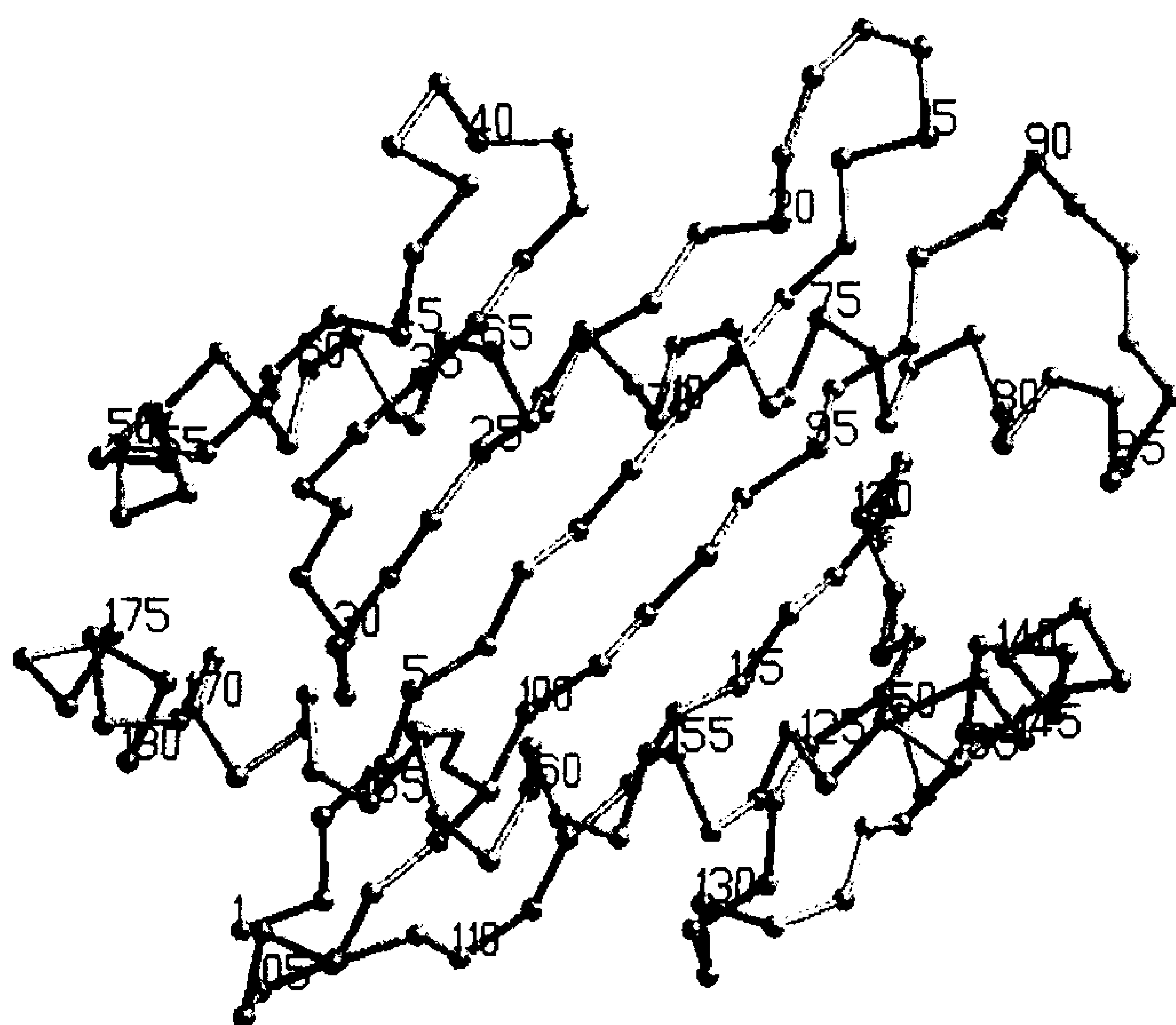


图 8.4　HLA-A2 的 α1 和 α2 结构域的 α 碳骨架。这是蛋白质数据库（PDB）文件 3hla[208] 的俯瞰图，用 SETER[264] 展示。残基 1 和随后每 5 个残基都已编号。

这种结构及其更高解析度的结构同紧密相关的人 MHC Ⅰ分子——HLA-Aw68（现在已知为 HLA-A68，或更确切地称为 HLA-A* A68011，见表 8.1）结构的比较，提示在 MHC Ⅰ分子沟槽表面更低的位置，现在称为口袋 A-F，在同结合肽的一些侧链相互作用中有作用[207,208]。形成这 6 个口袋的氨基酸侧链见彩图 8.2C。这些

MHC Ⅰ结构是从组织培养细胞中纯化出来而确定的分子，它们含有异质性自身肽谱。同 MHC 分子的结构研究相平行，许多实验室开发了鉴定由特定 MHC Ⅰ分子结合的肽基序的能力（见上述 MHC 结合肽的讨论部分）。同人 MHC Ⅰ分子——HLA-B* 2705[209] 的 X 射线结构的确定相伴随，从该分子中获取的肽基序也已确定，使 MHC Ⅰ分子沟槽中结合肽更精确的建模成为可能[210]。对于 HLA-B27，这尤其显得有意思，因为在结合肽的第 2 位有过度出现的 Arg[210]。对 HLA-B27 的仔细研究提示，衬于 B 口袋的氨基酸残基，特别是在第 45 位的酸性谷氨酸和第 67 位的半胱氨酸，同肽的第 2 位的精氨酸长而带正电的侧链互补[209]。这些结构研究支持 MHC Ⅰ-肽结合的这样一种观点：结合肽的 C 端残基的侧链深深地位于 F 口袋中。另外，氨基端的氨基和保守的氨基酸 Tyr59 和 Tyr171 的羟基形成强氢键。保守的 Try147 的氨基同倒数第 2 位的肽氨基酸（通常为第 8 位）的骨架羰基氧形成的氢键似乎也很重要，肽的 C 端的自由羧基和 Tyr84、Thr143、Lys146 之间的电荷作用和形成的氢键也很重要。

278

MHC Ⅰ分子的其他结构取决于用同源性肽制备的复合物，这些复合物在体外用细菌中[211]或昆虫细胞中[212]表达的 MHC 蛋白同合成肽组装。用同源性肽确定的结构可用来证实用异源性自身肽所得到的结构。特别是，H-2K^b 分子同来源于仙台病毒、水泡性口炎病毒[213]或鸡卵白蛋白[214]的肽形成的复合物结构揭示，同样的 MHC 分子可以结合不同序列和结构的肽，这是因为这些肽保守的肽基序。虽然 MHC 分子在结合不同肽时可检测的变化很小，但同一个 MHC 分子结合的不同肽在识别时的主要区别是由肽所处的位置、前后残基的关系、肽的大小和肽的氨基酸侧链电荷决定的。

从最初的 X 射线衍射结构得到的并由通过 MHC 分子制备肽和早期结合实验补充的最为人们接受的规则是，MHC Ⅰ结合的肽必须将其 C 端氨基酸侧链埋入 F 口袋。但是更进一步的研究清楚地显示，MHC Ⅰ分子能结合更长的肽，这些肽的延伸超过了锚定在 F 口袋残基[215]。这可通过结晶学可视化这样一种复合体的结构而清楚地确定[216]。

MHC Ⅱ 结构

MHC Ⅱ分子结构的最初模型是基于氨基酸序列的排列和可利用的 MHC Ⅰ三维结构[217]。这种模型作出了很多正确的预测，这些预测在随后对 HLA-DR1[218] 结构的确定而得到支持。MHC Ⅱ分子清楚地显示同 MHC Ⅰ分子有相似的结构，通过并列的 α1 和 β1 结构域而形成其自己的结合沟槽。代表同 HLA-DR1 共纯化的异源性肽的电子密度已经被确定。彩图 8.3 显示了在 HLA-DR1 结构的范德华表面增加的共纯化肽的电子密度。同 MHC Ⅰ分子结构相比较（彩图 8.1），MHC Ⅱ分子结合肽延伸通过结合沟槽，而不是通过其两端来锚定。

彩图 8.4 显示了 MHC Ⅰ和 MHC Ⅱ分子结构的肽结合区的 α 碳骨架的比较。值得注意的是，这些结构很相似，不管结合结构域是由同一条链的 α1 和 α2 结构域组成（MHC Ⅰ），还是由来自两条链的 α1 和 β1 结构域组成（MHC Ⅱ）。彩图 8.5 显示人类 MHC Ⅰ和 MHC Ⅱ链的比较带状图解，图中显示了呈多态性氨基酸残基的位置，也显示了排列在肽结合沟槽中的局部氨基酸可变性所衍生的多态性现象。这提示 MHC 多态性对 MHC 分子，或作为结果的有机体，对不断变化的抗原环境的应答是必要的。

同 MHC Ⅰ一样，肽与 MHC Ⅱ分子间相互作用的细节的进一步理解来自于对同源肽制备的肽-MHC 复合物的结晶学研究。第一例这种实验是对来自于流感病毒血凝素的抗原肽和 HLA-DR1 复合物的研究[219]。彩图 8.6 显示结合在 HLA-DR 分子表面结合肽俯瞰图（图 A）和侧示图（图 B）。基于这种结构，对一套口袋进行了命名，对肽结合位置进行了编号。对于本例子中研究的流感肽，彩图 8.7 显示了主要的相互作用来自肽的第 1、4、6、7 和 9 的位置。深深的 P1 口袋容纳 Tyr（肽 PKYVKQNTLKLAT 的第 3 位置），图中所示的第 4、6、7、9 口袋分别容纳 Q、T、L 和 L 残基。MHC Ⅱ在结合方式上同 MHC Ⅰ相似，但也显示了重要的不同：MHC Ⅱ不需要肽游离的 N 端和 C 端，肽以相对延伸的构象结合（类似于Ⅱ型脯氨酸螺旋的构象），并且在衬于结合槽中的保守氨基酸和肽的主链原子之间可以形成大量的氢键。

MHC Ⅱ结构中最令人激动的发现是该分子显示为二聚体中的二聚体，这推动着许多研究人员考虑这种

可能性：T 细胞通过其受体的活化可能需要 TCR 的二聚化或多聚化，一个被认为是依赖于 MHC-肽复合体自身二聚化的倾向性事件。这种二聚体简图见彩图 8.8。有多个论据支持这种二聚化假说：在多个不同实验室中制备出了 HLA-DR 二聚体中的二聚体结晶[218~220]；TCR V_α 形成紧密的二聚体，并在其结晶中形成了二聚体中的二聚体[221]；能够从 B 细胞中免疫沉淀 MHC Ⅱ 二聚体[222]；在一个体外系统中，T 细胞的刺激需要 MHC Ⅰ 分子的二聚化[223]；准弹性光散射检测显示，MHC Ⅱ -肽-TCR 复合物在溶液中能形成更高级的多聚体[224]。然而，也有大量相反意见对这种假说提出疑问。除了 HLA-DR1 外的其他 MHC Ⅱ 分子也已经被制备成结晶，但在这些结晶体中似乎没有形成相似的二聚体中的二聚体[225]。用 X 射线晶体学检测过的 MHC Ⅰ 分子中，没有一例显示同已报道过的 MHC Ⅱ 一样相同方位的二聚体。即使在高浓度条件下，不同的 V_α 不能形成二聚体[226]。报道过的 TCR-MHC-肽复合物的 X 射线结构[227,228]没有显示二聚化。尽管是一个简图，可能需要另外的实验来了解 T 细胞通过 αβ TCR 而活化的拓扑需要。

MHC Ⅰ b 分子

279

至此，我们对 MHC Ⅰ 分子的描述集中在以人 HLA-A、HLA-B、HLA-C，和以小鼠 H-2K、H-2D 和 H-2L 为代表的经典分子上。有两组相关的 MHC Ⅰ b 分子，它们的三维结构已经确定，特别令人感兴趣的是：CD1 分子[229]和 H-2M3[90]。H-2M3 特别值得注意，因为它能结合并呈递含氨基端 *N*-甲酰基的肽抗原。H-2M3 最初被鉴定为 MHC Ⅰ b 分子是因为它呈递来自线粒体编码蛋白 ND1 的内源性肽。ND1 被称为母方传递因子(maternally transmitted factor, MTF)[230]。因此，从结构上来说，理解这种分子怎样结合这种 *N*-甲酰化的肽是非常有趣[231]。H-2M3 同 *N*-甲酰化 9 肽(fMYFINILTL)形成的复合物的晶体结构显示 A 口袋的结构是显著不同的，它在 MHC Ⅰ a 分子是高度保守的，并含有 Tyr7、Tyr59、Tyr159、Try167 和 Tyr171，因此，它能在 A 口袋容纳 *N*-甲酰基。特别是，H2-M3 在第 167 位有 Leu，在 171 位有 Phe，由于 Leu167 侧链方位，A 口袋的大小显著缩小，导致甲酰化肽的氨基端氮定位于肽的第二位氨基氮本应该在 MHC Ⅰ a 分子中的位置。因此，H-2M3 独特的肽选择性从结构上是可以解释的。

另一个很有趣的 MHC Ⅰ b 分子是 CD1，它是定位于 MHC 之外的一组 MHC Ⅰ 分子的典型代表，有限制性组织特异性表达，并且似乎能够同 αβ 和 γδT 细胞相互作用[229]。在人类，CD1b 和 CD1c 已显示能呈递非肽的分枝杆菌细胞壁成分，如含有脂质和脂质阿拉伯树胶酸甘露糖脂多糖的霉菌酸[232,233]，一个次要的 T 细胞亚组被认为对 CD1 是限制性的[234]。因此，小鼠的 CD1d1 的晶体结构被确定了[235]，它同人的 CD1d 相对应，并显示了一个典型的 MHC Ⅰ 结构，有同 MHC Ⅰ a 分子极为相似的骨架 α 碳的折叠。同其结合含脂质疏水分子的表观生物学功能相对应，它的结合沟槽同 MHC Ⅰ a 和 MHC Ⅱ 分子相比更窄和更深。彩图 8.9 显示了 CD1 的 α1α2 结构域结构的主链构象，以及它同 H-2K^b、HLA-DR1 和另外一个 MHC Ⅰ b 分子 FcRn，一个新生成的 Fc 受体的比较。为了获得 MHC Ⅰ a、MHC Ⅰ b 和 MHC Ⅱ 分子的多个实例的的肽结合沟槽的形状和电荷分布的三维结构的理解，Zeng 等[235]用映射到结合区表面的静电势展示了结合区的表面图像(彩图 8.10)。尽管基于 α 螺旋之间距离的入口较窄，但由于其深度，CD1 分子仍是最大的沟槽。沟槽的深度起因于口袋的合并，并形成所谓的 A 和 F 口袋，以代替 MHC Ⅰ a 的 A-F 口袋。这种 A 口袋的大小约为一个特异脂质结合蛋白结合位点的大小。作为比较，图中也显示了 H-2M3 沟槽，它有一个含少量电荷的 A 口袋和深深的 B、F 口袋。H-2D^b[236]是 MHC Ⅰ a 分子的一个例子，显示了该群分子中的电荷分布是如何不同，对 HLA-DR1 的描述揭示了那里的侧连口袋的深度。FcRn(见下文)的非常窄的沟槽缺乏足够的空间来容纳一个肽抗原。

MHC Ⅰ b 分子的另一个例子是新生成的 Fc 受体，它之所以值得注意是因为它是 MHC 分子一个新功能的一个实例。它在大鼠中最先被描述为肠上皮的一个分子，其作用涉及从肠腔将初乳转运到血液[237,238]，小鼠和人类的同源分子也已经被发现[239~241]，大鼠中的该分子已经通过结晶照相术鉴定过[242]。就像 FcRn 同 MHC Ⅰ 蛋白的氨基酸相似性所提示的那样，三维结构也揭示了同 MHC Ⅰ a 分子极大的相似性[242]；特别是，尽管如上所讨论，在 MHC Ⅰ a 分子中本应为肽结合沟槽的结构被紧紧地关闭，并缺少足够的空间来容纳一个配基，但 α1 和 α2 结构域同 MHC Ⅰ 分子有着相似的拓扑学。彩图 8.11 显示了 FcRn 和 Fc 复合物的较低分辨率

结构中该分子最令人兴奋的特性[243]，FcRn 有 MHC Ⅰ 样的折叠，并将其功能转移到同 Ig 的 Fc 相互作用上。典型地被认为位于肽结合沟槽右侧的氨基酸同位于 CH2 和 CH3 之间的 Fc 界面相接触。在 FcRn/FcR 共结晶中，存在一个相互作用的网络，提示在两个平行的膜上的分子相互作用的可能性，例如可能存在于肠上皮细胞的微绒毛上的表面，此处为分子所表达的位置。FcRn 可作为在免疫系统中被转变为另一目的的相似结构的一个杰出的例子。由于观察到在因为 β_2m 的诱导缺失、FcRn 的正常表达缺失且血浆 Ig 代谢异常的动物中，Ig 的血清半衰期的不同从而使 FcRn 的重要性得到加强[244]。

MHC 分子-配体复合物

我们的结构-功能概览将用对 MHC Ⅰ 分子与共同受体 CD8、CD4 与 MHC Ⅱ 的相互作用，HLA-DR 与超抗原复合物的形成，TCR 与 MHC Ⅰ -肽复合物的相互作用等的简单描述而结束。每一个这种结构研究同相应的生物学实验相补充，后者导致了对理解这些免疫应答的结构基础重要性的正确评价。

CD8，MHC Ⅰ 限制性 $\alpha\beta$ T 细胞上的共同受体，作为两条 α 链的同型二聚体或 α、β 链的异二聚体的形式存在与一个细胞的表面。它们在活化成熟外周 T 细胞和 MHC Ⅰ 限制性淋巴细胞在胸腺中的发育中有重要作用[245]。这种双重功能似乎同基于 CD8 与 MHC Ⅰ 分子相互作用的黏附功能，以及其对 TCR 介导的信号传导作用有关。现在已经确定了人 MHC Ⅰ 分子 HLA-A2 同 pol 肽，以及一种可溶性重组人 CD8$\alpha\alpha$ 同型二聚体的三维结构[246]。这种结构有点令人惊奇。大量的 HLA-A2 的突变分析发现，在作细胞黏附分析中，α2、α3 结构域的氨基酸残基影响其同 CD8$\alpha\alpha$ 转染体的相互作用[247]。这导致作者推断，同 CD8 的相互作用促进了 MHC Ⅰ 分子的二聚化，这也是 T 细胞活化所必需的。虽然清楚地显示 CD8 同 MHC 的 α2、α3 结构域相互作用，但这种三维结构揭示 CD8$\alpha\alpha$ 同型二聚体形成了一个抗体样结合位点，其集中了 MHCI α3 结构域的一个暴露的肽环。这种相互作用见彩图 8.12，其中显示了嵌入 CD8 结合位点的残基 223 ~ 229 的柔韧的肽环。

280

CD4 为 T 细胞共受体，同 MHC Ⅱ 限制性抗原相作用，也已经成为详细结构研究的目标，这一部分是因为它是一个附着受体，另一方面它也是 HIV 的入口[248]。虽然 CD4 同 MHC Ⅱ 分子的复合物的 X 射线结构还不能应用，但 CD4 的 X 射线结构研究已经清楚地显示了这种分子的结构，它有 4 个串联的 Ig 样结构域，命名为 D1 ~ D4。这种分子完整胞外部分的结构测定显示在 D2 和 D3 结构域之间存在节段性弹性，结晶学和生物化学数据都显示在细胞表面出现了 CD4[249]。这些结果已经被解释成支持 CD4 介导的 MHC Ⅱ 依赖的二聚化在促进 TCR 二聚化和信号转导中的作用。

MHC Ⅱ 同诸如来自病菌等的超抗原相互作用，是 APC 约束的多价排列的超抗原呈递到含能结合超抗原受体家族或种类的受体的 T 细胞过程中的第一步[250]。来自于葡萄球菌肠毒素 B(staphylococcal enterotoxin B, SEB)与 HLA-DR1[220] 复合物和中毒性休克综合征毒素-1(toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1)与 HLA-DR1[251] 复合物的结晶结构分析显示两种毒素主要结合在 MHC Ⅱ 的 α 链上，且结合位点有重叠；也提示 SEB 结合不受 MHC 结合的特异性肽所影响，而 TSST-1 则要受影响。审视超抗原同 TCR β 链的复合物，Fields 等[252] 研制出了 MHC Ⅱ /SEB/TCR 完整复合物的模型。这种模型见彩图 8.13，它强调了一个由 MHC 呈递，主要同 α 链接触的分子怎样能够随后同 T 细胞上的 TCR 相作用。

最近的结构观测中最令人激动的事情是 MHC 分子同特异肽和 TCR 形成的复合物的 X 射线结构的解决。这已在两个系统中完成。小鼠 MHC Ⅰ 分子 H-2K^b 已经同一个特异肽 dEV8 和一个为 2C 的 TCR[228] 共结晶。结合 Tax 肽的 HLA-A2 MHC Ⅰ 分子已经与其同源的来自于 CTL 的 A6 TCR 共结晶[227]。这两种结构提供了 TCR 在 MHC-肽复合物中方位的基本情况。绘制在其各自 MHC-肽复合物中的 TCR 足迹见彩图 8.14。该图显示了对称地位于 MHC-肽复合物中的互补决定区位点。对于 2C/H-2Kb/dEV8 复合物(图 8.14A)，同 TCR 的 V_α 区的 CDR 相接触的区域位于结合槽中，同 V_β 区的 CDR 相接触的区域位于右侧。标记为 α3(即同 CDR3 的 V_α 接触的区域)和 β3，同 CDR3 接触的区域位于结合肽的中心，而 V_α 和 V_β 的 CDR1 和 CDR2 接触的区域位于周边。A6 TCR 在 HLA-A2/Tax 肽复合物中的足迹有点不同，因为虽然来自 V_α 的 CDR 的接触同其他 MHC/TCR 复合物中的类似，但 V_β 区的接触几乎完全归因于 CDR3。这可能部分因为这种特殊 TCR 相对长的

CDR3b。显然,TCR 同 MHC-肽复合物广泛的其他结构需要进一步确定以满足这种总的原则。

MHC 分子间的相互作用

尽管晶体结构提供了一个生动的 MHC 分子与其肽、FcRn、SA、CD8 和 TCR 配体相互作用的静态图解,但是这些结合的动态结合特征也可通过许多生物物理学方法获得[253]。在这里不详细讨论这些内容,但很有必要提出 MHC-肽复合体同 TCR 相互作用的亲和力和动力学已经在许多系统中用各种方法加以测定[224,254-261]。虽然不同 TCR 和不同 MHC-肽复合物的结合的亲和力和动力学存在明确的差异,但总的来说一致性的实验结论是亲和力介于低到中等(即 $K_d = 5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-7}$ mol/L),并以相对快速的解离速率为特征($K_d = 10^{-1} \sim 10^{-3}$/S)。虽然已有一些研究试图建立特定 MHC-肽复合体同特定 TCR 的亲和力和胸腺选择的结果或成熟 T 细胞的活化之间的联系,但这些应用得还不够广泛,所以目前还不能得出结论。

要点重述

Mhc 作为一个遗传区域和 MHC 分子作为免疫效应器的审视将我们的研究领域从小鼠带到人,从基因到其编码的蛋白质。更高等生物中的 *Mhc* 基因代表一个正在进行的进化事件的结果,在这个进化过程中,多细胞生物努力地同外部的和内部的生物和分子入侵者作斗争,在这一阶段,这种生物已经取得了很大的成功,因为它的免疫系统在检测入侵者并与之应答方面的成功。由 *Mhc* 编码的系统不仅调节对通过 MHCⅡ类途径呈递的可溶性外源性抗原的应答,而且控制对病毒和其他胞内感染病原体的反应,并且通过相同的机制对恶性转变特征的误调节蛋白表达的应答。虽然 MHCⅠ限制性抗原呈递过去常常被认为是 $CD8^+$ T 细胞的主要领域,但很清楚同一家族的分子也调节 NK 细胞的反应。像 Fc 受体一样起作用的能力提示 MHC 蛋白家族很不相关的成员可能也有某些功能,甚至是免疫系统之外的功能。由于我们在译解化学和生物学密码方面越来越有经验,但我怀疑我们将会知道大自然的想像力远比我们自己的活跃。

致谢

本章是为了纪念我的同事兼朋友 Sergei Khilko 而作。我也要感谢我实验室的成员,L. F. Boyd、R. Carey、D. H. Chung、M. Jelonek、K. Natarajan、D. Plaksin 和 K. Polakova,感谢他们在编写本章过程中的耐心;也要感谢 K. Natarajan 和 D. Eilat 对本章内容的评论。

(倪 兵 译)

参考文献

1. Snell GD, Dausset J, Nathenson S. *Histocompatibility.* New York: Academic Press, 1976.
2. Klein J. *Natural history of the major histocompatibility complex.* New York: Wiley-Interscience. 1986.
3. Benacerraf B, McDevitt HO. Histocompatibility-linked immune response genes. *Science* 1972;175:273–279.
4. Shevach EM, Rosenthal AS. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. II. Role of the macrophage in the regulation of genetic control of the immune response. *J Exp Med* 1973;138:1213–1229.
5. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 1974;248:701–702.
6. Shearer GM, Rehn TG, Garbarino CA. Cell-mediated lympholysis of trinitrophenyl-modified autologous lymphocytes. Effector cell specificity to modified cell surface components controlled by H-2K and H-2D serological regions of the murine major histocompatibility complex. *J Exp Med* 1975;141:1384–1364.
7. Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 1993;11:403–450.
8. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994;76:287–299.
9. York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996;14:369–396.
10. Karre K. Natural killer cells and the MHC class I pathway of peptide presentation. *Semin Immunol* 1993;5:127–145.
11. Yokoyama WM, Daniels BF, Seaman WE, Hunziker R, Margulies DH, Smith HR. A family of murine NK cell receptors specific for target cell MHC class I molecules. *Semin Immunol* 1995;7:89–101.
12. Schild H, Mavaddat N, Litzenberger C, et al. The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell* 1994;76:29–37.
13. Lyon MF, Rastan S, Brown SDM. *Genetic variants and strains of the laboratory mouse.* Oxford: Oxford University Press, 1996.
14. Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, et al. Nomenclature for factors of the HLA

system, 1996. *Hum Immunol* 1997;53:98–128.
15. Gorer PA. The detection of antigenic differences in mouse erythroctyes by the employment of immune sera. *Br J Exp Pathol* 1936;17:42–50.
16. Gorer PA. The role of antibodies in immunity to transplanted leukemia in mice. *J Pathol Bacteriol* 1942;54:51–65.
17. Duran LW, Horton RM, Birschbach CW, Chang-Miller A, Pease LR. Structural relationships among the H-2 D-regions of murine MHC haplotypes. *J Immunol* 1989;142:288–296.
18. Ceppellini R. *Histocompatibility testing, 1967.* Copenhagen: Munksgaard, 1967: 149.
19. Yoshino M, Xiao H, Jones EP, et al. Genomic evolution of the distal Mhc class I region on mouse Chr 17. *Hereditas* 1997;127(1-2):141–148.
20. Lindahl KF. On naming H2 haplotypes: functional significance of MHC class Ib alleles. *Immunogenetics* 1997;46:53–62.
21. Gruen JR, Weissman SW. Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood* 1997;11:4252–5265.
22. Stroynowski I, Lindahl KF. Antigen presentation by non-classical class I molecules. *Curr Opin Immunol* 1994;6:38–44.
23. Germain RN, Quill H. Unexpected expression of a unique mixed-isotype class II MHC molecule by transfected L-cells. *Nature* 1986;320:72–75.
24. Malissen B, Shastri N, Pierres M, Hood L. Cotransfer of the Ed alpha and Ad beta genes into L cells results in the surface expression of a functional mixed-isotype Ia molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3958–3962.
25. Spencer JS, Kubo RT. Mixed isotype class II antigen expression. A novel class II molecule is expressed on a murine B cell lymphoma. *J Exp Med* 1989;169: 625–640.
26. Matsunaga M, Seki K, Mineta T, Kimoto M. Antigen-reactive T cell clones restricted by mixed isotype A beta d/E alpha d class II molecules. *J Exp Med* 1990;171:577–582.
27. Natarajan K, Burstyn D, Zauderer M. Major histocompatibility complex determinants select T-cell receptor alpha chain variable region dominance in a peptide-specific response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:8874–8878.
28. Yewdell JW, Bennink JR. Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes. *Adv Immunol* 1992;52:1–123.
29. Boon T, van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183:725–729.
30. Heemels MT, Ploegh H. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 1995;64:463–491.
31. Cresswell P. Antigen presentation. Getting peptides into MHC class II molecules. *Curr Biol* 1994;4:541–543.
32. Cresswell P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 1996;84: 505–507.
33. Denzin LK, Hammond C, Cresswell P. HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J Exp Med* 1996;184:2153–2165.
34. Pierre P, Denzin LK, Hammond C, et al. HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. *Immunity* 1996;4:229–239.
35. Germain R. Immunology. The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 1986;322:687–689.
36. Yewdell JW, Bennink JR. The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. *Cell* 1990;62:203–206.
37. Brodsky FM, Guagliardi LE. The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 1991;9:707–744.
38. Connolly JM, Potter TA, Wormstall EM, Hansen TH. The Lyt-2 molecule recognizes residues in the class I alpha 3 domain in allogeneic cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* 1988;168:325–341.
39. Norment AM, Salter RD, Parham P, Engelhard VH, Littman DR. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature* 1988;336:79–81.
40. Salter RD, Norment AM, Chen BP, et al. Polymorphism in the alpha 3 domain of HLA-A molecules affects binding to CD8. *Nature* 1989;338:345–347.
41. Salter RD, Benjamin RJ, Wesley PK, et al. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature* 1990;345:41–46.
42. Doyle C, Strominger JL. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 1987;330:256–259.
43. Konig R, Huang LY, Germain RN. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 1992;356: 796–798.
44. Konig R, Shen X, Germain RN. Involvement of both major histocompatibility complex class II alpha and beta chains in CD4 function indicates a role for ordered oligomerization in T cell activation. *J Exp Med* 1995;182:779–787.
45. Luescher IF, Vivier E, Layer A, et al. CD8 modulation of T-cell antigen receptor-ligand interactions on living cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1995;373:353–356.
46. Sloan VS, Cameron P, Porter G, et al. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 1995;375:802–806.
47. Elliott T. Transporter associated with antigen processing. *Adv Immunol* 1997;65: 47–109.
48. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990;11:237–244.
49. Karre K. Express yourself or die: peptides, MHC molecules, and NK cells. *Science* 1995;267:978–979.
50. Rolstad B, Vaage JT, Naper C, et al. Positive and negative MHC class I recognition by rat NK cells. *Immunol Rev* 1997;155:91–104.
51. Newell WR, Trowsdale J, Beck S. MHCDB: database of the human MHC (release 2). *Immunogenetics* 1996;45:6–8.
52. Monaco JJ, McDevitt HO. H-2-linked low-molecular weight polypeptide antigens assemble into an unusual macromolecular complex. *Nature* 1984;309: 797–799.
53. Monaco JJ, McDevitt HO. The LMP antigens: a stable MHC-controlled multi-subunit protein complex. *Hum Immunol* 1986;15:416–426.
54. Martinez C, Monaco J. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature* 1991;353:664–667.
55. Monaco JJ. Genes in the MHC that may affect antigen processing. *Curr Opin Immunol* 1992;4:70–73.
56. Hill A, Ploegh H. Getting the inside out: the transporter associated with antigen processing (TAP) and the presentation of viral antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:341–343.
57. Howard JC. Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr Opin Immunol* 1995;7:69–76.
58. Yang Y, Sempe P, Peterson PA. Molecular mechanisms of class I major histocompatibility complex antigen processing and presentation. *Immunol Res* 1996;15:208–233.
59. Powis SJ. Major histocompatibility complex class I molecules interact with both subunits of the transporter associated with antigen processing, TAP1 and TAP2. *Eur J Immunol* 1997;27:2744–2747.
60. Spee P, Neefjes J. TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin. *Eur J Immunol* 1997;27:2441–2449.
61. Driscoll J, Brown MG, Finley D, Monaco JJ. MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* 1993;365: 262–264.
62. Nandi D, Jiang H, Monaco JJ. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J Immunol* 1996;156:2361–2364.
63. Livingstone AM, Powis SJ, Diamond AG, Butcher GW, Howard JC. A trans-acting major histocompatibility complex-linked gene whose alleles determine gain and loss changes in the antigenic structure of a classical class I molecule. *J Exp Med* 1989;170:777–795.
64. Livingstone AM, Powis SJ, Gunther E, Cramer DV, Howard JC, Butcher GW. Cim: an MHC class II-linked allelism affecting the antigenicity of a classical class I molecule for T lymphocytes. *Immunogenetics* 1991;34:157–163.
65. Powis SJ, Young LL, Joly E, et al. The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* 1996;4:159–165.
66. Simmons WA, Roopenian DC, Summerfield SG, et al. A new MHC locus that influences class I peptide presentation. *Immunity* 1997;7:641–652.
67. White PC, Chaplin DD, Weis JH, Dupont B, New MI, Seidman JG. Two steroid 21-hydroxylase genes are located in the murine S region. *Nature* 1984;312: 465–467.
68. White PC, New MI, Dupont B. HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:7505–7509.
69. Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, et al. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* 1993;72:847–856.
70. Lawton P, Nelson J, Tizard R, Browning JL. Characterization of the mouse lymphotoxin-beta gene. *J Immunol* 1995;154:239–246.
71. Ciccone E, Pende D, Viale O, et al. Involvement of HLA class I alleles in natural killer (NK) cell-specific functions: expression of HLA-Cw3 confers selective protection from lysis by alloreactive NK clones displaying a defined specificity (specificity 2). *J Exp Med* 1992;176:963–971.
72. Braud V, Jones EY, McMichael A. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol* 1997;27:1164–1169.
73. Grimsley C, Ober C. Population genetic studies of HLA-E: evidence for selection. *Hum Immunol* 1997;52:33–40.
74. Le Bouteiller P, Lenfant F. Antigen-presenting function(s) of the non-classical HLA-E,-F and -G class I molecules: the beginning of a story. *Res Immunol* 1996;147:301–313.
75. Wei XH, Orr HT. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum Immunol* 1990;29:131–142.
76. Schmidt CM, Orr HT. HLA-G transgenic mice: a model for studying expression and function at the maternal/fetal interface. *Immunol Rev* 1995;147:53–65.
77. Chorney MJ, Sawada I, Gillespie GA, Srivastava R, Pan J, Weissman SM. Transcription analysis, physical mapping, and molecular characterization of a non-classical human leukocyte antigen class I gene. *Mol Cell Biol* 1990;10:243–253.
78. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996;13:399–408.
79. Bodmer JG, Parham P, Albert ED, Marsh SG, Marsh SG. Putting a hold on "HLA-H". The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System [Letter; Comment]. Nomenclature for factors of the HLA System, update June 1996. *Nat Genet* 1997;15:234–235.

80. Mercier B, Mura C, Ferec C. Putting a hold on "HLA-H" [Letter; Comment]. *Nat Genet* 1997;15:234.
81. Klein J, Figueroa F. Evolution of the major histocompatibility complex. *Crit Rev Immunol* 1986;6:295–386.
82. Lawlor DA, Zemmour J, Ennis PD, Parham P. Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. *Annu Rev Immunol* 1990;8:23–63.
83. Margulies D, Evans G, Flaherty L, Seidman J. H-2-like genes in the Tla region of mouse chromosome 17. *Nature* 1982;295:168–170.
84. Pease LR, Nathenson SG, Leinwand LA. Mapping class I gene sequences in the major histocompatibility complex. *Nature* 1982;298:382–385.
85. Steinmetz M, Minard K, Horvath S, et al. A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse. *Nature* 1982;300:35–42.
86. Shawar SM, Cook RG, Rodgers JR, Rich RR. Specialized functions of MHC class I molecules. I. An N-formyl peptide receptor is required for construction of the class I antigen Mta. *J Exp Med* 1990;171:897–912.
87. Kurlander R, Shawar S, Brown M, Rich R. Specialized role for a murine class I-b MHC molecule in prokaryotic host defenses. *Science* 1992;257:678–679.
88. Shawar SM, Vyas JM, Rodgers JR, Rich RR. Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules. *Annu Rev Immunol* 1994;12: 839–880.
89. Smith GP, Dabhi VM, Pamer EG, Lindahl KF. Peptide presentation by the MHC class Ib molecule, H2-M3. *Int Immunol* 1994:6:1917–1926.
90. Lindahl KF, Byers DE, Dabhi VM, et al. H-2M3, a full-service class IB histocompatibility antigen. *Annu Rev Immunol* 1997;15:851–879.
91. Parham P, Ohta T. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules [see comments]. *Science* 1996;272:67–74.
92. Figueroa F, Tichy H, McKenzie I, Hammerling U, Klein J. Polymorphism of lymphocyte antigens-encoding loci in wild mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986;127:229–235.
93. Sultmann H, Mayer WE, Figueroa F, O'HUigin C, Klein J. Zebrafish Mhc class II alpha chain-encoding genes: polymorphism, expression, and function. *Immunogenetics* 1993;38:408–420.
94. Sato A, Klein D, Sultmann H, Figueroa F, O'HUigin C, Klein J. Class I mhc genes of cichlid fishes: identification, expression, and polymorphism. *Immunogenetics* 1997;46:63–72.
95. Hood L, Steinmetz M, Malissen B. Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. *Annu Rev Immunol* 1983;1:529–568.
96. Williams AF. Immunoglobulin-related domains for cell surface recognition. *Nature* 1985;314:579–580.
97. Burnside SS, Hunt P, Ozato K, Sears DW. A molecular hybrid of the H-2D^d and H-2L^d genes expressed in the dm1 mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81: 5204–5208.
98. Sun YH, Goodenow RS, Hood L. Molecular basis of the dm1 mutation in the major histocompatibility complex of the mouse: a D/L hybrid gene. *J Exp Med* 1985;162:1588–1602.
99. Evans G, Margulies D, Camerini-Otero R, Ozato K, Seidman J. Structure and expression of a mouse major histocompatibility antigen gene, H-2L^d. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:1994–1998.
100. Schulze DH, Pease LR, Geier SS, et al. Comparison of the cloned H-2Kbm1 variant gene with the H-2K^b gene shows a cluster of seven nucleotide differences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2007–2011.
101. Geliebter J, Zeff R, Schulze D, et al. Interaction between K^b and Q4 gene sequences generates the K^{bm6} mutation. *Mol Cell Biol* 1986;6:645–652.
102. Nathenson SG, Geliebter J, Pfaffenbach GM, Zeff RA. Murine major histocompatibility complex class-I mutants: molecular analysis and structure-function implications. *Annu Rev Immunol* 1986;4:471–502.
103. Hemmi S, Geliebter J, Zeff RA, Melvold RW, Nathenson SG. Three spontaneous H-2D^b mutants are generated by genetic micro-recombination (gene conversion) events. Impact on the H-2-restricted immune responsiveness. *J Exp Med* 1988; 168:2319–2335.
104. Nathenson S, Kesari K, Sheil J, Ajitkumar P. Use of mutants to analyze regions on the H-2K^b molecule for interaction with immune receptors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54:Pt 1:521–528.
105. Hasenkrug K, Nathenson S. Nucleic acid sequences of the H-2K^s and H-2K^{sm1} genes. *Immunogenetics* 1991;34:60–61.
106. Zemmour J, Parham P. HLA class I nucleotide sequences, 1992. *Immunogenetics* 1993;37:239–250.
107. Witte T, Smolyar A, Spoerl R, et al. Major histocompatibility complex recognition by immune receptors: differences among T cell receptor versus antibody interactions with the VSV8/H-2Kb complex. *Eur J Immunol* 1997;27:227–233.
108. Yun TJ, Melvold RW, Pease LR. A complex major histocompatibility complex D locus variant generated by an unusual recombination mechanism in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1384–1389.
109. Silver LM. *Mouse genetics: concepts and applications.* New York: Oxford University Press, 1995:362.
110. Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE, Sharp JJ. Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet* 1997;16:19–27.
111. Sechler JMG, Yip JC, Rosenberg AS. Cutting edge: genetic variation 129 substrains: practical consequences. *J Immunol* 1997;159:5766–5768.
112. Nepom G, Erlich H. MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:493–525.
113. Thomson G. HLA disease associations: models for the study of complex human genetic disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1995;32:183–219.
114. Wedell A. Molecular approaches for the diagnosis of 21-hydroxylase deficiency and congenital adrenal hyperplasia. *Clin Lab Med* 1996;16:125–137.
115. Tiwari JL, Terasaki PI. *HLA and disease associations.* New York: Springer-Verlag, 1985.
116. Baines M, Ebringer A. HLA and disease. *Mol Aspects Med* 1992;13:263–378.
117. Oldstone MB, McChesney MB, Oldstone MB. Virus-induced autoimmunity: molecular mimicry as a route to autoimmune disease. Virus-induced immunosuppression: infections with measles virus and human immunodeficiency virus. *J Autoimmun* 1989;2[Suppl]:187–194.
118. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80:695–705.
119. Wucherpfennig KW, Yu B, Bhol K, et al. Structural basis for major histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11935–11939.
120. Oldstone MB. Viruses and autoimmune diseases. *Scand J Immunol* 1997;46: 320–325.
121. Mignot E, Tafti M, Dement WC, Grumet FC. Narcolepsy and immunity. *Adv Neuroimmunol* 1995;5:23–37.
122. Ellis MC, Hetisimer AH, Ruddy DA, et al. HLA class II haplotype and sequence analysis support a role for DQ in narcolepsy. *Immunogenetics* 1997;46:410–417.
123. Jouanolle AM, Fergelot P, Gandon G, Yaouanq J, Le Gall JY, David V. A candidate gene for hemochromatosis: frequency of the C282Y and H63D mutations. *Hum Genet* 1997;100:544–547.
124. Rothenberg BE, Voland JR. Beta2 knockout mice develop parenchymal iron overload: a putative role for class I genes of the major histocompatibility complex in iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1529–1534.
125. Santos M, Schilham MW, Rademakers LH, Marx JJ, de Sousa M, Clevers H. Defective iron homeostasis in beta 2-microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man. *J Exp Med* 1996;184:1975–1985.
126. Hattori M, Buse JB, Jackson RA, et al. The NOD mouse: recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex. *Science* 1986;231:733–735.
127. Acha-Orbea H, McDevitt HO. The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84: 2435–2439.
128. Tochino Y. The NOD mouse as a model of type I diabetes. *Crit Rev Immunol* 1987;8:49–81.
129. Wicker LS, Miller BJ, Fischer PA, Pressey A, Peterson LB. Genetic control of diabetes and insulitis in the nonobese diabetic mouse. Pedigree analysis of a diabetic H-2nod/b heterozygote. *J Immunol* 1989;142:781–784.
130. Quartey-Papafio R, Lund T, Chandler P, et al. Aspartate at position 57 of nonobese diabetic I-A^{g7} beta-chain diminishes the spontaneous incidence of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* 1995;154:5567–5575.
131. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996;85:291–297.
132. Kohn HI, Melvold RW. Spontaneous histocompatibility mutations detected by dermal grafts: significant changes in rate over a 10-year period in the mouse H-system. *Mutat Res* 1974;24:163–169.
133. Melvold RW, Kohn HI. Histocompatibility gene mutation rates: H-2 and non-H-2. *Mutat Res* 1975;27:415–418.
134. Melvold R, Wang K, Kohn H. Histocompatibility gene mutation rates in the mouse: a 25-year review. *Immunogenetics* 1997;47:44–54.
135. Ewenstein BM, Uehara H, Nisizawa T, Melvold RW, Kohn HI, Nathenson SG. Biochemical studies on the H-2K antigens of the MHC mutants bm3 and bm11. *Immunogenetics* 1980;11:383–395.
136. Pease LR, Ewenstein BM, McGovern D, Melvold RW, Nisizawa T, Nathenson SG. Biochemical studies on the H-2K mutant B6.C-H-2^{bm10}. *Immunogenetics* 1983;17:7–17.
137. Yamaga KM, Pfaffenbach GM, Pease LR, et al. Biochemical studies of H-2K antigens from a group of related mutants. I. Identification of a shared mutation in B6-H-2^{bm5} and B6-H-2^{bm16}. *Immunogenetics* 1983:17:19–29.
138. Yamaga KM, Pfaffenbach GM, Pease LR, et al. Biochemical studies of H-2K antigens from a group of related mutants. II. Identification of a shared mutation in B6-H-2^{bm6}, B6.C-H-2^{bm7}, and B6.C-H-2^{bm9}. *Immunogenetics* 1983;17: 31–41.
139. Zijlstra M, Li E, Sajjadi F, Subramani S, Jaenisch R. Germ-line transmission of a disrupted beta 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 1989;342:435–438.
140. Koller BH, Marrack P, Kappler JW, Smithies O. Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science* 1990; 248:1227–1230.
141. Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R. Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature* 1990;344: 742–746.
142. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997;15:749–795.

143. Houlihan JM, Biro PA, Harper HM, Jenkinson HJ, Holmes CH. The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. *J Immunol* 1995;154:5665–5674.
144. McMaster MT, Librach CL, Zhou Y, et al. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol* 1995;154:3771–3778.
145. Le Bouteiller P, Rodriguez AM, Mallet V, Girr M, Guillaudeux T, Lenfant F. Placental expression of HLA class I genes. *Am J Reprod Immunol* 1996;35: 216–225.
146. Wiertz EJHJ, Mukherjee S, Ploegh HL. Viruses use stealth technology to escape from the host immune system. *Mol Med Today* 1997;3:116–123.
147. Fruh K, Ahn K, Djaballah H, et al. A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* 1995;375:415–418.
148. Hill A, Jugovic P, York I, et al. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 1995;375:411–415.
149. Ahn K, Meyer TH, Uebel S, et al. Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47. *Embo J* 1996;15:3247–3255.
150. Koszinowski UH, Reddehase MJ, Del Val M. Principles of cytomegalovirus antigen presentation in vitro and in vivo. *Semin Immunol* 1992;4:71–79.
151. Burgert HG, Kvist S. The E3/19K protein of adenovirus type 2 binds to the domains of histocompatibility antigens required for CTL recognition. *Embo J* 1987;6:2019–2026.
152. Glimcher LH, Kara CJ. Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu Rev Immunol* 1992;10:13–49.
153. Rijkers GT, Roord JJ, Koning F, Kuis W, Zegers BJ. Phenotypical and functional analysis of B lymphocytes of two siblings with combined immunodeficiency and defective expression of major histocompatibility complex (MHC) class II antigens on mononuclear cells. *J Clin Immunol* 1987;7:98–106.
154. Plaeger-Marshall S, Haas A, Clement LT, et al. Interferon-induced expression of class II major histocompatibility antigens in the major histocompatibility complex (MHC) class II deficiency syndrome. *J Clin Immunol* 1988;8:285–295.
155. Hume CR, Lee JS. Congenital immunodeficiencies associated with absence of HLA class II antigens on lymphocytes result from distinct mutations in trans-acting factors. *Hum Immunol* 1989;26:288–309.
156. Mach B. MHC class II regulation—lessons from a disease. *N Engl J Med* 1995; 332:120–122.
157. Guardiola J, Maffei A, Lauster R, Mitchison NA, Accolla RS, Sartoris S. Functional significance of polymorphism among MHC class II gene promoters. *Tissue Antigens* 1996;48:615–625.
158. Roche PA, Cresswell P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 1990;345:615–618.
159. Roche PA, Marks MS, Cresswell P. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 1991;354:392–394.
160. Bikoff EK, Huang LY, Episkopou V, van Meerwijk J, Germain RN, Robertson EJ. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J Exp Med* 1993;177:1699–1712.
161. Viville S, Neefjes J, Lotteau V, et al. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 1993;72:635–648.
162. Bonnerot C, Marks MS, Cosson P, et al. Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *Embo J* 1994;13:934–944.
163. Orr HT, Lopez de Castro JA, Parham P, Ploegh HL, Strominger JL. Comparison of amino acid sequences of two human histocompatibility antigens, HLA-A2 and HLA-B7: location of putative alloantigenic sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4395–4399.
164. Coligan JE, Kindt TJ, Uehara H, Martinko J, Nathenson SG. Primary structure of a murine transplantation antigen. *Nature* 1981;291:35–39.
165. Ploegh HL, Orr HT, Strominger JL. Molecular cloning of a human histocompatibility antigen cDNA fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77: 6081–6085.
166. Sood AK, Pereira D, Weissman SM. Isolation and partial nucleotide sequence of a cDNA clone for human histocompatibility antigen HLA-B by use of an oligodeoxynucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:616–620.
167. Steinmetz M, Frelinger JG, Fisher D, et al. Three cDNA clones encoding mouse transplantation antigens: homology to immunoglobulin genes. *Cell* 1981;24: 125–134.
168. Choi E, McIntyre K, Germain RN, Seidman JG. Murine I-A beta chain polymorphism: nucleotide sequences of three allelic I-A beta genes. *Science* 1983; 221:283–286.
169. Hood L, Steinmetz M, Goodenow R, et al. Genes of the major histocompatibility complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983;47:Pt 2:1051–1065.
170. Mathis DJ, Benoist CO, Williams VEd, Kanter MR, McDevitt HO. The murine E alpha immune response gene. *Cell* 1983;32:745–754.
171. Robinson RR, Germain RN, McKean DJ, Mescher M, Seidman JG. Extensive polymorphism surrounding the murine Ia A beta chain gene. *J Immunol* 1983; 131:2025–2031.
172. Robinson PJ, Steinmetz M, Moriwaki K, Lindahl KF. Beta-2 microglobulin types in mice of wild origin. *Immunogenetics* 1984;20:655–665.
173. Lew AM, Margulies DH, Maloy WL, Lillehoj EP, McCluskey J, Coligan JE. Alternative protein products with different carboxyl termini from a single class I gene, H-2^{Kb}. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:6084–6088.
174. Lew AM, McCluskey J, Maloy WL, Margulies DH, Coligan JE. Multiple class I molecules generated from single genes by alternative splicing of pre-mRNAs. *Immunol Res* 1987;6:117–132.
175. Handy DE, McCluskey J, Lew AM, Coligan JE, Margulies DH. Signals controlling alternative splicing of major histocompatibility complex H-2 class I pre-mRNA. *Immunogenetics* 1988;28:81–90.
176. Vega MA, Strominger JL. Constitutive endocytosis of HLA class I antigens requires a specific portion of the intracytoplasmic tail that shares structural features with other endocytosed molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86: 2688–2692.
177. St-Pierre Y, Nabavi N, Ghogawala Z, Glimcher LH, Watts TH. A functional role for signal transduction via the cytoplasmic domains of MHC class II proteins. *J Immunol* 1989;143:808–812.
178. Evans G, Margulies D, Shykind B, Seidman J, Ozato K. Exon shuffling: mapping polymorphic determinants on hybrid mouse transplantation antigens. *Nature* 1982;300:755–757.
179. Bluestone JA, Foo M, Allen H, Segal D, Flavell RA. Allospecific cytolytic T lymphocytes recognize conformational determinants on hybrid mouse transplantation antigens. *J Exp Med* 1985;162:268–281.
180. Ozato K, Evans G, Margulies D, Seidman J, Levy R. The use of hybrid H-2 genes for localizing the positions of polymorphic determinants recognized by antibodies and by cytotoxic T cells. *Transplant Proc* 1983;15:2074–2076.
181. Reiss C, Evans G, Margulies D, Seidman J, Burakoff S. Allospecific and virus-specific cytolytic T lymphocytes are restricted to the N or C1 domain of H-2 antigens expressed on L cells after DNA-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2709–2712.
182. Bjorkman PJ, Strominger JL, Wiley DC. Crystallization and x-ray diffraction studies on the histocompatibility antigens HLA-A2 and HLA-A28 from human cell membranes. *J Mol Biol* 1985;186:205–210.
183. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987;329:506–512.
184. Schwartz RH. Immune response (Ir) genes of the murine major histocompatibility complex. *Adv Immunol* 1986;38:31–201.
185. Babbitt B, Allen P, Matsueda G, Haber E, Unanue E. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 1985;317:359–361.
186. Buus S, Sette A, Colon S, Jenis D, Grey H. Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition. *Cell* 1986;47:1071–1077.
187. Townsend A, Ohlén C, Bastin J, Ljunggren H, Foster L, Kärre K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 1989;340:443–448.
188. Townsend A, Elliott T, Cerundolo V, Foster L, Barber B, Tse A. Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro [published erratum appears in *Cell* 1990;62(6):following 1233]. *Cell* 1990;62:285–295.
189. Boyd LF, Kozlowski S, Margulies DH. Solution binding of an antigenic peptide to a major histocompatibility complex class I molecule and the role of beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2242–2246.
190. Van Bleek GM, Nathenson SG. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2Kb molecule. *Nature* 1990;348: 213–216.
191. Falk K, Rötzschke O, Rammensee H. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 1990;348: 248–251.
192. Rötzschke O, Falk K, Deres K, et al. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* 1990;348: 252–254.
193. Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 1993;11:213–244.
194. Hunt D, Henderson R, Shabanowitz J, et al. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 1992; 255:1261–1263.
195. Corr M, Boyd LF, Frankel SR, Kozlowski S, Padlan EA, Margulies DH. Endogenous peptides of a soluble major histocompatibility complex class I molecule, H-$2L^{d}_{s}$: sequence motif, quantitative binding, and molecular modeling of the complex. *J Exp Med* 1992;176:1681–1692.
196. Corr M, Boyd LF, Padlan EA, Margulies DH. H-$2D^{d}$ exploits a four residue peptide binding motif. *J Exp Med* 1993;178:1877–1892.
197. Gavin MA, Dere B, Grandea AGr, Hogquist KA, Bevan MJ. Major histocompatibility complex class I allele-specific peptide libraries: identification of peptides that mimic an H-Y T cell epitope. *Eur J Immunol* 1994;24:2124–2133.
198. Brusic V, Rudy G, Kyne AP, Harrison LC. MHCPEP, a database of MHC-binding peptides: update 1996. *Nucleic Acids Res* 1997;25:269–271.
199. De Groot AS, Jesdale BM, Szu E, Schafer JR, Chicz RM, Deocampo G. An interactive Web site providing major histocompatibility ligand predictions: application to HIV research. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997;13:529–531.
200. Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* 1994;152:163–175.
201. Rudensky A, Preston-Hurlburt P, Hong S, Barlow A, Janeway CJ. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991;353:622–627.
202. Chicz R, Urban R, Lane W, et al. Predominant naturally processed peptides

bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 1992;358:764–768.
203. Janeway CA Jr, Mamula MJ, Rudensky A. Rules for peptide presentation by MHC class II molecules. *Int Rev Immunol* 1993;10:301–311.
204. Urban RG, Chicz RM, Vignali DA, Strominger JL. The dichotomy of peptide presentation by class I and class II MHC proteins. *Chem Immunol* 1993;57: 197–234.
205. Hammer J, Takacs B, Sinigaglia F. Identification of a motif for HLA-DR1 binding peptides using M13 display libraries. *J Exp Med* 1992;176:1007–1013.
206. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987;329:512–518.
207. Garrett TP, Saper MA, Bjorkman PJ, Strominger JL, Wiley DC. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 1989;342:692–696.
208. Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 1991;219: 277–319.
209. Madden D, Gorga J, Strominger J, Wiley D. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 1991;353: 321–325.
210. Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 1991;353:326–329.
211. Zhang W, Young AC, Imarai M, Nathenson SG, Sacchettini JC. Crystal structure of the major histocompatibility complex class I H-$2K^b$ molecule containing a single viral peptide: implications for peptide binding and T-cell receptor recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:8403–8407.
212. Fremont D, Matsumura M, Stura E, Peterson P, Wilson I. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-$2K^b$. *Science* 1992; 257:919–927.
213. Zhang W, Young AC, Imarai M, Nathenson SG, Sacchettini JC. Crystal structure of the major histocompatibility complex class I H-$2K^b$ molecule containing a single viral peptide: implications for peptide binding and T-cell receptor recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:8403–8407.
214. Fremont DH, Stura EA, Matsumura M, Peterson PA, Wilson IA. Crystal structure of an H-2Kb-ovalbumin peptide complex reveals the interplay of primary and secondary anchor positions in the major histocompatibility complex binding groove. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2479–2483.
215. Joyce S, Kuzushima K, Kepecs G, Angeletti RH, Nathenson SG. Characterization of an incompletely assembled major histocompatibility class I molecule (H-$2K^b$) associated with unusually long peptides: implications for antigen processing and presentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4145–4149.
216. Collins EJ, Garboczi DN, Wiley DC. Three-dimensional structure of a peptide extending from one end of a class I MHC binding site. *Nature* 1994;371: 626–629.
217. Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988;332:845–850.
218. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993;364:33–39.
219. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 1994;368:215–221.
220. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 1994;368:711–718.
221. Fields BA, Ober B, Malchiodi EL, et al. Crystal structure of the V alpha domain of a T cell antigen receptor. *Science* 1995;270:1821–1824.
222. Schafer PH, Pierce SK. Evidence for dimers of MHC class II molecules in B lymphocytes and their role in low affinity T cell responses. *Immunity* 1994;1: 699–707.
223. Abastado JP, Lone YC, Casrouge A, Boulot G, Kourilsky P. Dimerization of soluble major histocompatibility complex-peptide complexes is sufficient for activation of T cell hybridoma and induction of unresponsiveness. *J Exp Med* 1995;182:439–447.
224. Reich Z, Boniface JJ, Lyons DS, Borochov N, Wachtel EJ, Davis MM. Ligand-specific oligomerization of T-cell receptor molecules. *Nature* 1997;387: 617–620.
225. Fremont DH, Hendrickson WA, Marrack P, Kappler J. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 1996;272: 1001–1004.
226. Plaksin D, Chacko S, McPhie P, Bax A, Padlan EA, Margulies DH. A T cell receptor V alpha domain expressed in bacteria: does it dimerize in solution? *J Exp Med* 1996;184:1251–1258.
227. Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 1996;384:134–141.
228. Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, et al. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 A and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 1996;274:209–219.
229. Porcelli SA. The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. *Adv Immunol* 1995;59:1–98.
230. Loveland B, Wang CR, Yonekawa H, Hermel E, Lindahl KF. Maternally transmitted histocompatibility antigen of mice: a hydrophobic peptide of a mitochondrially encoded protein. *Cell* 1990;60:971–980.
231. Wang CR, Castano AR, Peterson PA, Slaughter C, Lindahl KF, Deisenhofer J. Nonclassical binding of formylated peptide in crystal structure of the MHC class Ib molecule H2-M3. *Cell* 1995;82:655–664.
232. Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature* 1994;372:691–694.
233. Melian A, Beckman EM, Porcelli SA, Brenner MB. Antigen presentation by CD1 and MHC-encoded class I-like molecules. *Curr Opin Immunol* 1996;8:82–88.
234. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 1995;268:863–865.
235. Zeng Z-H, Castaño AR, Segelke B, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA. The crystal structure of murine CD1: an MHC-like fold but with a large hydrophobic antigen binding groove. *Science* 1997;277:339–345.
236. Young AC, Zhang W, Sacchettini JC, Nathenson SG. The three-dimensional structure of H-2Db at 2.4 Å resolution: implications for antigen-determinant selection. *Cell* 1994;76:39–50.
237. Simister NE, Rees AR. Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Eur J Immunol* 1985;15:733–738.
238. Simister NE, Mostov KE. Cloning and expression of the neonatal rat intestinal Fc receptor, a major histocompatibility complex class I antigen homolog. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54 Pt 1:571–580.
239. Ahouse JJ, Hagerman CL, Mittal P, et al. Mouse MHC class I-like Fc receptor encoded outside the MHC. *J Immunol* 1993;151:6076–6088.
240. Simister NE. IgG Fc receptors that resemble class I major histocompatibility complex antigens. *Biochem Soc Trans* 1993;21:973–976.
241. Story CM, Mikulska JE, Simister NE. A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. *J Exp Med* 1994;180:2377–2381.
242. Burmeister WP, Gastinel LN, Simister NE, Blum ML, Bjorkman PJ. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature* 1994;372:336–343.
243. Burmeister WP, Huber AH, Bjorkman PJ. Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature* 1994;372:379–383.
244. Israel EJ, Wilsker DF, Hayes KC, Schoenfeld D, Simister NE. Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. *Immunology* 1996;89:573–578.
245. Zamoyska R. The CD8 coreceptor revisited: one chain good, two chains better. *Immunity* 1994;1:243–246.
246. Gao GF, Tormo J, Gerth UC, et al. Crystal structure of the complex between human CD8αα and HLA-A2. *Nature* 1997;387:630–634.
247. Sun J, Leahy DJ, Kavathas PB. Interaction between CD8 and major histocompatibility complex (MHC) class I mediated by multiple contact surfaces that include the alpha 2 and alpha 3 domains of MHC class I. *J Exp Med* 1995;182:1275–1280.
248. Weiss A, Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 1994;76:263–274.
249. Wu H, Kwong PD, Hendrickson WA. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* 1997;387:527–530.
250. Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM. Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol* 1991;9: 745–772.
251. Kim J, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Toxic shock syndrome toxin-1 complexed with a class II major histocompatibility molecule HLA-DR1. *Science* 1994;266:1870–1874.
252. Fields BA, Malchiodi EL, Li H, et al. Crystal structure of a T-cell receptor beta chain complexed with a superantigen. *Nature* 1996;384:188–192.
253. Fremont DH, Rees WA, Kozono H. Biophysical studies of T-cell receptors and their ligands. *Curr Opin Immunol* 1996;8:93–100.
254. Matsui K, Boniface JJ, Reay PA, Schild H, Fazekas de St. Groth B, Davis MM. Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* 1991;254:1788–1791.
255. Corr M, Slanetz AE, Boyd LF, et al. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science* 1994;265:946–949.
256. Matsui K, Boniface JJ, Steffner P, Reay PA, Davis MM. Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12862–12866.
257. Khilko SN, Jelonek MT, Corr M, Boyd LF, Bothwell AL, Margulies DH. Measuring interactions of MHC class I molecules using surface plasmon resonance. *J Immunol Methods* 1995;183:77–94.
258. Sykulev Y, Cohen RJ, Eisen HN. The law of mass action governs antigen-stimulated cytolytic activity of CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11990–11992.
259. Alam SM, Travers PJ, Wung JL, et al. T cell receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 1996;381:616–620.
260. Garcia KC, Tallquist MD, Pease LR, et al. Alphabeta T cell receptor interactions with syngeneic and allogeneic ligands: affinity measurements and crystallization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13838–13843.
261. Plaksin D, Polakova K, McPhie P, Margulies DH. A three-domain T cell receptor is biologically active and specifically stains cell surface MHC/peptide com-

plexes. *J Immunol* 1997;158:2218–2227.
262. McCluskey J. *The human leucocyte antigens and clinical medicine.* Oxford: Oxford University Press, 1997:415–427.
263. Margulies D, McCluskey J. Exon shuffling: new genes from old. *Surv Immunol Res* 1985;4:146–159.
264. Evans SV. SETOR: hardware lighted three-dimensional solid model representations of macromolecules. *J Mol Graphics* 1993;11:134–138.
265. Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 1991;219:277–319.
266. Nicholls A, Sharp KA, Honig B. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 1991; 11:281–296.
267. Ravetch JV, Margulies DH. Immunology. New tricks for old molecules. *Nature* 1994;372:323–324.
268. Fields BA, Malchiodi EL, Li H, et al. Crystal structure of a T-cell receptor beta-chain complexed with a superantigen. *Nature* 1996;384:188–192.
269. Kruisbeck, AM Commonly used mouse strains. In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, eds. *Current protocols in immunology.* New York: John Wiley and Sons, 1998 (*in press*).
270. Mathis DJ, Benoist C, Williams VED, Kanter M, McDevitt HO. Several mechanisms can account for defective E alpha gene expression in different mouse haplotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:273–277.
271. Parker KC, Martin R. *Appendix II. Peptide binding motifs for MHC class I and II molecules.* New York: John Wiley and Sons, 1997.

第 9 章 抗原处理呈递

Ronald N. Germain①

抗原识别和免疫反应

宿主非克隆化的防御机制

机体采用大量的防御机制来抵抗微生物和寄生虫的入侵、扩增、组织损害及相应疾病[1]。在多细胞生物中，宿主防御的第一道防线是病原体入侵的物理屏障。而第二道防线是针对入侵微生物一些特定特征的反应，这些特征将入侵微生物与宿主区别开来。如原核生物蛋白的 N 端含有甲酰化蛋氨酸，能通过 fMet-Leu-Phe 受体活化中性粒细胞，酵母和某些细菌细胞壁的重复多糖结构能活化补体的旁路途径，而病毒的双链 287

① R. N. Germain: Laboratory of Immunology, Nationa Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of *Health, Bethesda, Maryland 20892.*

RNA 基因组能诱导 α 干扰素和 β 干扰素反应。虽然启动这些反应是针对一些特定的化学结构，但这种识别并不能区别成分不同的微生物，一种组织类型的所有效应细胞分享同一种受体，而体液效应因子使用同一个结合位点。另外这种种属防御模式通常并不引起机体永久改变，只要从系统去除启动物质，将不存在原反应的选择性记忆。

宿主克隆化的防御机制

288

另一类的防御机制则与特异性阻碍感染和特异性获得性免疫的概念相关，即当重复暴露于同一抗原时，机体将被诱发在量和质上更为剧烈的应答。这种反应类型依赖于两类淋巴细胞：T 细胞和 B 细胞。通过体细胞的基因重排，在这些组织类型相似的淋巴细胞膜表面形成不同的受体分子，而克隆宿主防御机制则是通过细胞膜表面受体的识别，选择性地活化这些细胞中的少量淋巴细胞。正是由于这些淋巴细胞数量上的克隆活化扩增，永久改变了含有这些重排受体细胞的反应性，并且延长了再次暴露于同一抗原时抗体的分泌，或者说延长获得性免疫中病原的特异性抵抗特性。而理解 T 和 B 淋巴细胞对抗原的克隆性特异性识别的分子机制则是免疫学的中心问题。

抗原激发 B 和 T 淋巴细胞反应的不同特征

鉴定了被称之为 B 细胞抗原受体的细胞膜免疫球蛋白后，B 淋巴细胞对大量化学物质的反应性才得以真正理解（见第 6、7 章）。大量研究显示这种膜受体的分泌型（抗体）可与几乎无限的抗原结构相结合，故容易理解 B 细胞如何通过其类似于抗体的膜受体，具有广泛的反应性，而达到分泌这些抗体的目的。

当认识到活化的小群淋巴细胞是由 B 和 T 细胞组成时，T 细胞的抗原识别特性成为了关注的重点。追溯到 20 世纪 50 年代 Gell 和 Benaceraf 显示那些由天然构型蛋白质分子激发的抗体通常对变性后的蛋白质呈低反应性，而迟发型变态反应中二次 T 细胞反应则不受影响[2]。这些数据提示参与迟发型变态反应的淋巴细胞（后被证实是 T 细胞）并不识别天然构型决定簇，而抗体则典型依赖对天然构型决定簇的识别。另外发现一些可诱发抗体的物质并不能激发 T 细胞反应，如各种多糖，而只有蛋白质或蛋白质衍生物有效。与 B 细胞类似研究的成功相反，尝试研究抗原与 T 细胞的直接结合是不成功[3]，而抗免疫球蛋白的试剂并不能可靠地与 T 细胞反应。基于这些观察，可认为参与 B 细胞受体形成的免疫球蛋白基因并未用于产生 T 细胞克隆分布的抗原识别结构，而 T 细胞识别抗原的方式不同于 B 细胞。

在 20 世纪 70 年代早期另外一些 T 和 B 细胞在抗原反应方面的差异被观察到。T 细胞活化需要与抗原相关的其他类型细胞，而这些细胞同样不能与抗原直接结合。另外发现依赖 T 细胞的应答受到组织相容性复合体（MHC 见第 11 章）编码基因的控制。MHC 基因座的多态性控制动物激发抗原特异性 T 细胞依赖应答的能力。这些抗原包括简单重复结构的合成多肽或者相近种属间只有少数残基不同的蛋白质。这个现象被称之为“反应性的免疫反应基因（immune response gene ，IR gene）控制”[4]。MHC 多样性对抗原特异性 T 细胞功能的重要作用表现在多个方面，如对抗原的增殖反应[5]，细胞毒性杀伤活性[6,7]及与 B 淋巴细胞协同产生抗体[8]（见第 6、7 章）。

T 淋巴细胞识别的肽和 MHC 分子复合物

对于 T 细胞抗原识别所有独特特征的解释基于如下认识，即 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞 αβ 免疫球蛋白样受体（见第 10 章）的配体是：多样性 MHC Ⅰ 类和 Ⅱ 类基因座编码的糖蛋白与短肽的复合物（见第 8 章）[9]。这解释了 T 细胞与蛋白质抗原的中心问题，包括不要求维持天然构型，需要与膜上含有 MHC 肽复合物的细胞相互作用和等位基因特异性抗原应答。不同的等位基因与抗原蛋白来源肽的结合方式不同于自身肽的结合（与自身肽结合导致对自身肽的耐受，见第 11、12 章），从而反应了 IR 基因的调节作用。

肽-MHC 分子复合物在大量情况中是 T 细胞的有效刺激。这包括种系内主要移植抗原本身的应答（MHC 的命名即来源于此现象），次要组织相容性抗原（其中一些的相关特异肽尚不清楚，如 H-Y[10]）、微生物

病原体(真菌、细菌、病毒、原虫、多细胞寄生虫)、接触的致敏原、变态反应原和肿瘤。

为什么选择肽?

如果病原体穿过宿主的物理屏障,逃避了克隆非特异性细胞和体液先天防御机制,而随后淋巴细胞依赖的效应活性只可能发生在两个不同的位置。其中之一是细胞外的微生物及其产物,而另外一个是微生物生活周期的胞内阶段(如果有的话)。在两种情况,多数病原体如细菌和病毒的复制速率远远大于相关淋巴细胞群落的可能扩增速度,这就需要机体的防御策略缩小病原体数量的优势[11]。B细胞发展了一种扩增策略来处理这个问题,细胞膜免疫球蛋白受体启动招募B细胞进入机体反应,诱导体细胞突变,产生更高亲和力的免疫球蛋白相似体,并在生发中心分化选择,继而高速分泌此免疫球蛋白受体的可溶形式(见第25章)。一个分化的B细胞(浆细胞)能产生大量的相同抗体分子,只要一个或少许即可灭活病毒或细菌颗粒。这个策略对于病原体的胞外期或者那些有胞内期的微生物在胞间移动时是十分有效的(图9.1),但是在许多情况下免疫系统的这种机制对胞内的微生物则视而不见,只有当入侵微生物的特殊成分暴露到细胞外液时可溶性抗体分子或免疫球蛋白受体 才能与之接触,虽然在某些情况下抗体分子的内吞可导致抑制病毒的聚合或者攻击驻留于内吞相关囊泡的微生物。这样抗体可高效抑制新的感染和感染的扩散,但只能在胞间复制过程发挥作用。抗体攻击那些膜上表达病毒成分的感染细胞往往落后于病毒复制和子代的形成,并且对于无胞膜病毒,感染细胞释放子代病毒前根本不在膜上表达抗体的靶结构。这种机制同样对于长时期驻留于胞内(胞质)的寄生虫无效。

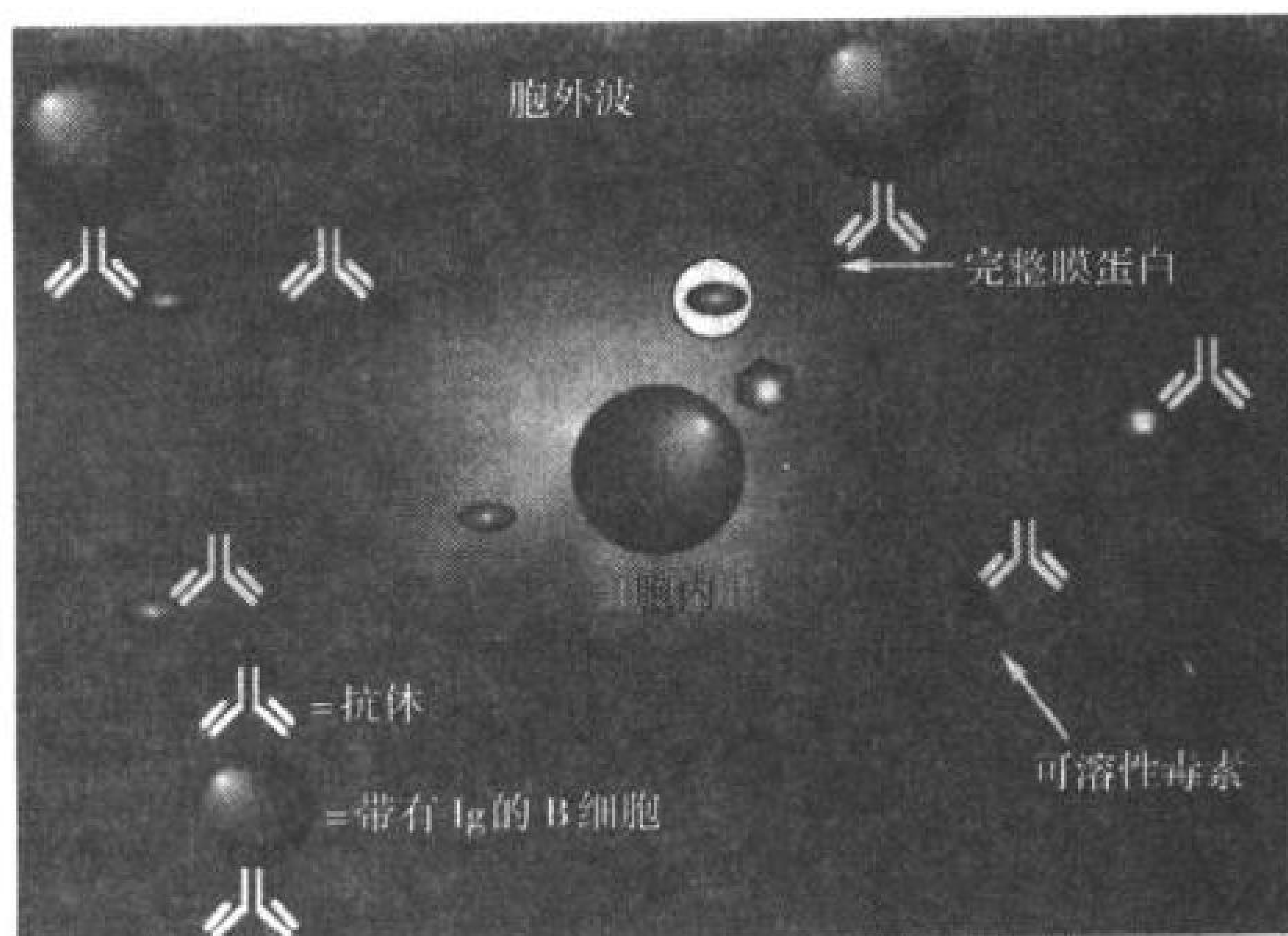


图9.1 B细胞表面免疫球蛋白对胞外抗原直接识别的限制性,提示需要在胞膜表达胞内抗原的标志以提供一种方案刺激针对胞内病原体的获得性免疫。

289

如果考虑到B淋巴细胞/抗体的限制性,从进化的角度看,免疫系统应拥有监测胞内病原体存在的方法,无论此病原体是位于胞质还是吞噬系统的细胞器,并且最好能在侵入细胞的早期和随后复制之前。但是如果在感染细胞膜表面没有被众多B细胞免疫球蛋白库识别的化学结构,早期识别又如何完成呢? T细胞对肽-MHC分子复合物的识别提供了一个解决方案。所有活的微生物均包含和产生一种或多种独特的蛋白质,原则上即使这些分子的完整形式从未到达胞膜,这些蛋白质可通过蛋白质酶解产生小的片段,被MHC分子捕获,运送到细胞表面,从而以多价阵列的方式被T细胞识别。这些肽可来源于感染细胞中入侵微生物的特殊蛋白质,也可来源于病原体胞内复制的第一生化事件中新生成蛋白质。识别这些早期感染标志,增加感染细胞对病原体存活的抵抗或者牺牲感染细胞,从而消除病原体的爆发性复制。这种机制也提供了一种方法监测那些在胞内持续性存在、只一过性被体液免疫接触的微生物。

作为一种病原体监测策略,肽识别拥有另外一些优点。大多数蛋白质能适应位于其表面氨基酸侧链相当大的变化而不影响其功能,但为维持蛋白质折叠模式和活性,蛋白质内部的氨基酸只能耐受非常少的替换。由于容许替换的区域不同,在识别连续或者不连续构型表位抗体(位于表面)的选择下,微生物易发生在蛋白质表面氨基酸的突变成为突变株[12]。而由于在蛋白质内部氨基酸侧链的结构限制,在蛋白质核心氨基酸的化学改变很少发生。肽为基础的识别系统是应用来源于外源蛋白质任何肽片段来完成的,并不理会肽片段在折叠分子的位置或蛋白质的进化功能,从而使通过改变蛋白质表面的侧链来逃避这种识别系统变得十分困难。

同时,除存在一些肽结合蛋白外(MHC Ⅰ 和 MHC Ⅱ),一个肽特异性识别系统还需要其他一些属性。首先,细胞必须能有效地降解相对耐受蛋白质酶的折叠分子,产生合适的肽片段,还要阻碍片段的过分降解以

免影响与 MHC 分子的结合。如果这个系统是快速地识别那些刚被病原体(如病毒)感染且尚未完全复制的细胞,就需要一种方法降解胞质蛋白或核蛋白产生肽片段(这些蛋白通常是病毒表达的第一个基因产物),然后将它们转送到细胞外表面。也就是说,必须穿过细胞膜屏障,因为发生 T 细胞识别的细胞外表面与细胞内结构存在差异。另外 MHC 分子的结合特异性必须较低,以避免病原体通过简单突变和选择不结合肽序列逃避,而这个特征使此结合系统在大多数情况很难区分肽是来源于自身蛋白还是外源蛋白。这意味着免疫系统必须建立对自身肽-MHC 复合物的耐受机制,并且细胞必须有足量的 MHC 分子以避免此结合系统对来源自身蛋白肽的饱和。而且当一个特异性 T 细胞与某一细胞相互作用时,它必须分检所有的胞膜 MHC 分子,以确定是否其中一些被符合此 T 细胞特异性肽占有。为了使此扫描系统高效,此过程在每个靶细胞花费的时间是有限的。如果膜上的 MHC 分子越多,扫描所需的时间越长,所以在膜上需最大可能地表达有用的 MHC 分子。对于 T 细胞而言,有用的 MHC 分子是与肽结合的 MHC 分子,而对于此系统,空 MHC 分子是一个干扰因素,将抑制对含有外源蛋白肽的 MHC 的有效识别。因此细胞需要一种机制以限制到达或驻留于细胞膜表面的空 MHC 分子数量。同样,在效应细胞活性阶段,其目的是选择性破坏转染或感染的细胞,而不破坏其他未感染细胞,所以必须阻碍未感染细胞膜上 MHC 的结合。这也意味着应限定膜上空 MHC 分子数目,以防止未感染细胞捕获在胞外环境中自由状态的肽,因为在组织损害处,胞外肽具有相当高的溶度。

本章首先回顾了肽呈递策略的研究历史,然后从几个方面讨论抗原呈递系统如何达到上述要求,包括:与抗原片段呈递相适应的 MHC 分子生化特征,抗原肽产生和与 MHC 有效作用的细胞生物学基础及 T 细胞和相应复合物的识别特点。一些新的研究结果也被描述,包括:两类肽配体的另类特定的呈递途径及非肽成分特定的呈递途径。另外总结了关于自然杀伤细胞(NK)的最近数据,其使用 MHC I 类分子调节其效应功能,此发现揭示在获得性免疫中,识别自我与非我化学特征的一些机制同样被天然免疫系统采用。在非克隆应答和由大量 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞 TCR 介导的肽特异性克隆应答间构建了桥梁。

肽呈递策略的研究历史

MHC 分子在 T 细胞免疫中作用的早期模型

基于两个现象,即 MHC 连锁的 IR 基因控制 T 细胞依赖免疫和 T 细胞 MHC 限制性的抗原识别(见第 10、11、12 章),建立了三种模型来解释 T 淋巴细胞应答中 MHC 的作用。最早的模型是 MHC 分子本身就是分布在 T 细胞克隆的抗原特异性受体[13],根据这个假说,缺乏正确的 MHC 编码受体蛋白就会剥夺动物对特定蛋白的 T 细胞识别。但随后在最初由 von Boehmer 和 Sprent 发展的辐射后骨髓重建模型[14](见第 20 章),显示抗原反应仍在 MHC 连锁的 IR 基因控制下,这证明 IR 基因的控制并不是 T 细胞固基因型,而是 T 细胞发育和抗原暴露环境的基因型[15,16]。如果 T 细胞自己表达 MHC 基因编码的受体,将会获得相反的结果;因此这个模型被放弃,或者修改为 T 细胞 MHC 分子与抗原暴露细胞同样的 MHC 分子互为受体(相似-相似识别)。

其余两个是争论超过十年的是双识别(dual recognition)模型和改变自我模型(altered self model)[17]。双识别模型认为 T 细胞使用两个不同的受体分别独立识别抗原和 MHC 分子的等位基因产物。与两类受体结合的配体均被推测向 T 细胞提供了一种特定信号,而且两个信号是激活所必需的。这为在一个细胞上需要同时存在抗原和 MHC 编码蛋白质提供了解释,又避免了两类信号直接化学相互作用的必要性。因为激活被假定要求同时产生两个特定的信号,在每个识别事件中,两个配体中的任何一个高溶度不能独自代替两个的同时存在。通过发育选择形成成熟 T 细胞的 MHC 特异受体亚群,可解释 MHC 限制性环境控制的研究数据。但是采用这个机制解释 IR 基因控制则更为困难,因为它要求抗原和 MHC 受体的表达存在某种功能上的连锁,以便在发育中,由于环境的差异引起抗 MHC 受体的不存在时特定抗原受体同时不表达。然而,如此的连锁规律不能被主观地排除,因此不能否定此模型[18]。

一个另外的看法是蛋白质抗原(或来源于此抗原的碎片)和 MHC 存在一个相互的物理作用,产生了一

个由单个受体识别的混杂有两个部件联合特性的复合配体。这个模型在解释 IR 基因功能时，假定某个抗原不仅限于与 MHC 分子特定的等位基因形式结合，因为这样阻止有效的 T 细胞识别[19]。MHC 限制性的抗原认别则被理解为：在 MHC-抗原复合物与 TCR 组合位点的特 异性结合中，需要此复合物中的两种组分的贡献。在 MHC 限制性的抗原认别中，关于环境作用的各种数据可被认为在成熟 T 细胞膜上受体的选择受到 MHC 分子的影响，从而使这些受体偏向于 T 细胞发育中存在的 MHC 等位基因产物，能更好地结合这些 MHC 分子与抗原形成的复合物。关于这个模型被提起了的主要疑问是此模型要求在每个个体中，一个有限数目的 MHC 的分子与免疫系统能应答的许多蛋白质抗原以高度特异的方法结合。

单个 T 细胞受体复合物识别抗原-MHC 组合体的早期证据

一个转化胸腺瘤细胞和未转化抗原特异 T 细胞间的体细胞融合形成 T 杂交瘤细胞系，其维持了母 T 细胞与抗原和 MHC 分子特异性结合的特征，此领域的持续发展允许 Kapple 等人完成关于两个争论的 T 细胞抗原识别模型的一个重要实验[20]（图 9.2），这些研究者融合两个针对不同抗原和 MHC Ⅱ类等位基因产物的特异性 T 杂交瘤细胞。如果 T 细胞的双识别特性是被两个受体介导，它们独立地与分开的抗原和 MHC 分子反应，那么一个两倍 T 杂交瘤细胞应该不仅与原母细胞的抗原-MHC 分子组合反应，还应该也显示针对一个母细胞抗原和另一个母细胞 MHC 的混合反应（图 9.2A），但是这没被观察到。两倍的 T 杂交瘤细胞仅仅表现出了两个原来母 T 细胞对抗原-MHC 分子组合的识别性质，并没获得代表了原抗原和 MHC 分子重排的新反应。这些数据可提示 TCR 是理化上的单个复合物，功能上不能一分为二（图 9.2B），或者是在激活 T 细胞中，抗原和 MHC 分子显示出是一个严格、特殊的等位基因连锁(图 9.2C)。

Schwartz 和同事使用一个细胞色素 c 抗原的模型系统进行了一系列精细的研究，强烈支持在抗原和 MHC 分子之间存在一个重要的物理相互作用[21]。他们证明那些能和含 MHC Ⅱ类分子 $E\alpha^kE\beta^k$ 细胞呈递的鸽子细胞色素 c 特异反应的 T 细胞，也可和同样 $E\alpha^kE\beta^k$ 细胞呈递的蛾细胞色素 c 反应。同时这些 T 细胞可和含 MHC Ⅱ类分子 $E\alpha^kE\beta^b$① 细胞呈递的蛾细胞色素 c 特异性反应，却不能和同样 $E\alpha^kE\beta^b$ 细胞呈递的鸽子细胞色素 c 反应。这些数据不能被抗原和 MHC 分子双受体独立识别理论解释。根据双识别模型，能和两种 MHC Ⅱ类分子呈递的蛾细胞色素反应证明这些 T 细胞的 anti-MHC 受体一定能识别这两个等位基因产物，而能和 $E\alpha^kE\beta^b$ 细胞呈递的鸽子细胞色素 c 反应的能力显示这些 T 细胞上所谓的抗原受体一定能认出这种抗原。如果鸽子细胞色素 c 抗原的受体和 $E\alpha^kE\beta^b$ 的识别受体在细胞上是独立的，那么这些 T 细胞应该能和含 $E\alpha^kE\beta^b$ 的细胞呈递的鸽子细胞色素反应，但是它们不能。关于这些数据更好的解释是 $E\alpha^kE\beta^b$ 分子能和蛾而非鸽子的细胞色素相互作用，从而和 T 细胞上的受体形成联合受体对，相反 $E\alpha^kE\beta^k$ 能与细胞色素的两种形式相互作用，这一推测后来证明是正确的[22]。

Rock 和 Benacerraf 首先清楚地阐明能识别一个 MHC 类Ⅱ分子相关的两种抗原的 T 细胞能相互防碍对方的呈递[23]。如此的结果不能被存在 TCR 独立识别抗原和 MHC 分子的双识别模型预示，但是如果认为 TCR 的激活需要抗原和 MHC 分子形成的复合物，则能解释此结果。不相关的抗原将竞争与 MHC 分子的结合，以便成为潜在地刺激性抗原，从而在 T 细胞的活化中相互竞争。

两个关于 MHC-抗原相互作用的系列研究不幸地限制了 Kappler 等人实验的价值。他们的研究提供了解 TCR 特性的机会，因为两倍杂交瘤细胞未出现新反应特性，不仅可能是由于未产生新的抗原-MHC 复合物，而且可能是由于缺乏不同反应性的受体。虽然如此，这些研究仍显示如果有两个分开的 TCR 存在，它们和抗原和 MHC 分子复合物相互作用时必须聚合在一起。

单个 T 细胞受体复合物识别抗原-MHC 组合体的直接证据

在 20 世纪 80 年代的早期，几个研究组开始使用整个蛋白质的碎片作为抗原，以依赖于 MHC Ⅱ类分子

---

① 此处原文为 $E\alpha^kE\beta^k$，实应为 $E\alpha^kE\beta^b$。——译者注。

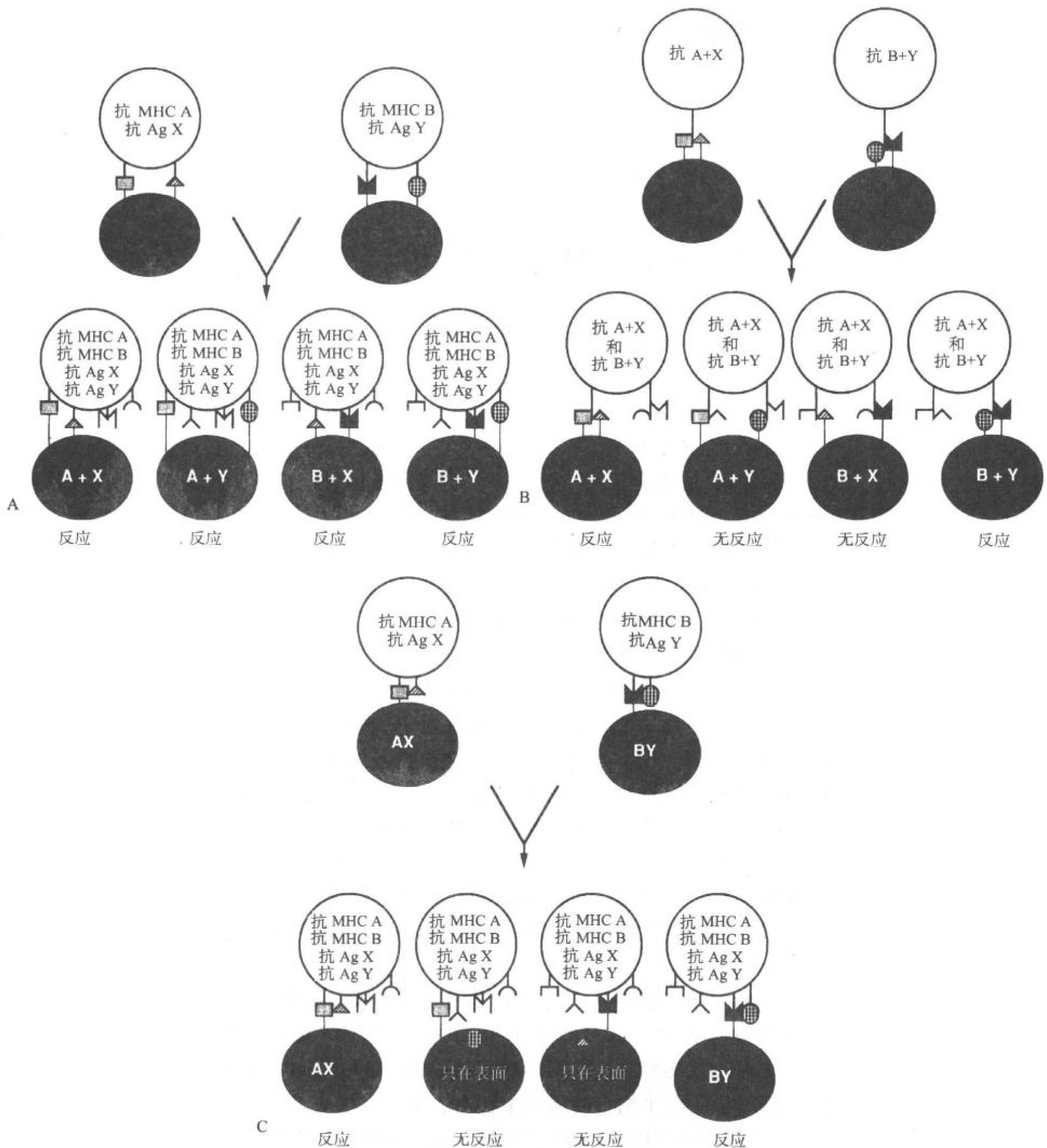


图 9.2　T 研究抗原和 MHC 分子识别独立性的细胞杂交瘤融合试验。此图图示 Kappler 等人试验[20]，其设计研究 T 细胞是否拥有受体独立识别抗原和 MHC 分子。两个具有不同抗原特异性(X 和 Y)和不同 MHC 限制(MHC A 和 MHC B)的 T 杂交瘤细胞融合，然后研究融合细胞对各种抗原和 MHC 组合的反应性。A：如果 T 细胞拥有两个不同受体所预期的结果，这两个受体一个是抗原受体和一个是 MHC 分子受体，当一个抗原受体和一个 MHC 受体同时被结合才能功能活化 T 细胞，所以不仅原先的抗原和 MHC 等位子组合能构成有效刺激，而且抗原与其他 MHC 分子的混合组合也应该有效。B：如果 T 细胞仅拥有一个受体所预期的结果，这个受体拥有 MHC 分子和抗原联合的特异性识别。只有源抗原和 MHC 等位子组合构成刺激。C：如果存在要求的 MHC 分子和抗原的特异性相互作用，同时 T 细胞拥有两个独立的受体，一个针对抗原和一个针对 MHC，并且必须同时占有才能刺激 T 细胞。和单个 TCR 模型相似，只有源母 T 杂交瘤细胞的刺激组合能被看到。实验的实际结果符合模型 B 和 C，而不符合 A，显示要么存在单一受体，要么存在要求的特异性的抗原和 MHC 分子相互作用。

的方式刺激T细胞。由于变性蛋白质能激活T细胞依赖的应答，故蛋白质碎片也可能代用抗原拥有这种能力。Ziegler和Unanue观察到几个重要的现象：①氯喹等试剂能抑制在MHC Ⅱ类分子背景下的完整蛋白质呈递，而此类试剂增高胞内的pH值，抑制酸性蛋白质水解酶的活性；②完整蛋白质的有效呈递要求抗原呈递细胞(antigen-presenting cell，APC)部分存在新陈代谢的活性[24]。Shimonkevitz等人综合这些结果，显示新陈代谢活性主要用于将完整蛋白质降解成小的片段，因为无新陈代谢活性的呈递细胞不能呈递完整蛋白质，却能呈递预先降解的蛋白片段，以MHC Ⅱ类分子限制性的方式刺激T细胞。这些关键的数据清楚地说明至少CD4$^+$ T细胞是与蛋白质的更小部分反应，因为此类细胞介导的迟发型超敏反应并不依赖抗原构型，并且抗原降解成如此小碎片是呈递/识别过程所必要。这些结果建立了一个概念，即抗原的加工过程是抗原经MHC Ⅱ类分子有效地限制性呈递的序曲。

在呈递中抗原碎片能绕过活细胞的新陈代谢机制的能力，导致采用合成肽作为天然产生的T细胞抗原的类似物，从而可以在离体条件下直接探索抗原和MHC分子相互作用。尽管生化学家们预测，在T细胞的抗原识别中，MHC分子不可能以稳定的方式与各种蛋白质结构相互作用。Babbit等人通过使用一个合成的肽抗原和免疫亲合纯化的MHC Ⅱ类分子，显示这些分离组份直接的等位基因特异性结合[26]。这些结果很快被Buus等证实并推广，他们首先报道这些肽和MHC Ⅱ类分子复合物维持相当长的时间[27]。这些生化数据证实了Schwartz[21]、Rock、Benacerraf等人[23]根据功能研究提出的预言，即抗原以等位基因特异性相互作用的方式与MHC分子相互作用。而T细胞识别MHC分子-肽抗原稳定结合物的研究成为建立了MHC限制性呈递理论的依据。

292

在同一时期，一系列研究的分子证据提示T细胞和MHC-肽复合物的双特异性结合是由单个克隆化分布的受体介导。通过基因克隆第一次获得了单个T细胞克隆表达的免疫球蛋白样结构(αβTCR)的蛋白质数据(见第10章)。通过研究单个T细胞杂交瘤的α和β基因家族的重排和与抗原-MHC分子的识别，Yagüe等人认为一对α和β链聚集成受体结构，介导T细胞的双特异性结合[28]。这个解释得到两组研究者的试验支持，他们将一个已知其结合特性T细胞的α和β链基因转移到一个无关的T细胞，此α和β链聚集成二聚体，使接受转移的T细胞获得和原T细 胞一样的结合特性[29,30]。

293

这样，肽结合试验显示出MHCⅡ类限制性T淋巴细胞的TCR识别配体是具有较长半衰期的肽-MHC分子的复合物，而基因转移研究提供的证据说明与此复合物是被结合与单个区域的免疫球蛋白样受体识别，所有的这些结论均和改变自我模型的期望一致。然而，在MHC Ⅰ 类分子的抗原呈递中，并没有使用抗原碎片或肽和通过试剂抑制胞内抗原降解影响抗原递呈的类似试验。这样，尽管有力证据证实肽-MHCⅡ 类分子复合物是一些αβT细胞(CD4$^+$亚群)受体的配体，而占优势的看法仍然是MHCⅠ类分子与完整膜固定的病毒或自身蛋白质直接结合。与这个模型看起来一致的证据是Morrison等人的结果，他们发现当流感病毒的血凝素蛋白质内吞进入细胞，经酸性依赖的蛋白酶降解，可呈递活化MHC Ⅱ类分子限制性的T细胞，但是如果此蛋白质在胞内瞬时合成则不能有效呈递[31]。相反，如此活跃的合成是Ⅰ类分子呈递所必需的，而从外界吞噬的完整蛋白质被认出是不能有效的被MHCⅠ类分子限制的CD8$^+$细胞毒性T细胞识别。

但是随着Townsend等人的意外发现，看法发生了变化。他们发现流感病毒的内部核蛋白能被某个一类分子限制性细胞毒性T细胞识别，而这种识别能被与核蛋白某部分类似的短肽所替代[32]。这些数据与在MHC Ⅱ类分子建立的肽-MHC复合物模型完全类似。提示被Ⅰ类分子限制性T细胞识别的蛋白质抗原可能是结合与MHC Ⅰ类分子的蛋白质小片段，而不是表达于细胞表面的完整蛋白，这些数据被以后的生化研究所证实。

Ⅰ类和Ⅱ类MHC分子在不同的胞内区域呈递抗原肽

Ⅰ类和Ⅱ类MHC分子均以短肽方式呈递抗原，并且活化由相同基因片段组指导合成αβ受体的T细胞，引出MHC两类分子在抗原呈递中是否具有不同角色的疑问。基于Morrison等人的观察，两类分子的呈递抗原的不同之处在于：Ⅱ类分子呈递抗原来源细胞外，而Ⅰ类分子呈递抗原则由细胞内合成[31]，另外已知的不同之处是在效应功能方面MHCⅡ类限制性和MHC Ⅰ类限制性T细胞的差异。这些差异建议两类MHC分

子在细胞内不同的区域捕获抗原肽[33]。提供抗原肽到这些区域的蛋白质大部分(并非绝对)可根据他们的胞内位置划分成两类,一类在细胞内合成或者通过诸如病毒融合进入胞浆,提供肽与 MHC Ⅰ类分子结合,另一类从胞膜或胞外进入细胞的内吞系统,提供肽参与 MHC Ⅱ类分子呈递[33~35]。

关于 MHC 两类分子不同抗原呈递方式的这个假设,和研究牢固建立的 αβT 细胞通过肽- MHC 分子复合物识别抗原的观点,导致大量关于肽-MHC 分子相互作用分子基础,肽产生、捕获、呈递的细胞生理学和 T 细胞识别肽-MHC 复合物细节的研究。如此研究鉴定了细胞产生的与Ⅰ类和Ⅱ类分子相结合的肽;获得了肽-MHC 分子复合物、αβ TCR 和肽- MHC 分子及 αβ TCR 复合物的晶体结构图像;发现许多参与抗原处理、呈递的新基因;并且揭示了在细胞表面表达可识别的肽-MHC 复合物前复杂的胞内转运的模式。在 MHC 基因区域外编码的特殊非经典 MHC 分子被发现参与特殊肽或非肽结构的呈递,而经典的Ⅰ和Ⅱ类 MHC 分子的非经典呈递途径也被描述。胞质和内体(endosome)的蛋白质降解系统处理抗原和相关的许多细胞功能的主要特性已经基本清楚。这样,我们现在开始获得关于获得性免疫识别中这个关键方面的相当全面理解。

在抗原呈递中配体结合分子的蛋白质结构和遗传组织方式

MHC 的遗传结构

现已经获得人、小鼠和大鼠包含主要组织相容性复合体的染色体区域的详细图谱,而一些其他动物如黑猩猩和小型猪的相似区域虽未完成,但是已经进行了一些遗传信息作图研究。大规模作图和核酸测序将很快提供人 MHC 的一幅完整分子图谱[36,37](见第 8 章 MHC 基因组织的更广泛描述)。在每个物种的 MHC 区域均覆盖数百万碱基 DNA。图 9.3 包含人和小鼠 MHC 的图解,显示主要的Ⅰ类和Ⅱ类基因。除了这些基因,MHC 区域还包含非经典Ⅰ类基因和一些位于Ⅱ类基因区域的基因,其产物被证实或怀疑参与抗原肽的形成和Ⅰ类和Ⅱ类 MHC 分子对肽的获取。这些基因——TAP-1 和-2、LMP-2 和-7、DMα 和 DMβ、DOα 和 DOβ——将在描述抗原处理的细胞生物学的章节中详细讨论。MHC 也包含大量其他基因,其产物免疫功能与抗原处理和呈递无直接联系,例如补体的第四组分和肿瘤坏死因子 α(TNF-α),尽管后者在树突细胞的成熟中起作用[38~40],可因此被考虑此细胞因子在抗原呈递扮演重要角色,从而为它的在 MHC 区域存在提供一个可能的原因。

294

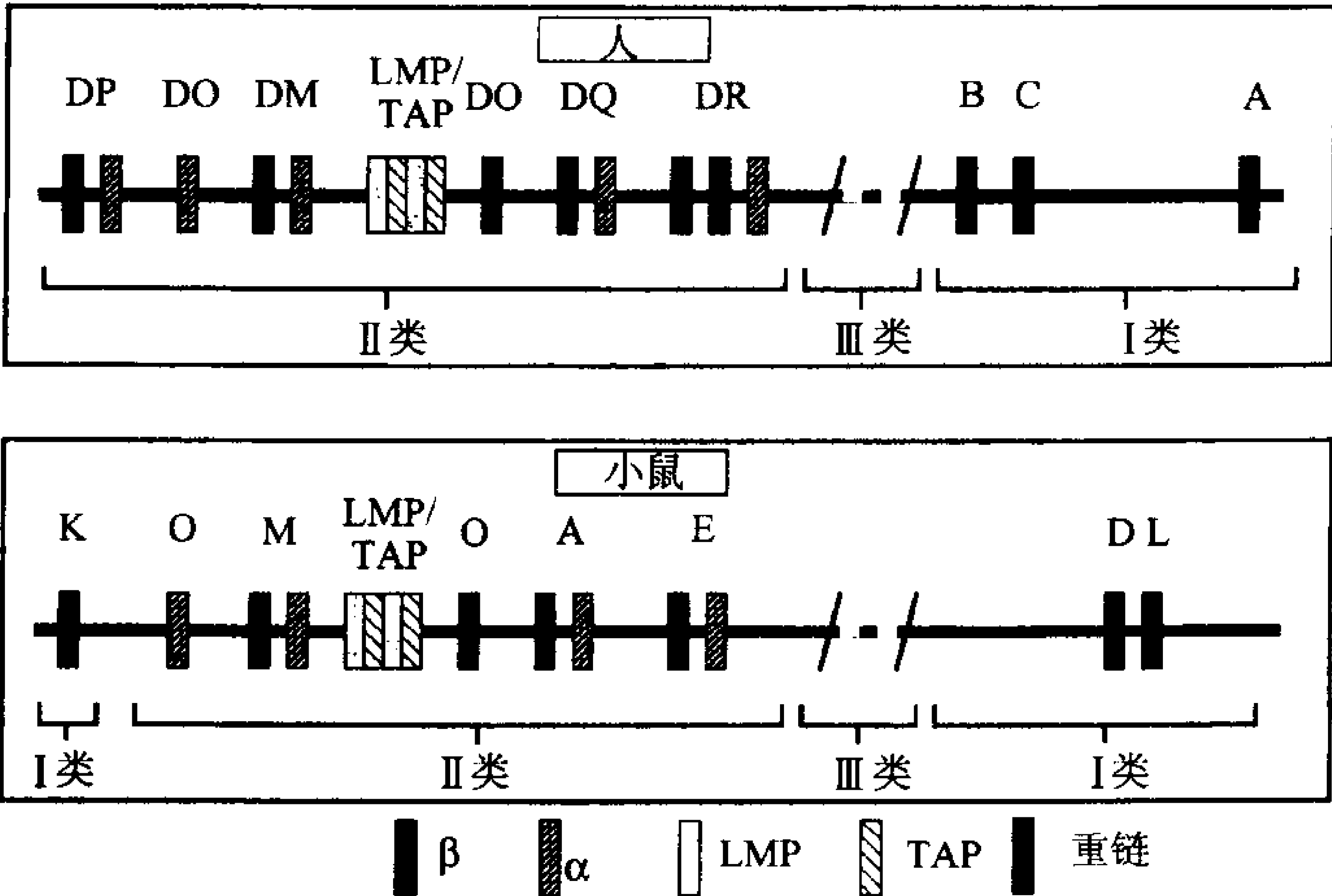


图 9.3 人和小鼠 MHC 复合物的示意图。此图示人和小鼠主要Ⅰ类和Ⅱ类分子的相对位置,以及几个被认为参与抗原处理和呈递 MHC 相关基因。为简洁未显示 Ib 类基因(细节参看第 8 章)。

MHC Ⅰ类和Ⅱ类基因和蛋白质

Ⅰ类分子

大量不同的Ⅰ类分子遗传基因座已经被鉴定。在人类中,有功能 MHC Ⅰ 类基因座有 *HLA-A*、*-B*、*-C*、

-D、-E、-F 和-G[41]。其中 A 和 B 遗传基因座具有广泛的种内多样性，C 基因座变化少一些，而 G 基因座在个体之间则几乎没有差异。在小鼠，有功能高度多样性的Ⅰ类蛋白质分子是由 H-2K、D 和 L 遗传基因座编码。另外较少变化的蛋白质分子则由 Qa 和 TL 遗传基因座编码，组成Ⅰb 类分子和非传统Ⅰ类分子[42]。各种Ⅰ类分子具有不同的组织分布和表达调节，HLA-A、-B、-C 和 H-2K、D 和 L 的编码产物以不同的水平广泛的存在各种体细胞，其中血源性细胞中表达最高。HLA-G 在胎儿的滋养细胞中表达[43]，而小鼠的 Qa-2 在成熟 T 细胞强表达[44]。Ⅰ类分子的表达受到各种细胞因子的强烈影响，特别是 IFN-γ 和 TNF-α。

许多经典和非经典Ⅰ类分子遗传位点产物的结构是相似的，均为Ⅰ型穿膜蛋白，其成熟糖蛋白形式的分子质量为 45 kDa。被称之为 Ⅰ 类分子重链，根据生化特性和基因外显子-内含子的关系可将重链分为几个亚结构域[45]。N 端区域称之 α1，随之相邻为 α2。这两个区域每个均由单一外显子编码，包含了许多主要的体现种内多样性的基因座。第三个结构域也由单一的外显子编码，与免疫球蛋白结构域有相当的序列同源，拥有有限的多态性。此免疫球蛋白样结构域的一部分(223～233 位氨基酸)形成一个环，是 CD8 共受体的主要结合部位[46,47]。在这个外显子后的一系列外显子编码穿膜区、胞质尾。采用几个小的外显子编码Ⅰ类分子的胞质尾部，从而可以通过改变剪接方式产生在胞质区域不同的蛋白质序列。

除了重链外，成熟的膜型Ⅰ类分子包含一条非共价键结合的 12kDa 多肽，即 β_2 微球蛋白(β_2m)。编码 β_2 微球蛋白的基因不位于 MHC 区域，它几乎没有等位基因变化。β_2 微球蛋白由一个单一的、可溶的、免疫球蛋白样结构域组成，由 β_2 微球蛋白基因中第二外显子编码。

Ⅱ类分子

Ⅱ类分子由一个非共价结合的 α、β 链异源二聚体组成[48]。α 链(33kDa)、β 链(29kDa)均为Ⅰ型穿膜蛋白，这与Ⅰ类分子中仅重链锚定膜上而 β_2 微球蛋白则情况不同，而穿膜片段间的相互作用有利于二聚体的形成和稳定[49]。由于Ⅱ类分子 α 和 β 基因(分别编码Ⅱ类分子的 α 和 β 链)通常同时表达，一个细胞包含来源不同遗传基因座或者同一基因座两种等位基因的几种Ⅱ类 α 和 β 链。原则上，这可能导致由于混合配对各种 α 和 β 链，而出现大量Ⅱ类异源二聚体，然而，事实上紧密连锁群的α 和 β 链基因能最好地聚合，而通常来源其他基因座的Ⅱ类分子链不能有效地聚合[48,50,51]。组合优先配对和竞争结合的结果可以获得由生化和血清学研究确定的同种型Ⅱ类二聚体的特征[52]。人的 DR 基因座拥有多个紧密连锁的可编码有功能 β 链的基因，每个均能与单个的相对缺少多样性的 DR α 链配对。同样，虽然限制并不严格，但是在单一个基因座不同等位基因间共表达和聚合仍受到限制，这提示共遗传的 α 和 β 链的多样性区域同时进化，以便优化聚合和共表达[51]。尽管存在遗传基因座和等位基因限制聚合和共表达的普适性原则，一些混合的同种型或混合的等位基因二聚体形成的交叉配对的确存在[53]，虽然低水平表达但具有重要的生物功能[54]。

在人类中，主要多态性的 MHC Ⅱ类分子是 DRαDRβ、DPαDPβ、DQαDQβ，而小鼠则为 AαAβ、EαEβ。其典型表达在各种血源性细胞如 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞，以及大量的上皮细胞，特别是在胸腺的上皮细胞。大多数体细胞如不暴露在某些细胞因子多不表达Ⅱ类分子，细胞因子特别是 IFN-γ 能诱导许多种细胞表达Ⅱ类分子。其他的Ⅱ类分子如 DO 则有更为有限的组织分布和更低的膜上表达水平[55,56]。

和Ⅰ类分子相似，Ⅱ类分子的蛋白质结构与 α、β 基因的外显子-内含子组织方式相关。起始外显子编码了信号肽和成熟多肽链 N 端的少数几个氨基酸残基。随后 α、β 基因的第二个外显子编码了一个约 90 个氨基酸残基的区域，分别命名为 α1、β1，这个区域包含许多基因座显示大量的种内多态性。第三个外显子编码 α2、β2 结构域，与免疫球蛋白同源，仅限于等位基因变化。穿膜区和胞内区则由 α 的 5、6 外显子或者 β 的 5、7 外显子编码。人的 DQβ 基因在与小鼠 Aβ 同源的第 6 外显子的剪接受体信号方面有缺陷，从而使 DQβ 蛋白胞内区与第 6 外显子对应部分缺失。

MHC 分子的结构细节和肽结合、呈递的化学观点

在 20 世纪 70 年代末 80 年代初，利用表达 MHC Ⅰ类、Ⅱ类分子的野生型和突变体的细胞，详细研究了

295

其结构与功能的关系。广泛使用离体突变编码Ⅰ类、Ⅱ类蛋白质的 DNA 分子,转染后表达突变蛋白的技术,研究 MHC 分子的不同部分,甚至这些部分的单个氨基酸与其肽结合或者 T 细胞识别的关系[57,58]。这些研究鉴定了与蛋白质折叠、聚合、膜表达、血清反应性和抗原结合、呈递相关的特定残基。根据这些工作的数据建立了 MHC 蛋白质的结构域模型,对 MHC Ⅱ类分子还推测了多型性残基的排列方式[59]。在 1987 年,第一次获得了 MHC 分子-人的 HLA-A2 蛋白质的晶体结构,以往粗略但大致正确的结论很快被晶体结构分析所替代(见第 8 章)[60,61]。此研究第一次描述 MHC 分子肽结合部位的细节结构,阐明那些已知与肽结合、T 细胞识别相关的多态性氨基酸残基的位置和方向。

现在已经获得大量人和小鼠的传统Ⅰ类、Ⅱ类分子以及Ⅰ类样的 CD1 分子的晶体结构。均为此类分子的胞外部分,它们或产生于淋巴细胞膜表面分子的蛋白质酶解,或由重组杆状病毒转染昆虫细胞表达,或来源大肠杆菌的重组表达。其中一些结构,特别是来源于淋巴细胞的 MHC 分子,包含由一系列的异源的结合肽,也有些则只含有一种肽分子。后者在原子水平显示单个肽分子与 MHC 结合的细节。

Ⅰ类分子的 α1 和 α2 结构域形成了一个肽结合部位,以 8 个片层的 β 折叠为底,两个分别来源 α1 和 α2 结构域的 α 螺旋围成沟槽结构。$β_2$ 微球蛋白不仅与免疫球蛋白样的 α3 结构域结合,而且与形成结合槽底部的 β 折叠接触。所有结构均显示在肽结合槽存在一系列的结合口袋[62~65]。在某些情况下,在结合区的底部和螺旋壁之间,结合口袋可以延伸得很深。对至今的大多数 MHC Ⅰ类分子数据而言,均存在相似但不一致的结合口袋分布,它们现被命名为 A ~ F。

在第一个 HLA-A2 结构,一个最为显著和满意的特征是:大量位于高度多态性位置的氨基酸残基侧链指向肽结合区域,很显然它们显著影响结合的肽属性[61]。几乎没有多变的氨基酸残基指向超过结合槽的螺旋壁,或者离开结合区域。这些数据明确地支持 MHC 分子的多态性与其肽结合的特异性相关,也就是说不同 MHC 分子其实结合不同类的肽。同是这些数据也显示 MHC 分子的序列多态性并不直接控制其与 TCR 的结合,因为大多数变化的侧链与肽结合后被包埋,而不能被 TCR 获取。最近与 αβTCR 结合的 MHC Ⅰ类分子-肽复合物的晶体结构[66,67]显示 TCR 实际结合于 MHC 分子的肽结合周围区域,而不是像以前的数据期望与多态性侧链区域结合,这说明 TCR 的结合主要与 MHC 分子的保守区域相关。有趣的是,在至今获得的少数几个 TCR/配体结构,TCR 相对 MHC的大致旋转方向是一样的,这建议 TCRα、β 链的 V 区与 MHC 的肽结合周围区域的相互作用相对保守。关于后面结果的意义将在 T 细胞识别的章节中进一步讨论。

296

MHC 结合肽的化学性质已经被晶体结构所确定[68]。大多数结合肽为 8 ~ 9 肽,其是中间存在绞结结构的延展构型。MHC Ⅰ类分子结合肽的一个重要特性是:其 N 端与Ⅰ类分子保守的第 7、59、171 位的酪氨酸形成氢键,而其 C 端与Ⅰ类分子保守的第 84 位的酪氨酸、第 143 位的苏氨酸、第 146 位的赖氨酸形成氢键。另外结合肽的第一个和倒数第二个残基的羧基分别与Ⅰ类分子的第 159 位的酪氨酸、第 147 位的色氨酸形成氢键[64,69]。不变残基与所有肽相似结构组分形成保守的氢键可以解释多态性的 MHC Ⅰ类分子如何与众多不同肽结合[70]。因为保守的氢键对于稳定 MHC Ⅰ类分子-肽结合十分重要,故如果肽的 N 端和 C 端不能有效参与这种结合,其几乎不可能与Ⅰ类分子紧密结合。这样为优化与Ⅰ类分子结合就导致相对的肽长度限制,因为长于或短于 8、9 个氨基酸的肽链很难在形成氢键的同时能在结合槽中轻松伸展。在那些更长的肽结合例子中,如果其 N 端和 C 端合适的与保守区域结合,其中间的氨基酸残基则拱出[71],或者 F 结合口袋附近的保守残基与肽的羧基形成次稳定键,而超过此位点的残基向上伸出结合槽[72]。这些情况和短而合适的 8 肽或 9 肽相比,均不能形成最高的亲和力,但是这些含有长肽的复合物可构成某些 TCR 的有效配体。分析与 8 肽或 9 肽共结晶的 MHC Ⅰ类分子 K^b,发现单独Ⅰ类分子的结构显著受到肽结合的影响,其与 TCR 接触的 α2α 螺旋的氨基酸有着不同的组成位置[63],这为老的改变自我的 T 细胞识别模型提供了生化支持。

通过研究等位基因多态性与结合槽中结合口袋的形状和化学性质的关系,研究长度相同序列不同肽与 MHC Ⅰ类分子结合特性,阐述了Ⅰ类分子与肽复合物的第二个特征。大量Ⅰ类分子多态性的位点形成结合槽中结合口袋的形状和化学性质。举例说明,HLA-A2 的 B 结合口袋适合与 2 位为亮氨酸的 HLA-A2 呈递肽结合。而 HLA-B27 含有天冬氨酸的 B 结合口袋适合含精氨酸的呈递肽。H-$2K^b$ 深的 C 结合口袋喜欢与 5 位

为苯丙氨酸或色氨酸的多肽结合。

一个仅能部分回答的疑问是采用Ⅰ类分子总结的化学策略适合Ⅰb类分子与肽结合的程度。至少在一种情况下，已发现特定修饰不同的Ⅰ类分子保守结构影响其与肽N端的结合。通过研究特定CTL反应鉴定的第一个Ⅰb类分子现称之为H-2M3，其呈递一个N端为甲酰化蛋氨酸的线粒体多肽[73]。这种修饰在线粒体和原核生物较为多见，而真核生物蛋白质尚未发现，因此构成一个普遍的区分自己和非己的化学特征。H-2M3分子第171位的酪氨酸在Ⅰ类分子高度保守，参与肽自由氨基末端的氢键形成，采用苯丙氨酸替换后，显著影响了H-2M3分子与*N*-甲酸基团的结合[74]。一种特定呈递*N*-甲酸化肽的MHC Ⅰ类分子可发现来源胞内细菌如单核细胞增多性利斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的多肽，而CTL细胞可以直接识别这种复合物则能保护由这种微生物感染所引起的疾病[75,76]。

小鼠非MHC编码的Ⅰ类分子样(重链 + β_2m)的CD1分子也获得了晶体结构分析。与典型的Ⅰ类分子不同，公认的配体结合区域发生较大变化。它缺乏与肽N、C端形成氢键的保守氨基酸，而且结合槽的一端即A、B结合口袋相对狭窄，其他结合口袋特别疏水[77]。这些特征与CD1分子参与含脂的非肽成分的呈递相吻合。

大量MHC Ⅱ类分子的结构也被结晶解析[80~85]。Ⅰ类和Ⅱ类分子含有相同的肽结合区域且显示强烈的序列同源性，提示两类分子主链几乎拥有相同的三维结构。这与以突变为基础的结构功能研究相一致，突变研究显示在Ⅰ类和Ⅱ类分子改变许多同源的氨基酸对肽结合和T细胞识别有着相似的影响。与Ⅰ类分子一样，Ⅱ类分子在肽结合区域含有几个多态性的结合口袋，结合肽特定氨基酸的侧链则结合于其中。

同时，Ⅱ类分子存在几个区域，不能由Ⅰ类分子的构型精确预测，这些区域具有显著不同的组成方式。这些结构上的差异有着重要的功能意义。可能最为重要的区别是Ⅱ类分子不拥有Ⅰ类分子参与短肽N、C端结合的保守氨基酸残基，改变Ⅰ类分子结合槽封闭两端的氨基酸残基使Ⅱ类分子的结合槽两端开放。这个特征导致Ⅱ类分子结合肽缺乏Ⅰ类分子结合肽类似的严格长度限制，而晶体结构也显示与Ⅰ类分子不同，Ⅱ类分子结合肽的残基伸展超出其结合区两端。然而，和Ⅰ类分子一样，Ⅱ类 分子与肽结合也存在普遍的、不依赖序列的特性。Ⅱ类分子主要与肽的主链原子形成氢键，而不是肽的N、C端，这主要由散存与两个α螺旋的天冬酰胺参与，对于存在结合槽内的N、C端也存在保守残基的结合。与Ⅰ类分子结合肽相比，结合于Ⅱ类分子的肽几乎多呈线状结构，而不存在绞结[86]。Ⅱ类分子的α2与免疫球蛋白样结构域β2的空间关系也不同于Ⅰ类分子相应的α3与β_2m。

297

可能最没有预料的MHC Ⅱ类分子特征是在几个结晶结构中，存在Ⅱ类分子二聚体的二聚体，或称之为超二聚体，虽然现在发表的人和小鼠的Ⅱ类分子晶体结构中，超二聚体中单体的精确方向不同。虽然现在不清楚结晶过程MHC Ⅱ类分子自聚合的生理意义，推测其可能与稳定TCR结合以便活化第二信号系统有关[80,87](见第10~12章)。CD4共受体与Ⅱ类分子集合的主要位置定于β2结构域的137~143位氨基酸残基，在晶体结构这个区域形成一个环，与Ⅰ类分子与CD8结合的223~239位残基相似[88,89]。有趣的是鉴定的影响Ⅱ类分子与CD4结合的第二区域位于Ⅱ类分子的α2结构域[90]。它位于β2结构域的对面，不可能与同一个CD4分子相互作用(图9.4A)。但在超二聚体，位于Ⅱ类分子的α2结构域的区域与β2相近(图9.4B)，所以可能稳定寡聚体结构，参与TCR与肽-MHC Ⅱ类分子结合的T细胞信号转导。CD4能二聚化和在溶液中TCR/肽-MHC Ⅱ类分子复合物可形成高度有序结构均提示这种寡聚化的意义。

Ⅱ类分子同样也呈递非肽配体。一些病毒和微生物的产物被命名为超抗原(见第10章)，因为它们能不受限个体TCR克隆特异性，活化总T细胞池中的一大部分[93]。这是超抗原与特定种类TCR V_β片段的特异性结合的结果[94~97]。细菌和病毒的超抗原刺激T细胞均不需要蛋白酶降解成短肽，细菌毒素超抗原的晶体结构分析显示公认的TCR结合残基是由线性蛋白质链中相距甚远的氨基酸折叠聚成[98]，与MHC Ⅱ类分子结合的残基也是同样的情况。细菌毒素超抗原(如SEB、SEA、TSST-1)的功能依赖其与MHC Ⅱ类分子物理结合，现在这几个毒素超抗原与MHC Ⅱ类分子结合结构已经被解析[82,83]。SEB和TSST-1与MHC Ⅱ类分子虽然均与α链相关，但位于不同的部位。如同突变功能研究的提示，毒素结合与肽结合槽的外侧，虽然TSST-1

覆盖结合槽使结合肽的侧链可能影响结合强度[99,100]。由于结合部分位于Ⅱ类分子结合槽外的更为保守的区域，与肽呈递相比，等位基因多态性具有更小的影响。病毒超抗原与 MHC Ⅱ类分子的相互作用，如小鼠乳腺肿瘤病毒编码蛋白 *orf*，还未广泛分析，但是它们可能以同样的方式结合与Ⅱ类分子结合槽的外侧。

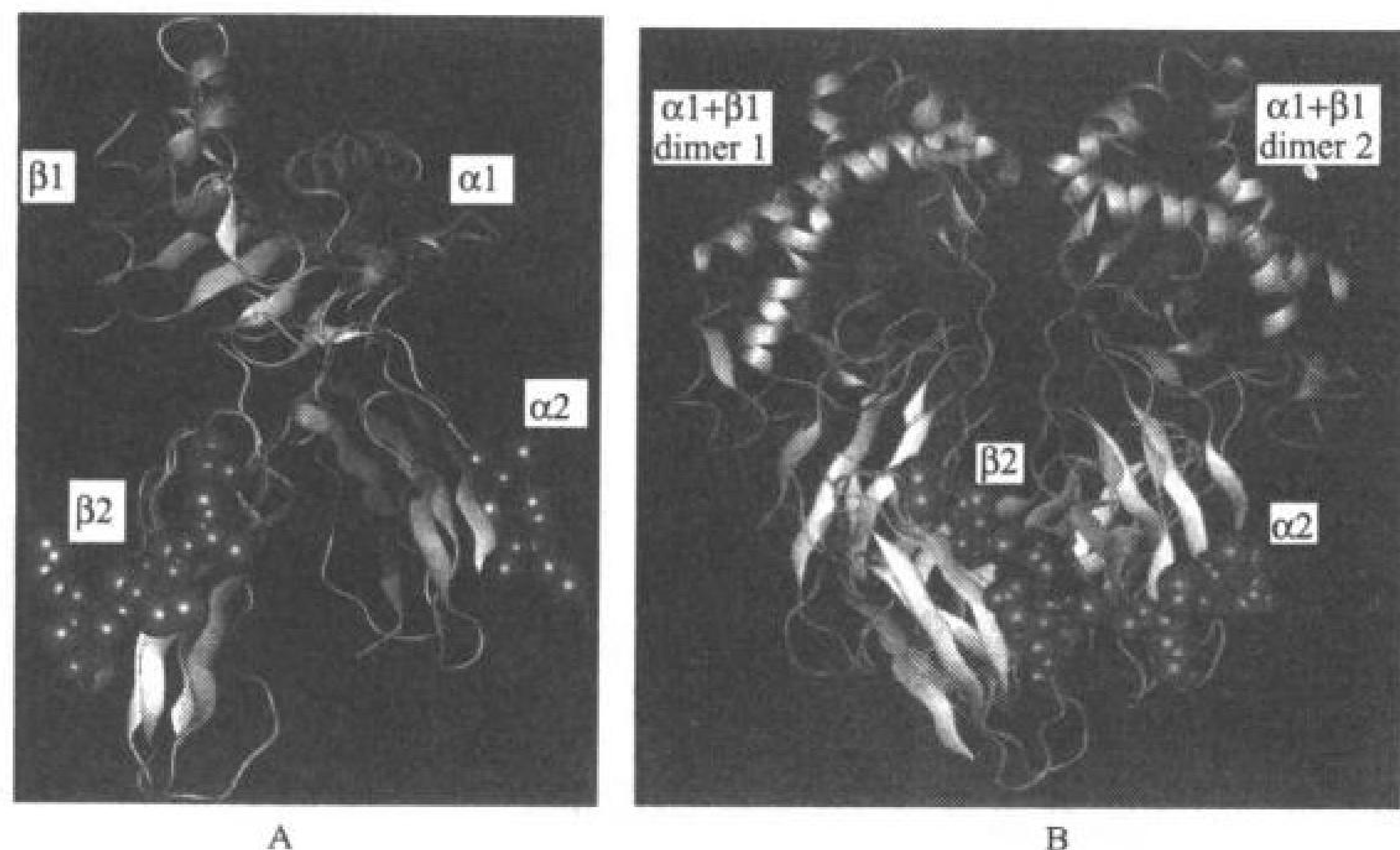


图 9.4 A：控制 MHC Ⅱ类分子与 CD4 相互作用的两个位点的位置（红色球型残基）。一个位点是β链内包括 137～143 位残基的环状结构（标记为β2），它和 MHC Ⅰ类分子的 CD8 相互作用位点同源。另外一个位点在α链的α2 结构域（标记为α2），似乎不可能结合于β2 位点的 CD4 分子接触到同一个 MHC Ⅱ类分子的α2 位点。B：两个Ⅱ类分子αβ异源二聚体（二聚体 1 和二聚体 2）的图示来源于 Brown 等人[80]报道的二聚体的二聚晶体结构，显示一个 MHC Ⅱ类分子二聚体的β2 位点相邻于第二个Ⅱ类分子二聚体的α2 位点。显示这两个位点可作为一个 CD4 分子的联合表面，这可帮助稳定 TCR 寡聚体成信号复合物。

MHC-肽相互作用化学特性的生物学意义

从这些新的肽-MHC 相互作用结构的分子水平观点，许多关于抗原呈递到 T 细胞的生物学特性可以被真正理解。特别是 T 细胞抗原识别的等位基因特异性能看作 MHC 分子多态性三个不同效应的综合。一是包绕肽暴露残基的α螺旋顶端的不同侧链的作用，最近 MHC Ⅰ类分子-TCR 复合物的研究显示 MHC 这个多态性区域直接影响与 TCR 的结合。即使等位基因变化仍能维持一些结合，但是其导致 TCR 特定结合部位（CDR3）的方向变化，从而干扰 TCR 与暴露肽侧链的相互作用[66,67,101,102]。这样即使两个 MHC 分子结合同一个构型相同的肽分子，其在这些暴露区域的等位基因不同仍将限制其识别。在 MHC 等位基因中，并没有太多这种完全暴露在外、存在大量变化的残基，但这种差异的确存在，并且那些侧链指向结合区、部分暴露的残基也参与调节 TCR 结合。

第二是在结合位点等位基因差异的作用，特别是那些影响各个结合口袋大小和化学特征的差异，这有效地调节一个 MHC 等位基因产物与特定肽的结合能力。对于一个抗原产生的所有的肽段，不同等位基因的 MHC 分子趋向结合的肽也不同。Rosenthal[103]和 Benacerraf[19]根据等位基因限制的抗原反应和 IR 基因的功能，建议等位基因间与来源抗原肽段结合的量化差异构成抗原簇选择原则。现在已认识到针对某个 MHC-肽复合物暴露残基的特异性 T 细胞不可能和其他 MHC-肽复合物具有高亲和力，即使不同等位基因的 MHC 分子结合的两个肽具有相同的暴露残基。结合、呈递不同的肽至少可部分看作等位基因特异性的抗原呈递。另外，自身蛋白质也能产生多肽与 MHC 分子结合，从而导致 T 细胞群体中的自身耐受[104]（见第 10、20 章）。那些与自身蛋白质仅存在几个氨基酸位置差异的外源蛋白质将产生一个或几个不同于自身蛋白质的肽段，然而原则上它仍能被存在的有功能的 T 细胞识别。但是采用这些有限数量的潜在肽段去刺激一个反应，有可能特定的 MHC 等位基因不能有效结合这些非自我肽，从而出现不反应状态。正如解释 IR 基因的功能所期望，当蛋白质与自身明显不同时，如此的缺陷更为罕见。

T 细胞反应的第三个多态性效应是一个性质问题。从量化的角度，MHC 结合区域的一些改变并不阻碍对某个肽的结合，但是它们将改变肽的结合方式；另外地，比较结合不同肽的相同一级蛋白质顺序的 MHC 分子，可发现结合改变了 MHC 分子的构型，正如 Kb 分子与仙台病毒和水泡性口炎病毒肽的复合物所显示的一样[63]。这种情况的第一个例子是改变位于β片层中央部分的一个指向结合槽的残基。如此的残基并不直接与 TCR 相互作用，但是通过比较仅此位点不一样的等位基因 MHC 分子，发现它能扭曲结合肽的形状。两者可结合以同样数量结合一样的肽，但是提供给 TCR 相互作用表面的实际构型显著不同[22]。这强调线性

的氨基酸顺序限制并不能完全确实肽抗原真实的抗原结构:这结构仅仅在结合于 MHC 分子以后所获得并且依赖于结合 MHC 蛋白质的性质。这样,当结合在两个不同的 MHC 分子时,同样的肽能被认为不同的抗原。TCR 认别并非不依赖空间构型;而是它不仅仅取决于来源于原蛋白质的抗原肽构型。

与Ⅰ类和Ⅱ类分子天然结合肽的鉴定和特征

我们对于 MHC 分子-肽结合细节的理解,其主要进展的得益于从正常或感染细胞的 MHC 洗脱的肽分子,及其大小和顺序分析方法的发展(图 9.5),以及离体采用合成肽[105],组合的肽库[106],或噬菌体肽展示[107]进行结合研究。这些方法允许确定天然被处理肽的长度,鉴定这些肽来源的蛋白质,并且发现特定 MHC 等位基因产物所结合肽的化学结构偏向。它们导致可能快速分析来源于病原体且在感染细胞与 MHC 分子结合的肽抗原,并且可鉴定作为肿瘤抗原的自身肽或突变肽[108~112]。关于 MHCⅠ类和Ⅱ类分子等位基因多态性特征在抗原肽呈递选择方面的作用,洗脱肽的化学特征提供了一个更深理解,而关于结合肽来源蛋白质的知识则帮助了解细胞内抗原处理和肽装配途径。大量合成肽和肽库的研究特别提供了足够的数据,允许构造算法预测蛋白质内的肽顺序与特定 MHC Ⅰ类和Ⅱ类 等位基因结合的强度,从而可鉴定蛋白质数据库中潜在结合序列。

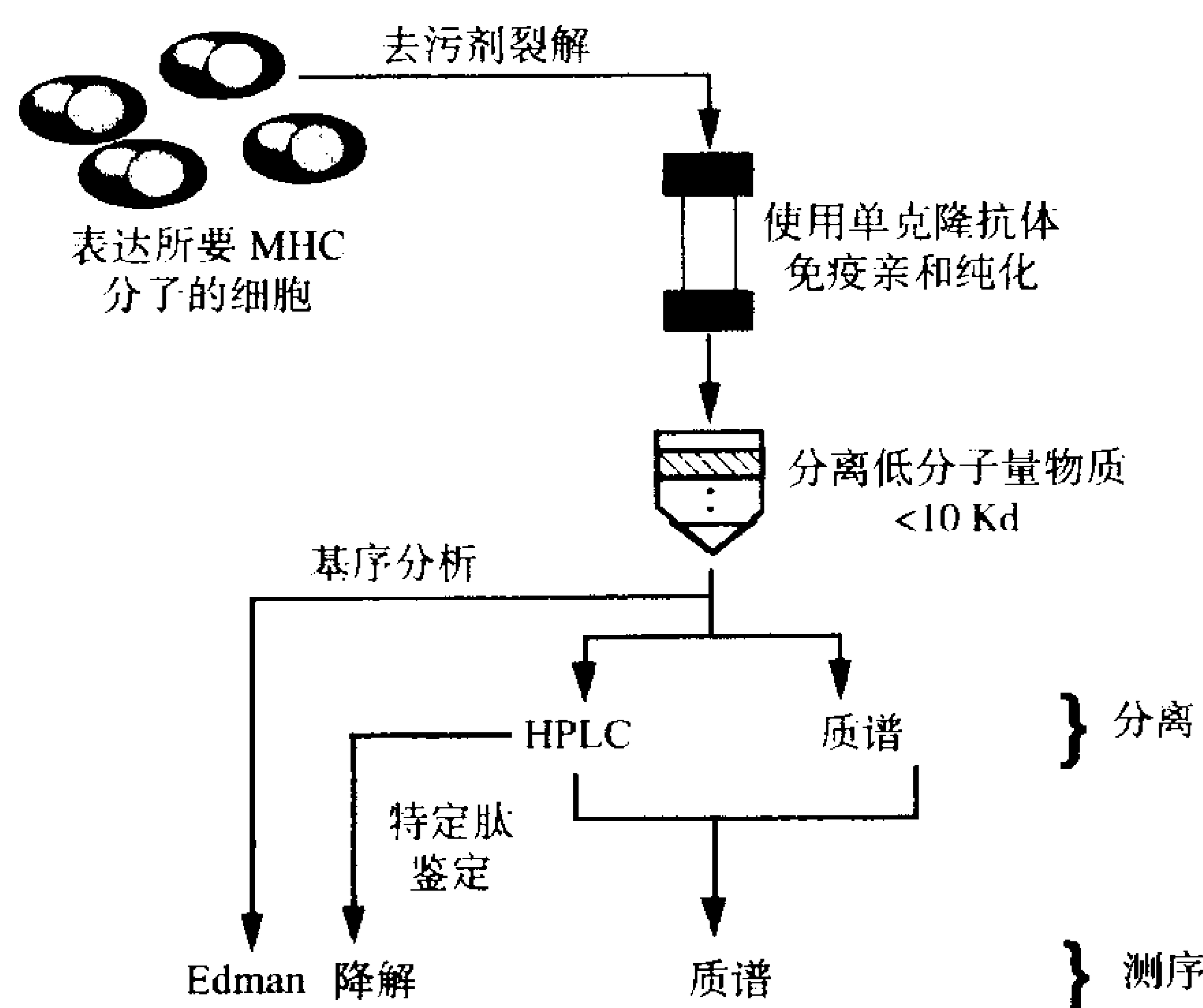


图 9.5 MHC 相连肽洗脱、鉴定和测序的技术路线。图示如何去污剂裂解选定细胞源后,通过固定 MHC 单抗的亲和层析获得 MHC。获得的 MHC 分子经酸变性,通过过滤从大的 MHC 链(在Ⅰ类分子时,含有 β_2m)分离多肽。肽池要么被完整测序,观察序列特定位点的显性基序或锚定位点,要么使用 HPLC 联合或不联合质谱分离和鉴定单个肽。这单个肽然后能通过 Edman 降解或质谱测定序列。从许多单个肽的池序列中可发现基序,而可通过分离肽序列鉴定源蛋白。通过测试 HPLC 分离的各部分对特定活化 T 细胞群的刺激能力,可在测序前鉴定感兴趣的生物活性多肽。

与Ⅰ类分子结合的多肽

根据 HLA-A2 重链和 β_2m 的已知氨基酸顺序不能说明 HLA-A2 晶体结构中一部分电子密度图。在这部分额外密度位于假定的结合肽槽沟内,除了材料的异质性,与它代表整个免疫亲和纯化和结晶中留在 MHC Ⅰ类蛋白质分子的多种肽相一致,这显示Ⅰ类分子与肽的相互作用是很稳定的,并且在纯化Ⅰ类蛋白质后,洗脱结合肽可能具有合适的数量进行直接的化学分析。对这预言的最初尝试是洗脱肽的功能分析。如图 9.5 所示,Rammensee 和同事使用单克隆抗体分离了大量老鼠 MHC Ⅰ类蛋白质,然后采用酸洗脱结合肽。低分子质量的洗脱物质(<10 kDa)在反相高效液相(HPLC)分离,然后测试 HPLC 分部收集敏感细胞成为特定细胞毒性 T 细胞靶细胞的 能力。HPLC 梯度分离的分部收集可使靶细胞敏感,当不同特异性的 T 细胞作为效应细胞使用时,在这个分析中,不同的分部收集具有活动[113,114]。这些数据提供清楚的证据提示经天然胞内处理后结合在Ⅰ类分子的肽能回收成具有生物学活性、大概完整肽分子,并且暗示如果能获得足够的材料,将可能分析收回肽的化学性质。在这些研究过程中有一个意外的观察,当细胞合成源蛋白质,但缺乏相应Ⅰ类分子时,这种通常与某种Ⅰ类分子结合的肽不能被发现[115]。这样,累积那些与Ⅰ类分子结合的肽到

可检测水平，需要Ⅰ类分子的捕获、呈递，否则这些肽很快降解到每个细胞只有一到两个拷贝的稳定状态水平。

这种洗脱方案第一次应用于鉴定特殊的天然处理的病毒抗原肽，并未直接测定洗脱的肽序列，而是使用流感病毒血细胞凝激素的天然处理决定簇的 HPLC 性质来确定有同样层析性质的合成肽。这个肽对应血细胞凝激素的九肽，包含一个 T 细胞克隆识别的 T 细胞决定簇[116]。当完成洗脱肽的微测序，这个方法得以成熟，代谢放射标记的感染水泡性口炎病毒的细胞，洗脱其分离的 H-2 K^b分子，完成洗脱肽的微测序，显示一个在位置 3 和 5 为酪氨酸、位置 8 为亮氨酸的十肽，而已经知道对应的含有此核心序列的合成肽能敏感细胞被水泡性口炎病毒特异的、H-2K^b 限制的 CTL 识别[117]。

随后几种不同方法相继被使用，以便收集足够的数据认识与Ⅰ类分子单个等位基因结合肽的普遍结构特征。Falk 等人[118]从单个等位基因的Ⅰ类分子洗脱的肽池进行 Edman 降解测序。尽管从这些异源混合物不能获得特定序列，但在特定的位置某些氨基酸给出很强的信号，并且测序信号通常不超过位置 9。在顺序的一个特定位置的出现强信号显示了 N 端是一个固定数字的氨基酸，通过比较以前鉴定的相关Ⅰ类分子呈递肽，可发现某个位置占优势的残基。这产生了在特定等位基因Ⅰ类分子与肽的结合中，基序或锚定氨基酸起重要作用的概念。测序分析鉴定的这些残基被发现对应着那些占据Ⅰ类分子结合槽的结合口袋(通常多态)的氨基酸残基。这样，在我们肽与 MHC Ⅰ类分子相互作用图像和Ⅰ类分子采用特殊化学结构在细胞选择捕获肽的功能行为之间存在令人满意的一致。这种对应超越了在Ⅰ类分子的多态性结合口袋存在特定的等位基因特异的结合基序的结论。在洗脱肽池，缺乏超过 9 个 氨基酸的强烈测序信号，这和鉴定的Ⅰ类分子结合的特定病毒肽均为 8、9 残基相一致，并且和晶体结构图中结合肽的 N 和 C 端与结合槽两端保守残基形成氢键相符。其他的技术也被用来了鉴定、分析、测序大量与特定等位基因的Ⅰ类分子结合多肽。其中一个方法是采用化学降解测定 HPLC 纯化的单个多肽峰。更有用的方法被发展，包含毛细管 HPLC 和电喷雾离子质谱可评估结合肽的复杂性并测定它们的序列。这方法建议大约有 2 000 不同的肽和来源克隆细胞的 HLA-A2 共纯化，并且允许测定众多单个肽的序列[119]。联合使用 T 细胞检测包含抗原 的 HPLC 分部收集，强有力的质谱方法可以鉴定人类的肿瘤抗原[112]。

最近，若干研究者分析了固定长度、在每个位置氨基酸包含变化的合成肽，或者说复杂的肽库与特定的 MHC Ⅰ类分子的结合情况。这个方法曾常用于测量标记肽的竞争结合试验，以及更为复杂的的表面胞质团共振，它能评价结合的动力学和联合的亲和力[120]。这些研究产生了大量相关肽序列与 MHC Ⅰ类分子相互作用强度的量化数据。结合从活细胞Ⅰ类分子洗脱肽池分析和单个肽顺序，这些数据可描述许多与特定 MHC Ⅰ类分子优化结合的基序，它们包含给定长度肽内的某个位置的特定氨基酸组成（见第 8 章和第 19 章）。这些研究的结果也被用来生成计算机程序，计算任何氨基酸序列与那些已分析的 MHC Ⅰ类分子结合的可能强度。如此的算法不仅考虑晶体图形研究中偏好占据 MHC Ⅰ类分子的特定结合口袋的氨基酸残基，也考虑了在其他位置的具有阴性抑制效果的不恰当残基。现在已经认识到冲突效应对肽特异性结合有着实质影响[121,122]，在算法中的包括这些影响显著地改进了预测的准确性。当推测一个已知抗原中能与某种 MHC Ⅰ类分子一起被 T 细胞识别的短肽序列时，已经证实这些算法可有效减少合成多肽的数目，尽管应注意到并不是所有的有生物学意义的多肽都是与蛋白质结合很好的多肽，因此仅分析在预测顶端的多肽可能导致鉴定有活性抗原肽的失败[123]。

分离、测定结合与活细胞Ⅰ类分子的特定肽序列也可用于确定分离肽的源蛋白质，通过查找 DNA 或蛋白质数据库同源或相同的顺序可做到这一点(表 9.1)。通过这种方法能明确的确定肽来源的蛋白质，正如在普遍模型中Ⅰ类途径呈递的蛋白多来源胞内的期望一样，它们大多数来源高丰度的胞质或核蛋白。在这些正常普遍的结果中的例外，特殊突变的细胞系将在以后的章节中讨论。

表 9.1　和 MHC Ⅰ类、Ⅱ类分子天然结合肽的来源

Ⅰ类分子相关	Ⅱ类分子相关
核糖体蛋白 60S(胞质)	反转录病毒包膜(膜蛋白组分)
热激蛋白 HSP89α(胞质)	MHC Ⅱ类 Eα(膜蛋白组分)
热激蛋白 HSP89β(胞质)	恒定链(膜蛋白组分)
延长因子 2(胞质)	牛血清白蛋白(主要的血浆成分)
螺旋酶(胞核)	载脂蛋白(主要的血浆成分)
信号序列(ER)	转铁蛋白受体(膜蛋白组分)
白细胞共同抗原(内源性合成的膜蛋白)	MHC Ⅰ类分子重链(膜蛋白组分)
磷酸甘油激酶(胞质)	免疫球蛋白重链(膜蛋白组分)
	Na^+/K^+ ATP 酶(膜蛋白组分)

与Ⅱ类分子结合的多肽

研究Ⅰ类分子结合肽的方法同样被用于分析天然结合Ⅱ类分子的多肽。免疫亲合纯化的Ⅱ类分子经酸处理,采用 Edman 降解或质谱分析洗脱肽[124~127]。如此的分析显示每个 MHC 等位基因的洗脱肽均含有的特征轮廓,这与在决定簇的选择中等位基因多态性的作用相一致。与Ⅰ类分子的状况相对照,Ⅱ类分子结合肽在大小方面,更长更具异质性,其长度从 12 到最长的 24,这种异质性不仅是因为肽来源不同蛋白质,更反映Ⅱ类分子捕获来源单个蛋白质的嵌套的肽集合,也就是说,这些肽分享一个核心氨基酸序列,但有着不同全长和 N 和 C 端。延展 N 和 C 端均被观察到,这和在晶体图像观察相一致,即Ⅱ类分子结合槽两端开放,允许这些更长肽的末端伸出结合槽,并且因此位于结合槽中间区域的长肽没有多余绞结结构。

因为Ⅱ类分子关联肽拥有相同核心和不同 N 端顺序,故在鉴定基序或锚定氨基酸时,测定混合的洗脱肽池序列少有成功,尽管通过这个方法仍然取得了一些重要的进展。采用此方法一个主要的发现是在 +2 位脯氨酸的检测频率比预言的高[128]。由于当肽顺序的 +2 位置是脯氨酸时,许多氨基肽酶不能进一步裂解,这些数据建议 Ⅱ类分子结合肽的末端是由这些氨基肽酶降解结合在 MHC Ⅱ类 分子的更长肽所产生,证实此提议的数据逐步得以积累[129]。然而,通过测定 HPLC 和 质谱分离的不同肽序列,更多地分析了Ⅱ类分子联系的多肽,从而能获得滑动对齐相互重叠顺序的结果数据。使用在每个肽位置有多个替换的单个合成肽的全部集合[105,130]或者丝状噬菌体展示肽库[107],产生大量关于偏好和抑制的残基数据集。使用这些方法,可以确定结合与特定Ⅱ类等位基因分子的肽最佳基序。这些通常仅包含在 7~9 残基核心区域中的 2~4 残基。在相应的Ⅱ类分子的晶体结构中显示基序残余占据主要或次要的结合口袋。

301

Ⅱ类分子结合肽的来源与Ⅱ类分子的功能和呈递途径模型相一致,在此模型,占优势的可鉴定的来源蛋白质均为进入内吞途径的蛋白质(表 9.1)。这暗示胞内蛋白质进入Ⅱ类分子呈递途径较进入Ⅰ类分子呈递途径低效,尽管一些明显的例外被报道。还有一些尚未确定是:那些来源胞质蛋白质的例外多肽是否在细胞中进入内体,或者这些例外多肽是来源在提供 MHC Ⅱ分子进行多肽分析的大量细胞培养中,细胞死亡后吞噬的胞质蛋白。已经观察到来源正常和突变细胞的Ⅱ类分子关联肽系列与Ⅰ类分子的差别,这些将在以后的章节讨论。

肽作为 MHC Ⅰ类分子和Ⅱ类分子不可分的部分

根据如下的一些试验曾推测肽和 MHC 分子紧密相关的,如在在 MHC Ⅰ类分子的晶体结构中可看见的肽分子,采用粗糙的亲合纯化后还能从 MHC 分子回收相当量的多肽,并且测定 MHC Ⅱ类分子-肽复合物存在很慢的解离率。但是到了 1989 年,MHC Ⅰ类分子的晶体结构被很好解析后,MHC 分子则被认为是一种含有肽稳定结合位点的充分折叠的蛋白质。随着 Townsend 和同事对突变的老鼠淋巴瘤细胞(RMA-S)的研究,

这个想法发生了重要变化，RMA-S 合成正常数量的Ⅰ类分子重链和 β_2m，但在胞膜仅有低的稳定状态Ⅰ类分子表达[131,132]。生化研究显示这些细胞在重链翻译后与 β_2m 聚合成复合物和从内质网（ER）运输出Ⅰ类分子有缺陷，从而可解释Ⅰ类分子在胞膜的低表达水平。尽管从 RMA-S 细胞Ⅰ类分子低表达所期望的一样，RMA-S 细胞缺乏在活跃病毒感染期间产生抗原的呈递，但是它们能显著有效地呈递合成肽。加抗原肽显著地增加膜表面的Ⅰ类分子的表达，且与已知Ⅰ类分子等位基因呈递特定外加肽给 T 细胞的能力严格一致。去污剂裂解这些肽处理细胞，采用 $\alpha1\alpha2$ 构型特异的抗体可检测稳定聚合的重链-β_2m 复合物显著的增加。虽然这种聚合和合适折叠的Ⅰ类分子的增加来源于细胞裂解后肽，而非原先所认为的在培养中进入细胞[133]，尽管如此，研究者正确得出正是肽导致重链和 β_2m 稳定聚合成天然构型的结论。他们也证明了 RMA-S 显示Ⅰ类分子的低表达是由于在 ER 不能供应为Ⅰ类分子重链与 β_2m 聚合所需要的肽。这些富有启发性的试验告诉我们，尽管分析静态的晶体结构使我们详细地了解 MHC Ⅰ类分子与肽结合的化学基础，但不能揭示 MHC Ⅰ类分子重要的动态的生化特性，而这正是理解其生物活性所必需的。

伴随Ⅰ类分子肽结合过程的结构和聚合状态的变化

在 RMA-S 的观察为大量后续研究提供了框架，这些研究为肽、β_2m 和Ⅰ类分子重链如何聚合成能被 T 细胞识别的有功能的胞膜Ⅰ类分子给出了更多的观察。在 I 类分子高合成、膜低表达的细胞，结合特定Ⅰ类等位基因分子的肽增加膜表达的能力在许多小鼠和人的分子得到证实，如突变的细胞不能呈递天然处理的抗原[134]，正常的细胞不能提供足够肽，去完全占据某种Ⅰ类等位基因分子如 H-2L^d[135]，或胚胎细胞的分化状态影响肽的结合与处理[136]。

当肽加载 RMA-S 表型细胞时，抑制蛋白质外运或合成可阻碍膜表面Ⅰ类分子的增加。这显示其主要机制是：膜上增加表达的分子来源于正常能到达胞膜分子的胞内储藏，其在生理条件下被很快清除或不可逆变性，而不是诱导膜表面驻留的大量稳定状态的非天然分子的折叠所形成。这与这样的细胞产生的Ⅰ类分子不稳定的想法相一致；即使它们作为重链-β_2m 二聚体到达细胞膜，它们也很快解离并且经历永久的变性。这个变性模型的证据来源于突变的的 RMA-S 细胞，即发现室温培养可增加其膜表面的Ⅰ类分子表达[137]。302 当温度增加到 37℃，采用血清学检验可发现这些细胞积累的分子快速的失去，显示室温下膜表面积累的Ⅰ类分子是热易变的。同样，在细胞裂解物中，室温培养 RMA-S 积累的Ⅰ类分子-β_2m 聚合物在 37℃很快变性。这些数据支持未结合肽的Ⅰ类分子-β_2m 聚合物是热力学不稳定的模型。在低温这种聚合被延长，保持了重链结构。增加温度引起复合物的的快速分离和重链变性作用（Ⅰ类分子"溶化"）。

在感染细胞中，那些与Ⅰ类分子相关、长度和序列相同的短肽能优化诱导重链-β_2m 复合物的稳定性[138]。这些数据显示在细胞中对最佳肽的非常有效的选择机制，和肽稳定Ⅰ类分子结构的能力是选择、呈递肽到 T 细胞的一个重要特征。在几个从暴露后Ⅰ类分子-肽复合物回收肽的研究中，已经图形表述了偏好与Ⅰ类分子结合的肽长度和组成[106]。也应该看到，某些长的多肽经血浆蛋白酶作用能戏剧性的刺激 T 细胞，其原因是蛋白酶产生适当小量被合适截断的多肽，它们被提供的Ⅰ类分子结合位点有效地结合[139,140]。如果蛋白质酶被去除或失去活性，这些长肽敏感靶细胞的能力将下降几个数量级，因为这些长肽并不能稳定结合在Ⅰ类分子。事实上，在生物活性试验中，许多合成肽设计序列比最佳长度长，但均可发现其中存在较短多肽的低水平污染[116、141]。

这些观察强调的生理稳定Ⅰ类分子实际上是重链、β_2m 和肽的三聚体。正如这个结论所期望，不仅肽是建立稳定的重链-β_2m 相互作用的的主要贡献者，而且自由的 β_2m 也增强肽与Ⅰ类分子的结合。这样，在重链与相互作用的两各组分——肽和 β_2m 之间存在相互稳定的状态[142]。与这些结论一致，若干组研究者显示自由的 β_2m 对外加肽的有效呈递有着实质的贡献[145]。从这些和另外的分析细胞表面或细胞裂解物Ⅰ类分子的研究中得出结论：成熟的Ⅰ类分子三聚体（重链、β_2m 和肽）的聚合过程是一个平衡反应（图 9.6）。包含重链的二聚反应（重链-β_2m 和重链-肽）虽然可以看到，但与三聚体相比其表观存在时间较短。这样，在缺乏

β_2m时，肽可和重链结合，但这需要高溶度的肽，并且生成的分子不稳定。相反，高溶度自由的 β_2m能维持重链的折叠，虽然较大多数重链-肽二聚体的生存期长，但其结构也是相对不稳定的。肽和 β_2m 合作形成生存期长的合适折叠复合物[138,143,146]。这已经在大量使用细胞或细菌变性Ⅰ类分子和 β_2m 的试验得到证明。形成合适折叠的、稳定的Ⅰ类分子依赖于外加的特定多肽[147]。后者在细胞膜表面分子重新折叠的研究数据，也建议胞内的分子伴侣并非折叠、聚合所必需，虽然这些蛋白质可能增加折叠、聚合的效率，小量的分子伴侣可在Ⅰ类分子与合适肽结合之前，防止Ⅰ类分子不可逆错误折叠导致沉积。这些结果明显提示我们对细胞内Ⅰ类分子捕获肽的理解。肽结构稳定Ⅰ类分子也表现在暴露的Ⅰ类分子和加外源肽的Ⅰ类分子拥有更长的生存期，从而提供更长的T细胞识别时间。

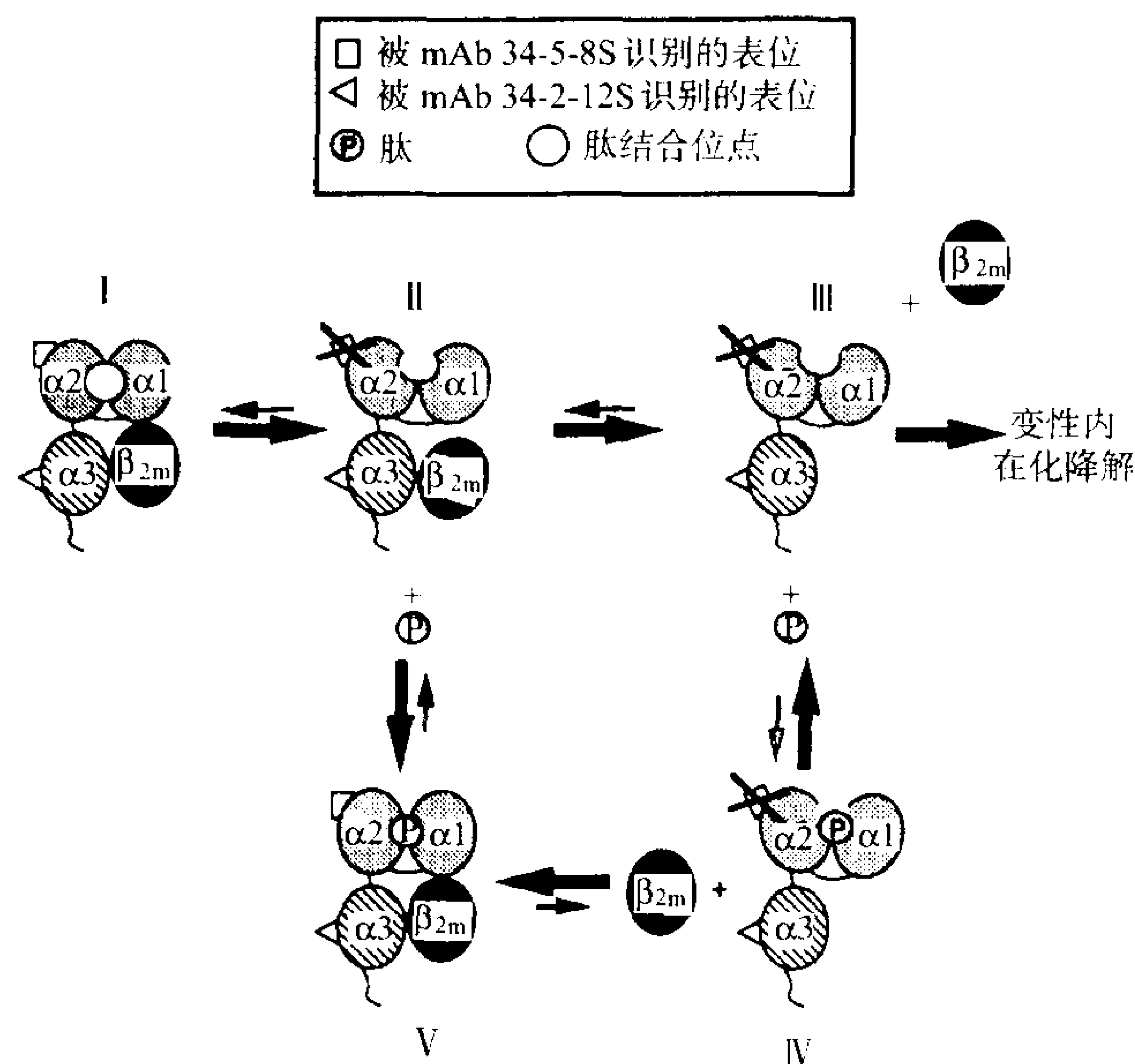


图9.6　在聚合和变性 MHC Ⅰ类分子复合物，Ⅰ类分子重链、β_2m 和肽之间的可逆平衡反应。此图显示可能的二聚和三聚复合物和成熟 MHC Ⅰ类分子三个组分间的反应途径。粗箭头示易于进行的反应，细箭头示不易进行的反应。（经允许使用[146]。）

肽结合和 MHC Ⅱ类分子生化行为间的关系

由于肽在成熟Ⅰ类分子的聚合和结构稳定方面起着重要作用，提出肽在Ⅱ类分子的聚合和稳定中是否起着类似作用的问题。20世纪70年代，若干研究组注意到在SDS-PAGE电泳时，如样品为加热变性，分离的Ⅱ类分子仍为非共价的二聚体形式[148,149]。这显示尽管缺乏共价键结合，在成熟状态，Ⅱ类分子的 α 和 β 链比Ⅰ类分子的重链-β_2m二聚体结合得更为牢固。足够从Ⅱ类分子洗脱肽的温和变性作用，可改变其在胶上的移动，但延迟的迁移仍未失去二聚体状态。更强的变性作用导致电泳中分子分开成 α 和 β 链[150]。这些数据建议肽结合和二聚体稳定性间的可能关系，但是这些研究不能区分是失去肽导致二聚体行为的变化，还是Ⅱ类分子的变性导致失去肽的结合。　303

这个问题最终通过如下试验得以解决，酸夺去肽成熟Ⅱ类分子中的肽后，则丧失了SDS耐受的二聚体结构，而加入已知的与研究的Ⅱ类等位基因结合的合成肽后，可恢复稳定的二聚体状态。这些离体结果与Ⅱ类分子的胞内成熟的在体研究所获得的数据相一致。这些试验证实没有加热的新合成Ⅱ类分子样品在SDS缓冲液中解离。然而，在合成以后的若干小时，这些同样二聚体中的一部分变得可以抵抗SDS的变性作用，但是这仅仅在允许肽产生和装配的培养条件下出现[152,153]。像Ⅰ类分子一样，这证实肽促进Ⅱ类分子二聚体的稳定(图9.7)。然而，它们促进稳定的精确机制是不同的。对于Ⅱ类分子，在生理的温度和pH下，维持链间的结合中肽并非必需，而对于Ⅰ类分子的重链-β_2m结合则不同。

一些研究显示并非所有拥有SDS稳定表型的二聚体均与肽结合[154,155]。这些结果可能显示抵抗SDS解

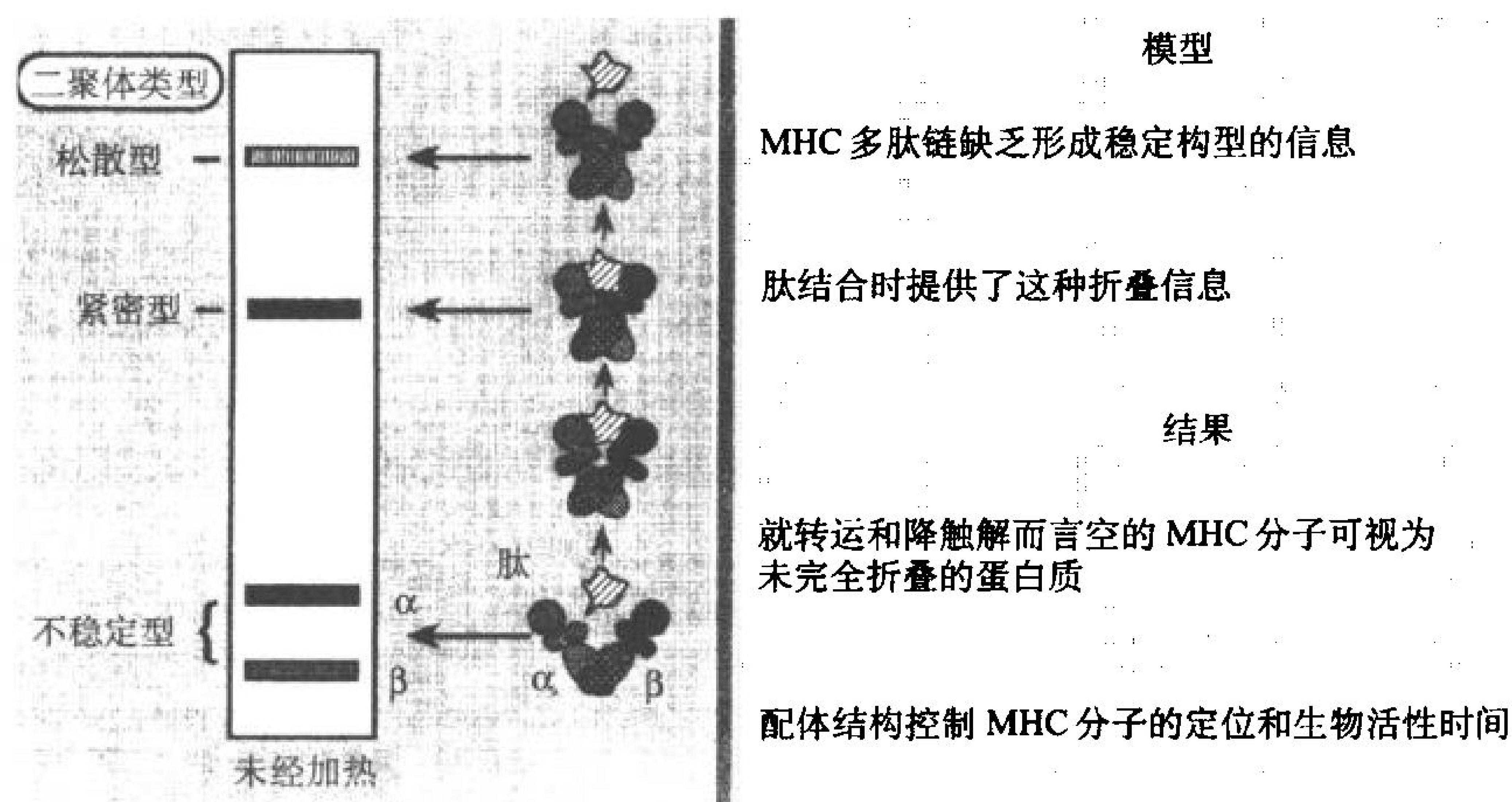


图 9.7 图示Ⅱ类分子肽结合、结构状态和 SDS 行为的结果。未经加热的纯化Ⅱ类分子样品 SDS-PAGE 电泳的理想图形,以及胶上条带对应的Ⅱ类分子状态。文字描述肽依赖性Ⅱ类分子折叠的功能结果。

离的二聚体状态是由于肽的两个不同效果引起。第一个可能是肽与 α 和 β 链两个部分的相互作用导致的稳定性。第二个可能是存在Ⅱ类分子的 α、β 二聚体结构本身的变化,从而增加Ⅱ类分子内在的稳定性。作为一个普遍的规律,从未结合肽的Ⅱ类分子在 SDS 胶系统上解离;包含肽的二聚体抵抗 SDS 的解离效果;然而,在胶上解离成 α 和 β 链的二聚体可能在 SDS 缓冲液中解离前从未结合肽或另外的配体(例如,恒定链或此蛋白质的碎片)。这样,基于存在稳定的二聚体,这方法在证实肽结合发生过是有用的,但是如果二聚体不存在不能证明是否缺乏肽结合或肽结合位点的占有。在使用此方法鉴定细胞内Ⅱ类分子肽占有程度的试验中,此方法的这种有限性必须牢记。

肽在Ⅰ类和Ⅱ类 MHC 蛋白质结构中扮演不同的角色,显然与两个分子的不同结构域组织方式有关,特别是Ⅱ类分子的两条链均拥有穿膜区。已发现这些穿膜区包含结构基序,促进合成后 α 和 β 链的相互作用,并且甚至在肽不在时,也可能帮助维持链间的结合[49]。肽在Ⅰ类和Ⅱ类分子的生化特征存在相关又不同的效应,这为理解两类 MHC 分子捕获肽的位置与机制有着重要的意义。

MHC 分子与肽相互作用的动力学观点

304

肽获得与 MHC 分子稳定的相互作用,并非通过结合于一个已形成的稳定位点;正常表达 MHC分子的结合区域大多已经被肽牢固占据;Ⅰ类分子结合过程中的三聚体特性:这些均用于解释在尝试测定结合过程的动力学和量化参数中,所观察到许多 MHC 分子与肽相互作用的令人迷惑的特征。

最初尝试测量标记肽与 MHC Ⅰ类分子的结合大部分是失败的,在孵化阶段结束后最好的占有水平不到理论的 1%[156]。回顾这些实验,这些困难主要来源于合成肽长于Ⅰ类分子有效结合所需的最佳长度,部分是由于从正常细胞分离的成熟Ⅰ类分子大多已被肽占有,部分是由于在亲合纯化中,选择分离了那些肽与 MHC 分子紧密结合复合物,还有部分是在结合阶段未提供足够的 β_2m。当认识到细胞(如 RMA-S 或人的细胞系 T2)、细菌或转染的昆虫细胞可产生大量空的或者说处于准备空状态的Ⅰ类分子,这些分子被用于结合反应,同时使用 8~10 个残基的多肽作为探针,并且在一些情况中,过量 β_2m 被加到结合反应中,上述问题大部分得以解决。在这些条件下,结合是快速的,尽管比真正的扩散限制反应所期望的慢。这是否与肽构型的柔软性相关,这种柔软性导致肽仅在很短的时间中出现适合结合的状态,或者需要Ⅰ类分子重链在结合反应过程中经历一个构型变化,或者两者均需要,现在尚未完全确定。在测量结合率时肽长度的变化似乎没有太大的差别。然而,肽的长度和化学组成在分离率上有不同的影响。在细胞中最佳肽与某个Ⅰ类分子的自然

结合显示很慢的解离率，即使缺乏自由的肽和 β_2m 时，一些肽-MHC Ⅰ类分子复合物在 37℃能存在数小时。更长或非最佳化学组成的肽则很快解离，其半衰期($t_{1/2}$)通常不到 30 分钟。肽和结合的 β_2m 的解离率是类似的，这强调肽和 β_2m 与重链的结合是互相依赖的。这些差别清楚的显示对肽-MHC 复合物的生物学功能有着足够的影响，因为短存在期的结合物将不能在细胞表面积累到高水平，从而限制 T 细胞的识别。另外，这些结果提起长肽可能结合于Ⅰ类分子，然后其相当快地在细胞表面释放，从而产生能被外源肽占据的空结合位点。

肽与 MHC Ⅱ类分子的结合则更快地被阐明，尽管在早期试验的肽占有率从未达理论的 100%。测量肽与平衡透析分离的Ⅱ类分子的结合，得出其平衡常数为 1 ~ 2μmol/L[26]。在典型的情形下(例如抗体-抗原相互作用)，这将显示此复合物具有快速的分离率。然而，肽与暴露Ⅱ类分子的细胞有功能的结合可长达数天。这相互矛盾的结论被 Buus 等人解决[27]，他们发现Ⅱ类分子-肽复合物的半衰期超过 1 天是由于它是一个具有每秒 1mol/L 表观结合率的慢过程。这样的平衡常数是很慢的表观结合率和同样慢的解离率的联合结果。

为什么会这样呢? Sadegh-Nasseri 和 McConnell[158] 显示一个很快、特异的肽-Ⅱ类分子的结合会发生，其 $t_{1/2}$ 近似 2 分钟。然而，很快形成的复合物也很快的分离，其 $t_{1/2}$ 大约 10 分钟。在这些同样的条件下，长存在期的复合物($t_{1/2} > 30$ 个小时)慢慢地产生。这些观察者得出结论：在产生长存在期复合物的有限步骤中，包含了为到达稳定的结合状态所必要的很少发生的肽-MHC Ⅱ类分子复合物的结构转变，这个结论与我们当前关于肽结合中Ⅱ类分子生化行为变化的知识完全一致。然而，这些数据再次与在细胞中肽结合可能的生物学常识观点相不符。肽很慢的稳定结合率似乎与合成后Ⅱ类分子到胞膜的过程中捕获处理抗原的有效性不一致。虽然对于这个动力学问题的一个可能答案是存在特定的辅助分子暗示了载体催化肽的装载，如 DM 分子可能扮演一个起动力学作用的角色，(见后文，)但是 Jensen 开创性的研究暗示了另外做出贡献的因素。他模仿 II 类分子通过内体的酸性环境，Ⅱ类分子装载处理抗原据信在此环境发生。同时并非依次暴露 MHC Ⅱ类分子到生理范围的 pH5 ~ 6 和特定的肽，显著增加了肽的功能性呈递，后来被证实这与增加总的结合肽相关[159,160]。采用此方法，许多研究者观察到低 pH 加速Ⅱ类分子装载肽，尽管并非全部，大多数有效结合率从在中性 pH 值的若干小时减少到几分钟[151,161 ~ 163]。低 pH 效果部分是由于去除已经占据Ⅱ类分子的结合肽，正是这种结合肽使动力学测定复杂化[164]，为克服此困难，在测量中可采用功能方面有空的Ⅱ类分子，这时也可观察到Ⅱ类分子加快装载某个肽[163,165]。由于Ⅱ类分子是在内吞途经与蛋白酶降解的多肽结合，故低 pH 增加肽与Ⅱ类分子的结合具有生理意义。

MHC Ⅰ类和Ⅱ类分子与肽结合存在不同的化学特征，这很大影响着两类分子肽稳定结合时的表观结合、解离率的差异。MHC Ⅰ类分子使用保守残基与肽自由 N 端和 C 端形成氢键。这提供一个"分子尺"帮助选择稳定结合的最佳长度肽。这个特征在Ⅰ类分子结合肽来源方面具有重要作用，使Ⅰ类分子装载质来源于胞质处理后的肽分子，而不是在内质网经过折叠的蛋白质短片段。因为这些保守的结合区域能帮助肽进入对应结合口袋的合适临时区域，故锚定的残基进入结合口袋后，能帮助肽更为有效地和 MHC Ⅰ类分子成功结合。这种高成功率表现为快速达到的稳定结合率。

305

对于 MHC Ⅱ类分子，结合是通过主链原子而不是肽的两端，这使肽可以伸出结合槽，从而具有不同的长度。这就使肽的锚定残基与对应口袋对齐困难。相反，许多肽与 MHC Ⅱ类分子相遇后，仅少数结合口袋被占有即相互结合，此时形成许多结合键的主链也未沿着结合槽对齐。这将导致肽与 MHC Ⅱ类分子的相互作用是快速而不稳定的，这与试验观察相符[166]。只有少量的肽以合适框架结合，在这个方向结合口袋被占据而不解离，而且可获得重新结合。如果肽能诱导这种状态的改变，则可形成对 SDS 稳定的复合物，而配体与 MHC Ⅱ类分子成功结合的解离率将会很慢，因为两个组分(肽和 MHC Ⅱ类分子)的优化对齐是很少发生的。低 pH 导致的构型改变[167]妨碍主链的氢键形成，消除潜在的松散结合，从而防止其对连续尝试结合与合适位点的干扰。这也有助聚焦于锚定残基与结合口袋衔接事件，这种结合促进肽与Ⅱ类分子结合槽合适的对齐。以后将讨论，DM 分子参与维持多个天冬酰胺间相距甚远，从而使之不能同时与肽主链键合，DM 分子也

帮助在结合口袋的结合。

MHC Ⅰ类和Ⅱ类分子的生物合成和胞内运输

Ⅰ类分子生物合成的基本模式

Ⅰ类分子重链和β_2m均为Ⅰ型蛋白，通过信号肽认别和转运系统进入内质网。重链很快与ER中命名为p88(钙联接蛋白calnexin)[168]或Ip90[169]的驻留蛋白结合。此分子是一种Ca^{2+}敏感的蛋白质，与信号肽序列依赖的转运系统相关，并且被报道与内质网中许多膜蛋白和分泌型蛋白质相互作用，包括T细胞和免疫球蛋白受体的组分，它们在聚合成适合运输到胞膜的完整受体前均与此蛋白质相互作用。钙联接蛋白与重链的结合包括蛋白质的修饰糖类和本身结构特征的识别[171,172]。对于人类的Ⅰ类分子，这个分子伴侣在β_2m与重链结合时解离[173,174]，在此时另外一个分子伴侣蛋白质——钙网蛋白(Calreticulin)与Ⅰ类分子-β_2m复合物结合[175]。在细胞缺乏β_2m时，在ER的Ⅰ类分子重链仍然与钙联接蛋白结合，这可能是这些缺乏β_2m的细胞不能在膜上表达相当数量Ⅰ类分子的原因[176]。然而，在Ⅰ类分子的运输中对β_2m的要求不是绝对的。缺乏β_2m的细胞表面仍可检测到低水平的Ⅰ类重链分子[177,178]。大多数或者说全部的这些膜上分子缺乏与β_2m联合表达相同Ⅰ类分子的血清学表位，暗示它们处于另外的折叠状态。

随着β_2m与重链结合，钙联接蛋白解离，复合物和ER中另一个叫钙网蛋白的分子伴侣结合。除与钙网蛋白结合外，重链-β_2m复合物也与一个被称为TAP相关蛋白(tapasin)的MHC编码分子相结合[175,179]。这个分子将ER膜上提供抗原肽的分子聚集和不含肽的Ⅰ类分子-β_2m复合物联系起来。一旦与肽结合，钙网蛋白和tapasin不再与离开ER的Ⅰ类分子复合物相关联，然后复合物通过高尔基体堆(Golgi stock)到达反面高尔基体网(trans-Golgi network)，由缺省分泌途经到达细胞表面。

Ⅱ类分子的生物合成和运输到质膜的概述

MHC Ⅱ类分子的α和β链合成后2分钟以内即相互结合。这种聚合好像需要存在这些多肽链穿膜区域的某个保守特征。在生理情况下，α和β链并不会共聚在一起，但如果存在恒定链(invariant chain, Ii)两条链将会聚合[181]，Ii分子是一个非多态性的Ⅱ型的膜糖蛋白(N端在细胞质，C端在ER腔)[182,183]。Ii不是单一的蛋白质，而是一个蛋白质家族，在人类中这样的家族是由于选择拼接方式和选择翻译起点所产生，而在小鼠中仅是由于选择翻译起点[184]。这样，在人类中，有4种主要的形式的Ii分子，分别称之为p31、p33、p41和p43(一些研究者则分别称之为p33、p35、p43和p45)。p31和p33因为不同的翻译起点，在N端有17个残基不同，p41和p43也是如此。p31相对于p41和p33相对于p43的差异是由于一个外显子的不同剪接导致此蛋白增加一个甲状腺球蛋白样结构域[185]。

在ER，Ii很快通过非共价结合形成三聚体，Ⅱ类分子二聚体快速与这些三聚体相联系或其本身也聚合成三聚体[186,187]。MHC类Ⅱ类分子和非Ⅱ类分子的Ii均结合于钙联接蛋白，但形成Ⅱ类分子-Ii寡聚物后将失去这种结合[188,189]。在聚合成αβIi复合物后，这些多聚体移出ER，并且通过高尔基体堆，经历形成复杂的*N*-(在Ii中为*O*-)连接的多糖和末端的唾液酸[190]。这些事件在Ⅱ类分子开始生物合成的30~60分钟以内发生。可看见αβIi复合物显著累积于在反面高尔基体网络，然后处在于内吞途经而非在细胞的表面[191]，而且在任何时间，仅有少量的这些复合物能在细胞表面发现[192,193]。这些复合物在内吞系统囊泡停留若干个小时(2~6小时)，直到不含Ii的Ⅱ类分子二聚体到达细胞表面。离开反面高尔基体后，Ii经一个在其C端依次蛋白酶切的过程，与Ⅱ类分子分离[194]。Ii与Ⅱ类分子的分离可被一些干扰酸性蛋白酶的试剂抑制，例如亮抑酶肽(leupeptin，半胱氨酸蛋白质酶的一个抑制剂)[194]和氯喹(它提高内吞溶酶体系统的pH)[195]。

恒定链和 MHC Ⅱ类分子的胞内运输和定位

新合成的Ⅱ类分子在内吞系统累积，Ⅱ类分子胞内转运对抗原呈递的显著重要性促进详细研究Ⅱ类分子的移动和定位。

306

Ⅱ类分子稳定状态的分布

在转化的 B 细胞和活化的巨噬细胞中，Ⅱ类分子能在 ER、高尔基体堆，反面高尔基体区域、质膜和胞内囊泡检测到。这些囊泡一些是早期内体[196]，但是大多数是命名为 MⅡC(即 MHC Ⅱ类分子囊泡)的细胞器，他们在结构和组织学上与晚期内体和溶酶体相关(图 9.8A 和图 9.8B)[197]。在不成熟的树突细胞，Ⅱ类分子被发现主要位于胞内囊泡，而不是细胞膜表面，而成熟的树突细胞只有少量胞内Ⅱ类分子，胞膜上则有很高的稳定表达。这些变化和树突细胞的功能是一致的，不成熟的树突细胞处于有效捕获新生成抗原的准备状态，而成熟的树突细胞将生成的肽-MHC 分子复合物呈递到细胞表面[198,199]。Ⅱ类分子的分布在不同组织类型细胞变化很大，甚至相同组织起源的细胞中也根据它们分化状态而变化。

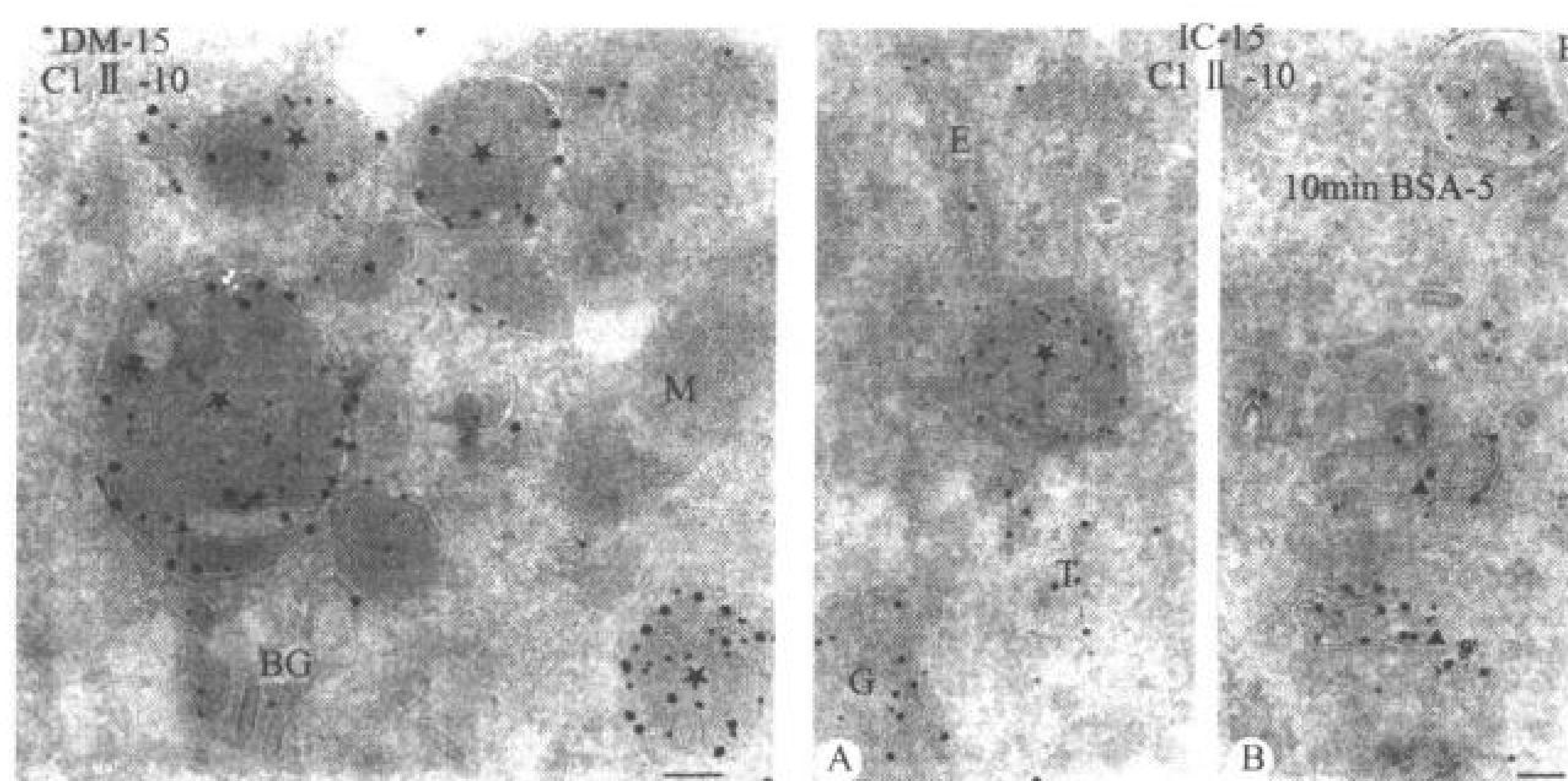


图 9.8　A：人皮肤朗格汉斯细胞冰冻超薄切片，免疫胶体金标记的 HLA-DM(15nm，DM-15)和Ⅱ类分子(10nm，CII-10)。几个 MIIC(星号)被Ⅱ类分子和 DM(主要在外周)标记。朗格汉斯细胞的 MIIC 具有典型的电子密度内容。BG，Birbeck 颗粒；M，线粒体。图例中_ = 100nm。B：在人 B 细胞冰冻超薄切片，免疫胶体金双标记的恒定链 C 端结构域(15nm，IC-15)和Ⅱ类分子(10nm，CII-10)。(a)在高尔基体复合物、反面高尔基体网和粗面内质网可见标记的恒定链。而Ⅱ类分子主要位于多层的 MIIC(星号)。注意使用 C 端特异性抗恒定链抗体不能检测在晚期内体/溶酶体蛋白酶降解的物质。(b)在免疫电镜前，细胞内吞 5nm 金颗粒标记的牛血清白蛋白(BSA-5)10 分钟。内吞 BSA-金颗粒存在不规则形状的多囊泡区域，称之为早期 MIIC(三角形)，它能被恒定链 C 端强标记。MIIC(星号)仅被Ⅱ类分子标记。图例条中_ = 200nm。

稳定状态恒定链的分布

人的 Iip33 形式滞留于 ER，其原因是它的胞质尾 N 端含有一个帮助腺病毒 E19 蛋白滞留于 ER 的结构区域。正常细胞的 Ii 产量通常超过Ⅱ类分子，在三聚体和更高分子量的聚合物中，p33 或 p43 与 p31 或 p41 相结合，帮助 p31 和 p41 滞留于 ER，这些分子在 ER 降解成更小的 N 端切开形式。

相反，当不与 p33 或 p43 形成复合物时，一定比例(从 5%～20%)人 Ii 的 p31 形式，小鼠的 p31 和 p41 形式，通过高尔基复合物，在囊泡结构中积累[200～202]。这种定位取决于胞质尾 N 端 30 个残基中的信号序列，其包含重要的二亮氨酸基序[203,204]和穿膜区尚未确定的信号[205]。删除 15 或更多的残基则失去靶向内吞系统的信号，导致 Ii 在细胞表面的累积。这些同样的截取增加 Ii 分子中获得对抗内吞系统酸的多糖结构的比

307

例,暗示即使E19相关的滞留信号不在时,Ii的这个区域也起到延迟Ii从ER离开的作用。Ii的三聚体结构也促进这些尾部信号的功能,因为两个或更多的胞质区域比一个尾部更有效的启动Ii在内体的定位[206]。

当Ii高水平表达时,Ii被主要发现位于胞内一群不寻常的囊泡[大囊泡结构(large vesicular structure, LVS)]或称之为大囊泡体(macrosome)[202]。富含Ii的大囊泡体的最显著特征是改变了早期内体分类区域到晚期内体小泡和溶酶体的内吞流动率[202,207]。这些研究结果暗示Ii能调节抗原内在化和新合成Ⅱ类分子-Ii复合物到达反面高尔基体的移动速率。这些观察的意义目前尚不清楚。过量产生的(Ii)与内吞小体转运机制的组分相互作用,从而出现大囊泡体,成为内体小泡运输或成熟的一个限制因素。另外的可能性是Ii提高内体小泡的融合和混合,以便进入的抗原和新合成的Ⅱ类分子-Ii复合物处于同一个成熟内体囊泡,而非占据分开的囊泡。这可能在抗原有限的情况下,促进Ⅱ类分子捕获肽的效率。

Ii在Ⅱ类分子复合物中的分子伴侣和运输功能

Ⅱ类分子与Ii的共表达改变了两个分子胞内的定位和蛋白质成熟的生化行为。在缺乏Ii的转染细胞或者是无Ii功能基因的小鼠细胞,尽管有一些Ⅱ类分子能离开ER,Ⅱ类等位基因分子的二聚体形成和从ER的移出是低效的[208~212]。同样,存在Ⅱ类分子时Ii更高效率地从的ER移动到高尔基体,显示Ⅱ类分子-Ii两个分子通过共聚互相促进转运。在转运方面,Ⅱ类分子-Ii结合的效果是由于这些组织相容性分子与分子伴侣解离,在ER,已知分子伴侣结合、滞留那些错误折叠或部分折叠的蛋白质[213],其中一个分子就是钙联接蛋白,另外,Ⅱ类分子与Ii的结合也分开内质网中与其结合位点结合的其他蛋白质[214]。最近,发现以Ⅱ类分子-Ii相互作用为基础的ER到高尔基体的运输与MHC Ⅱ类分子结合位点的占据有关,这类似于Ⅰ类分子三聚体(重链,β_2m和肽)的运输。Ii包含外显子3编码的一个片段,其被命名为CLIP(class II-associatied invariant chain-derived peptide,Ⅱ类分子相关恒定链来源肽[215]),它与缺乏DM表达细胞的Ⅱ类分子相结合。功能[216],血清学[217]和晶体图谱[84]研究均显示CLIP占据Ⅱ类分子结合槽的方式与抗原肽实质上难以区分(图9.9)。在Ii帮助Ⅱ类分子从ER转运中CLIP片段是必需的。这导致Ii的运输功能来源于这个肽区域占据Ⅱ类分子结合槽的假设,因为这种结合增强Ⅱ类分子的合适折叠,并且抑制Ⅱ类分子与ER中新合成折叠蛋白质的结合。由于Ⅱ类分子的结合槽具有开放末端,Ⅱ类分子与新合成蛋白质结合是可能发生的,其直接证据是当缺乏Ii表达时,Ⅱ类分子在ER与蛋白质结合[214]。而且,一个与β链N端共价结合的抗原肽代替CLIP占据Ⅱ类分子结合槽,从而替代分子伴侣Ii的功能,在缺乏Ii的任何部分时,仍能有效完成Ⅱ类分子的聚合和从ER到高尔基体的转运[218]。

在与Ii生理性或转染共表达的细胞中,研究了反面高尔基体以后的Ⅱ类分子转运途径。新合成的Ⅱ类分子和完整的Ii的唾液酸残基被位于早期内体小泡的唾液酸酶切开[219]。这暗示这些新形成的复合物在Ii降解、移走前至少通过早期的内体小泡。转染(transfection)试验显示出Ⅱ类分子与Ii的共表达导致大量的Ⅱ类分子存在早期而非晚期的内吞囊泡[202]。在小鼠正常活化的B淋巴母细胞,细胞的分级分离研究颗发现大部分(多于50%~70%)新装配的Ⅱ类分子-Ii复合物存在于一种内体小泡,其含有早期内体小泡的标志物,如转铁蛋白,而外源示踪物10分钟可进入这种内体小泡[220]。总结这些数据,建议大多数Ⅱ类分子-Ii首先到达早期内体小泡,然后经过晚期内体小泡,在不同于终末(致密)溶酶体的前溶酶体/不成熟溶酶体中积累。一些研究者曾报道在某些细胞系,一些Ⅱ类分子-Ii复合物直接从反式高尔基体网络移动到晚期内体小泡,而不经过早期内体小泡[197,201,221],但是最近在人淋巴母细胞的免疫电镜研究证实了小鼠细胞分级分离的结果[222],建议这是大多数B细胞的主要途径。

如果早期的内体小泡是Ⅱ类分子进入内体途径的入口,它们又是经过什么线路到达这些分隔空间呢?一些试验建议Ⅱ类分子先移至在细胞表面,而后快速内在化进入内体小泡[193,223]。另外地,存在一个直接从反面高尔基体到早期内体小泡的途径,如组织蛋白酶D通过与6磷酸甘露糖受体结合参与此途径[224],而αβIi复合物可能进入这个严格的胞内途径。免疫电镜研究显示Ⅱ类分子并不定位于反面高尔基体中6-磷酸甘露糖受体聚集的富含γ衔接蛋白(adaptin)的区域[197],但是最近的研究建议Ii的尾部能与衔接蛋白相互作

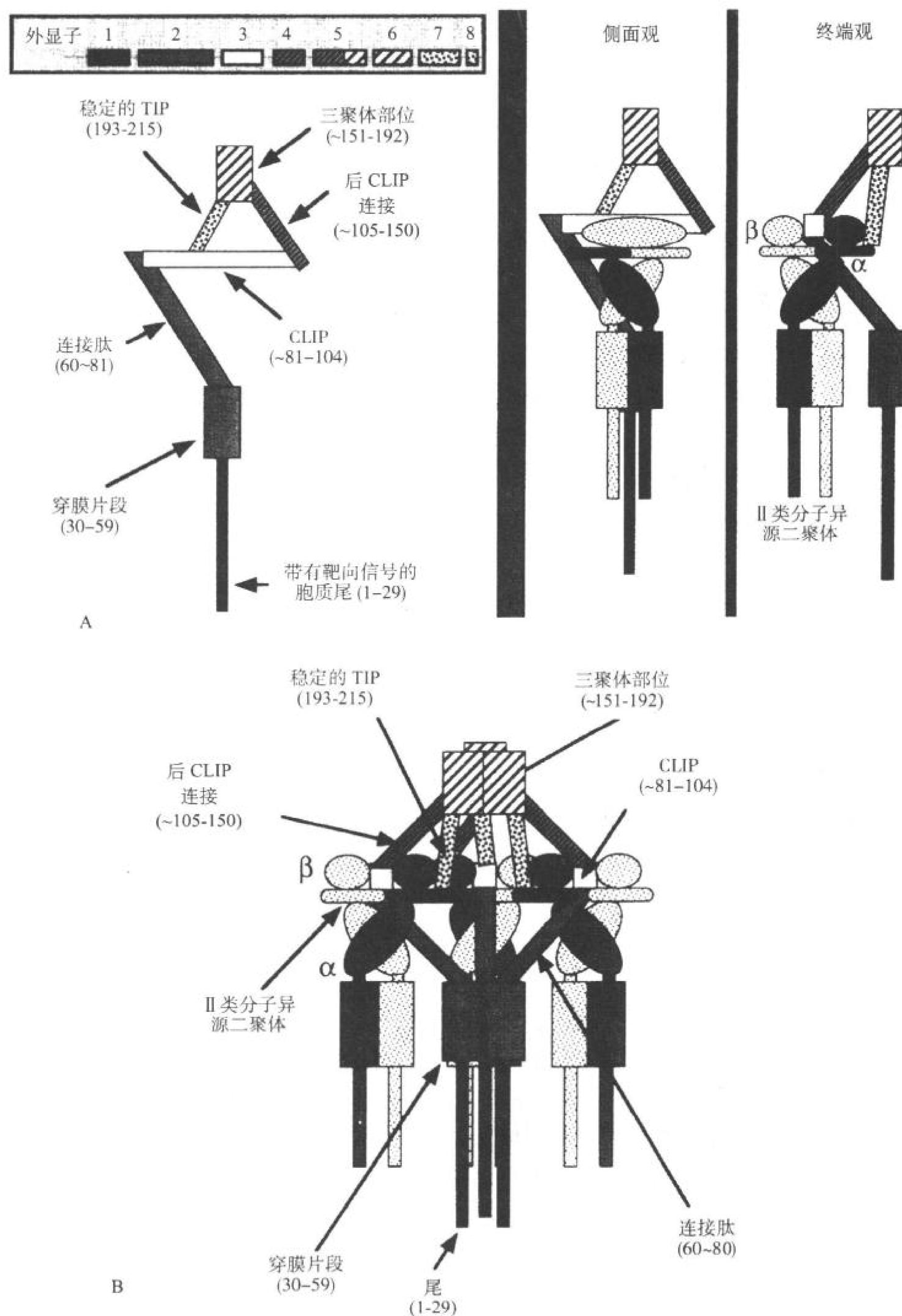


图 9.9 恒定链的结构功能关系。A:Ii 的二型膜蛋白方向,Ii 的不同片段与基因内含子-外显子组织方式的对应关系,这个蛋白质不同片段的功能,与 MHC Ⅱ类分子二聚体相互作用的最可能的方式。B:在内质网形成Ⅱ类分子-恒定链复合物的示意结构。

用,从而参与网格蛋白(clathrin)包被的囊泡形成[225],这与Ⅱ类分子的直接运输途径的推测相一致。

尽管在早期内体小泡存在显著组织蛋白酶 B 活性,大量完整的 Ii 分子仍能在早期内体小泡中观察到[226]。有可能一小部分的 Ii 在此小泡降解,释放部分Ⅱ类分子,其捕获肽后移至细胞表面。但是,大部分 Ii 分子 C 端的起始裂解发生在转运或到达内吞途径的晚期,包括晚期内体小泡或前溶酶体,可能由组织蛋白 *309*

酶 B 和 S 完成[227]，其中后者在血源性细胞有一个独特的表达模式。亮抑酶肽 能抑制从Ⅱ类分子去除 Ii 的裂解事件，并且导致一种 Ii 片段-亮抑酶肽诱导肽（leupeptin-induced peptide，LIP）或亮抑酶肽诱导短肽（small leupeptin-induced pepetide，SLIP）与Ⅱ类分子复合物的聚集。这些复合物被陷在细胞中，聚积于晚期内体小泡/前溶酶体[202,228,229]，这样 Ii 不仅影响Ⅱ类分子从早期的生物合成区域到内吞系统的转运，而且影响Ⅱ类分子从内吞途径到细胞表面的运动。这种部分降解 Ii 的内陷功能可部分解释细胞内Ⅱ类分子占优势的累积地点。

一些数据提示 Ii 的 p31(p33)和 p41(p43)形式有稍微不同的胞内途径，或者说以不同的方法降解。这个结论基于与Ⅱ类分子结合的两种 Ii 分子 N 端具有不同的蛋白酶解片段形式。这些差别可能来源于外显子 6b 的另外剪接方式，其产生 p41/p43 形式的 Ii 分子充当了蛋白酶的抑制剂[231]。这种抑制功能防止抗原决定簇在Ⅱ类分子结合前过度降解，还影响 Ii 分子自身的处理过程。

仔细分析无 Ii 分子的Ⅱ类分子从晚期吞噬囊泡到胞膜的途径是困难的。证据显示与 M6PR 的 转运途经不同，Ⅱ类分子并未通过循环回来反面高尔基体网（TGN）的途径。有限的证据显示Ⅱ类分子通过 MIIC 囊泡直接与质膜融合到达细胞表面[232,233]。存在于这些囊泡的外膜的Ⅱ类分子以正确方向直接插入质膜，而在囊泡内部的Ⅱ类分子则直接排出胞外。现在推测后一方式使含肽的Ⅱ类分子可转移到其他细胞的质膜。目前，这个融合/分泌途径的意义需进一步确定，大量刚与肽结合的Ⅱ类分子到达细胞表面的途径仍然未知。

肽产生和与 MHC 分子结合的地点

Ⅰ类分子

穿膜肽运输和内质网内腔的肽结合

因为Ⅰ类分子位于 N 端的肽结合区域不在胞质中，且重链翻译后立即进入 ER，肽与Ⅰ类分子结合的最初地点可能位于内质网腔。突变细胞的研究为Ⅰ类分子与肽胞内结合的早期事件提供了数据。在突变细胞 RMA-S 和 .174xCEM.T2 的 ER 中，由于缺乏肽结合，存在不稳定的Ⅰ类分子重链与 β_2m 复合物，进一步发现在正常细胞中的前体高尔基体中，由于肽的结合，合成后 15 分钟即形成稳定的重链与 β_2m 复合物，存在于前体高尔基体。内质网是Ⅰ类分子肽结合的主要部位，其直接证据是通过将Ⅰ类分子重链的胞浆尾部加上 E19，使其滞留于内质网，分离Ⅰ类分子结合肽发现其与正常细胞表面表达的Ⅰ类分子结合肽相同。而采用一个特殊肽-MHC Ⅰ类分子复合物的抗体，胞内染色显示此复合物位于 ER[235]。

如果Ⅰ类分子与肽相互作用的地点是 ER，而洗脱和测序证实与Ⅰ类分子结合的肽来源于胞质蛋白质，故可能存在低水平的胞质蛋白质进入 ER 降解，或者在胞质产生多肽，穿过 ER 膜到达Ⅰ类分子结合区。在 MHC Ⅱ类编码区，鉴定两个紧密连锁基因与穿膜转运的 ABC 家族高度同源[236~239]。这个家庭的另外成员包括多药耐受（multidrug resistance；MDR）蛋白和大量细菌的分子转运体，包括糖和小肽。这些位于 MHC 的基因名字是抗原处理相关转运体（transporter associated with antigen processing，TAP-1 和 TAP-2）。在 RMA-S 和人 TAP 突变细胞的转染研究，显示其Ⅰ类分子聚合和抗原呈递缺陷能通过足量表达两个 TAP 蛋白来克服[240~242]。这些蛋白质在 ER 膜形成二聚体结构[243,244]。

TAP 基因并不在所有细胞是组成型表达，并且甚至在 TAP 基因显著转录的细胞也处于静止状态，如在淋巴细胞，激活或暴露于细胞因子可增加 TAP 的表达。一些细胞，如胚胎干细胞，缺乏 TAP 转录。这样，除了通过Ⅰ类分子三聚体中重链和 β_2m 组分调节 MHC Ⅰ类分子表达水平外，在免疫系统，TAP 的改变提供了一个完全独立的途径控制细胞表面Ⅰ类分子水平和抗原呈递。

人 TAP 蛋白质显示等位基因多型性，而在小鼠的研究显示至少 TAP-2 基因具有重要功能的多型性[245]。这基因产物的结构变化导致Ⅰ类基因 RT1.A 产物表型差异，影响这个Ⅰ类分子的胞内转运率和抗体、T 细胞对其的识别。这个遗传位点的多态性导致与肽结合的显著改变，提示有可能由于这些多型性影响宿主对感染的反应性和自身免疫疾病的危险性，而不是由于Ⅰ类或Ⅱ类分子易感单体型的产物所引起。

现在已有大量文献描述 TAP 异源二聚体的肽转运功能以及控制肽结合和转运的规律。评价 TAP 功能使用最广泛的方法是使用链球菌溶血素-O 可透过的细胞，这些细胞 ER 膜包含野生型或突变型 TAP 亚单位，加入包含一个 *N*-多糖连接位点的标记肽，通过竞争结合试验可根据此标记肽的转运评价 TAP 对未标记肽的结合，反之，使用任何提供标记和糖基化位点的多肽，可直接评价其结合和转运。各种因素[例如三磷酸腺苷(ATP)]能被增加或去除或者改变温度，然后去污剂破坏溶解细胞，进入 ER 的标记肽添加了核心多糖，能通过植物凝集素分离糖化多肽，确定其含量[246,247]。使用这些或者相关的方法，直接显示 TAP-1 和 TAP-2 为转运复合物形成所必需，这种复合物将肽以一种 ATP 依赖的方式从胞质运输到 ER 内腔。

310

转运体显示对大小和化学特性的选择。长度超过 12 残基的多肽的运输效率下降，尽管一些更长序列仍然被 TAP 搬运[248,249]。肽 C 端氨基酸的化学特性在转运中具有主要作用，它决定转运体是否或如何搬运肽[250]。显然，与 TAP 异源二聚体结合的最佳 C 端残基和相应 MHC Ⅰ类分子 F 结合口袋显示的化学偏好一致[251,252]。这是一个清晰的证据，证明 TAP 和连锁Ⅰ类分子共进化以便它们在抗原呈递中有效合作。关于 TAP-1 和 TAP-2 结合连接区域靠近 ATP 结合位点，直接与转运肽相互作用[253,254]。关于肽与 ER 膜胞质面的 TAP 结合和转运进 ER 内腔的机制正在研究之中。

TAP 相关蛋白(tapasin)在新生成的重链-β_2m 复合物和 TAP 之间提供一个连接，以便进入的多肽在Ⅰ类分子结合位点周围有极高的聚集。在缺乏 TAP 相关蛋白的细胞，形成的Ⅰ类分子重链-β_2m-钙网蛋白复合物并不显示被肽占据分子的高度稳定性特征。这个观察结果提示通过 TAP 相关蛋白将Ⅰ类分子和肽转运体连接起来，可能在Ⅰ类分子有效结合肽中有重要作用，也许是由于这个浴度效应，也可能是 TAP 相关蛋白调整 TAP 的功能，以便没有 TAP 相关蛋白时，经 TAP 进入的肽可能损失。最后，TAP 相关蛋白存在时，重链和 β_2m 的结合增强，由于一个Ⅰ类分子结合位点与 TAP(也可能是 TAP 相关蛋白)[255]的结合产生相似的效应，一个有趣的可能性是 TAP 相关蛋白的部分直接作用于Ⅰ类分子的结合位点。由于短肽的自由 N 端和 C 端可与Ⅰ类分子形成保守的氢键，而 TAP 相关蛋白本身片段不能形成类似的结合，故 TAP 相关蛋白与Ⅰ类分子的相互作用可能是低亲和力(快的解离率)。然而，由于两个分子可能被其他部分的结合维持在一起，分离的 TAP 相关蛋白这个区域可能很快重新结合。这将帮助维持重链-β_2m 相互作用，并且 TAP 相关蛋白的每个解离周期均为进入 ER 腔的多肽提供一个空的结合位点。当合适的肽进入结合位点时，将阻碍 TAP 相关蛋白片段与Ⅰ类分子重新结合，从而丧失了 TAP 相关蛋白-Ⅰ类分子结合的稳定性。Ⅰ类分子和 TAP 相关蛋白/TAP 之间的结合位点永久缺失导致释放肽结合的Ⅰ类分子，使其分泌到细胞表面。这个模型提供一个可能的分子解释，将Ⅰ类分子肽装载和其离开 ER 相联系起来。如果这种思索的情形是正确的，它将进一步强调通过占有结合位点调节 MHC Ⅰ类分子功能的重要性，也为 ER 中Ⅱ类分子与恒定链相互作用的功能提供一个类比。

在胞质中产生 TAP 运输和Ⅰ类分子结合肽

关于理解 TAP 转运的肽是如何产生的，已获得大量的进展。所有真核细胞拥有一种多催化活性的蛋白质酶，称之为蛋白酶体(proteasome)[256]。这个分子是 16～20 个组分的大聚合物，其作为细胞组成型[持家的(housekeeping)]和调节功能的一部分，负责降解胞质蛋白[256,257]。在细胞存在若干类型的蛋白酶体，它们包含不同的亚单位组合，以及存在或缺少调节复合物 11S。试验清楚显示：当细胞存在蛋白酶体活性的抑制物，新合成的Ⅰ类分子结合肽和Ⅰ类分子呈递肽显著减少[258,259]。而这些抑制物对基因转染在胞质产生合适大小肽的呈递或外源肽则没有影响。一些证据也提示其他的胞质蛋白酶，甚至可能一些 ER 蛋白酶，可以产生 MHC Ⅰ类分子呈递的肽。

在 MHC 区域，紧靠 TAP-1 和 TAP-2 的两个基因，编码两个蛋白酶体亚单位——LMP-2 和 LMP-7。这些亚单位(也被称为 delta 和 MB1)和另外非 MHC 编码的相关蛋白——MECL-1 是 IFN-γ 高度可诱导的。这些分子一对一替换未暴露于 IFN-γ 的非血源细胞中的蛋白酶体亚单位 LMP-9、LMP-7、LMP-19[260～263]。这些 MHC 区域基因编码的蛋白酶体组分对于许多 MHC Ⅰ类分子有效呈递的肽而言并非必需[264,265]，但是它们确实影响蛋白酶体的特异性[266～270]，并且它们有助多催化复合物产生适合 MHC Ⅰ类分子结合的多肽。蛋白酶体

11S 的调节物(特别是 PA28 的共活化)有利于产生免疫显性决定簇[271,272]。

被蛋白酶体降解的蛋白质主要是经一种保守多肽——泛素修饰的蛋白质[273]。现在尚无足够的数据决定产生合适 TAP 转运和Ⅰ类分子结合肽的蛋白质,是否所有或者大多数在蛋白酶体裂解前均首先泛素修饰。蛋白酶体根据某些规则降解蛋白质,其中最了解的是 N 端规则,即蛋白质 N 端氨基酸的特性与其在胞质的稳定性相关,而蛋白质其他部分的作用是等价的[274]。数据显示肽呈递效率根据这条规则的变化,这和蛋白酶体参与产生Ⅰ类分子肽配体相一致[275]。这发现建议当采用重组疫苗提供Ⅰ类分子结合肽时,应该注意抗原源蛋白的 N 端的性质。

311

Ⅰ类分子对外源抗原的呈递和交叉活化(cross-priming)

MHC Ⅰ类分子呈递的主要途径如上描述,包括 TAP 转运多肽进入 ER 和Ⅰ类分子结合,而这些肽来源于胞质中合成或者通过直接融合穿过胞膜的蛋白质。但是,也有文献报道一些公认的完整蛋白加到免疫系统,其位于宿主 APC 细胞外,但能激发宿主限制的 MHC Ⅰ类分子依赖的反应[276,277]。这是如何发生的?

已经寻求了许多可能的解释(图 9.10)。在一些情况中,注射的蛋白质包含一定比例的变性或降解分子,可能适合直接结合膜表面的Ⅰ类分子,如合成肽,或经血液或细胞表面蛋白酶的进一步降解,成为适合直接结合的多肽。这样,这些例子实际与Ⅰ类分子限制识别肽敏感细胞等价,尽管这可能在疫苗设计中很重要,但并不改变我们关于Ⅰ类分子处理、呈递途径的概念。

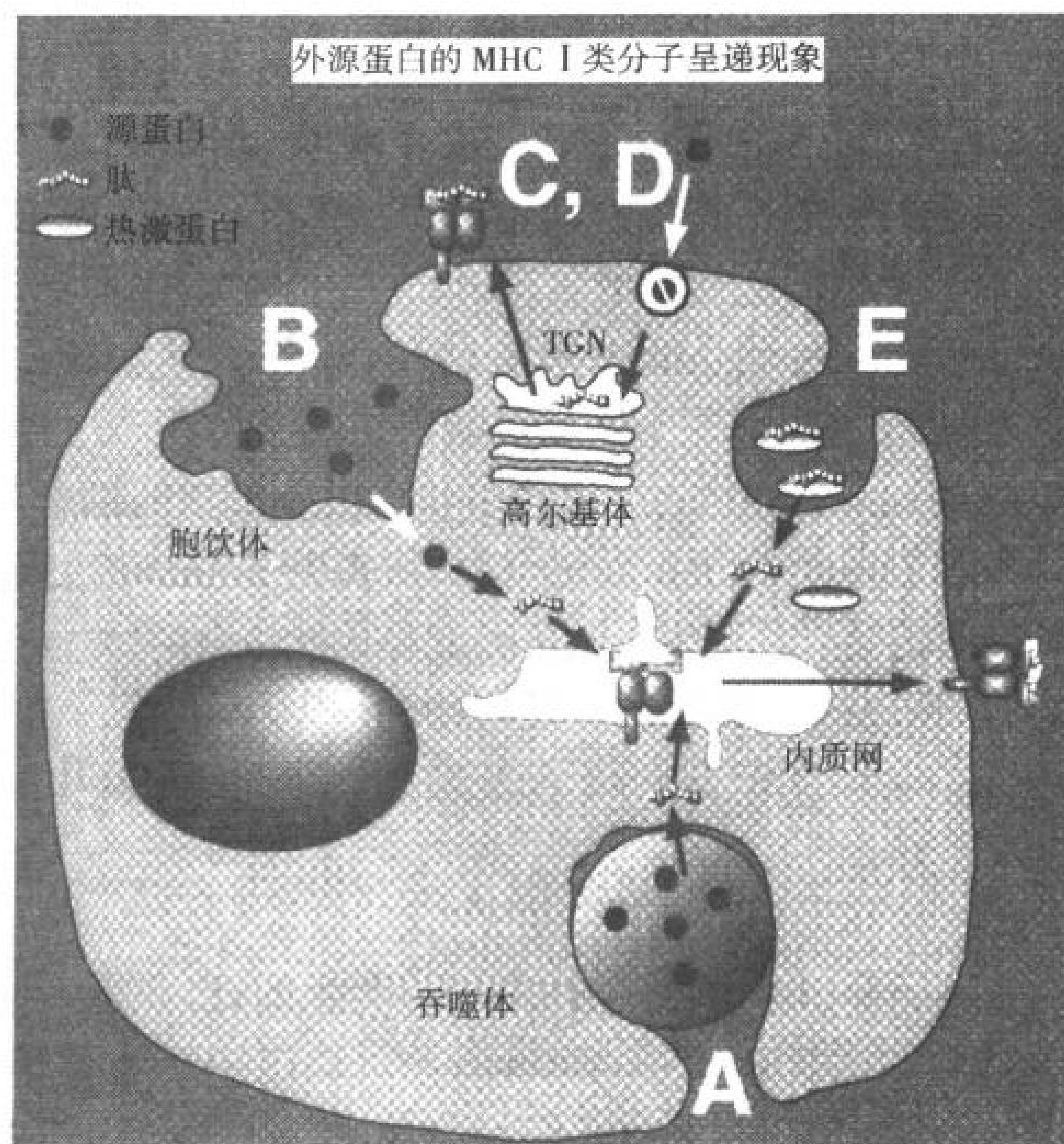


图 9.10 外源蛋白获取Ⅰ类分子处理途径或变成与Ⅰ类分子结合的可能机制。此图显示利用颗粒进入吞噬体,然后进入胞质,胞饮进入胞质,内吞小体肽反吐结合表面Ⅰ类分子,在反面高尔基网(TGN)结合来源于循环内体的肽,热激蛋白陪伴肽进入内体,并运输进胞质。

在一些情况中,完整的球状蛋白[278]或活细胞作为抗原使用。后者的几个试验模型涉及次要组织相容性抗原。这些试验显示所谓次要的 H 抗原实际是包含种内多态性的多肽,当其通过 MHC 等位基因 A 的细胞代入宿主时,能被宿主 MHC 等位基因 B 的Ⅰ类分子呈递[279]。注射的细胞能被宿主的免疫反应杀死,释放细胞降解的蛋白质,成为胞外肽,正如上面描述的外加的自由蛋白。这些发现和其他包括蛋白质或细菌抗原的研究提示一个更为有趣的可能是存在专门的 APC,它以如下几种呈递外源抗原:① 胞外蛋白质直接进入传统的Ⅰ类分子处理系统,也就是,尽管它们缺乏内化的融合活性,这些细胞允许这些蛋白质进入胞质;②在内吞途径产生多肽,与反面高尔基网少量的空Ⅰ类分子结合,因为反面高尔基网与早期内体相连;③在内体产生的多肽循环到细胞表面与空的 MHC Ⅰ类分子相互作用。

若干调查者为第一可能性提供了证据,尽管如此运输的分子机制尚未确定[280~282]。模式抗原的酶试验显示一部分巨噬细胞或树突细胞暴露到如此材料时,抗原的胞质染色依赖于酶活动,提示未降解蛋白质从胞外进入胞质可能通过内体的机制[283,284]。一个提议是热激蛋白介导越过内体膜的运输,Dice 和合作者曾描述在Ⅱ类分子呈递中,一个热激蛋白介导的、从胞质到内体的相反运输途径[285,286]。

其他的研究支持第二或第三个模型,包含在内体产生肽,然后在这些小体中或反吐到胞外与Ⅰ类分子结合[287~290]。这样无需特殊的穿膜运输机制,并且效率可能比期望低。推测可能存在一种有效的机制确保胞内囊泡中的有机体能被呈递,以便招募那些寄生虫驻留细胞特异的 $CD8^+$ 效应细胞分泌 IFN-γ,提高感染细胞抗微生物效应。Bevan[291]认为可能存在一些特定类型的吞噬细胞,拥有这些性质中的一个或其他;另外,这些细胞的内吞机制是释放蛋白质而非细胞或细胞碎片。一个表达Ⅱ类分子的 APC 细胞,其Ⅰ类和Ⅱ类分子和来源一个蛋白质的肽结合,故这些细胞将受利于在一个途径产生这些肽。那么 CD4 Th 细胞能被Ⅱ类分子-肽复合物激活,从而可为同一个呈递细胞的Ⅰ类分子-肽复合物活化 CD8 细胞提供最佳帮助(见第 26 章)。

在分离适合 $CD8^+$ T 细胞活化的肿瘤相关抗原时,另外外源抗原与 MHC Ⅰ类分子结合的可能途径首先被认识到。纯化肿瘤抗原导致称之为 grp96 的休克蛋白/细胞的分子伴侣的分离[292]。生化和遗传分析显示这蛋白质存在于未转化宿主细胞,并未发生改变,然而注射同系的宿主能产生肿瘤特异的免疫反应。现在已经清楚,此分子和热激蛋白家族的其他成员一样,是肽结合分子,并且在它结合的多肽之中对应有有效的Ⅰ类分子呈递的肿瘤特异性的抗原[293]。Srivastava 和同事们建议在某类巨噬细胞,这些载体蛋白选择性结合多肽,并可能进一步整修多肽后,进入常规的胞质Ⅰ类分子途径,最后在 ER 中与新生成的Ⅰ类分子-β_2m 复合物结合,运输到细胞膜供 T 细胞识别[294]。

312

随着最近发现裸 DNA 是一种有效疫苗,故对外源抗原参与 MHC Ⅰ类分子呈递的研究领域表现出更大的兴趣[295]。注射编码完整或部分候选疫苗蛋白质的 DNA 质粒,或在皮肤轰击涂有此 DNA 的金颗粒,能引起 $CD4^+$、$CD8^+$ T 细胞和抗体反应[296]。最近的试验显示在刺激产生针对注射 DNA 编码蛋白质抗原的细胞免疫反应中,宿主的 APC,很可能是树突细胞,是主要的参与细胞类型[297]。至少在一些例子中,DNA 被摄取或注射进入的细胞只有一种,如肌肉细胞,尽管 $CD8^+$ T 细胞活化需血源的 APC 细胞的参与。这需要一种机制解释肌肉细胞产生的蛋白质被血源的 APC 获取,上面描述的途径可能参与这个过程。这包括在 DNA 接种或颗粒轰击部位释放热激蛋白质。这些数据再次强调在疫苗的情形下,这种Ⅰ类分子肽结合非正常途径的重要性。

Ⅱ类分子

Ⅱ类分子配体结合位点

Ziegler 和 Unanue 的重要研究[24]显示内吞系统的蛋白酶裂解在 MHC Ⅱ类分子抗原呈递中的作用,而 Morrison 等人[31]和其他人的数据表明外源抗原能被Ⅱ类分子二聚体很好地呈递。这些结果导致一个普遍的观点:MHC Ⅱ类分子在内吞途径与抗原相互作用。MHC Ⅰ类分子首先在 ER 内腔结合其多肽配体的知识提出一个问题,即同样在 ER 形成的 MHC Ⅱ类分子结合位点如何避免与胞质来源肽的结合,并且还能保留在内吞系统与抗原相互作用的能力。当两个研究组证明完整的恒定链阻碍Ⅱ类分子与肽的结合,一个简单的模型开始被广泛地接受,也就是恒定链保证 MHC Ⅱ类分子不与 TAP 输入的胞浆肽在 ER 结合,从而导致外源和内源途径间的区别[298,299]。发现 Ii 的片段(CLIP)占据 MHC Ⅱ类分子的结合位点,干扰 MHC Ⅱ类分子与肽在 ER 的结合,进一步为这个模型提供了显著的支持[84,217]。但是在恒定链缺陷小鼠中,吃惊地发现 MHC Ⅱ类分子并非如预测的一样,结合 ER 区域的肽,而是缺乏与肽的紧密结合[211]。在转染细胞的直接分析证实了这个结果[300]。

随着最近认识到 TAP 相关蛋白在 MHC Ⅰ类分子与肽结合中的重要作用,以往吃惊的结果可得到合理的解释,没有恒定链的 MHC Ⅱ类分子未经 TAP 相关蛋白与 TAP 相互作用,故不能高效地与胞质肽结合。另

外，当不存在 Ii 时，Ⅱ类分子二聚体不能最佳地形成，减少结合肽的机会，并且就算形成了二聚体，在生理温度可快就失去肽结合能力，限制聚合二聚体结合肽的机会[166,301]。综上所述，Ⅱ类分子与 CLIP 的结合关系到Ⅱ类分子有效折叠和从 ER 到高尔基体的运输，同时也抑制长蛋白质而非短肽的结合。由于Ⅰ类分子结合槽两端封闭，这种与大蛋白质的结合并不影响Ⅰ类分子，但是对于Ⅱ类分子，其在内吞系统的抗原捕获要适当进行，需在分泌途径中调节其与大蛋白结合。

在内吞途径，肽在什么地方如何与 MHC Ⅱ类分子结合了？通过使用药物或温度改变细胞环境，探测Ⅱ类分子处理和呈递途径。提高胞内的试剂（例如氯喹或 NH_4Cl）水平，通常干扰 MHC Ⅱ类分子抗原呈递[302]。这些试剂的这种效果部分是因为减少抗原处理成适合与 MHC Ⅱ类分子结合，部分可能与 Ii 分子有关，因为酸性蛋白酶去除Ⅱ类分子-Ii 复合物中的 Ii 分子，才能暴露 MHC Ⅱ类分子结合位点和释放胞内的滞留状态。现在发表的试验中均使用表达 Ii 分子的细胞，采用 T 细胞来监测细胞膜上的Ⅱ类分子-肽复合物，这样不能区分这些试剂的抑制效应是由于影响了肽的结合和转运，还是由于缺乏肽，或者两者均存在。对亮抑酶肽抑制效应的解释也存在类似的争论。所以由于这些试剂不能将抗原和 Ii 的蛋白酶降解作用区分开，如此研究不能确定抗原和Ⅱ类分子结合的地点。

结合显微镜，细胞分级分离和免疫化学研究在确定抗原和Ⅱ类分子结合的地点方面更有价值。结合这些方法导致普遍认为内吞途径是Ⅱ类分子与肽相互作用的地点，但是现在仍存在一些争论，如Ⅱ类分子装载肽是发生在这条途径的一个位点还是多个位点，传统描述的内吞系统细胞器（早期内吞小体，晚期内体和溶酶体）是否就是抗原处理和把Ⅱ类分子与抗原结合的地点。早期形态学数据显示新合成的Ⅱ类分子并不进入内吞途径的所有成分，而是直接从 TGN 搬运到一个特定的分隔空间（MIIC），它们在此积累并且与到来的多肽结合[197,221]。主要基于细胞内存在富含高水平稳定状态 II 分子的区域，这个假设被广泛地接受，称之为直接转运-特定内吞装载地点模型（direct trafficking-unique endocytic loading site model）。

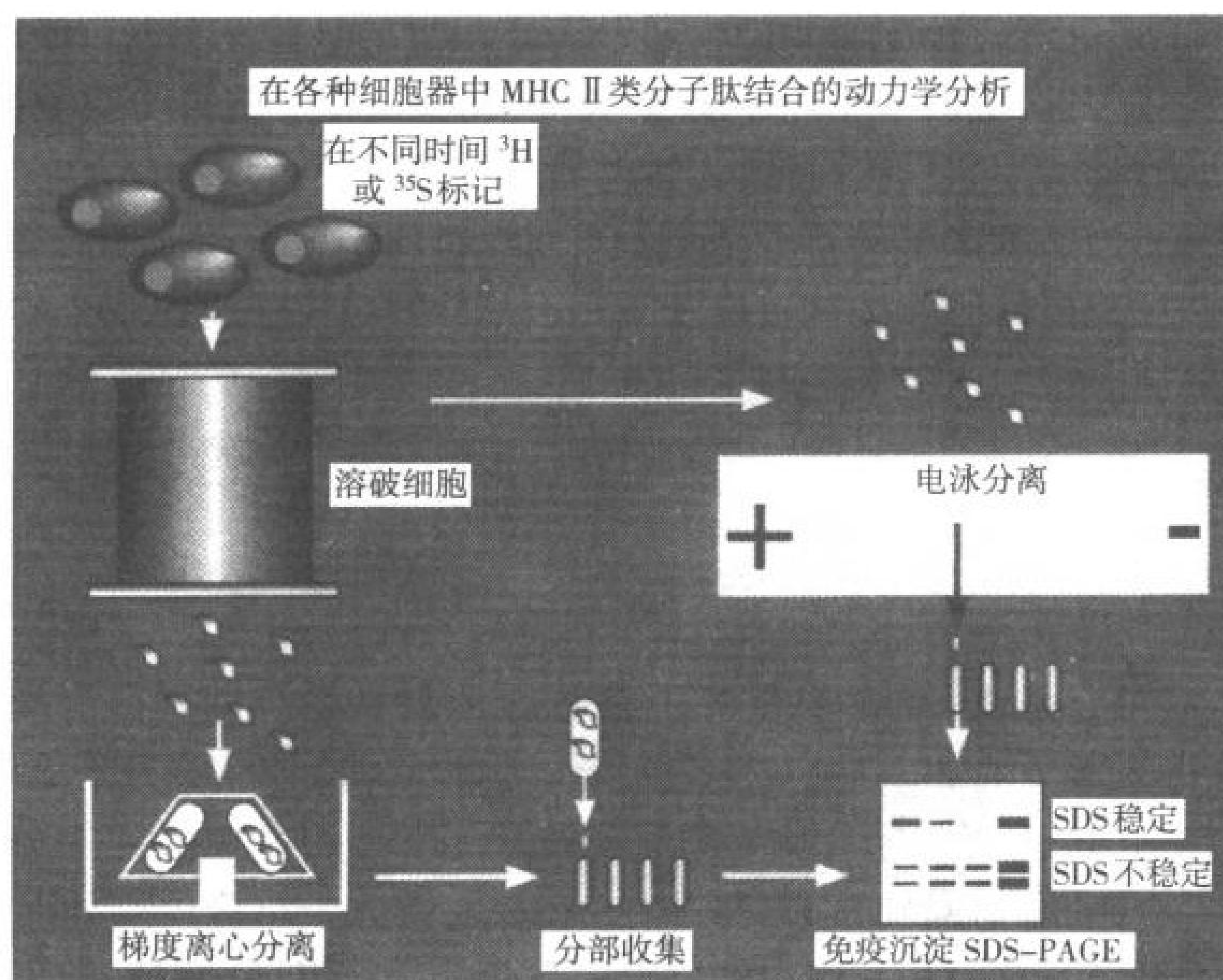


图 9.11 细胞分级分离和 SDS-PAGE 分析确定抗原与 MHC Ⅱ类分子结合的位置。此图显示在代谢标记蛋白后的不同时间，采用密度离心和游离电泳（free-flow electrophoretic）从破坏的 APC 分离膜性细胞器，然后采用免疫沉淀和胶电泳分析这些分离细胞器部分中标记的 MHC Ⅱ类分子，判定 SDS 稳定（结合肽后）的 MHC Ⅱ类分子二聚体。

若干研究组联合使用细胞分级分离和代谢脉冲标记/免疫沉淀技术进一步研究这个问题（图 9.11）。密度梯度离心或电泳方法可分离纯化不同的内吞系统细胞器，而标记和在可见 SDS 稳定二聚体的条件下电泳可了解各种状态的Ⅱ类分子-Ii 复合物，从新生成到去除 Ii 分子与肽结合[152,153]。使用这个技术，报道新合成的Ⅱ类分子位于一类特殊的与典型内体不同的内吞囊泡，这些囊泡是Ⅱ类分子-肽二聚体表达在细胞表面前聚集、装载肽的位点[303~306]。这些研究结果支持直接转运-特定内吞装载地点模型。同时，虽然这些不同研究均报道鉴定了与典型内吞系统细胞器不同的富含Ⅱ类分子的囊泡，在这些报道中这些包含Ⅱ类分子囊泡

313

本身的特征并不一致。例如，在小鼠的 B 细胞肿瘤 A20，这些囊泡对应于早期内吞小泡的一些特征；相反，在人黑色素瘤细胞和 B 淋巴母细胞瘤，它具有溶酶体囊泡的许多特征。

然而其他数据与这个过分简单化的模型不一致。一些使用未转化淋巴母细胞的研究，采用精确的细胞分级分离技术，采用不封闭恒定链的Ⅱ类分子特异性抗体（封闭恒定链是上面引用其他试验中的一个问题），显示在具有传统内吞系统细胞器特点的多个内吞囊泡存在 Ii 复合物，发生 Ii 的降解，产生肽结合的Ⅱ类分子二聚体[220]。因为 Ii 阻碍稳定的肽-Ⅱ类分子结合，胞内Ⅱ类分子捕获肽必须在除去 Ii 的抑制效应后发生。这预示正常肽的捕获在内吞途径中靠后的部分发生，因为完整的 Ii 分子在早期的内体中很少裂解。与这个观点相一致，最易发现装载抗原Ⅱ类分子的区域（MIIC）大概等价于溶酶体，但是在一些早期内吞系统位点也可观察到抗原与新合成的Ⅱ类分子结合。根据几个实验室进行的研究，另外的模型[连续内吞系统转运-多位点的抗原装载（sequential endosomal trafficking-multiple loading site）]正在获得更多的支持。这个模型似乎符合生物学规律。有效的抗原处理取决于降解蛋白质的复杂性，它包含蛋白酶识别位点的多少，和它在蛋白酶降解前解折叠的难度[307]。Ii 与 MHC Ⅱ类分子的解离则受到内体蛋白酶的活性和 Ii 与不同等位基因Ⅱ类分子亲合力的影响。Ⅱ类分子进化具有扫描整个内吞途径的能力，捕获在不同 pH 和蛋白酶降解活性下提供的决定簇，这样似乎更为合理的优化免疫系统识别入侵有机体的能力。对这个分散捕获模型建议的一个批评是：由于下面将讨论的限制，新合成的Ⅱ类分子复合物在通过早期内吞小体时的很少有 Ii 分子被移开。最近使用免疫电镜技术获得与连续内吞系统转运-多位点的抗原装载模型一致的数据[222]。

最后一个问题：是否所有具有Ⅱ类分子依赖抗原呈递的细胞在同样的位点以同样方式处理和结合抗原。逐步增长的证据显示在不同细胞系，甚至在细胞激活的不同阶段，MHC Ⅱ类分子的处理存在差异。若干报告显示，在 B 细胞中，通过特定受体和胞饮摄取同一种可溶性抗原，导致以不同的效率呈递此蛋白中某个决定簇[308]。IFN-γ 激活的巨噬细胞不同于 B 细胞，也许和树突细胞也存在差异。树突细胞能高效地呈递蛋白质中的决定簇，而与巨噬细胞呈递特别暴露的决定簇相比它更偏好位于蛋白质核心的决定簇[309,310]。树突细胞成熟后快速调节它们Ⅱ类分子的再循环率，改变任何一个分子处于某种内吞细胞器内的时间，并且在这个分化过程显示从胞内囊泡到质膜的全局再分布[198,199]。

DM 功能

在内吞途径一系列组织蛋白酶逐步降解完整的恒定链，导致在原位产生位于Ⅱ类分子结合槽的 CLIP[311]。为蛋白质抗原与这些Ⅱ类分子相互作用，这种结合位点必须移开。内吞环境 的若干特征有利于这个过程。酸性的 pH 本身可提高 CLIP 的解离[312,313]，但是总的来说这是一个低效过程，因为一些在 MHC 的Ⅱ类区域存在删除突变的细胞能生产大量膜表面表达的Ⅱ类分子，将这些分子在 PH 1～3 处理 3 个小时，仍几乎均被 CLIP 占有[215,314]。现在知道大多数 CLIP 的去除是由于存在一类Ⅱ类分子样的异源二聚体，称之为 DM。DM 的组成链在 MHC 区域内编码[315～317]。这个分子的 β 链尾有一个基于酪氨酸的靶向序列，使其聚集于内吞途径，特别是晚期内体/溶酶体样的 MIIC[318～320]。免疫沉淀分析显示 DM 直接与 MHC Ⅱ类分子相互作用[321,322]。DM 功能和酶相似，以与Ⅱ类分子-肽复合物内在亲和力成比例的方式，促进配体从Ⅱ类分子结合位点解离，这个解离效应在低 pH 时得到优化，尽管 pH 的效果在不同Ⅱ类等位基因间不一样。这样，当配体与Ⅱ类分子有较快的分离率时，DM 的存在将使配体很快离开 MHC Ⅱ类分子的结合位点，而有慢分离率的配体对 DM 诱导的分离相对耐受。由于大多数Ⅱ类等位基因与配体具有中等的亲和力，故在酸性条件下，DM 能促进 CLIP 以相当快速的分离。

314

因为 DM 似乎并不直接识别特定的 CLIP 或 CLIP-Ⅱ类分子复合物，DM 可能具有“编辑” MHC Ⅱ类分子结合配体的作用[327～329]。在富含 DM 的内吞囊泡，将可能抑制那些与Ⅱ类分子中等强度亲和力的抗原形成稳定的复合物。这导致对呈递抗原中最稳定结合决定簇的偏好，而原则上，这种偏爱能因为内体中很高的配体密度而克服。在如此条件下，由于 DM 和低 pH 的影响，在Ⅱ类分子复合物离开抗原处理囊泡时，只有少量结合配体解离。

在B细胞,DM与另外Ⅱ类分子样的异源二聚体DO相结合[56]。DO转运到内吞细胞器,这个过程需要与DM结合。DM-DO联合的功能意义仍然不清楚,尽管一份报告提示其下调DO的活性,并且这被推测有助于B细胞的Ⅱ类分子呈递表面免疫球蛋白介导进入的抗原而非胞饮[330]。

MHC Ⅱ类分子捕获抗原的生化观点

内吞系统处理的最终产物是表达在细胞表面的肽-Ⅱ类分子复合物。因为进入内吞途径的大多数蛋白质被降级成它们组成型的氨基酸,短肽只是在洗脱纯化的MHC Ⅱ类分子时发现,并且这些短肽能成为 $CD4^+$ T细胞有效活化配体,故通常认为MHC Ⅱ类分子抗原呈递在蛋白质抗原降级过程的中期发生。这样,内吞系统中MHC Ⅱ类分子装载的短肽被认为来源于已大量酶切的源蛋白质,而仅仅有少许几个残基伸出结合槽,随后被蛋白酶整修。然而,事实上从生化角度,我们并不了解在内吞途径Ⅱ类分子相互作用的实际配体和产生这些配体的步骤。

一个重要的问题是Ⅱ类分子在内体和溶酶体高度蛋白酶解的环境中如何能高效地捕获配体。Ⅱ类分子抵抗解离和降解与CLIP或抗原的结合相关,所以DM移去CLIP到结合抗原一定是一个快速的过程,虽然DM本身也具有维持空Ⅱ类分子的功能[322,331]。有关快速结合的讨论也适合抗原,因为在蛋白质解折叠,被蛋白酶内部裂解前,许多决定簇可能仅在很短的时间内提供。相反,另外一些决定簇要求广泛的变性,缩短,或者需进一步的蛋白酶裂解,以从高度稳定、很好折叠蛋白质的核心释放[332]。抗原对蛋白酶攻击具有不同的敏感性,导致短肽在如此环境可能具有不同的有限的存在期跨度,这些是如何与有效的抗原呈递相协调的呢?

基于功能而非生化研究,Deng等人认为抗原捕获可能发生在低pH的内体,在蛋白质解折叠后或初期裂解阶段,大蛋白质片段与Ⅱ类分子结合,随后进一步消化降解仅留下Ⅱ类分子结合槽保护片段。现在获得的一些生化数据支持这个Ⅱ类分子抗原捕获过程的看法。正常的B淋巴母细胞暴露到完整抗原,在其内吞途径发现一个120kDa的蛋白质复合物,由两个不同Ⅱ类分子二聚体结合在蛋白质抗原的一个大片段上组成[334]。这些数据提示当抗原解折叠,与CLIP很快解离的Ⅱ类分子与相关的决定簇结合并保护它们。这种情形暗示多个Ⅱ类分子能在多个位点结合在单个大的变性或部分裂解的蛋白质。通常蛋白酶将解离分开这些Ⅱ类分子抗原复合物成为单个含有短配体的二聚体,这些短配体的N端和C端将进一步被多肽酶整修,成为那些典型的从成熟Ⅱ类分子洗脱的不同长短的短肽[129]。

这个关于肽捕获假设模型的一个明显优点是在解折叠/裂解早期过程中暴露的抗原决定簇很快于Ⅱ类分子结合槽结合,从而防止其被蛋白酶攻击[125,127,333]。这极大增加在晚期内体/溶酶体囊泡中抗原捕获的效率。这个模型也为Ⅱ类分子结合槽进化成两端开放提供了优秀的解释,因为这将便于与抗原的解折叠形式快速的相互作用。同样,这将可解释在ER Ⅱ类分子的结合槽需恒定链的保护。与更长蛋白质结合的这种能力不排除Ⅱ类分子与短肽的结合;取决于可获取配体的状态,两机制能同时存在。

成熟Ⅱ类分子的再循环可呈递一部分蛋白质决定簇

大多数Ⅱ类分子依赖的抗原呈递需要新合成的αβ二聚体,Ii和DM,但是也存在许多例外[335~338]。即使位于同一个蛋白的不同决定簇也对呈递有着不同的要求;例如,和其他4个 A^k 呈递肽相比,HEL46-61的呈递需要Ii分子[339],并且46-61的呈递对蛋白质合成抑制特别的敏感。对这些结果的解释提示Ⅱ类分子的抗原处理和呈递可能存在两条途径。一条途径包括晚期内体/溶酶体的处理和新合成的Ⅱ类分子和Ii,而第二条途径包括通过早期内体内在化、再循环成熟的膜表面Ⅱ类分子。

315

很长时间以来,因为很难显示成熟再循环MHC Ⅱ类分子,上述提示的后者建议被认为值得怀疑[340]。两个提示的途径的直接证据来源最近的研究。内在化试验显示野生型HLA-DRαβ从细胞表面内在化,再循环到细胞表面[193,341,342]。在转染细胞,截断任何一个HLA-DR链的胞质尾部分极大地减少内在化[343],并且当Ii不存在时,Ⅱ类分子的胞质尾也为DR分子在内吞囊泡聚集所必需。截断任一个HLA-DR链的胞质尾对灭活流行性感冒病毒的两个决定簇的呈递有着不同的影响;Ⅱ类分子尾部截断抑制血凝素决定簇H3的呈递,

而基质蛋白质 M1 的呈递未受影响。这些研究为涉及膜Ⅱ类分子再循环的Ⅱ类分子肽结合旁路途径提供了第一直接证据。小鼠模型中，采用 HEL 被 $A\alpha^k A\beta^k$ 呈递的三个不同决定簇(34-45，46-61 和 116-129)的进一步试验支持、扩展了这些在人源细胞的研究。虽然仅仅 46-61 的呈递清楚地依赖于新合成的蛋白质和 Ii，但所有三个的呈递均需要内吞途径的处理。检测许多Ⅱ类分子的胞质尾部顺序，在 β 链尾部存在一个紧随甘氨酸的两个亮氨酸保守序列，其与 Ii 分子近膜的靶向信号相似，并且均距质膜内侧相似的距离(图 9.12)。位于Ⅱ类分子 β 链尾部，公认的两个亮氨酸信号序列对于位于 HEL 蛋白质表面的决定簇不依赖 Ii 的呈递十分重要。在 HEL116-129 的呈递中 Ii 不能代替此两个亮氨酸信号序列，尽管 HEL34-45 的呈递中 Ii 能代替Ⅱ类分子的尾部序列。与之对应，46-61 呈递中 Ii 不能被 β 尾部信号替代，而且这个信号也不是必需的[310]。另外的试验也在体显示 MHC Ⅱ类分子 β 链胞质尾对抗原呈递的影响[344]。

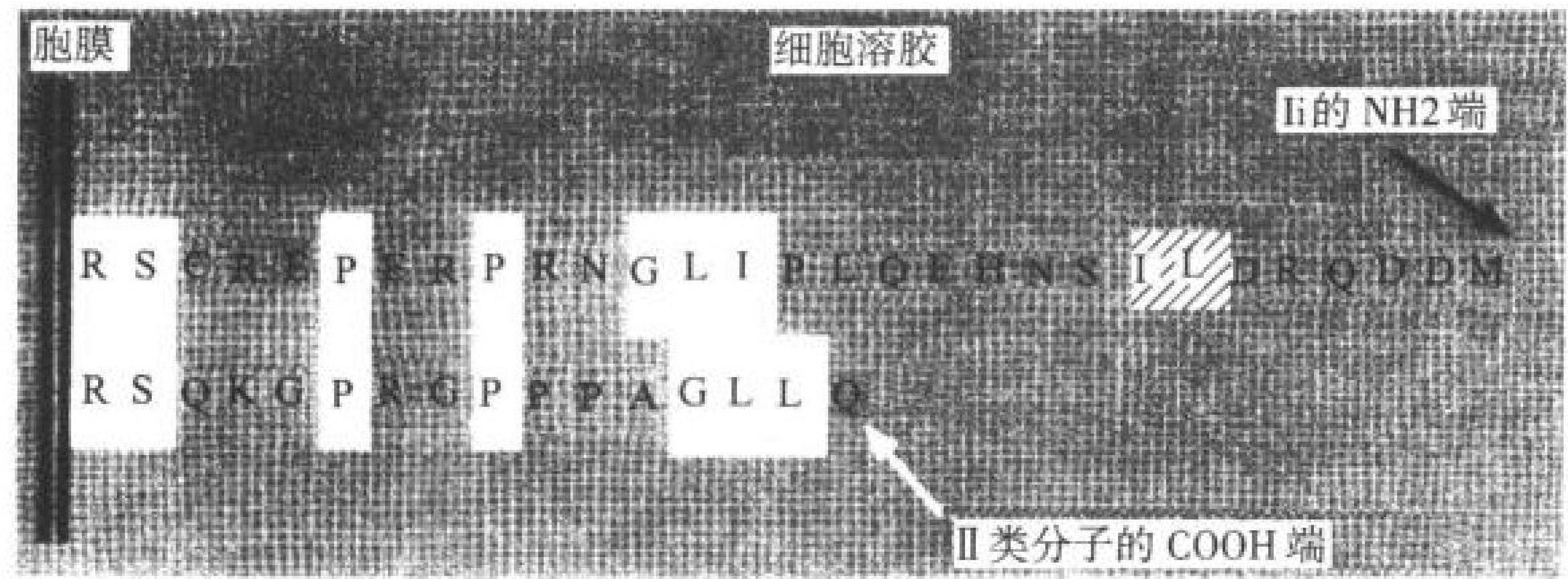


图 9.12 在恒定链和 MHC Iib 链的胞质尾部，以亮氨酸为基础的内体靶向基序。双亮氨酸信号和关键的甘氨酸被指出。

这些数据说明在内吞系统 MHC Ⅱ类分子以复杂的途径捕获不同的决定簇：存在Ⅱ类分子尾(β 链)依赖的位于蛋白表面决定簇的捕获；在早期内吞细胞器有再循环的成熟Ⅱ类分子结合；在晚期内吞小体主要捕获部分包埋的决定簇，由再循环Ⅱ类分子或新合成的与 Ii 结合的Ⅱ类分子完成；但新合成的Ⅱ类分子在 Ii 的控制下面的运输到溶酶体样细胞器，最为有效的呈递包埋抗原决定簇(图 9.13)[345]。在早期内吞小体，由于

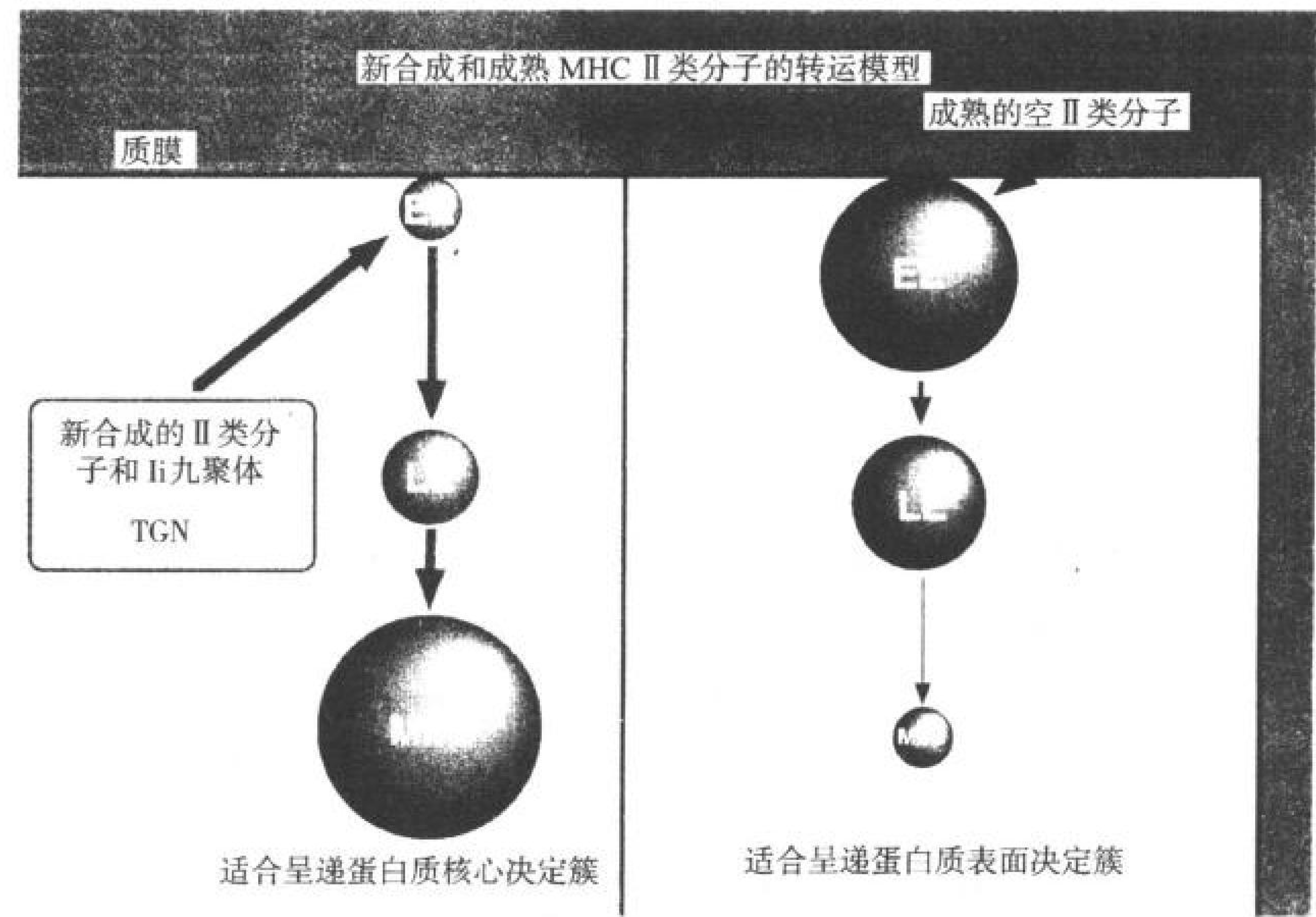


图 9.13 分别表示恒定链/新合成Ⅱ类分子的呈递途径和成熟胞膜Ⅱ类分子的尾信号依赖循环途径。两条途径可有效扫描所有内吞途径囊泡的抗原信息。图表每一部分的圆圈大小表示在指示位置可能提供捕获抗原的Ⅱ类分子结合位点的数目。与恒定链结合的新合成Ⅱ类分子偏向结合在晚期内体/溶酶体提供的决定簇，而成熟循环的Ⅱ类分子偏向结合在早期内体的决定簇。EE，早期内体；LE，晚期内体；MIIC，MHC Ⅱ类分子富含囊泡；TGN，反面高尔基体网。

仅去除少量位于新合成Ⅱ类分子结合槽的 Ii 分子，故再循环的成熟Ⅱ类分子能有效补充在早期内体抗原呈递，这样就产生一个模型：无论决定簇在内吞系统的什么地方产生均能被Ⅱ类分子呈递。

肽和Ⅱ类分子的生存期

在培养的脾细胞加入大量完整抗原导致新合成Ⅱ类分子显著转换成 SDS 耐受的二聚体，并且表面Ⅱ类分子的表达上升两倍多[152]。大多数这些增加的稳定二聚体来源于那些在几个小时内注定胞内降解的Ⅱ类分子。同样，在这些细胞加入与 MHC Ⅱ类分子高亲和力的合成肽，也导致与这些配体结合的Ⅱ类分子生存期延长，而同样的Ⅱ类分子结合低亲和力肽产生生存期相对短的复合物[346]。使用纯化Ⅱ类分子的离体研究显示空Ⅱ类分子与不同配体结合呈时间和温度依赖[166,301]。综合这些数据可认为：与Ⅰ类分子一样，肽结合控制着 MHC Ⅱ类分子二聚体的功能存在期。

316 在低 pH 加肽或不加肽时，Ⅱ类分子的命运为这个问题提供了线索[154]。在去污剂中新合成的Ⅱ类分子-肽复合物在 37℃暴露在 pH 5，导致Ⅱ类分子与 Ii 解离，并且大多数Ⅱ类分子蛋白质聚集。如果在此研究中，存在肽与此Ⅱ类分子结合，裂解物许多Ⅱ类分子能恢复可溶状态。在杆状病毒系统产生的无 Ii 和肽的Ⅱ类分子趋于聚集，而这种聚集能被肽逆转[165]。这样，肽结合似乎阻止空Ⅱ类分子进入蛋白质沉积，这和它能保持功能结合活性，防止不可逆变性相一致。当Ⅱ类分子与快速解离肽配体结合时，Ⅱ类分子短暂的生存期将由变性/解折叠/聚集组成。新合成释放 Ii 的Ⅱ类分子和从胞膜重新进入内吞系统的Ⅱ类分子是否仍然在到达细胞表面的途中，在内吞途径囊泡的Ⅱ类分子将面临两种可能命运：有效的与配体结合或者二聚体相互之间或与其他蛋白质聚集后，在溶酶体破坏。这机制将帮助保证高效胞膜呈递的是有用(即包含肽)的Ⅱ类分子。因此这些数据支持肽不仅离体调节Ⅱ类分子的结构，而且更重要是影响在细胞内Ⅱ类分子的命运，这个结果与肽在Ⅰ类分子中的作用相一致。

在Ⅱ类分子呈递中有效内吞的重要性

蛋白质的液相摄取提供Ⅱ类分子呈递途径的抗原，而内吞抗原量直接与细胞周围组织液中抗原溶度和摄取液体量的成正比。因为抗原溶度经常是很低的，特别在远离感染灶的地点，必须大体积的液体进入内吞途径，以提供足量抗原进入处理系统。这可能是树突细胞使用的一种策略，曾报道树突细胞显示组成型的高胞饮水平[347]。在呈递细胞中也存在其他更特殊的机制提高抗原的摄取(见第 6 章、第 15 章和第 16 章)。B 淋巴细胞使用其表面的免疫球蛋白分子结合、内在化抗原。有小鼠和人的细胞试验显示如此免疫球蛋白介导的摄取能由提高抗原呈递 $10^2 \sim 10^4$ 倍[348,349]。在周围很低完整抗原溶度下，B 细胞能在其表面获得有效 MHC Ⅱ类分子复合物，这对 B 细胞与辅助 T 细胞相互作用产生针对外源蛋白质特异性抗体十分重要。表面免疫球蛋白的胞质尾部参与指导结合蛋白转运到Ⅱ类分子处理位点[350,351]。一些研究提示 B 细胞受体除表面免疫球蛋白外还有其他分子，称之为 Igα 和 Igβ，它们也参与抗原-膜免疫球蛋白复合物的转运，帮助其到达 B 细胞内吞细胞器抗原处理或与Ⅱ类分子结合的位点[352]。巨噬细胞和树突细胞则利用与病原体蛋白质普通结构特征反应的受体，例如暴露的甘露糖残基促进抗原的摄取，因为在哺乳细胞甘露糖残基通常藏匿或不在表面蛋白质发现[353]。这机制不同于 B 细胞由表面免疫球蛋白介导的抗原摄取，因为在 B 细胞并不限制于相同组织类型中的特定细胞克隆。

采用其他人工或天然的方法增强内吞摄取，可以类似地提高抗原呈递。细胞参与内吞的表面蛋白的抗317 体与抗原交联，可提高呈递效率 10^2 倍[355~356]。非 B 细胞也使用抗体介导的机制提高抗原摄取。巨噬细胞的 FcγRⅢ受体包含一个特殊的区域帮助这个受体快速从细胞膜内在化；这样，结合在这个受体的嗜细胞抗体能加快抗原的呈递[357]。B 细胞的 FcγR 不含有巨噬细胞 FcγR 中靶向内吞系统的胞浆区域，阻止嗜细胞性抗体不恰当地扩充不相关抗原的呈递，因为嗜细胞性抗体与 B 细胞特异性免疫球蛋白受体并不匹配。

非免疫球蛋白受体也能完成同样的功能。激活的人 $CD4^+$ T 细胞表达 MHC Ⅱ类分子，能有效呈递人免疫缺陷病毒可溶性 1 型糖蛋白 120 (HIV-1 gp120)，这种蛋白就是通过结合与 CD4 分子内在化的。而同一供

体的 CD8⁺母细胞因为缺乏 CD4⁺摄取机制，其呈递 gp120 的效率至少低 100 倍[358]。如果其他生物学活动的外源蛋白具有与 APC 膜表面蛋白结合的能力，也能有效地运送到抗原处理地点。吞噬作用提高抗原呈递至少部分是由于较大的颗粒，它们通常使细胞在一个时刻含有多个拷贝的颗粒蛋白质分子。

Ⅱ类分子呈递的"内源"抗原

虽然大量的证据支持Ⅱ类分子在内吞途径的酸性环境获得多肽，但仍有众多观察发现Ⅱ类分子呈递肽来源于"内源"蛋白质[359]。这些数据如何与上面描述的Ⅱ类分子生物合成和处理途径相协调？参与此异常呈递途径的蛋白质可划分成三大类：已知可以到达细胞表面的蛋白质，这为进入内吞系统提供一个入口；显著滞留于 ER 的蛋白质；胞质蛋白质。第一组蛋白质仅在操作上"外源"，因为十分清楚它们重回细胞是进入标准的内吞处理途径。可以预料这些膜锚定分子或与其结合的其他蛋白质在此途径可以高效率地呈递，因为使用结合与表面免疫球蛋白或交联于表面蛋白质的配体可提高抗原呈递 $10^2 \sim 10^4$ 倍。在一些试验中，发现一些公认可溶性的内源合成蛋白高效地呈递。细胞混合试验显示几乎没有交叉呈递。但在这些试验中，未考虑高区域性溶度的蛋白质邻近于实际分泌性细胞，这将有利于抗原的摄取，有可能一部分其他可溶性蛋白质与分泌性细胞产生的膜组分相联合，导致快速循环进入的内吞途径（这在细胞混合中未提供的途径），另外的可能是可溶性蛋白部分直接从高尔基体到内吞途径，也可能作为一种调节机制错误折叠的蛋白质进入降解囊泡。这样，到目前为止，如此的试验尚不能提供坚实的证据证实存在一条不同的Ⅱ类分子抗原呈递处理途径，尽管仍然有此可能性。

第二类蛋白质，即那些进入并且滞留于 ER 的蛋白质（如存在一个 KDEL 信号序列），被用来强烈支持存在一个处理抗原和Ⅱ类分子与肽结合的非内吞系统地点。然而，至少一些事例报道中，虽然位于 ER 的蛋白质快速、高效降解，但与那些有效转运出 ER 的野生型蛋白质相比，在生成可刺激的呈递细胞方面明显效率低下[360]。这样，存在产生更多的肽但少量呈递的状态，在一些情况中甚至低几个数量级，这种状态使 ER 作为抗原处理和Ⅱ类分子与肽结合位点的结果有些奇怪。再者，在剂量效应试验中可看到，蛋白质从 ER 越多"漏出"则越有效呈递，而滞留最好蛋白质则对效应细胞最少具有刺激性。与呈递相关的蛋白质不是滞留、生化处理在 ER 的主要部分，而是从此细胞器逃逸的小部分，这一小部分可能进入内吞途径降解后与Ⅱ类分子结合。综上所述，需要进一步的试验确定那些滞留 ER 蛋白质的呈递是否发生在新的途径，而非进入内吞途径。

第三组抗原很可能包含与典型内吞蛋白质不同的呈递途径。Jacobson 等人首先报道一个胞质蛋白，麻疹病毒基质蛋白，被 MHC Ⅱ类分子呈递[361]。很多实验室后续的工作报道被严格认定的胞质蛋白质被Ⅱ类分子呈递。细胞混合试验排除了蛋白质大量释放到介质后摄取进内吞途径的解释。这些数据如何与上面描述的Ⅱ类分子生物合成和处理途径相一致？现在没有证据提供这些条件下Ⅱ类分子与肽结合的实际位置。氯喹能在一些例子中抑制呈递[362,363]，提示可能一些抗原或来源于抗原的肽到达内吞系统与Ⅱ类分子结合。在这种情况中，与Ⅱ类分子的所有其他配体一样，故问题不是肽在什么地方装载，而是，在什么地方产生多肽和抗原或肽通过什么途径到达内吞系统。这强调 MHC 分子以类别为基础的特定功能主要与它们装载肽所偏好的地点相关，这些试验仅仅间接不完全地显示这些肽的蛋白质来源（外源/内源）可能不同。Hsc70 分子参与转运胞质蛋白质或肽进入溶酶体[286]，为转运这些胞质抗原进常规的Ⅱ类分子结合环境提供了一条可能路线。另外的可能性是自噬作用，它以囊泡形成的方式运输胞质组分进入降解系统。一条更隐秘的线路是通过标准的Ⅰ类途径产生肽，然后进入 ER，经 TAP 途径成为Ⅰ类分子配体。如此肽在 ER 与Ⅰ类分子结合；当Ⅰ类分子进入内吞途径降解，释放的肽被Ⅱ类分子捕获。这能为胞质小基因产物依赖 TAP 的Ⅱ类分子呈递提供解释，与Ⅰ类分子相关肽相反，这种呈递是氯喹可抑制的。但是，在这个基础上解释一些试验是困难的，可能至少一些肽能在分泌途径结合于Ⅱ类分子，呈递给 T 细胞，尽管所有提供的证据均反对这是一个特别普遍或有效的途径[364,365]。

318

虽然Ⅱ类分子内源抗原呈递的机制并未在所有情况中完全理解，这个现象在呈递自身抗原和针对特定病原

体的免疫反应中是十分重要的。理解抗原或肽在这些条件下的呈递途径可能对疫苗设计策略是有用的。

常规 MHC Ⅰ类分子和Ⅱ类分子抗原呈递途径总结

尽管抗原处理和呈递途径还有一些特性需要认识和详细描述，但在 MHC 分子合成、运输、肽获得中的生化和细胞生物学事件的基本框架图已经显现[9,366,367]（图 9.14 和图 9.15）。从 MHC 分子结构和胞内行为的大量研究中获得的一个主要概念是：蛋白质折叠和特定空间区域的分子伴侣在不同类别的 MHC 分子功能中是十分重要的。错误折叠或不完全聚合的蛋白质通常与应急蛋白或分子伴侣结合，滞留在 ER。这些分子伴侣被认为阻止这些分子不可逆的聚集，并且提供尝试到达合适的折叠和聚合状态的机会[368]。最终没能合适折叠的分子则被消除。蛋白质的某些删除突变使蛋白质的一级序列缺乏到达合适空间构象的信息。如果我们想像由 MHC 基因编码的多肽链在功能上与蛋白质这些删除突变相类似，MHC 分子的胞内处理则容易理解。

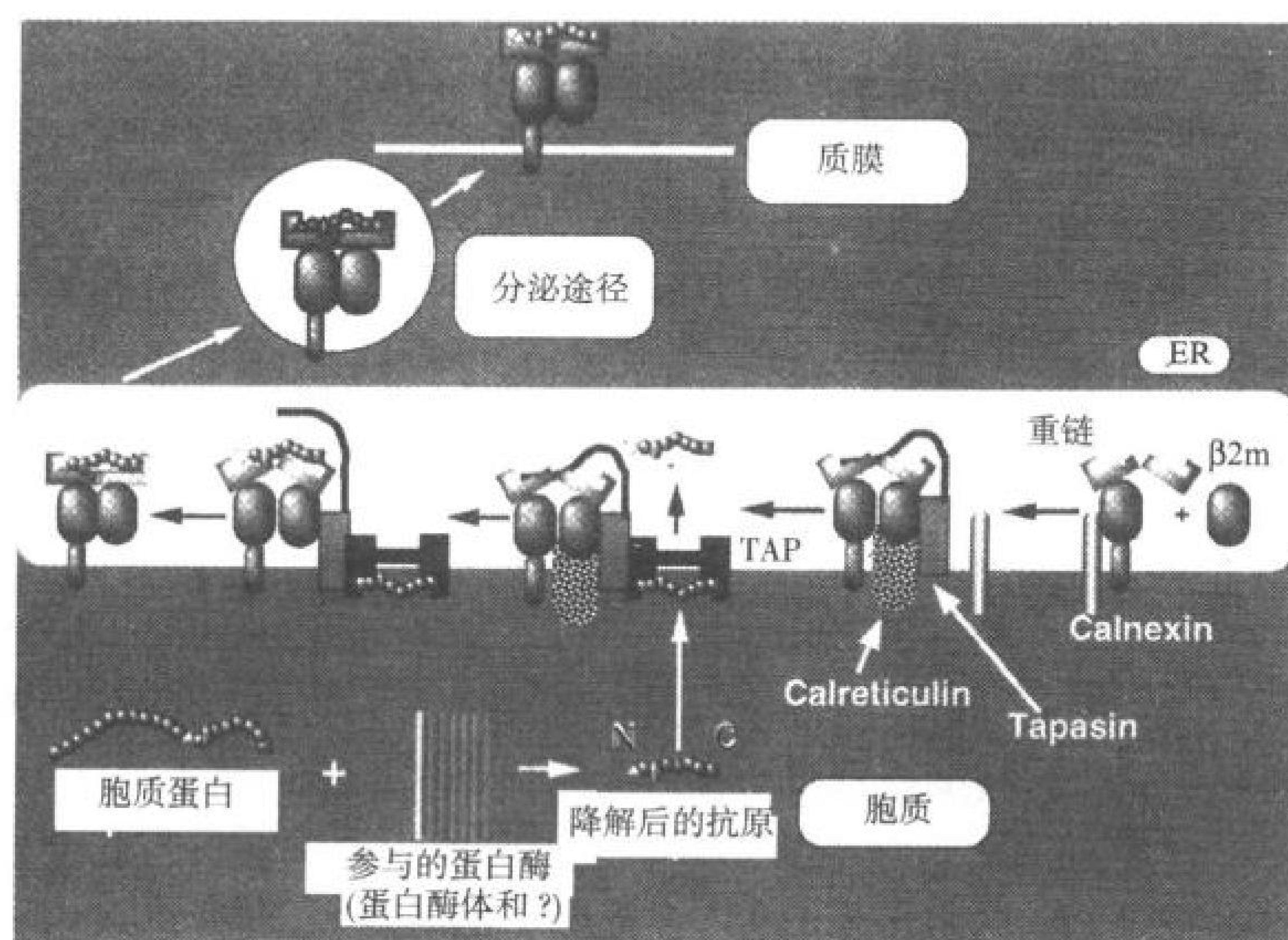


图 9.14 Ⅰ类分子抗原处理和呈递途径概貌。此图显示胞质蛋白的抗原处理（主要由蛋白酶体参与）和肽配体通过 TAP 进入 ER。在 ER，结合钙联接蛋白的Ⅰ类分子重链与 β_2m 相互作用，从钙联接蛋白解离后与钙网蛋白/TAP 相关蛋白复合物结合。这些含有一类分子的复合物与 TAP 联合，由 TAP 将胞质多肽转运到 ER 内腔与Ⅰ类分子结合。TAP 相关蛋白可与Ⅰ类分子结合槽短暂结合，从而维持其结构并且提供一个机制，将肽稳定结合和从 TAP、ER 释放结合起来。然后这个复合物经过常规的分泌途径到达细胞表面，提供给 T 细胞识别。经过一定时间（依赖于肽和 β_2m 与重链的亲和力），这个复合物将解离而不能再被抗原特异性 T 细胞识别。

对于Ⅰ类分子（图 9.14），TAP 相关蛋白和钙网蛋白均结合于新形成的重链-β_2m 的复合物，而 TAP 和 TAP 相关蛋白相互作用，将仅部分稳定的Ⅰ类分子二聚体结构滞留在 ER，直到与肽结合后形成稳定合适的折叠并且阻止两个 ER 驻留蛋白的结合。除上面推测肽干扰 I 类分子结合槽与 TAP 相关蛋白一部分结合外，从这些分子伴侣结合中释放 I 类分子可能与一个稳定、构型正确的重链-β_2m 结构的形成有关。如果 I 类分子重链和 β_2m 的亲和力太高，则没有肽占有的复合物会经常出现，将导致输出未结合肽的 I 类分子和无效的内源肽呈递。如果重链和 β_2m 的亲和力太低，就要求肽在链间结合中起更大的作用，反过来将导致有效呈递肽的数目太小。可见重链-β_2m 的亲和力已经进化到当不存在肽时，只有少部分重链以正确的折叠与 β_2m 短暂地结合。而这将导致从 TAP 相关蛋白/钙网蛋白结合中解离和离开 ER。不过一些分子伴侣在整个高尔基体堆中移动，可能重新捕获这些在松散结合的重链-β_2m 复合物。由于重链和 β_2m 的适应选择仅存在于种内，物种间的重链-β_2m 联合是彼此分开进化的，所以有可能不同物种的重链和 β_2m 在无肽的状态具有较高的亲和力，从而允许显著运输未捕获肽的复合物。这可解释为什么在 TAP 缺陷细胞存在人 β_2m 时有大量小鼠的Ⅰ类分子重链输出[369]。

319

大多数Ⅰ类分子捕获肽后将退出 ER。那些形成弱稳定性三聚体的肽仅为总Ⅰ类分子表达的极少一部分，因为它们将在 TAP 与Ⅰ类分子解离前被更好的结合者所代替，或者分离成单分子不能完成到胞膜的旅程。然而，仍有一部分肽不稳定的复合物到达细胞表面，可达到刺激 T 细胞的水平，或在肽分离后，产生大量

空的Ⅰ类分子结合位点,允许外源肽敏感一个靶细胞。其余的分子与更佳的多肽结合。一旦被这些肽占据,Ⅰ类分子将十分稳定。因为运输取决于肽的这个效果,细胞表面表达的Ⅰ类分子是相对选择后的肽结合分子,减少空Ⅰ类分子出现频率,因为它们可能干扰对有意义的肽-Ⅰ类复合物的识别。在另一方面,外源肽能促进稳定的Ⅰ类分子-β_2m复合物在TAP缺陷细胞的表面上聚集,显示通过分泌途径,那些空或很快失去松散结合配体的二聚体能恒定地到达细胞表面[132,137,370],可见上面所描述的机制也并非十分严格。

这样,为避免被胞内的分子伴侣滞留状态和Ⅰ类分子的结构均说明它在ER获得肽分子,并且Ⅰ类分子与肽结合的生化特征清楚地显示Ⅰ类分子优化与TAP提供的胞质来源短配体结合,而非内质网折叠蛋白长肽链中,类似长度序列的多肽。由于ER肽与大多数Ⅰ类分子紧密的结合,并转运到细胞膜,故存在很少的结合位点在其他位置捕获肽。由于许多病原体潜在抗原,例如病毒,是胞质蛋白,由于病毒直接与细胞膜融合,很少蛋白直接沉积发生在内吞途径,由于在感染期间病毒生产的第一蛋白质典型是调节病毒的胞质或核蛋白,故需要一种涉及多个分隔空间的机制为来源这些蛋白质的多肽提供结合Ⅰ类分子的位点。这包括在胞质产生肽(主要由蛋白酶体参与)和一种穿过内质网膜的机制(TAP)。从这个意义上讲,Ⅰ类分子的结构即确定它在哪儿得到肽,并且,也确定紧密连锁基因的产物如何提供肽到合适的供应位点。

320

虽然在细节有重要的差别,同样的原则也适用于Ⅱ类分子(图9.15)。MHC Ⅱ类二聚体并不和重链-β_2m复合物一样具有热不稳定性。但是在功能上它们同样对结合位点的占据敏感,Ii的CLIP区域占据结合位点,以便优化二聚化和折叠,防止与不合适的蛋白质配体(非肽)牢固结合。而这种结合效应促进Ⅱ类分子离开ER。然后Ii-MHC Ⅱ类分子的多聚体需要一种机制,获得通过内吞的胞外蛋白质的多肽序列。因为几乎所有离开ER的Ⅱ类分子均与Ii相结合,故假设Ii分子是转运到内吞途径的信号是合理的。Ⅱ类分子Ii

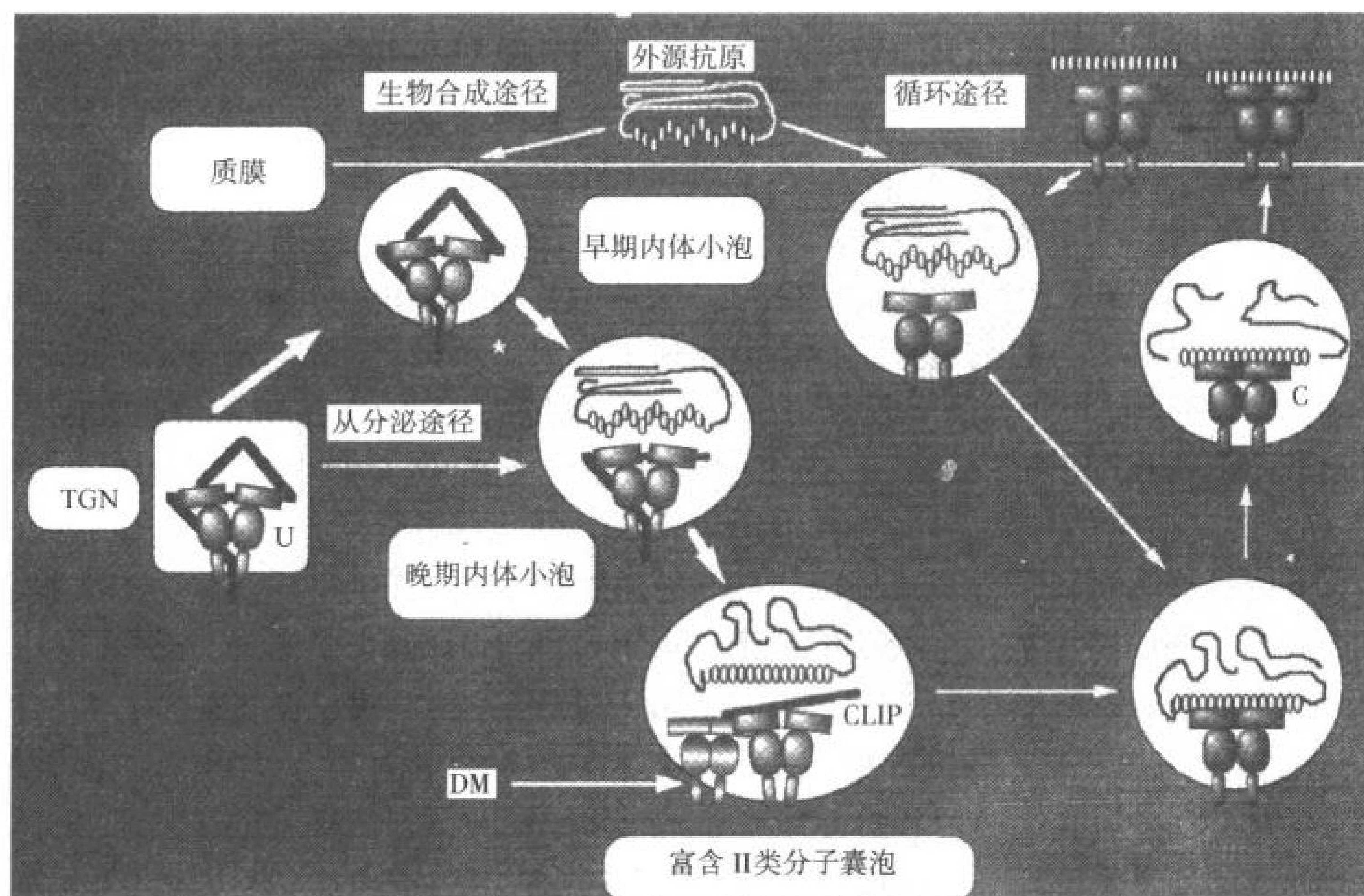


图9.15 Ⅱ类分子抗原处理和呈递途径概貌。此图显示Ⅱ类分子αβ二聚体在内质网与恒定链聚合。这个复合物缺乏肽紧密结合,而CLIP占据Ⅱ类分子结合位点,其能离开ER,从高尔基体迁移到反面高尔基网,随后或经短暂胞膜停留进入早期内体。在此一部分Ⅱ类分子失去Ii获得多肽,然后移动到表面与TCR相互作用。大部分Ⅱ类分子-Ii复合物移动到内吞途径的晚期部位——晚期内体和前溶酶体,在此Ii被蛋白酶降解。而还位于Ⅱ类分子结合槽的CLIP被包含更稳定结合肽序列的解折叠蛋白或蛋白片段所替换。随后蛋白酶截短结合的物质到15~20个残基,形成典型稳定的Ⅱ类分子-肽复合物。这些肽结合的Ⅱ类分子复合物离开这些囊泡,通过尚不清楚的途径迁移到胞膜被T细胞识别。成熟的分子失去肽配体后,能循环获得新的配体,这主要发生在早期内体。C,紧密,肽结合的SDS稳定的Ⅱ类分子形式;U,SDS不稳定的Ⅱ类分子形式。

复合物从反面高尔基网到内吞途径，可能经过在细胞表面的短暂表达。它们通常快速通过早期内泡，在这些囊泡其中的小部分失去 Ii 后与肽结合，而且它们可影响内体的成熟。然后复合物在晚期内体/前溶酶体积累，在这些酸性、蛋白酶活跃的囊泡大部分 Ii 被去除。在蛋白酶处理降解 Ii 分子后，CLIP 被留在Ⅱ类分子的结合位点，并且在 DM 的帮助下它与其他配体交换。这些配体可能是解折叠的，不完全降解的大蛋白质中的一段序列，而非短肽。这种结合的偏爱解释了Ⅱ类分子结合位点两端开放的需要和最终形成一组嵌套的具有不同的 N 端和 C 端多肽的原因。

关于 MHC 分子的这个看法强调 MHC 分子所有的生化行为根据类别变化，而不依赖于等位基因多型性，尽管等位基因的差别影响这个更大范围内的每个蛋白质的特定性质。如此行为强烈支持这样的假说：Ⅰ类和Ⅱ类分子家族为不同的目的进化，即它们被优化在不同的胞内环境中捕获多肽配体[33,68]。

研究抗原处理和呈递的新技术

最近使用了一些新的方法，促进在体和离体分析 MHC Ⅰ类分子和Ⅱ类分子的抗原处理和呈递取得快速的进展。上面已经提到使用组合肽库和噬菌体显示肽库帮助获得足够的信息设计有用的算法，预测源蛋白质中特别顺序与特定 MHC 分子的结合强度。同样，微量化学最先进技术的应用，特别是纯化 MHC 的洗脱肽经毛细管电泳与质谱连用，并且同时分析其 T 细胞活化能力，为鉴定病原体或肿瘤激活效应 T 细胞的特定肽提供了一个新奇的方法。另外在抗原鉴定方面也获得一些进展，如发展 DNA 表达方法克隆那些被 MHC Ⅰ类和Ⅱ类分子呈递，能被针对传染原或肿瘤特异性效应 T 细胞识别的抗原[109,371~373]。

在过去不易产生均一结合后 I 类和 Ⅱ类分子，这成为研究单一肽和 MHC 复合物的主要限制。对于 MHC Ⅰ类分子，建立在特定肽存在下重新折叠重组的Ⅰ类分子重链和 β_2m 的方法可有效解决这个问题。这条方法可高效产生合适折叠的Ⅰ类分子-β_2m-肽复合物，只存在很少的其他肽占据的Ⅰ类分子污染[63,147,374]。在活细胞，使用 TAP 缺陷细胞，合成肽和外源 β_2m 长时间孵育可获得类似结果。对于 MHC Ⅱ类分子，可构建重组的 MHC Ⅱ类分子 β 链，使其在信号肽和野生型序列间包含编码抗原肽和一个柔性的接头，此重组分子可与野生型 β 链聚合，形成与其 N 端抗原肽结合的二聚体[375]。在活细胞中，必须确保恒定链的产生，因为 CLIP 的插入阻碍 ER 中蛋白质与Ⅱ类分子二聚体高频率的形成。然而，当 Ii 的竞争不在时，在体或离体情况下，均能产生真正结合单个肽的Ⅱ类分子复合物，并呈递到细胞表面[376]。在哺乳动物或昆虫细胞产生重组的可溶性Ⅱ类分子，重新折叠和与肽结合后也能产生几乎纯的Ⅱ类分子-肽复合物，尽管一般较共价方法的产量低[163,165,166]。

其他领域的进展是在大群不同 TCR 的细胞中，鉴定识别特定肽-MHC 分子复合物的 T 细胞。在过去，使用可溶抗原探测紧密结合的特定表面受体，可鉴定抗原特异性 B 细胞，但这种方法不可能用于分析抗原特异性的 T 细胞。如上所述，发展大量方法产生均一的 MHC Ⅰ类或Ⅱ类-肽复合物，从而为设计 TCR 依赖染色的策略提供了一种方法。由于拥有纯的配体，主要的限制因素就变成大多数 TCR 与他们配体很低亲和力，一般在微摩尔区域[377~381]。如此低的亲和力导致在洗涤步骤中结合配体快速的解离，使分析特定 T 细胞不太可能。这个问题被通过生产均一肽-MHC 分子复合物的寡聚体形式所解决。这些寡聚体与细胞的多个 TCR 结合，使原先低亲和力/快解离的结合转变为稳定，高亲和力/慢解离的相互作用。通过生物素化的配体与链球菌卵白蛋白的结合，形成肽-MHC Ⅰ类分子四聚体，从而可能直接分析 HIV 感染个体外周血中 HIV 反应性的 CTL[382]。

321

最后一个进展领域是研究特定肽-MHC 复合物在胞内的区域和这些细胞在组织中的位置。同样在过去，只能示踪源蛋白质的定位，而不是处理后的肽，或者通过 T 细胞间接地评价抗原的处理和呈递。这阻碍在组织中示踪呈现单一特定配体的细胞，而正是在体理解抗原呈递中细胞相互作用的必要步骤。它也阻碍分析在体或离体给予抗原后，获取抗原细胞的表型和处理呈递细胞的数量。最后，这个限制使一些研究十分困难，如观察胞内 MHC Ⅰ类或Ⅱ类分子复合物形成的部位，示踪形成后复合物在细胞内的运动，或者在调节

TAP 和蛋白酶体时测量肽-MHC 分子复合物的数量变化。

现在有两种方法解决大多数上述问题。一个是将特定 TCR 的可溶形式寡聚化，通常采用以免疫球蛋白为框架的嵌合蛋白或则采用生物素-卵白蛋白复合物。这些寡聚体与肽-MHC 复合物寡聚体类似，将 TCR 与肽-MHC 复合物的结合从低亲和力转换成高亲和力的相互作用，以便于染色的操作，例如免疫组化或流式细胞计数[383]。另外的策略是采用肽 MHC 分子复合物诱导单克隆抗体，小心筛选去除针对内源肽-MHC 分子的背景，已经获得能有效完成上述操作的具有足够亲和力的单克隆抗体[235,384~388]。前面所述的寡聚化 TCR 的方法迄今为止仅被有限地使用，尽管这种方法理论上可预测最终能提供所需的试剂，而即使使用合适的免疫原也不能保证所需要单克隆抗体的产生。但是，大量关于在体抗原呈递（图 9.16）或离体抗原处理定量或定性方面（图 9.17）的信息，是通过使用新的单克隆抗体获得[235,386~388]。至今这两个方法的主要限制 TCR 寡聚体或单克隆抗体均趋向与一些自身肽-MHC 分子复合物结合，故需建立一个对敏感和特异性较低限制的背景使用这些试剂。

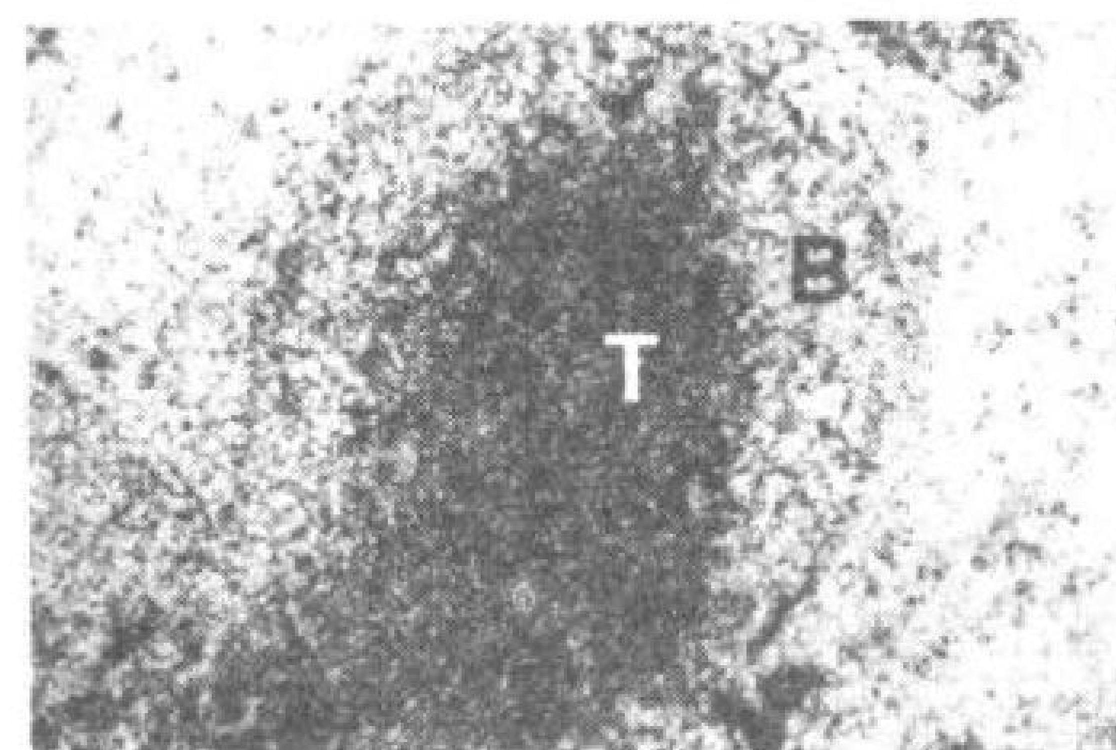


图 9.16　在抗原免疫小鼠的脾脏免疫组化检测特异性的肽-MHC Ⅱ类分子复合物。处死动物前几个小时注射可溶性鸡蛋溶菌酶（HEL）。取出脾脏，冰冻，切片，然后采用针对结合于小鼠Ⅱ类分子 $A\alpha^k A\beta^k$ 的 HEL 免疫显性决定簇 46-61 的特异性单克隆抗体染色（B，B 细胞区），TCR 复合物也被复染（T，细胞区）。这个图像显示几乎在所有 B 细胞存在特异性处理的抗原-MHC Ⅱ类分子复合物，而与膜表面的免疫球蛋白特异性无关[386]。

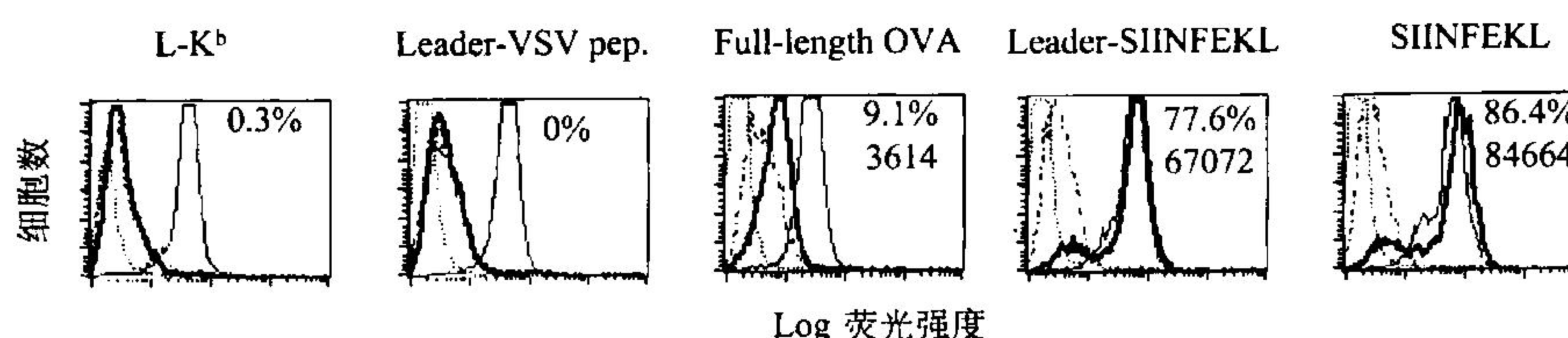


图 9.17　通过流式细胞技术法使用肽-MHC Ⅰ类分子复合物特异性单克隆抗体定量膜表面密度。不同方式重组表达 SIINFEKL 表位的各种痘苗病毒感染表达小鼠 Ⅰ类分子 K^b 的 L 细胞。几个小时后，细胞被针对 SIINFEKL-K^b 复合物的荧光抗体直接染色后经流式细胞分析。标记抗体的荧光标准和测定蛋白荧光量的比值可计算每个细胞肽-Ⅰ类分子的特异数目和总 K^b 分子被肽占有的百分比（在每个框图中显示）。在感染后，细胞被 1μg（过量）如下抗体染色：粗线，FITC 标记的 25-D1.16；点-短横线，25-D1.16 的 FITC 对照；细线，FITC-抗总的 K^b；点线，K^b 的 FITC 对照。当没有全部线可见时，显示对照和试验染色重叠。膜表达的 SIINFEKL- K^b 复合物从病毒产生完整卵白蛋白的几千个，到病毒产生只包含 SIINFEKL 决定簇序列的蛋白时的 80 000 多个[235]。

肽-MHC 分子被 T 细胞识别后的生物学后果

T 细胞克隆识别前要求肽与 MHC Ⅰ类或Ⅱ类分子结合，这导致对 T 细胞抗原反应添加许多限制。它也影响着病原体的进化和它们蛋白质的结构。而且，Ⅰ类和Ⅱ分子在获取肽方面采用不同的规则，影响病原体寻求躲避免疫消除的策略，以及疫苗研究者寻求激活适当的 T 细胞调节和效应反应的方法。最后，应指出在胸腺 MHC 分子参与功能 T 细胞池的选择。下面各节讨论肽呈递后的一些主要生物学后果。 322

在免疫识别和应答中蛋白结构导致生物学效应变化

被 T 细胞有效识别，肽顺序必须拥有至少三个性质。首先，它必须提供Ⅰ类分子足够的短肽或者给Ⅱ类分子足够的蛋白质暴露区域或肽。第二，必须有能力有效结合（以合适的亲和力）到 MHC Ⅰ类或Ⅱ类等位基因分子，无论是它在呈递细胞中产生或以外源方式提供。第三，一旦结合在一个 MHC 分子，它必须呈递给一

个能识别其为非己物质的成熟 T 细胞，也就是说，能与一些 T 细胞的 TCR 其结合，而这些 T 细胞没有因为以前暴露于自身抗原后被删除或导致耐受。

目前，无论 I 类还是 II 类途径，现在尚不清楚从源蛋白质产生一个特定肽的规律。当前关于蛋白酶体的知识显示这个多催化蛋白酶复合物能在蛋白质内的许多残基裂解，并且由于中性、酸性和碱性蛋白酶的存在产生非常广谱的多肽分子。一些最近的数据显示当 LMP-2、LMP-7 和 MECL-1 替换 LMP-9、-17 和-19 亚单位时，蛋白酶体具有偏好的裂解位点。20S 蛋白酶体在功能的特异性不同于 26S 形式，这样影响肽从源蛋白质产生。在至少在一些例子中，活化某些 T 细胞的肽决定簇是只由包含 LMP-2/7 的或 P28 相关的蛋白酶体所产生。一些试验结果建议改变已知抗原肽的侧翼序列能显著影响它被处理和呈递的能力[389]，这暗示肽序列周围的环境可以决定肽是否被呈递[269]。另外的结果显示一些蛋白质中的某些序列在理论上是能被 I 类分子有效呈递的决定簇，但由于未被蛋白酶体有效地裂解而不能有效地呈递[390]。

在 II 类途径也存在类似的限制；内肽酶的识别位点能被切割成不同的合适氨基酸序列，产生 II 类分子决定簇，并且外肽酶消化率可以留下不同的合适氨基酸序列，可能太长或太短影响有效结合。这些效果在不同细胞可能不同；例如，在鸡蛋溶菌酶或胰岛素的一些决定簇不能在 IFN-γ 激活的巨噬细胞有效呈递，但能被 B 细胞很好地呈递[309,310]。这个与巨噬细胞相关的问题可能是多方面的原因造成，内质网太有效的蛋白酶环境和从早期到晚期内体/溶酶体运输太快速，一起导致蛋白质抗原位点裂解速度超过 II 类分子结合、保护这些地点的速度。这些考虑提示病原体的蛋白质可能含有有效抗原肽的某些功能性氨基酸序列，但是把它们放在一个限制其呈递的上下序列中，通过如下方式放置，或是阻碍 MHC 分子所需序列的必要裂解或者是助益于这一位点的裂解。

一旦肽形成，抗原肽必须结合在 MHC 分子并且然后被 TCR 识别。抗原肽的单个残基可广义地分成两个功能类[21]。一类残基决定当其与 MHC 分子结合后，宿主未活化或免疫 T 细胞是否能识别包含它们的肽。如果一个来源病原体蛋白的肽-MHC 复合物模仿自身肽-MHC 分子复合物，由于 T 细胞的自身耐受这些复合物一般不能刺激 T 细胞应答。一种情况是蛋白质的某些肽最初没有如此自身模仿的性质，在编码源蛋白质的基因突变可能影响一个或多个这些决定特异性残基。如果在这些位置的新氨基酸影响与以前抗原活化 T 细胞 TCR 的化学相容性，则尽管肽-MHC 分子复合物能以适当的量呈递，这个决定簇对这些免疫细胞活化将停止[391]。然而，如果这些变化没有导致模仿自身肽-MHC 复合物，在肽的这些表位残基的变化一般将导致发展新一轮初始型 T 细胞应答反应。这样，导致表位替代的突变给病原体带来一个暂时的优势，使免疫系统必须玩这个"追踪游戏"。虽然如此，继续的效应应答仍然发生，未产生自身模仿，并且假定细胞免疫系统的功能完整。在感染 HIV 的个人，一些证据显示当 CD4 细胞的活动下降，失去对新一轮初始 $CD8^+$ T 细胞应答的适当帮助，从而不能再赶上变化的病毒群落[392]。通过序列改变可导致产生肽-MHC 复合物，能充当 TCR 源配体的拮抗剂，干扰已经存在的免疫后 T 细胞，允许突变的病原体亚群阻碍对组织的免疫活性细胞攻击[393,394]。在这些事件中，表位残基，要么在结合槽的螺旋之间暴露，并且可与 TCR 直接相互作用，或者残基埋在结合槽中，但改变时可影响结合肽的构型。改变这些暴露的残基或 MHC 本身的形状将改变 TCR 的结合和识别。

323

第二类残基包括控制肽和 MHC 分子相互作用亲和力的那些位置。如果在病原体蛋白质的这类氨基酸突变，这种变化能显著阻碍与 MHC 等位基因产品的结合呈递。在这种情形，以前活化的效应细胞将失去它们反应的能力。与第一例子相比，前者一般能活化新形成的突变肽-MHC 复合物的特异性 T 细胞，而上述的情况下，将没有新继发的 T 细胞回答。

这分析使我们清楚，失去 MHC 结合的突变与导致失去活化 T 细胞识别的突变相比，对于宿主而言更具破坏性。如果 MHC 分子的结合区域是统一的，这样通过突变使一个蛋白质失去 MHC 有效呈递的序列则相对容易，因为仅存在一种适合的基序，删除它将导致蛋白质对于免疫系统不可见。MHC 分子等位基因的多样化，存在共显性表达，每类 MHC 分子拥有多个遗传位点，以及大多数个人的杂合状态，对上述简单的逃避提供了一种保护机制[395]。MHC 分子结合口袋具有不同化学特征，故可能当突变一种 MHC 相互作用的合适

残基时导致它能与另外的 MHC 产物结合，即使另外的 MHC 分子不存在同一宿主，也存在于易感人群。因此多样性是对简单突变逃避多肽呈递的一种保护机制。

同样由于多样性使基于单个肽设计普遍有效的疫苗十分困难。如此的肽将不大可能与Ⅰ类或Ⅱ类分子不同等位基因产物均很好结合，故不可能在所有接种疫苗的个体呈递、诱发免疫。尽管我们关于肽-MHC 分子相互作用分子规则获得更多的理解，允许设计合成肽保留靶抗原的表位性质，同时也能与更多种类的 MHC 等位基因很好结合[130,396]。因为与未活化的 T 细胞相比，活化过的 T 细胞一般只需少量的 TCR 配体就可再次激活[397]，即使这些配体由等位基因产物和在感染期间或来源肿瘤抗原的野生型低亲和力肽组成，这个策略能帮助在人群中为更多的部分提供有效免疫。但总的来说，抗原呈递系统的这个特征意味着基于肽的疫苗需要包含大量的多肽，以便与人群中主要普遍存在的等位基因结合，或者分别为不同个体或拥有特定 MHC 分子的亚群设计疫苗。

在病原体蛋白中，鉴定与不同的 MHC 等位基因很好结合的不同肽现在主要由两个方法完成。首先，计算机搜索算法能被用来在蛋白质序列和研究 MHC 结合基序之间进行匹配扫描。合成鉴定的候选序列，离体测试其与 MHC 分子的结合和对合适 MHC 免疫个体 T 细胞的刺激效应。当有机体蛋白被完全了解时，这是一个有效的策略，比如许多病毒，但是对于原生动物或更为复杂的寄生虫则较为低效但是还是可行[398]，因为现在仅有少量的蛋白质序列提供。第二个方法是从暴露在研究有机体抽提物的细胞或感染细胞的 MHC 分子直接洗脱肽。如果存在 T 细胞能确定各种层析方法分离物中感兴趣的部分，则这个相关部分能被分析并且测序。候选肽然后被合成，并且测试刺激 T 细胞的能力，进一步证明可靠性。

MHC Ⅰ类和Ⅱ类分子与肽结合的不同位置导致不同的免疫防御和疫苗策略

尽管两类呈递方式均存在例外，大量获得的数据显示Ⅰ类分子主要结合进入或生产在 ER 的肽，而Ⅱ类分子优先与进入或产生于内体/溶酶体途径酸性囊泡的那些肽结合。因为 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞分别识别Ⅰ类和Ⅱ类分子结合肽[399,400]，故肽结合位置的差别意味着进入不同产生肽区域的蛋白质将刺激不同的 T 细胞亚群和效应状态。

生活在细胞质的病原体蛋白质将主要产生进入 ER 的多肽，从而被Ⅰ类分子呈递[401,402]。这能导致刺激 $CD8^+$ T 细胞，其效应机制包括细胞毒作用（靶细胞死亡），并且分泌细胞因子，如 TNF-β 和 IFN-γ。这是对这些胞内寄生虫合适的效应反应，但是它不包括帮助产生抗体；这些抗体在病原体生命周期的胞外相期间攻击病原体是有用的。相反，一个寄生虫驻留在修饰后的内体，如果这些病理囊泡与内吞途径中含Ⅱ类分子的部分相联系，其产生的多肽将与Ⅱ类分子结合。如果在这个环境，外源蛋白不进入从内体到胞质的Ⅰ类分子呈递途径或不存在内吞途径产生的肽"反刍"与成熟的Ⅰ类分子结合，这病原体蛋白质产生的肽将不能被Ⅰ类分子呈递。这将限制效应反应仅有 $CD4^+$ T 细胞。尽管存在抗原特异性 $CD4^+$ 细胞毒细胞[358,403]，但尚不清楚它们在体内潜在的功能是什么。细胞因子具有活化攻击病原体的宿主细胞的机制（例如 NO 的产生），但是一些有机体实际上适应宿主的这种类型反应，并且使用细胞因子调节它们自己的生物学过程。胞外的碎片能被表达Ⅱ类分子细胞内吞摄取，然后处理并且活化 $CD4^+$ 效应/调节细胞，帮助 B 细胞产生抗体。这个机制对于外毒素十分有效，因为抗体是与这些毒素的生物学效果对抗的惟一方法。

在设计疫苗中，理解抗原传送模式在处理和呈递的影响是十分重要，并且对其所需诱导的效应机制要有一个清楚的思路。一个重要且经常迷惑的问题是针对蛋白质抗原构型决定簇的 T 细胞依赖抗体的生产。如果中和抗体是最有效的防卫，那么抗原需有效地进入专职 APC 的内吞途径，以激活 $CD4^+$ T 细胞，并且需要最终产生抗体的抗原特异性 B 细胞摄取。正如上面所强调，$CD4^+$ T 细胞和抗原特异性 B 细胞都有对各自配体构型敏感的受体，但是与来源于完整蛋白质的 MHC 分子结合肽通常不会重新折叠成原抗原相应氨基酸的构型。而且，参与形成 TCR 配体的残基和 B 细胞受体识别的位点可能位于蛋白质的不同部位，TCR 配体可能来源于埋藏于折叠的核心，而 B 细胞受体识别区通常在蛋白表面。

324

尽管存在这些差别，上面描述的处理和呈递途径提供了一个直接、精妙的方法，允许两种对同一抗原具

有不同识别特异性的细胞能有效地彼此合作。处于天然折叠状态的蛋白与小部分 B 细胞的表面免疫球蛋白受体结合。与同样环境的其他抗原非特异性 B 细胞相比,这种结合为这些 B 细胞摄取抗原提供一个显著的优优势。这些少量 B 细胞通过程序化的遗传变化产生针对受体结合抗原决定簇的特异性抗体,同时内吞处理获得的抗原,生产、呈递 MHC Ⅱ类分子-肽复合物。CD4⁺ T 细胞,很可能已经被树突细胞一样处理的膜上抗原形式激活,将移进脾或淋巴节的 B 细胞区域,并且扫描它们接触的 B 细胞表面。当这些 T 细胞发现处理同样抗原的 B 细胞时,TCR 识别处理抗原将导致 CD4⁺ T 细胞上调表达膜型和可溶性细胞因子,从而促进 B 细胞增增值和分化。B 细胞将转变成高效率分泌抗体的细胞,并且它们产生抗体的特异性正是捕获抗原时所涉及的抗原决定簇。这种联系天然和处理抗原的 B-T 合作同样用于通过体细胞突变发展更高亲和力的抗体,因为这些含有遗传修饰免疫球蛋白的 B 细胞必须保留对靶抗原的特异性,以便捕获、处理和呈递抗原给 CD4⁺ T 细胞,这个信号是 B 细胞存活和分化所需要的(见第 7 章和第 25 章)。

预先存在的抗体能促进巨噬细胞和不成熟的树突细胞对抗原的摄取,这是因为这些细胞含有胞质尾部含有促进内吞结构的 Fcγ 受体[357]。B 细胞 Fcγ 受体缺乏这个特征,这可能是为了阻碍非特异性的抗原吞噬。有时 B 细胞表面的免疫球蛋白能与蛋白某个区域结合,但不产生中和或调理作用的抗体,这将和那些能产生有用抗体的 B 细胞竞争。一些有机体已经进化产生特殊的表面特征,促进发展无效 B 细胞应答,以便避免对宿主更有用的 B 细胞有效摄取抗原。被动获得的抗体或母源的抗体也能与细胞固定免疫球蛋白竞争,阻碍潜在的效应 B 细胞获得足够的抗原,呈递给 CD4⁺ Th 细胞。这样,设计激活特定中和抗体的疫苗必须包含组分靶向合适的呈递细胞,并且避免激活不需要的、竞争的 B 细胞应答。

如果炎症性的 Th1 类型应答是宿主防御的关键,例如对某些胞内寄生虫,那么必需抗原靶向Ⅱ类表达细胞,促进这个方向的分化。由于我们现在认为白介素 12(IL-12)促进 CD4⁺ T 细胞的 Th1 型反应中扮演关键的角色[404~406],故需要一种确保靶向的 APC 分泌这种细胞因子的方法。活化 APC 以便产生 IL-12 和其他有效指导 T 细胞激活的共信号是佐剂的功能。这些物质,特别那些可引起髓源细胞特别是树突细胞反应的微生物产物[407],能激活合成和表达 IL-12,B7 家族的共刺激分子 CD28 和 T 细胞在转化 TCR 信号成效应分化时所需的其他分子。

如果 CD8⁺ 效应细胞是重要的,那么给予抗原必须从细胞外进入Ⅰ类分子呈递途径。虽然交叉激活的机制仍不清楚,这条途径允许外源完整蛋白抗原不通过特殊方法进入胞质的情况下,激活 CD8⁺ T 细胞应答。提供的证据显示这个过程在 DNA 表达抗原的呈递中[297]或完整细胞肿瘤疫苗活化 CD8⁺ CTL 反应中[408]起到一个主要的作用。同时,另外的数据显示使用抗原传送系统,增强进入呈递细胞的胞质,可十分有效地为 CD8⁺ T 细胞的 TCR 提供配体。已经报道各种各样进入胞质的传送方法。这包括活的病毒载体,例如牛痘或腺病毒[409],融合的脂质体[410,411]和包含温和去污剂的结构[412]。肽(修饰的[413]或 没有修饰[414])在一些情况下成为 CD8⁺ T 细胞的有效免疫原。肽的缺点是它们可能广泛致敏宿主细胞,在已经活化的个体能导致不能接受的组织破坏。另外没有 CD4⁺ T 细胞的辅助,将限制肽刺激有效的 CD8⁺ 应答[415,416]。另外,血浆的蛋白酶和外蛋白酶能很快降解肽成无效的尺寸:故设计肽必须在这些蛋白酶的攻击下保持或产生优化的免疫原形式。

一个未解决的问题是 CD4⁺ T 细胞怎么帮助 CD8⁺ T 细胞应答的发生。上面清楚描述的 B 细胞和 T 细胞协调作用相对比,没有如此简单模型能解释两种 T 细胞间以抗原特异的方式相互作用,特别是两种 T 细胞针对单个蛋白质的不同处理多肽,甚至针对一个病原体的不同蛋白质。两种 T 细胞均不直接通过它们的表面受体接触完整抗原,故不支持 CD8⁺ T 细胞类似于 B 细胞,显示 CD4⁺ T 细胞识别的Ⅱ类分子配体的模型。基于在体细胞混合试验数据,提供的最好模型是假定单个专职 APC,很可能是树突细胞,同时显示 CD4⁺ T 细胞识别的 MHC Ⅱ类分子配体和 CD8⁺ T 识别的 MHC Ⅰ类分子配体[417]。在呈递细胞膜上两个邻近 T 细胞识别不同的配体,将允许 CD4⁺ T 细胞分泌细胞因子,例如 IL-2,扩增 CD8⁺ T 细胞的分化和增殖。这种模型主张优化 CD8⁺ T 效应细胞的发展要求:在同样细胞,即要传送源抗原进入内吞途径的Ⅱ类分子呈递,又要传送抗原到胞质进入常规Ⅰ类分子途径呈递或内体的Ⅰ类分子的旁路途径呈递。

325

病原体干扰抗原呈递

毫无疑问,免疫系统在对微生物病原体的防御中起着决定性作用,所以不奇怪发现许多病原体能产生调节宿主应答的许多分子[418]。在大多数情况中,它们将钝化宿主的防御机制,这通常通过调节细胞因子的产生(见第 21 章、第 25 章和第 26 章)。然而,在一些情况中相反提高宿主防御,保证宿主存活一个足够的时间,入侵有机体能有效复制,以便有可能传播新的宿主。在过去几年,已经十分清楚肽抗原呈递到 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞在抗感染斗争中扮演重要角色,也发现许多有机体有能力产生分子干扰 MHC 依赖的抗原呈递途径中的关键步骤[419]。

最吃惊的结果来自病毒和 MHC Ⅰ类分子。不同的病毒生产蛋白干扰:①TAP 的肽结合(单纯疱疹病毒 ICP47)[420~422]或由 TAP 的肽转运(人的巨细胞病毒 US6)[423,424];②固定插入内质网膜的重链(人的巨细胞病毒 US2 和 US11[425-427]和 HIVvpu[428];③释放 ER 中聚合的Ⅰ类分子肽复合物(腺病毒 E19)[429];④抑制 MHCⅠ类分子重链基因的转录(腺病毒,HIV)[429,430];⑤加速表面Ⅰ类分子的清除(HIV Nef)[431]。另外的数据提示一些病毒瞄准 MHC Ⅱ类分子途径;例如,Epstein-Barr 病毒生产结合 DRβ 链的分子[432]。

人体针对单纯疱疹的 T 细胞反应被发现有不平常的特征,其激活初始型 $CD4^+$ 细胞毒性细胞,而不刺激 $CD8^+$ CTL 应答。在感染单纯疱疹的细胞,发现 MHC Ⅰ类分子重链与 β_2m 的稳定聚合和从 ER 到细胞表面的转运存在缺陷。这种转运障碍类似于 TAP-1 或-2 突变导致细胞缺乏有效肽进入 ER。扫描研究介导聚合/表达缺陷的病毒蛋白,鉴定 ICP47 是导致这种Ⅰ类分子途径混乱的充要条件。更深入工作显示这蛋白质与 TAP 的胞质部分结合,干扰转运体稳定结合肽的能力。这样就阻碍转运肽到 ER,干扰抗原呈递。由于这个影响Ⅰ类分子聚合和转运是个普遍效应,故并不仅选择作用疱疹病毒来源的肽。ICP47 与人 TAP 反应良好,但不能与小鼠 TAP 反应,显示一个病毒病原体与相关宿主之间功能上的选择进化。

感染人巨细胞病毒(HCMV)的细胞也导致丧失 MHC Ⅰ类分子的膜表面表达。就像 ICP47,这个病毒产生的 US2 蛋白质也干扰 TAP 功能,尽管作用于转运的不同步骤。另外,和单纯疱疹病毒相比,感染 CMV 细胞的Ⅰ类分子并非不能发现合适的配体,以适当的聚合状态离开 ER。相反,采用代谢标记和免疫沉淀试验分析 HCMV 感染细胞的Ⅰ类分子命运,显示新合成的Ⅰ类分子重链很快消失。这效果是由 HCMV 的 US2 和 US11 蛋白质参与引起。最为有意义是发现在Ⅰ类分子核心糖基化插入脂质双分子层后,这些蛋白质从 ER 膜替换Ⅰ类分子重链。只要存在于胞质,Ⅰ类分子将去糖基,然后由蛋白酶体降解。这些令人激动的数据不仅揭示病原体试图躲避Ⅰ类分子呈递的的新机制(一个不能产生稳定的Ⅰ类分子将不能呈递与 MHC Ⅰ类分子结合的 CMV 来源肽),而且它也显著提示着 ER 蛋白质降解机制。这条途径曾被认为是降解 ER 中错误折叠蛋白质的细胞质量控制机制[433],现在考虑可能是 US11 所引起的一种蛋白质降解的变化模式,这种模式将蛋白质 ER 内腔移动到胞质,然后被蛋白酶降解。HIV vpu 也导致新合成的Ⅰ类分子重链降解,其发生的详细机制还不清楚[428]。

病毒躲避Ⅰ类分子呈递的第三种策略是妨碍聚合的Ⅰ类分子-肽-β_2m 复合物从 ER 到胞膜的运输,这样没有阻止配体的实际形成,但抑制 T 细胞识别。一些腺病毒含有被称为 E19 的蛋白质,它能在 ER 结合许多Ⅰ类分子。这个穿膜蛋白质的胞质尾部含有导致其在 ER 滞留的特定序列[434]。随后在其他滞留 ER 的蛋白尾部也发现 E19 胞质尾部的双碱性氨基酸基序,并且将此序列转移到其他分子也将导致其在这个细胞器的滞留。这样正如 US11 一样,这个关于病毒干扰Ⅰ类分子呈递途径的研究为基本的细胞生物过程提供了新见解。

其他类的干扰机制涉及Ⅰ类途径更近或更远的事件。一些病毒不是在Ⅰ类分子合成后封阻其配体的聚合或转运,而是攻击编码重链的基因本身,干扰转录,这样在最初的位置妨碍重链生产。这策略已知被腺病毒(E19)和 HIV(Tet)使用[435]。相反,HIV Nef 下调胞膜Ⅰ类分子的表达,限制 $CD8^+$ 细胞的识别[431]。

在过去几年,已经十分清楚免疫系统被组织起来,处理这些病原体尝试躲避依赖膜表达特定肽-MHC 分子复合物的识别。一般被分类属于天然免疫系统的 NK 细胞显示拥有两组表面受体。一组促进活化效应功

能，例如细胞毒或细胞因子分泌，这包括被特异抗体占据的 Fc 受体和其他尚不清楚特异性目标的受体。另一组包括两个亚类的细胞抑制由第一组受体介导的活化。这些杀伤抑制受体(killer inhibitory receptors, KIR)

326

是 C 类型凝集素家族或免疫球蛋白超家族成员[436]。这些受体中的每一个在干细胞存在多种不同形式，而且在每个 NK 细胞的膜上，每个家族的几个成员存在不同的组合[437,438]。这样，这些 KIR 的分布即非同源类聚也不是克隆分化。最为特殊的是，免疫球蛋白超家族 KIR 和 C 类型凝集素 KIR，尽管它们结构缺乏类似，但两者均可识别 MHC Ⅰ类分子[439~442]，并且均通过招募磷酸酶到活化受体聚集位点发挥抑制效应[443,444]，阻止活化受体诱导的磷酸酪氨酸依赖的信号扩增。

KIR 的特异性阻碍 NK 细胞被表达正常Ⅰ类分子的细胞活化。然而，如果一个细胞失去 MHC Ⅰ类分子表达，如通过一些肿瘤的遗传变化或由传染有机体的各种基因产品作用，KIR 信号将减少，允许 NK 激活受体活化，从而促进效应活性[445]。这样，由于 NK 细胞和 $CD8^+$ 表达 αβTCR 的 T 细胞功能相似，当病原体防卫蛋白介导减少 MHC Ⅰ类分子呈递的获得性免疫时，而同样由于 MHC Ⅰ类分子下调活化的 NK 细胞可产生 IFN-γ 和细胞毒效应来补偿。NK 细胞激活的这个模式，正如它在感染和转化细胞的宿主防御中的重要性一样，在临床实践中也有负面的作用。在尝试通过干扰 MHC 分子表达，使移植物对于获得性免疫系统不可见时，将同时导致增强 NK 细胞攻击移植物，从而降低在移植存活中操作 MHC 的有效性。

MHC 分子、肽和 T 细胞池的选择和维持

众多的现象，如细胞毒性 T 细胞介导的靶细胞溶破，抗原依赖的活化 T 细胞扩增，辅助 T 细胞和 B 细胞在抗体反应中的合作，均在 MHC Ⅰ类或Ⅱ类等位基因多型性的控制之下，从而构成了抗原呈递规律，这正是本章前几节的焦点。然而，我们仍然不能完全和合理接受地解释：限制性识别特定 MHC 等位基因背景下抗原的 T 细胞群落是如何形成的。这下面的章节描述了早期和最近解释这个现象的尝试，这些解释基于在缺乏特定外源蛋白来源肽的胸腺，T 细胞依赖等位基因的选择性成熟(见第 11 章)，并且新结果提示在外周淋巴组织，也存在类似的自身识别事件维持 T 细胞的生存能力。

T 细胞池等位基因偏差的证据

很早发现 F_1 代动物针对大蛋白抗原发展至少两群不同的反应 T 细胞，每群只识别父或母 MHC 类型背景下的抗原[446,447]。这个现象的基础已在上面详细描述，它包括：每个 MHC 等位基因选择来源处理蛋白的不同肽呈递，并且即使同一配体结合在不同 MHC 分子也构成具有不同功能的构型配体。这样，MHC 的限制性主要是成熟 T 细胞在外周选择性活化，这是基于 T 细胞表面克隆分布的受体(TCR)识别特定肽与 MHC 分子的复合物，毫无疑问复合物的形成和维持是与等位基因相关的。在免疫后 T 细胞的二次活化中，同样表现出等位基因相关的特异性，因为发生有效的重刺激必须呈递一样的肽-MHC 分子组合。

是否这种成熟后的效果能全部说明 MHC 等位基因相关的 T 细胞应答偏差？从另一个方向讲，是否在一个个体任何肽-MHC 结合均能有效活化 T 细胞反应？这个问题不能简单地通过细胞处理测试抗原，然后注射它们到一个动物来研究，因为外源的供体 MHC 分子带有供体自身蛋白来源的肽，是受体不能耐受的复合物，将诱导强烈的异体应答(见第 20 章)。这个异体应答将遮盖抗原特异性应答的检验。为防止这个问题，研究者使用各种删除技术清除 T 细胞池中参与异体应答的细胞，然后测试剩余细胞对外源肽-非己 MHC 分子的识别。这此试验的结果与预期不同，因为一些研究显示确实存在针对抗原-非己 MHC 组合的应答[448,449]。这些研究显示自身 MHC 限制是相对的，而非绝对。确定这种缺乏绝对限制的精确含义是很困难，因为其他的研究表明 T 细胞的识别存在模糊性；即一个单独的 T 淋巴细胞识别自身 MHC 加抗原 A，也能识别外源 MHC 加抗原 B[450,451]。这样，就算实际的外周 T 细胞池原则上偏向以一种等位基因特异的方式识别自身 MHC 分子加抗原，同时也可能由于 T 细胞识别的模糊性识别外源 MHC 加抗原。因此，存在非完全的自我限制并不强烈地反对在成熟的 T 细胞池中存在自身 MHC 肽复合物的偏差。

为进一步研究这个问题，若干实验室转向使用放射嵌合动物。这些动物经受致命放射线照射，从而阻碍

它们的自身骨髓扩增造血系统,然后给予外源的骨髓,允许血和淋巴系统再生。这个过程破坏接受者的胸腺生血单位,同时保存上皮组分的功能。这样,重构的动物拥有宿主原来的T细胞发育的胸腺基质,同时具有其他来自供体的胸腺和外周的造血系统来源组分。选择各种供体-受体组合,各种特定MHC等位基因和遗传基因座导致T细胞池成熟差别的效果被评估。在这些试验中最具有揭示性的是:将F_1代(A×B)的骨髓移植到父母A或父母B照射后的受体[452]。这些动物将有F_1的淋巴细胞和F_1 APC,但T细胞将在要么是A要么是B的胸腺基质中成熟。当重建后给予抗原时,抗原将通过F_1 APC表达的A和B两个等位基因的形式呈递。由于在动物存在F_1造血细胞,特别是在胸腺T细胞分化期间,动物对两种MHC单体型A和B耐受。提出的问题是在这些条件下 是否应答将类似于F_1(对抗原加A和抗原加B均有强应答),或者反应是否将偏向胸腺基质组分的MHC类型。很多如此研究被实施,尽管效果的程度有一些不同,这些试验清楚地支持在胸腺基质的MHC分子的等位基因形式强烈偏差成熟T细胞潜在反应能力的看法。在A胸腺发育的细胞针对抗原加MHC A比抗原加MHC B的反应要好一些,尽管APC来源F_1。在B胸腺发育的细胞则正好相反,对于抗原加MHC B的反应要好一些。这些研究强烈建议MHC等位基因在胸腺指导T细胞功能产出中的重要作用。因为F_1→父母嵌合动物对父母血源APC同样耐受(即,它们已经删除或灭活那些可能与自身MHC加这些细胞来源肽反应的T细胞),故偏好是存在于胸腺MHC类型的阳性效应结果,而非血源组分的阴性效应结果。如同第11章所讨论,成熟中的选择是阳性选择,使用其T细胞表达单个TCR的转基因小鼠,这个过程已被清楚地描述。在这些动物,转基因TCR的成熟T细胞的发育依赖于胸腺基质合适的等位基因形式的表达。

327

TCR识别MHC分子结构

等位基因依赖的T细胞选择如何明显地发生,自身肽的角色是什么,并且胸腺如何促进在创造自身耐受状态时未删除T细胞的成熟,如何使用同样的MHC分子同时进行阴性和阳性选择过程?最为重要的是考虑在这些事件中涉及基因和蛋白之间的关系。TCR基因和编码MHC分子的基因位于不同的染色体上(见第8章和第10章),并且两类基因在减数分裂期间独立地分配。这样,尽管TCR和MHC-肽复合物必须最终相互作用导致T细胞应答,这个等位基因特异相互作用的基础并不是通过相关遗传导致受体与其识别的特定等位基因预适应。

Claverie和Kourilsky[453]提出一个简单的假设,MHC分子的没有直接与TCR相互作用。在这些条件下,所有的等位基因特性被推定为MHC多态性的作用是在选择结合成熟细胞识别的肽集合,这些肽集合之间的差别导致所观察到的等位基因相关的识别限制。这个模型消除TCR结构为了与MHC分子相互作用进行预先选择的需要,无论这种选择是针对保守或多变的结构成分。尽管这个模型有吸引人的地方,突变学研究结果[454]和TCR与肽-MHC配体的晶体图谱数据显示这个模型是不正确的[66,67]。

TCR直接与MHC接触的事实对于理解T细胞的等位基因限制与TCR胚系结构间的关系有何意义?如果只有识别肽-MHC分子配体的TCR是有用的,那么不能参与形成具有这种潜力受体的胚系TCR单元将会在进化中丢失,因为没有选择压力维持它成为活跃基因。这说明为了有效与种系的MHC分子相适应,胚系池中存在一定偏好。即使在阳性选择前,为了与MHC分子有效相互作用,T细胞池所预言的本身内在的偏差最近被试验描述[455]。关于这种内在反应特性可想像两个模型。一个假说认为某些胚系的TCR单元与MHC分子等位基因优先相互作用是预先进化。另一个则认为如果胚系TCR单元促进与MHC分子直接相互作用,这些TCR单元主要是结合在保守、不变的位置。第一模型预言在成熟的胸腺细胞,胚系TCR单元的表达存在与等位基因相关的很强且易于发现的偏好。这种类型的一些偏好已经被报道,但是它们以任何方式都不是绝对的,在存在相关MHC时不是选择所有拥有某个单元的TCR,并且其MHC分子也能选择包含一样V片段TCR的细胞[456~459]。与第二模型相一致,每个胚系TCR单元均能有效地与各种不同类和等位基因的MHC分子相互作用,尽管不是等效。

TCR 的 CDR3 区域、肽识别和等位基因多型性

如果正如试验观察,胚系单元在等位基因特异识别肽-MHC 分子复合物中并非单独起到主要作用,这暗示交联区必须参与其中,这已经获得功能试验和在 TCR-配体晶体数据的广泛支持[66,67,460]。抗原活化成熟细胞时,可清楚观察到 CDR3 的功能,它与结合肽表位部分相互作用,而不是 MHC 分子。这样,这些数据没有反映未活化细胞池对肽-MHC 分子识别偏好的关键问题。为什么即使在结合外源肽选择 T 细胞活化前,在胚系和非胚系部分均存在等位基因偏好?这些倾斜或者是一个进化的优势,或者它是抗原呈递到 T 细胞不可避免的结果,并且在细胞池强加如此的限制不足以破坏对其的选择。

进化的优势是什么?设想一个有效识别与特定 MHC 分子结合肽的 TCR,是有可能识别一个结合同样 MHC 分子的不相关肽,还是更可能识别结合不同 MHC 的相关肽。在外周 T 细胞池大量放入那些已知偏向识别肽-自身 MHC 的 TCR 表达细胞,将显著提高个体识别由自身 MHC 等位基因形式呈递外源肽的 T 细胞密度/频数。如果这种偏好没被引入,在外周淋巴组织的许多 T 细胞可能是无用的,这将减少感染时 T 细胞应答的速度和强度。

328

很少有直接证据证实存在等位基因相关的简并性。然而,每个 MHC 分子趋向结合一定特征的肽,其溶液暴露(表位)残基形成与结合槽相关的空间结构,这种结构依赖于 MHC 分子最为重要的结合口袋和肽锚定残基的位置。在表位残基结构的偏好,使我们很容易设想 TCR 使用某些胚系单元优化与 MHC 结合保守区域的相互作用,这要求交联区具有合适的长度和化学特性,以便 CDR3 处于正确的相对位置,与随等位基因改变的表位残基恰当的相互作用[461]。这样,基于适合与自身 MHC 分子-自身肽表位相互作用的选择,将能显著地增强与外源肽-自身 MHC 分子高亲和力结合的可能性,因于自身肽和外源肽结合在同一 MHC 分子后,其表位残基的空间位置类似。

自身肽的影响既可能增加也可能减少 MHC 分子有效受体的亲和力。可假定如果 TCR 的胚系单元可形成与 MHC 有相当高亲和力的有效受体,导致其结合独立于结合肽的表位结构。这样的亲和力太高可能使其不能在外周存在,因为它将导致强烈的自反应性。CDR3 区域是具有同样胚系单元受体的差异处,其是不同结合肽的分辨区域,只有 CDR3 与 MHC 分子亲和力低于适当量的 T 细胞将被选择[462,463]。如果亲和力下降太少将导致阴性选择;如果残基亲和力太低将导致无效的 TCR 信号和无选择。当然,当一个肽结合 MHC 时将得到合适的亲和力,但是,同样 MHC 结合其他肽将获得不同亲和力,可能更高或更低。作为一个有用选择方法,所有如此的自身肽-MHC 结合需要被扫描。如果同一生理类型不同 APC 上呈现的所有肽无显著差异的条件达到,发育的胸腺与这种类型 APC 中的一个相互作用将和此类型其他 APC 相互作用是相同。这个模型暗示在 T 细胞的阳性选择中,TCR 通过 CDR3 区域特异结合或识别自身肽-自身 MHC 分子复合物是不重要的,虽然在选择中,通过调节 TCR 胚系单元针对特定 MHC 等位基因分子的亲和力,受体的这个区域被有效选择。这被称之为“平淡”(plain)或“香精”(vanilla)肽模型[464],并且已经获得某些胚系 TCR 偏好证据有关文献的支持。

另外一个更为广泛支持的模型是由于 CDR3 区域对结合肽的识别,TCR 需要在与 MHC 相互作用时增加有效的亲和力。如果亲和力获得太少将导致无选择;如果亲和力获得太多将导致阴性选择,只是合适的亲和力被阳性的选择。这个模型允许单个 APC 的呈递效果足够完全决定一个细胞阳性选择的表型,但是和前面模型一样它也面临反面的问题;只有在一个空间所有 APC 的肽-MHC 复合物是同等的,或者 T 细胞扫描此空间所有 APC,以便未错过重要的阴性选择复合物,阴性选择才是充分有效的。

各种模型中均没有强调与 TCR 直接作用的特殊 MHC 残基在等位基因偏好选择中的角色。可肯定朝向结合肽的暴露表位残基面的任何 MHC 残基将有如此的效果,但是实际上此位置仅有很少高度可变的残基,能期望对与 TCR 相互作用有很大的影响,而且不影响肽的结合。这样,可推测这些多型性并不明显强烈地参与选择。而且,证据显示改变与 TCR 不直接接触的 MHC 结构,对细胞池的选择有很大的影响[465],表明与肽相关的事件有能力塑造细胞池,并不依赖于 TCR 直接接触的 MHC 残基。

尽管上面讨论的模型仅是假设，现在有相当大量的数据证实肽在阳性选择过程中的作用。旧的数据显示突变肽结合位置的底部能影响T细胞的发育，以致于一些针对野生型分子呈递的外源抗原的应答丧失了，可能是阳性选择失败的结果。最近，胎儿胸腺组织与MHC Ⅰ类或Ⅱ类分子呈递蛋白抗原缺陷的动物胸腺共培养，进而分析T细胞池。使用TAP或β_2m缺陷的TCR转基因鼠，发现一些令人激动的结果。来源这些动物的胸腺器官培养显示很少有成熟$CD8^+$ T细胞发育。在培养中加入合成肽（在β_2m突变的情况下同时加入外源β_2m）能或多或少的纠正选择缺陷[466~470]。另外支持肽依赖阳性选择的数据来源于分析那些其MHC分子只结合有限变化肽的老鼠，在某些情况下只有单独的一个肽[471~474]。

大量的工作研究肽/MHC识别和阴性选择的关系（发展自我耐受）。当提供TCR单克隆抗体[475]，并且通过在发育胚系引入重排基因使小鼠表达单一TCR时[476]，早期试验提到的这种功能耐受的清除基础被清楚地描述。在这些模型的一些试验中，如在体内试验性的暴露，胸腺器官的培养[478,479]，分离的胸腺细胞与已知的TCR配体肽共培养导致表达同源TCR的胸腺发育细胞快速的细胞凋亡。这样，可建立这样的结论，当发育T细胞的TCR被已知能在外周活化的配体（激动剂）占有时，在胸腺可诱导的细胞死亡。比较各种肽刺激成熟转基因动物的TCR表达T细胞的效率，或它们在胸腺清除表达这些受体的T细胞的能力，发现那些较差或不能刺激成熟T细胞的各种肽从来不能有效导致胸腺内的清除[468,469,479,481]，这个结果和通常持有的观点一致，即阴性选择中所需TCR信号阀值低于成熟T细胞活化所要求的阈值。这具有生物学意义，因为它建立了清除/忍耐过程中边界 错误，也就是说在介导阴性选择的胸腺细胞上自身肽-MHC复合物密度的小变化不会导致由此逃逸的外周T细胞的自身反应。

329

肽认别如何导致有用的T细胞选择

如果在胸腺分化中，自身肽参与阳性和阴性选择，一部分胸腺细胞是如何接受一个肽-MHC信号进入发育，而不是从同样肽-MHC复合物接受消除/灭活的信号？一些并不互相排斥的模型被建议解释这明显的驳论（见第11章）。他们能广泛地划分成这样几类，一些推测TCR和肽-MHC复合物相互作用的数量差别扮演主要角色，一些推测与这些相互作用的质的变化相关，还有一些关注于对于这个相互作用的应答在发育中的变化。

最早常被误解的模型被称为胸腺细胞选择的亲和力模型。这个名字具有误导性，因为实际假说与TCR占有的数量差别有关，而不是TCR和特定肽- MHC复合物的亲和力本质上不同。这个模型建对于影响细胞的不同生理应答存在不同的胞内信号转导阀值，这个推论现在至少在成熟T细胞中积累了证据[482~485]。诱导进一步分化的阈值被推定低于诱导死亡途径。因此，由于胸腺APC上相关的复合物的数目低，即使与TCR有很高的亲和力，或这复合物多，但与TCR的亲和力低，都将导致TCR的低占有，使转导信号仅到达第一个阈值，然非第二个阀值，结果是这些T细胞阳性选择。

一个真实的亲和力模型实际上可能是更普遍模型中的特例，即配体与TCR相互作用的质变将改变T细胞接受的信号类型，因此而活化[486]。现在有大量证实显示改变同一个TCR的配体结构，能产生不同的T细胞反应，这不能简单的受体占有数目改变来解释[487~489]。这样可能就有大量本质上不能经TCR诱导程序性细胞死亡的配体，能在胸腺充当一个阳性选择的元素。

第三个普遍模型的最简单形式是：在早期发育阶段，被足够肽-MHC复合物占有的TCR产生胞内信号将仅导致进行性分化（阳性选择），而在以后阶段，如此的占有将导致死亡（阴性选择）。有用的细胞池将来源于两个阶段中在APC上存在肽集合差异。如果在早期经APC上A肽选择的胸腺T细胞，在晚期阶段并不遇见肽在APC上的A肽，将被阳性选择，而不被清除[490]。我们关于抗原处理途径的理解使之非常清楚，即两个APC产生的不同分化特异性蛋白，将在它们的表面至少存在一些不重叠的肽-MHC复合物。因此，关于这个模型的试验不能通过寻找不同肽-MHC复合物存在的证据，因为它们肯定存在，而是这些差别是否在确定功能性T细胞池中起主要作用。

获得的一些证据显示：皮质上皮细胞是胸腺发育早期阶段的主要呈递细胞，其介导阴性选择并没有明显的障碍[477]，而晚期提供相互作用的血源细胞也同样介导阳性选择[491]。这使上面描述的阶段特异模型的纯

粹形式可能不正确。然而，上皮和血源细胞介导的两种选择类型的效率确实存在差异，而两种 APC 的非-MHC 分子提供信号存在质上的差别。在后者例子中，两个 APC 呈递同一个肽的数量差别将可能导致阳性选择。如果由于在上皮细胞肽-MHC 分子复合物的信号水平足够导致进一步分化，而这种复合物在血源细胞太低不足以产生足够的 TCR 信号，它将和非-TCR 信号一起导致活化死亡机制。这个假说提示呈递细胞之间呈现肽的数而不是质的差别是选择过程中的重要因素。

在胸腺细胞选择领域的一个主要的问题是特定肽的结构在阳性选择表达特定 TCR 的 T 细胞中的作用。一类研究者认为在 TAP-或 β_2m 缺陷供体的胎儿胸腺培养中，引入有效选择是由于通过肽诱导、稳定重链-β_2m 复合物重建了 MHC Ⅰ类分子的表达。选择被假定需要细胞表面Ⅰ类分子高密度的表达，以补偿在不诱导细胞死亡的阳性选择中所需要的低亲和力识别。在这个模型肽表位残基的任何贡献被认为是次要的。支持这个结论常在引用的数据是：在非 TCR 转基因胸腺的培养中，单个肽能促进大量表达不同 TCR 的 $CD8^+$ T 细胞分化[466,467]，和显然结构无关肽能诱导所有 TCR 转基因情况下的选择[492]。而其他意见认为肽的特性在过程扮演中心角色，他们引用数据是：当占有 MHC Ⅰ类分子的肽多样化时，显著提高总的 $CD8^+$ T 细胞的选择[466,467]，以及肽结构微小变化影响 TCR 转基因情况下的有效选择[469,493]。

从其他研究也获得除Ⅰ类分子数据外的另外数据，这些试验包括：研究一个显性或只有一个肽结合与表达 MHC Ⅱ类分子的小鼠，这是通过转基因模型中共价交联 β 链而获得[471,494]，或者使用 DM 突变小鼠，在 H-2^b 单体型的Ⅱ类分子几乎只与 CLIP 结合[472~474]。在每种情况下，这些动物的胸腺有接近正常 25% 的成熟 $CD4^+$ T 细胞池，并且显示使用 TCR 遗传单元构成多样性。这些数据与来源非转基因模型中的一些Ⅰ类分子结果一致，在这些模型的胸腺培养中单个肽能重建大约 20% 到 30% 正常的成熟 $CD8^+$ 细胞。

330

如果考虑在生理情况下胸腺有效选择的细胞数，可发现阳性选择中肽具有次要作用的观点存在问题。只有大约 5% 的 $CD4^+CD8^+$ 前体细胞避免"忽视"，经历阳性或阴性选择[476]。如果胚系 V-D-J 单元和表达 MHC 分子的相互作用并不依赖于诱发选择信号的结合肽特异性结构，可以想像单个肽的重建分数应该更高。因为如果没有每个 TCR 特殊 CDR3 区域妨碍 TCR 与细胞上几乎所有含肽 MHC 分子的结合，这将没有理由解释：通过胚系单元对 MHC 结构的识别，每个合适组装的 αβTCR 为何不提供活化信号。一个可能建议的是某些 V-D-J 片段的组合不能与某个 MHC 等位基因适当结合，但是在一个动物有 2～4 个Ⅰ类分子和 2～4 个Ⅱ类分子，如果不同单体型种类池中每个 V_α 和 V_β 类型几乎都存在，并且这个池中的所有 V_α-V_β 组合均被扫描选择，那么 95% 的组合失败发现一个可接受的目标与这个模型是不一致的。

这些不同结果和解释怎么才能协调一致呢？一个可能性是：在大多数 T 细胞的选择，肽特异性结构起一定作用，但是在匹配中存在大量足以驱动有效识别和信号事件的灵活性/简并性。这样，单个的高溶度肽能选择相当大的细胞池，通过这些简并性识别和极高的配体密度扩增效应，反之如果肽剂量很低，但其与某个 TCR 很好匹配，也能有效进行选择。简而言之，正如期望一样，这个识别系统的配体和受体均具有巨大的多样性，被此系统可接受的相互作用范围广泛，识别配体的亲和力和密度提供了一个系列可满足启动选择要求的相互作用。多种有效识别模式的观点与不同识别方式的研究证据是一致的，这些研究显示一些 TCR 要求特定肽结合在不同 MHC 分子，以激发特定 T 细胞应答[这和一些转基因 TCR 模型的数据吻合，它们胎儿胸腺器官培养(fetal thymus organ culture，FTOC)显示出精确的肽选择]，其他识别要求某个肽家庭成员之一(这和在一些转基因 TCR 的 FTOC 模型中看到存在简并性但非不依赖肽结构的现象一致)，而另外的一些识别则是任何肽结合在相关Ⅰ类分子即可(这和一些情形下单个肽活化广泛细胞池的结果相一致)。

对于启动某个 TCR 阳性选择的配体性质，几乎所有研究者都认为如果 TCR 与未结合肽的 MHC 分子等位基因形式具有高亲和力将导致阴性选择，因为在 T 细胞发育中提供太高的配体密度。如果 TCR 是对肽-MHC 分子具有高亲和力，而不是 MHC 本身，现在一些证据显示非常低的 TCR 配体密度就能促进细胞发育而不被清除[470~495]。然而在这种条件下成熟的 T 细胞离开胸腺后，并不和原肽-MHC 组合反应，则提出一个疑问这些 TCR 表达细胞对配体的识别是否启动拮抗剂信号。证据显示细胞信号转导系统的其他方面能修改特别肽-MHC 分子识别所介导 TCR 信号，这种修饰可不依赖于识别过程的亲和力。对此的一个解释是细胞

上 CD4 或 CD8 共同受体的密度[468,496,497]。这样，在转基因 TCR 表达的许多 CD4⁺ CD8⁺ 前体细胞之间，只有那些其共同受体水平能阻碍拮抗剂样信号的细胞有能力有效选择，而不被清除。最近的数据也支持另外的可能性，在胸腺，肽结合在皮质上皮细胞的 MHC 分子(非其他地方)能促进阳性选择，而不被清除，这可能由于前体细胞的一个特殊信号特性允许有限的拮抗信号存在时不诱导细胞死亡(B. Lucas 和 R. Germain，未发表的观察结果)。如果这些细胞在胸腺完全成熟前不再遇见同样的配体，这些细胞可逃脱在形成表达 TCR 池中扮演重要角色的晚期血源性阴性选择[498]。

这样，和生物学大部分假说一样，竞争的假说经常并不相互排斥，并且在胸腺发育情况中，存在大量的理由相信：组合竞争模型中关于促进净阳性选择(net postive selection)的几个特征将有利于对此过程的理解。现在几乎可以确定的是：胸腺 APC 和上皮细胞的肽呈递中存在差异，这些细胞的差异在于共同受体能力，以及在 T 细胞成熟的不同阶段，结合肽-MHC 分子的信号结果在量和质上均发生变化。挑战将确定在建立有用 T 细胞池中这些机制的相对角色。

自身肽呈递、胸腺选择和自身免疫

MHC 分子通常不能区分来源自身蛋白和外源蛋白的多肽。如同上面的详细说明，从正常细胞 MHC 洗脱的肽大多数来源于自身蛋白，其中有些是 APC 生产的蛋白质，有些来源于细胞间介质或血浆环境。呈递系统不能分辨自己-非己意味着 T 细胞免疫系统必须有自己的机制学习如何区分自身肽-和外源-MHC 分子复合物，以消除有害的自身免疫反应的可能性。

前面的章节强调在胸腺 T 细胞发育中，识别有效呈递自身肽的胸腺细胞被清除，特别是血源细胞介导的清除，因为它们是外周刺激成熟 T 细胞活化的主要专职 APC[499]。然而，不大可能胸腺内对这些抗原的扫描是绝对的，或者不太可能扫描胸腺外组织特异性的表达。在胸腺确实存在自身肽-MHC 分子复合物占据太少的受体，以致不能诱导表达对应受体的胸腺细胞阴性选择，特别是配体显著或仅仅表达在呈递 CD4⁺ CD8⁺ 胸腺细胞的皮质上皮细胞，这些胸腺细胞能通过部分清除拮抗剂配体诱导的活化而得到保护(B. Lucas 和 R. Germain，未发表的观察结果)。这些 T 细胞能成熟，并且将作为静止、潜在的自身反应细胞在外周存在。许多情形能允许这些细胞到达活化所需的足够量或质的 TCR 结合水平，产生自身免疫应答。第二类自身反应性细胞特异于未在胸腺内细胞表达的蛋白来源肽。这些分化特异性蛋白能生产足量的肽-MHC 分子复合物，刺激没在胸腺发育期间遇见如此复合物的 T 细胞。一些证据建议外周的耐受机制与机体的非血源 APC 上缺乏共刺激信号相关，它们灭 活将产生自身免疫性疾病威胁的细胞[500,501]。很易想像，在存在未预料的共刺激信号时，如果允许这些自反应 T 细胞遇见他们的组织特异性配体，将导致病理性的自身免疫的发展。这类基于缺乏共刺激信号的外周耐受显然不合适在外周专职 APC 上的自身肽-MHC 分子复合物，它们存在有效水平的共刺激受体，因此需要在完成 T 成熟和输出前，通过暴露这些 APC 获得非常有效的胸腺内清除。

331

由于自身肽-MHC 复合物耐受的量化特性和在胸腺此过程中血源细胞的重要作用，提示存在这种可能性，即在外周存在大量呈递自身肽反应的细胞，但其需要的呈递量超过这些 APC 提供的量[502,503]。含有特定肽的 MHC 分子数目不仅仅反映细胞产生的相关蛋白的量，而且与 APC 的特定生理状态有关，以及 MHC 分子竞争配体的存在和其他因素。例如，竞争结合被恒定链肽占有Ⅱ类分子，能使低亲和力肽或那些中等产量肽在血源 APC 上不能达到高水平。然而由于减少了竞争或增加了产量，同样这些肽能在肿瘤细胞上到达如此高的水平，从而组成一个肿瘤排斥抗原。从真正的意义上讲，效应细胞识别这些复合物的活性事实上是一种自身免疫性反应，因为呈递的肽来源于没有突变的自身抗原[108,109,504]。这个有用的自身免疫概念可以为设计有效的肿瘤免疫治疗方法保持希望。

自身识别和自身反应在一定水平足以诱导病理状态的问题，和自身-MHC 识别在维持外周 T 细胞池中的作用变得更加相关。若干研究者发现初始和记忆 CD4⁺ 或 CD8⁺ T 细胞在宿主动物缺乏Ⅱ类或Ⅰ类分子表达时很快死亡[505~509]。在一种情况，仅仅树突细胞表达Ⅱ类分子足以促进 CD4⁺ 存活[508]。总的来说，这些研究结果显示在胸腺成熟完成后，阳性选择实际上仍在继续。尽管它还没有被直接表明，可假定在 TCR 识

别和信号转导中需要自身-MHC复合物,这与发现刚分离T细胞显示TCR复合物磷酸化的发现相一致[510]。将来研究的一个重要领域是鉴定推定的自身识别事件的信号转导途径,以及这个系统如何避免经常超过活化到效应功能的阈值,因为这种活化将导致自身免疫机能障碍。

结论

本章详细说明 αβT 细胞的主要聚焦点:以肽与组织相容性复合物多型性产物结合的形式呈现在细胞膜的抗原(图9.18)。这副抗原处理和呈递的图像似乎并非相当完整。我们现在已经获得Ⅰ类和Ⅱ类MHC分子生物化学的详细知识,以及关于胞内提供MHC分子结合肽途径的广阔且详细的理解,还有被MHC分子获取这些肽的地点,及(除了MHC Ⅱ类分子输出的最后步骤)这些肽-MHC分子复合物在细胞内和到细胞膜的移动。关于每类MHC在不同的胞内分隔空间和不同的蛋白来源获得肽的特性已变得清楚,而肽结合在胞内Ⅰ类或Ⅱ类分子的重要效应也是如此。各种关系,如处理和呈递途径,肽与MHC分子相互作用和功能T细胞识别,胸腺T细胞池的选择,自身免疫性,和疫苗有效性,都已清楚。我们鉴定一系列与MHC Ⅰ类或Ⅱ类结构蛋白一起表达的关键辅助分子,在异源细胞系统很好地(虽然尚不完美)重建了呈递途径。发现存在呈递结构特殊肽(例如那些包含 *N*-甲酰蛋氨酸的肽)和非肽配体(例如由CD1呈递的糖脂)的途径,这些系统的细胞生物学知识也较详细地了解。结合肽或超抗原的每个主要的MHC分子,TCR,甚至TCR、特定肽-MHC分子复合物的晶体结构图像现在均可得到。

332

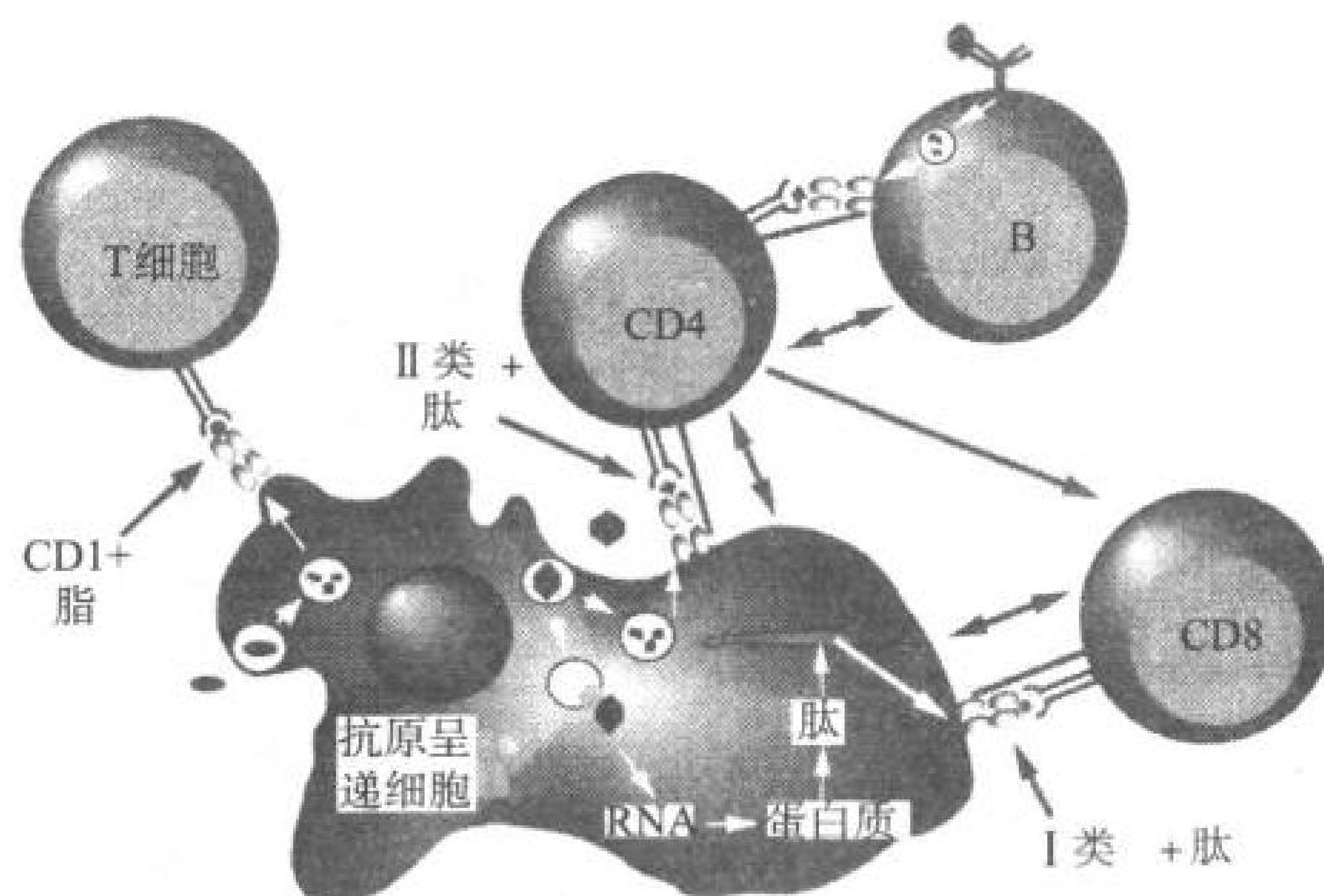


图9.18 在获得性免疫中的抗原呈递。图示一个APC,可能是树突细胞,提供Ⅰ类分子、Ⅱ类分子和CD1配体给各种T细胞识别。同一个树突细胞被显示呈递病毒抗原给$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞。现在还不清楚在体这三种细胞同时相互接触是否发生。在表面免疫球蛋白摄取抗原后,B细胞呈递和树突细胞一样的肽-MHC Ⅱ类分子复合物也被显示,图示通过树突细胞活化T细胞和T-B细胞协同产生抗体之间的关系。$CD4^+$ T细胞同时与树突细胞和B细胞接触并不表示会在体内发生,虽然发现树突细胞位于生发中心[511]提示存在这种可能性。

但是同样很显然还有许多仍需研究。我们仍然没有足够的了解蛋白酶体或内吞途径蛋白质酶的裂解规律,这些规律可充分解释在源蛋白中一些序列的优先呈递。在体内呈递特定的肽仍是一个很大的未知领域。追踪表达特定肽-MHC分子结合细胞的方法最近才被开发出来,并且刚开始使用,以便我们能开始理解在抗原不同的暴露条件下,哪些细胞充当相关的APC。控制胞内含有特定胞质尾蛋白质运输的分子机制才开始定义,并且这些系统的调节远未了解。这样,尽管T细胞抗原中迷惑两代免疫学家的迷团的一些方面已经被解决,许多免疫的、细胞生物的和生化问题仍然需继续研究。

(万瑛译)

参考文献

1. Janeway CJ. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;1:1–13.
2. Gell PGH, Benacerraf B. Studies on hypersensitivity. II. Delayed hypersensitivity to denatured protein in guinea pigs. *Immunology* 1959;2:64–70.
3. Unanue ER. Antigen-binding cells. I. Their idenification and role in the immune response. *J Immunol* 1971;107:1168–1174.
4. Schwartz RH. Immune response (Ir) genes of the murine major histocompatibility complex. *Adv Immunol* 1986;38:31–201.
5. Rosenthal AS, Shevach EM. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and

lymphocytes. *J Exp Med* 1973;138:1194–1212.
6. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 1974:248:701–702.
7. Bevan MJ. The major histocompatibility complex determines susceptibility to cytotoxic T cells directed against minor histocompatibility antigens. *J Exp Med* 1975;142:1349–1364.
8. Katz DH, Hamaoka T, Dorf ME, Benacerraf B. Cell interactions between histoincompatible T and B lymphocytes. The H-2 gene complex determines successful physiologic lymphocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70:2624–2628.
9. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994;76:287-299.
10. Meadows L, Wang W, den Haan JM et al. The HLA-A*0201-restricted H-Y antigen contains a posttranslationally modified cysteine that significantly affects T cell recognition. *Immunity* 1997;6:273–281.
11. Cohn M, Langman RE. The protecton: The unit of humoral immunity selected by evolution. *Immunol Rev* 1990;115:11–147.
12. Smith DB, Inglis SC. The mutation rate and variability of eukaryotic viruses: An analytical review. *J Gen Virol* 1987;68:2729–2740.
13. Benacerraf B, McDevitt HO. Histocompatibility-linked immune response genes. *Science* 1972;175:273–279.
14. von Boehmer H, Hudson L, Sprent J. Collaboration of histoincompatible T and B lymphocytes using cells from tetraparental bone marrow chimeras. *J Exp Med* 1975;142:989–997.
15. Longo DL, Schwartz RH. Gene complementation. Neither Ir-GLf gene need be present in the proliferative T cell to generate an immune response to Poly(Glu55Lys36Phe9)n. *J Exp Med* 1980;151:1452–1467.
16. Singer A, Hathcock KS, Hodes RJ. Self recognition in allogeneic radiation bone marrow chimeras. A radiation-resistant host element dictates the self specificity and immune response gene phenotype of T-helper cells. *J Exp Med* 1981;153:1286–1301.
17. Doherty PC, Blanden RV, Zinkernagel RM. Specificity of virus-immune effector T cells for H-2K or H-2D compatible interactions: Implications for H-antigen diversity. *Transplant Rev* 1976;29:89–124.
18. von Boehmer H, Haas W, Jerne NK. Major histocompatibility complex-linked immune-responsiveness is acquired by lymphocytes of low-responder mice differentiating in thymus of high-responder mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:2439–2442.
19. Benacerraf B. A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I region-specific Ir genes in macrophages and B lymphocytes. *J Immunol* 1978;120:1809–1812.
20. Kappler JW, Skidmore B, White J, Marrack P. Antigen-inducible, H-2-restricted, interleukin-2-producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition. *J Exp Med* 1981;153:1198–1214.
21. Heber-Katz E, Hansburg D, Schwartz RH. The Ia molecule of the antigen-presenting cell plays a critical role in immune response gene regulation of T cell activation. *J Mol Cell Immunol* 1983;1:3–18.
22. Racioppi L, Ronchese F, Schwartz RH, Germain RN. The molecular basis of class II MHC allelic control of T cell responses. *J Immunol* 1991;147:3718–3727.
23. Rock KL, Benacerraf B. Inhibition of antigen-specific T lymphocyte activation by structurally related Ir gene-controlled polymers. Evidence of specific competition for accessory cell antigen presentation. *J Exp Med* 1983;157:1618–1634.
24. Ziegler K, Unanue ER. Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region-restricted antigen presentation to T lymphocytes. *J Immunol* 1981;127:1869–1875.
25. Shimonkevitz R, Colon S, Kappler JW, Marrack P, Grey HM. Antigen recognition by H-2-restricted T cells. II. A tryptic ovalbumin peptide that substitutes for processed antigen. *J Immunol* 1984;133:2067–2074.
26. Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue ER. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 1985;317:359–361.
27. Buus S, Sette A, Colon SM, Jenis DM, Grey HM. Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition. *Cell* 1986;47:1071–1077.
28. Yagüe J, White J, Coleclough C, Kappler J, Palmer E, Marrack P. The T cell receptor: The alpha and beta chains define idiotype, and antigen and MHC specificity. *Cell* 1985;42:81–87.
29. Dembíc Z, Haas W, Weiss S, et al. Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature* 1986;320:232–238.
30. Saito T, Weiss A, Miller J, Norcross MA, Germain RN. Specific antigen-Ia activation of transfected human T cells expressing murine Ti ab-human T3 receptor complexes. *Nature* 1987;325:125–130.
31. Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL, Fan DP, Braciale TJ. Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med* 1986;163:903–921.
32. Townsend AR, Gotch FM, Davey J. Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell* 1985;42:457–467.
33. Germain RN. The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 1986;322:687–689.
34. Long EO. Intracellular traffic and antigen processing. *Immunol Today* 1989;10:232–234.
35. Yewdell JW, Bennink JR. The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. *Cell* 1990;62:203–206.
36. Newell WR, Trowsdale J, Beck S. MHCDB—database of the human MHC. *Immunogenetics* 1994;40:109–115.
37. Abdulla S, Alderton RP, Glynne RJ et al. DNA sequencing of the MHC class II region and the chromosome 6 sequencing effort at the Sanger Centre. *DNA Seq* 1996;7:5–7.
38. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109–1118.
39. Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 1996;289:1–8.
40. Wang B, Kondo S, Shivji GM, Fujisawa H, Mak TW, Sauder DN. Tumour necrosis factor receptor II (p75) signalling is required for the migration of Langerhans' cells. *Immunology* 1996;88:284–288.
41. Heinrichs H, Orr HT. HLA non-A,B,C class I genes: Their structure and expression. *Immunol Res* 1990;9:265–274.
42. Klein J, Benoist C, David CS, et al. Revised nomenclature of mouse H-2 genes. *Immunogenetics* 1990;32:147–149.
43. Wei XH, Orr HT. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum Immunol* 1990;29:131–142.
44. Vernachio J, Li M, Donnenberg AD, Soloski MJ. Qa-2 expression in the adult murine thymus. A unique marker for a mature thymic subset. *J Immunol* 1989;142:48–56.
45. Hood L, Steinmetz M, Malissen B. Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. *Annu Rev Immunol* 1983;1:529–568.
46. Salter RD, Benjamin RJ, Wesley PK, et al. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature* 1990:345:41–46.
47. Gao GF, Tormo J, Gerth UC, et al. Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA- A2. *Nature* 1997:387:630–634.
48. Kaufman JF, Auffray C, Korman AJ, Shackelford DA, Strominger J. The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell* 1984;36:1–13.
49. Cosson P, Bonifacino JS. Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules. *Science* 1992;258:659–662.
50. Murphy DB, Jones PP, Loken MR, McDevitt HO. Interaction between I region loci influences the expression of a cell surface Ia antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:5404–5408.
51. Germain RN, Bentley DM, Quill H. Influence of allelic polymorphism on the assembly and surface expression of class II MHC (Ia) molecules. *Cell* 1985;43:233–242.
52. Sant AJ, Germain RN. Intracellular competition for component chains determines class II MHC cell surface phenotype. *Cell* 1989;57:797–805.
53. Germain RN, Quill H. Unexpected expression of a unique mixed-isotype class II MHC molecule by transfected L-cells. *Nature* 1986;320:72–75.
54. Ruberti G, Sellins KS, Hill CM, Germain RN, Fathman CG, Livingstone A. Presentation of antigen by mixed isotype class II molecules in normal H-2^d mice. *J Exp Med* 1992;175:157–162.
55. Karlsson L, Surh CD, Sprent J, Peterson PA. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* 1991;351:485–488.
56. Liljedahl M, Kuwana T, Fung-Leung WP, et al. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J* 1996;15:4817–4824.
57. Germain RN, Malissen B. Analysis of the expression and function of class-II major histocompatibility complex-encoded molecules by DNA-mediated gene transfer. *Annu Rev Immunol* 1986;4:281–315.
58. Jelachich ML, Biddison WE. Class I antigen presentation. *Year Immunol* 1989;4:41–58.
59. Braunstein NS, Germain RN. I-A-restricted T cell antigen recognition. Analysis of the roles of Aa and Ab using DNA-mediated gene transfer. *J Exp Med* 1986;163:678–696.
60. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987;329:506–512.
61. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987;329:512–518.
62. Garrett TP, Saper MA, Bjorkman PJ, Strominger JL, Wiley DC. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 1989;342:692–696.
63. Fremont DH, Matsumura M, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K^b. *Science* 1992;257:919–927.
64. Matsumura M, Fremont DH, Peterson PA, Wilson IA. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 1992;257:927–934.
65. Madden DR, Garboczi DN, Wiley DC. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: A comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* 1993;75:693–708.
66. Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, et al. An $\alpha\beta$ T cell receptor structure at 2.5

A and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 1996;274:209-219.
67. Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 1996;384:134–141.
68. Stern LJ, Wiley DC. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure* 1994;2:245–251.
69. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 1991; 353:321–325.
70. Bouvier M, Wiley DC. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science* 1994;265:398–402.
71. Guo HC, Jardetzky TS, Garrett TP, Lane WS, Strominger JL, Wiley DC. Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature* 1992;360:364–366.
72. Collins EJ, Garboczi DN, Wiley DC. Three-dimensional structure of a peptide extending from one end of a class I MHC binding site. *Nature* 1994;371: 626–629.
73. Fischer-Lindahl K, Hermel E, Loveland BE, Wang C-R. Maternally transmitted antigen of mice: A model transplantation antigen. *Ann Rev Immunol* 1991;9: 351–372.
74. Wang CR, Lindahl KF, Deisenhofer J. Crystal structure of the MHC class Ib molecule H2-M3. *Res Immunol* 1996;147:313–321.
75. Kurlander RJ, Shawar SM, Brown ML, Rich RR. Specialized role for a murine Class-I-b MHC molecule in prokaryotic host defenses. *Science* 1992;257: 678-679.
76. Pamer EG, Wang C-R, Flaherty L, Fischer-Lindahl K, Bevan MJ. H-2M3 presents a Listeria monocytogenes peptide to cytotoxic T lymphocytes. *Cell* 1992;70:215–223.
77. Zeng Z, Castao AR, Segelke BW, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA. Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* 1997;277:339–345.
78. Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted $\alpha\beta^+$ T cells. *Nature* 1994;372: 691-694.
79. Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, et al. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 1995;269:227–230.
80. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993;364:33–39.
81. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 1994;368:215-221.
82. Kim J, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Toxic shock syndrome toxin-1 complexed with a class II major histocompatibility molecule HLA-DR1. *Science* 1994;266:1870–1874.
83. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 1994;368:711-718.
84. Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 1995;378:457–462.
85. Fremont DH, Hendrickson WA, Marrack P, Kappler J. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 1996;272: 1001–1004.
86. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, et al. Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:734–738.
87. Germain RN. Seeing double! *Curr Biol* 1993;3:586–589.
88. König R, Huang L-Y, Germain RN. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 1992;356:796–798.
89. Cammarota G, Scheirle A, Takacs B, et al. Identification of a CD4 binding site on the β2 domain of HLA-DR molecules. *Nature* 1992;356:799-801.
90. König R, Shen X, Germain RN. Involvement of both MHC class II α and β chains in CD4 function indicates a role for ordered oligomerization in T cell activation. *J Exp Med* 1995;182:779–787.
91. Wu H, Kwong PD, Hendrickson WA. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* 1997;387:527–530.
92. Reich Z, Boniface JJ, Lyons DS, Borochov N, Wachtel EJ, Davis MM. Ligand-specific oligomerization of T-cell receptor molecules. *Nature* 1997;387: 617-620.
93. Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM. Superantigens: Mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol* 1991;9: 745–772.
94. Choi YW, Herman A, DiGiusto D, Wade T, Marrack P, Kappler J. Residues of the variable region of the T-cell-receptor β-chain that interact with *S. aureus* toxin superantigens. *Nature* 1990;346:471–473.
95. Pullen AM, Wade T, Marrack P, Kappler JW. Identification of the region of T cell receptor β chain that interacts with the self-superantigen Mls-1a. *Cell* 1990;61: 1365-1374.
96. Kappler J, White J, Kozono H, Clements J, Marrack P. Binding of a soluble αβ T-cell receptor to superantigen/major histocompatibility complex ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:8462–8466.
97. Fields BA, Malchiodi EL, Li H, et al. Crystal structure of a T-cell receptor β-chain complexed with a superantigen. *Nature* 1996;384:188–192.
98. Swaminathan S, Furey W, Pletcher J, Sax M. Crystal structure of staphylococcal enterotoxin B, a superantigen. *Nature* 1992;359:801-806.
99. Thibodeau J, Cloutier I, Lavoie PM, et al. Subsets of HLA-DR1 molecules defined by SEB and TSST-1 binding. *Science* 1994;266:1874-1878.
100. von Bonin A, Ehrlich S, Malcherek G, Fleischer B. Major histocompatibility complex class II-associated peptides determine the binding of the superantigen toxic shock syndrome toxin-1. *Eur J Immunol* 1995;25:2894–2898.
101. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988;334:395–402.
102. Kourilsky P, Claverie JM, Prochnicka CA, Spetz HA, Larsson SE. How important is the direct recognition of polymorphic MHC residues by TCR in the generation of the T-cell repertoire? *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;1: 93–103.
103. Rosenthal AS. Determinant selection and macrophage function in genetic control of the immune response. *Immunol Rev* 1978;40:136–152.
104. Schwartz RH. A clonal deletion model for Ir gene control of the immune response. *Scan J Immunol* 1978;7:3–10.
105. Hammer J, Bono E, Gallazzi F, Belunis C, Nagy Z, Sinigaglia F. Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning. *J Exp Med* 1994;180:2353–2358.
106. Schumacher TNM, Van Bleek GM, Heemels M-T, et al. Synthetic peptide libraries in the determination of T cell epitopes and peptide binding specificity of class I molecules. *Eur J Immunol* 1992;22:1405-1412.
107. Hammer J, Takacs B, Sinigaglia F. Identification of a motif for HLA-DR1 binding peptides using M13 display libraries. *J Exp Med* 1992;176:1007–1013.
108. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254:1643–1647.
109. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3515–3519.
110. Wang RF, Robbins PF, Kawakami Y, Kang XQ, Rosenberg SA. Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes [erratum *J Exp Med* 1995;181:1261]. *J Exp Med* 1995;181:799–804.
111. Boon T, van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183:725–729.
112. Engelhard VH. Direct identification of tumor-associated peptide antigens. *Springer Semin Immunopathol* 1996;18:171–183.
113. Rötzschke O, Falk K, Wallny HJ, Faath S, Rammensee HG. Characterization of naturally occurring minor histocompatibility peptides including H-4 and H-Y. *Science* 1990;249:283–287.
114. Wallny HJ, Rammensee HG. Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide. *Nature* 1990;343:275–278.
115. Falk K, Rötzschke O, Rammensee HG. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 1990;348: 248–251.
116. Rötzschke O, Falk K, Deres K, et al. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* 1990;348:252–254.
117. Van Bleek GM, Nathenson SG. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2Kb molecule. *Nature* 1990;348: 213–216.
118. Falk K, Rötzschke O, Stevanović S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991;351:290–296.
119. Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, et al. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 1992;255:1261–1263.
120. Khilko SN, Jelonek MT, Corr M, Boyd LF, Bothwell AL, Margulies DH. Measuring interactions of MHC class I molecules using surface plasmon resonance. *J Immunol Methods* 1995;183:77-94.
121. Boehncke WH, Takeshita T, Pendleton CD, et al. The importance of dominant negative effects of amino acid side chain substitution in peptide-MHC molecule interactions and T cell recognition. *J Immunol* 1993;150:331–341.
122. Ruppert J, Sidney J, Celis E, Kubo RT, Grey HM, Sette A. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell* 1993;74:929–937.
123. Parker KC, Shields M, DiBrino M, Brooks A, Coligan JE. Peptide binding to MHC class I molecules: Implications for antigenic peptide prediction. *Immunol Res* 1995;14:34–57.
124. Rudensky A, Preston HP, Hong SC, Barlow A, Janeway CAJ. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991;353:622–627.
125. Chicz RM, Urban RG, Lane WS, et al. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 1992;358:764–768.
126. Hunt DF, Michel H, Dickinson TA, et al. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science* 1992;256:1817–1820.
127. Rudensky AY, Preston-Hulbert P, Al-Ramadi B, Hong S-C, Rothbard J, Janeway

CA Jr. Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs. *Nature* 1992;359:429–431.

128. Falk K, Rötzschke O, Stevanović S, Jung G, Rammensee HG. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics* 1994;39:230–242.
129. Nelson CA, Vidavsky I, Viner NJ, Gross ML, Unanue ER. Amino-terminal trimming of peptides for presentation on major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:628–633.
130. Alexander J, Sidney J, Southwood S, et al. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity* 1994;1:751–761.
131. Ljunggren HG, Pääbo S, Cochet M, Kling G, Kourilsky P, Kärre K. Molecular analysis of H-2-deficient lymphoma lines. Distinct defects in biosynthesis and association of MHC class I heavy chains and β2-microglobulin observed in cells with increased sensitivity to NK cell lysis. *J Immunol* 1989;142:2911–2917.
132. Townsend A, Öhlén C, Bastin J, Ljunggren HG, Foster L, Kärre K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 1989;340:443–448.
133. Townsend A, Elliott T, Cerundolo V, Foster L, Barber B, Tse A. Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro. *Cell* 1990;62:285–295.
134. Cerundolo V, Alexander J, Anderson K et al. Presentation of viral antigen controlled by a gene in the major histocompatibility complex. *Nature* 1990;345: 449–452.
135. Lie WR, Myers NB, Gorka J, Rubocki RJ, Connolly JM, Hansen TH. Peptide ligand-induced conformation and surface expression of the L^d class I MHC molecule. *Nature* 1990;344:439–441.
136. Bikoff EK, Jaffe L, Ribaudo RK, Otten GR, Germain RN, Robertson EJ. MHC class I surface expression in embryo-derived cell lines inducible with peptide or interferon. *Nature* 1991;354:235–238.
137. Ljunggren HG, Stam NJ, Öhlén C, et al. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 1990;346:476–480.
138. Elliott T, Cerundolo V, Elvin J, Townsend A. Peptide-induced conformational change of the class I heavy chain. *Nature* 1991;351:402–406.
139. Sherman LA, Burke TA, Biggs JA. Extracellular processing of peptide antigens that bind class I major histocompatibility molecules. *J Exp Med* 1992;175: 1221–1226.
140. Kozlowski S, Corr M, Takeshita T, et al. Serum angiotensin-1 converting enzyme activity processes a human immunodeficiency virus 1 gp160 peptide for presentation by major histocompatibility complex class I molecules. *J Exp Med* 1992;175:1417–1422.
141. Schumacher TN, De BM, Vernie LN, et al. Peptide selection by MHC class I molecules. *Nature* 1991;350:703–706.
142. Elliott T. How do peptides associate with MHC class I molecules? *Immunol Today* 1991;12:386–388.
143. Rock KL, Rothstein LE, Gamble SR, Benacerraf B. Reassociation with β2-microglobulin is necessary for K^b class I major histocompatibility complex binding of exogenous peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:7517–7521.
144. Vitiello A, Potter TA, Sherman LA. The role of β2-microglobulin in peptide binding by class I molecules. *Science* 1990;250:1423–1426.
145. Kozlowski S, Takeshita T, Boehncke WH, et al. Excess β2 microglobulin promoting functional peptide association with purified soluble class I MHC molecules. *Nature* 1991;349:74–77.
146. Otten GR, Bikoff E, Ribaudo RK, Kozlowski S, Margulies DH, Germain RN. Peptide and β2-microglobulin regulation of cell surface MHC class-I conformation and expression. *J Immunol* 1992;148:3723–3732.
147. Silver ML, Parker KC, Wiley DC. Reconstitution by MHC-restricted peptides of HLA-A2 heavy chain with β2-microglobulin, in vitro. *Nature* 1991;350:619–622.
148. Springer TA, Kaufman JF, Siddoway LA, Mann DL, Strominger JL. Purification of HLA-linked B lymphocyte alloantigens in immunologically active form by preparative sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and studies on their subunit association. *J Biol Chem* 1977;252:6201–6207.
149. Cresswell P. Human B cells alloantigens; separation from other membrane molecules by affinity chromatography. *Eur J Immunol* 1977;7:636–639.
150. Dornmair K, Rothenhäusler B, McConnell HM. Structural intermediates in the reactions of antigenic peptides with MHC molecules. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;1:409–416.
151. Sadegh-Nasseri S, Germain RN. A role for peptide in determining MHC class II structure. *Nature* 1991;353:167–170.
152. Germain RN, Hendrix LR. MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding. *Nature* 1991;353:134–139.
153. Davidson HW, Reid PA, Lanzavecchia A, Watts C. Processed antigen binds to newly synthesized MHC class II molecules in antigen-specific B lymphocytes. *Cell* 1991;67:105–116.
154. Germain RN, Rinker AG Jr. Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes selective cell surface expression of occupied molecules. *Nature* 1993;363:725–728.
155. Lanzavecchia A, Reid PA, Watts C. Irreversible association of peptides with class-II MHC molecules in living cells. *Nature* 1992;357:249–252.
156. Chen BP, Parham P. Direct binding of influenza peptides to class I HLA molecules. *Nature* 1989;337:743–745.
157. Cerundolo V, Elliott T, Elvin J, Bastin J, Rammensee HG, Townsend A. The binding affinity and dissociation rates of peptides for class I major histocompatibility complex molecules. *Eur J Immunol* 1991;21:2069–2075.
158. Sadegh-Nasseri S, McConnell HM. A kinetic intermediate in the reaction of an antigenic peptide and I-Ek. *Nature* 1989;337:274–276.
159. Jensen PE. Regulation of antigen presentation by acidic pH. *J Exp Med* 1990; 171:1779–1784.
160. Jensen PE. Enhanced binding of peptide antigen to purified class II major histocompatibility glycoproteins at acidic pH. *J Exp Med* 1991;174:1111–1120.
161. Harding CV, Roof RW, Allen PM, Unanue ER. Effects of pH and polysaccharides on peptide binding to class II major histocompatibility complex molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:2740–2744.
162. Sette A, Southwood S, O'Sullivan D, Gaeta FC, Sidney J, Grey HM. Effect of pH on MHC class II-peptide interactions. *J Immunol* 1992;148:844–851.
163. Reay PA, Wettstein DA, Davis MM. pH dependence and exchange of high and low responder peptides binding to a class II MHC molecule. *Embo J* 1992;11: 2829–2839.
164. Tampé R, McConnell HM. Kinetics of antigenic peptide binding to the class II major histocompatibility molecule I-Ad. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88: 4661–4665.
165. Stern LJ, Wiley DC. The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty alpha beta heterodimers in the absence of antigenic peptide. *Cell* 1992;68:465–477.
166. Sadegh-Nasseri S, Stern LJ, Wiley DC, Germain RN. MHC class II function preserved by low-affinity peptide interactions preceding stable binding. *Nature* 1994;370:647–650.
167. Boniface JJ, Lyons DS, Wettstein DA, Allbritton NL, Davis MM. Evidence for a conformational change in a class II major histocompatibility complex molecule occurring in the same pH range where antigen binding is enhanced. *J Exp Med* 1996;183:119–126.
168. Degen E, Williams DB. Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *J Cell Biol* 1991;112:1099–1115.
169. Hochstenbach F, David V, Watkins S, Brenner MB. Endoplasmic reticulum resident protein of 90 kilodaltons associates with the T-cell and B-cell antigen receptors and major histocompatibility complex antigens during their assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4734–4738.
170. Hammond C, Helenius A. A chaperone with a sweet tooth. *Curr Biol* 1993;3: 884–886.
171. Zhang Q, Tector M, Salter RD. Calnexin recognizes carbohydrate and protein determinants of class I major histocompatibility complex molecules. *J Biol Chem* 1995;270:3944–3948.
172. Ware FE, Vassilakos A, Peterson PA, Jackson MR, Lehrman MA, Williams DB. The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J Biol Chem* 1995;270: 4697–4704.
173. Ortmann B, Androlewicz MJ, Cresswell P. MHC class I/β2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 1994;368: 864–867.
174. Rajagopalan S, Brenner MB. Calnexin retains unassembled major histocompatibility complex class I free heavy chains in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 1994;180:407–412.
175. Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 1996;5:103–114.
176. Zamoyska R, Parnes JR. Rescue of Daudi cell HLA expression by transfection of the mouse beta 2-microglobulin gene. *J Exp Med* 1988;167:288–299.
177. Williams DB, Barber BH, Flavell RA, Allen H. Role of β2-microglobulin in the intracellular transport and surface expression of murine class I histocompatibility molecules. *J Immunol* 1989;142:2796–2806.
178. Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R. β2-microglobulin deficient mice lack $CD4^-8^+$ cytolytic T cells. *Nature* 1990;344: 742–746.
179. Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, et al. A critical role for tapasin in the assembly and function of MHC class I-TAP complexes. *Science* 1997;277:1306–1309.
180. Grandea AGr, Androlewicz MJ, Athwal RS, Geraghty DE, Spies T. Dependence of peptide binding by MHC class I molecules on their interaction with TAP. *Science* 1995;270:105–108.
181. Jones PP, Murphy DB, Hewgill D, McDevitt HO. Detection of a common polypeptide chain in I—A and I—E sub-region immunoprecipitates. *Mol Immunol* 1979;16:51–60.
182. Singer PA, Lauer W, Dembić Z, et al. Structure of the murine Ia-associated invariant (Ii) chain as deduced from a cDNA clone. *EMBO J* 1984;3:873–877.
183. Strubin M, Mach B, Long EO. The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity. *EMBO J* 1984;3:869–872.
184. Strubin M, Berte C, Mach B. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J* 1986;5:3483–3488.
185. Koch N, Lauer W, Habicht J, Dobberstein B. Primary structure of the gene for the murine Ia antigen-associated invariant chains (Ii). An alternatively spliced exon encodes a cysteine-rich domain highly homologous to a repetitive sequence

of thyroglobulin. *EMBO J* 1987;6:1677–1683.
186. Marks MS, Blum JS, Cresswell P. Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J Cell Biol* 1990;111:839–855.
187. Roche PA, Marks MS, Cresswell P. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 1991;354:392–394.
188. Anderson KS, Cresswell P. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J* 1994;13:675–682.
189. Romagnoli P, Germain RN. Inhibition of invariant chain (Ii)-calnexin interaction results in enhanced degradation of Ii but does not prevent the assembly of αβ complexes. *J Exp Med* 1995;182:2027–2036.
190. Cresswell P, Blum JS, Kelner DN, Marks MS. Biosynthesis and processing of class II histocompatibility antigens. *Crit Rev Immunol* 1987;7:31–53.
191. Neefjes JJ, Stollorz V, Peters PJ, Geuze HJ, Ploegh HL. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* 1990;61:171–183.
192. Koch N. Moldenhauer G, Hofmann WJ, Moller P. Rapid intracellular pathway gives rise to cell surface expression of the MHC class II-associated invariant chain (CD74). *J Immunol* 1991;147:2643–2651.
193. Roche PA, Teletski CL, Stang E, Bakke O, Long EO. Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8581–8585.
194. Blum JS, Cresswell P. Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:3975–3979.
195. Nowell J, Quaranta V. Chloroquine affects biosynthesis of Ia molecules by inhibiting dissociation of invariant (gamma) chains from aα-β dimers in B cells. *J Exp Med* 1985;162:1371–1376.
196. Guagliardi LE, Koppelman B, Blum JS, Marks MS, Cresswell P, Brodsky FM. Co-localization of molecules involved in antigen processing and presentation in an early endocytic compartment. *Nature* 1990;343:133–139.
197. Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 1991;349:669–676.
198. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997;388:782–787.
199. Pierre P, Turley SJ, Gatti E, et al. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 1997;388:787–792.
200. Bakke O, Dobberstein B. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 1990;63:707–716.
201. Lotteau V, Teyton L, Peleraux A, et al. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 1990;348:600–605.
202. Romagnoli P, Layet C, Yewdell J, Bakke O, Germain RN. Relationship between invariant chain expression and MHC Class II transport into early and late endocytic compartments. *J Exp Med* 1993;177:583–596.
203. Pieters J, Bakke O, Dobberstein B. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* 1993;106:831–846.
204. Bremnes B, Madsen T, Gedde-Dahl M, Bakke O. An LI and ML motif in the cytoplasmic tail of the MHC-associated invariant chain mediate rapid internalization. *J Cell Sci* 1994;107:2021–2032.
205. Odorizzi CG, Trowbridge IS, Xue L, Hopkins CR, Davis CD, Collawn JF. Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J Cell Biol* 1994;126:317–330.
206. Arneson LS, Miller J. Efficient endosomal localization of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes requires multimerization of the invariant chain targeting sequence. *J Cell Biol* 1995;129:1217–1228.
207. Gorvel JP, Escola JM, Stang E, Bakke O. Invariant chain induces a delayed transport from early to late endosomes. *J Biol Chem* 1995;270:2741–2746.
208. Layet C, Germain RN. Invariant chain promotes egress of poorly expressed, haplotype-mismatched class II major histocompatibility complex AαAβ dimers from the endoplasmic reticulum/cis-Golgi compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:2346–2350.
209. Anderson MS, Miller J. Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2282–2286.
210. Viville S, Neefjes J, Lotteau V, et al. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 1993;72:635–648.
211. Bikoff EK, Huang L-Y, Episkopou V, Van Meerwijk J, Germain RN, Robertson EJ. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4⁺ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J Exp Med* 1993;177:1699–1712.
212. Elliott EA, Drake JR, Amigorena S, et al. The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med* 1994;179:681–694.
213. Schaiff WT, Hruska KA Jr, McCourt DW, Green M, Schwartz BD. HLA-DR associates with specific stress proteins and is retained in the endoplasmic reticulum in invariant chain negative cells. *J Exp Med* 1992;176:657–666.
214. Busch R, Cloutier I, Sékaly R-P, Hämmerling GJ. Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 1996;15:418–428.
215. Riberdy JM, Newcomb JR, Surman MJ, Barbosa JA, Cresswell P. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 1992;360:474–477.
216. Romagnoli P, Germain RN. The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating MHC class II folding, transport, and peptide occupancy. *J Exp Med* 1994;180:1107–1113.
217. Morkowski S, Goldrath AW, Eastman S, et al. T cell recognition of major histocompatibility complex class II complexes with invariant chain processing intermediates. *J Exp Med* 1995;182:1403–1413.
218. Zhong G, Castellino F, Romagnoli P, Germain RN. Evidence that binding site occupancy is necessary and sufficient for effective major histocompatibility complex (MHC) class II transport through the secretory pathway redefines the primary function of class II-associated invariant chain peptides (CLIP). *J Exp Med* 1996;184:2061–2066.
219. Cresswell P. Intracellular class II HLA antigens are accessible to transferrin-neuraminidase conjugates internalized by receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:8188–8192.
220. Castellino F, Germain RN. Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity* 1995;1:73–88.
221. Benaroch P, Yilla M, Raposo G, et al. How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J* 1995;14:37–49.
222. Kleijmeer MJ, Morkowski S, Griffith JM, Rudensky AY, Geuze HJ. Major histocompatibility complex class II compartments in human. *J Cell Biol* 1997;139:639–649.
223. Warmerdam PA, Long EO, Roche PA. Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J Cell Biol* 1996;133:281–291.
224. Ludwig T, Griffiths G, Hoflack B. Distribution of newly synthesized lysosomal enzymes in the endocytic pathway of normal rat kidney cells. *J Cell Biol* 1991;115:1561–1572.
225. Salamero J, Le Borgne R, Saudrais C, Goud B, Hoflack B. Expression of major histocompatibility complex class II molecules in HeLa cells promotes the recruitment of AP-1 Golgi-specific assembly proteins on Golgi membranes. *J Biol Chem* 1996;271:30318–30321.
226. Blum JS, Fiani ML, Stahl PD. Proteolytic cleavage of ricin A chain in endosomal vesicles. Evidence for the action of endosomal proteases at both neutral and acidic pH. *J Biol Chem* 1991;266:22091–22095.
227. Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, et al. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 1996;4:357–366.
228. Neefjes JJ, Ploegh HL. Inhibition of endosomal proteolytic activity by leupeptin blocks surface expression of MHC class II molecules and their conversion to SDS resistance alpha beta heterodimers in endosomes. *EMBO J* 1992;11:411–416.
229. Loss G Jr, Sant AJ. Invariant chain retains MHC class II molecules in the endocytic pathway. *J Immunol* 1993;150:3187–3197.
230. Fineschi B, Arneson LS, Naujokas MF, Miller J. Proteolysis of major histocompatibility complex class II-associated invariant chain is regulated by the alternatively spliced gene product, p41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10257–10261.
231. Fineschi B, Sakaguchi K, Appella E, Miller J. The proteolytic environment involved in MHC class II-restricted antigen presentation can be modulated by the p41 form of invariant chain. *J Immunol* 1996;157:3211–3215.
232. Wubbolts R, Fernandez-Borja M, Oomen L, et al. Direct vesicular transport of MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface. *J Cell Biol* 1996;135:611–622.
233. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996;183:1161–1172.
234. Lapham CK, Bacik I, Yewdell JW, Kane KP, Bennink JR. Class I molecules retained in the endoplasmic reticulum bind to antigenic peptides. *J Exp Med* 1993;177:1633–1641.
235. Porgador A, Yewdell JW, Deng Y, Bennink JR, Germain RN. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* 1997;6:715–726.
236. Monaco JJ, Cho S, Attaya M. Transport protein genes in the murine MHC: Possible implications for antigen processing. *Science* 1990;250:1723–1726.
237. Deverson EV, Gow IR, Coadwell WJ, Monaco JJ, Butcher GW, Howard JC. MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* 1990;348:738–741.
238. Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the "ABC" superfamily of transporters. *Nature* 1990;348:741–744.
239. Spies T, Bresnahan M, Bahram S, et al. A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* 1990;348:744–747.
240. Spies T, DeMars R. Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature* 1991;351:323–324.
241. Powis SJ, Townsend AR, Deverson EV, Bastin J, Butcher GW, Howard JC. Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature* 1991;354:528–531.
242. Spies T, Cerundolo V, Colonna M, Cresswell P, Townsend A, DeMars R. Presen-

tation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature* 1992;355:644–646.
243. Kelly A, Powis SH, Kerr LA, et al. Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* 1992;355:641–644.
244. Kleijmeer MJ, Kelly A, Geuze HJ, Slot JW, Townsend A, Trowsdale J. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and 'cis-Golgi. *Nature* 1992;357:342–344.
245. Powis SJ, Deverson EV, Coadwell WJ, et al. Effect of polymorphism of an MHC-linked transporter on the peptides assembled in a class-I molecule. *Nature* 1992;357:211–215.
246. Neefjes JJ, Momburg F, Hämmerling GJ. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 1993;261:769–771.
247. Androlewicz MJ, Anderson KS, Cresswell P. Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:9130–9134.
248. Androlewicz MJ, Cresswell P. Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity* 1994;1:7–14.
249. Momburg F, Roelse J, Hämmerling GJ, Neefjes JJ. Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med* 1994;179:1613–1623.
250. Neefjes J, Gottfried E, Roelse J, et al. Analysis of the fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters. *Eur J Immunol* 1995;25:1133–1136.
251. Momburg F, Roelse J, Howard JC, Butcher GW, Hämmerling GJ, Neefjes JJ. Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature* 1994;367:648–651.
252. Powis SJ, Young LL, Joly E et al. The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* 1996;4:159–165.
253. Androlewicz MJ, Ortmann B, van Endert PM, Spies T, Cresswell P. Characteristics of peptide and major histocompatibility complex class I/β2-microglobulin binding to the transporters associated with antigen processing (TAP1 and TAP2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:12716–12720.
254. Nijenhuis M, Schmitt S, Armandola EA, Obst R, Brunner J, Hämmerling GJ. Identification of a contact region for peptide on the TAP1 chain of the transporter associated with antigen processing. *J Immunol* 1996;156:2186–2195.
255. Neisig A, Wubbolts R, Zang X, Melief C, Neefjes J. Allele-specific differences in the interaction of MHC class I molecules with transporters associated with antigen processing. *J Immunol* 1996;156:3196–3206.
256. Peters JM. Proteasomes: Protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci* 1994;19:377–382.
257. Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 1992;357:375–379.
258. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994;78:761–771.
259. Harding CV, France J, Song R, et al. Novel dipeptide aldehydes are proteasome inhibitors and block the MHC-I antigen-processing pathway. *J Immunol* 1995; 155:1767–1775.
260. Belich MP, Glynne RJ, Senger G, Sheer D, Trowsdale J. Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC- encoded LMP proteins. *Curr Biol* 1994;4:769–776.
261. Fruh K, Gossen M, Wang K, Bujard H, Peterson PA, Yang Y. Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: A newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *EMBO J* 1994; 13:3236–3244.
262. Groettrup M, Kraft R, Kostka S, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur J Immunol* 1996;26:863–869.
263. Nandi D, Jiang H, Monaco JJ. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J Immunol* 1996;156:2361–2364.
264. Momburg F, Ortiz-Navarrete V, Neefjes J, et al. Proteasome subunits encoded in the major histocompatibility complex are not essential for antigen presentation. *Nature* 1992;360:174–177.
265. Yewdell J, Lapham C, Bacik I, Spies T, Bennink J. MHC-encoded proteasome subunits LMP2 and LMP7 are not required for efficient antigen presentation. *J Immunol* 1994;152:1163–1170.
266. Driscoll J, Brown MG, Finley D, Monaco JJ. MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* 1993;365: 262–264.
267. Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 1993;365: 264–267.
268. Gaczynska M, Rock KL, Spies T, Goldberg AL. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91: 9213–9217.
269. Eggers M, Boes-Fabian B, Ruppert T, Kloetzel PM, Koszinowski UH. The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. *J Exp Med* 1995;182:1865–1870.
270. Sibille C, Gould KG, Willard-Gallo K, et al. LMP2+ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Curr Biol* 1995;5:923–930.
271. Groettrup M, Ruppert T, Kuehn L, et al. The interferon-gamma-inducible 11 S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20 S proteasome in vitro. *J Biol Chem* 1995;270:23808–23815.
272. Groettrup M, Soza A, Eggers M, et al. A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* 1996;381:166–168.
273. Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: Mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *Faseb J* 1994;8:182–191.
274. Varshavsky A. The N-end rule. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1995;60: 461–478.
275. Grant EP, Michalek MT, Goldberg AL, Rock KL. Rate of antigen degradation by the ubiquitin-proteasome pathway influences MHC class I presentation. *J Immunol* 1995;155:3750–3758.
276. Staerz UD, Karasuyama H, Garner AM. Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein. *Nature* 1987;329:449–451.
277. Carbone FR, Bevan MJ. Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J Exp Med* 1990;171:377–387.
278. Rock KL, Gamble S, Rothstein L. Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* 1990;249:918–921.
279. Matzinger P, Bevan MJ. Induction of H-2-restricted cytotoxic T cells: In vivo induction has the appearance of being unrestricted. *Cell Immunol* 1977;33:92–100.
280. Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 1995;267:243–246.
281. Reis e Sousa C, Germain RN. MHC class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med* 1995;182:841–852.
282. Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 1997;158:2723–2730.
283. Norbury CC, Hewlett LJ, Prescott AR, Shastri N, Watts C. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* 1995;3:783–791.
284. Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren HG, Watts C. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997;27:280–288.
285. Isenman LD, Dice JF. Secretion of intact proteins and peptide fragments by lysosomal pathways of protein degradation. *J Biol Chem* 1989;264:21591–21596.
286. Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 1989;246: 382–385.
287. Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 1993;361:359–362.
288. Harding CV, Song R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* 1994;153:4925–4933.
289. Schirmbeck R, Melber K, Reimann J. Hepatitis B virus small surface antigen particles are processed in a novel endosomal pathway for major histocompatibility complex class I-restricted epitope presentation. *Eur J Immunol* 1995;25: 1063–1070.
290. Bachmann MF, Oxenius A, Pircher H, et al. TAP1-independent loading of class I molecules by exogenous viral proteins. *Eur J Immunol* 1995;25:1739–1743.
291. Bevan MJ. Class discrimination in the world of immunology. *Nature* 1987; 325:192–194.
292. Palladino MJ, Srivastava PK, Oettgen HF, DeLeo AB. Expression of a shared tumor-specific antigen by two chemically induced BALB/c sarcomas. *Cancer Res* 1987;47:5074–5079.
293. Lammert E, Arnold D, Nijenhuis M, et al. The endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96 binds peptides translocated by TAP. *Eur J Immunol* 1997; 27:923 927.
294. Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 1995;269:1585–1588.
295. Manickan E, Karem KL, Rouse BT. DNA vaccines—a modern gimmick or a boon to vaccinology?. *Crit Rev Immunol* 1997;17:139–154.
296. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:11478–11482.
297. Ulmer JB, Deck RR, Dewitt CM, Donnhly JI, Liu MA. Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: Antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* 1996;89:59–67.
298. Roche PA, Cresswell P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 1990;345:615–618.
299. Teyton L, O'Sullivan D, Dickson PW, et al. Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 1990; 348:39–44.
300. Busch R, Vturina IY, Drexler J, Momburg F, Hämmerling GJ. Poor loading of

major histocompatibility complex class II molecules with endogenously synthesized short peptides in the absence of invariant chain. *Eur J Immunol* 1995; 25:48–53.
301. Mason K, McConnell HM. Short-lived complexes between myelin basic protein peptides and IAk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:12463–12466.
302. Harding CV, Unanue ER. Cellular mechanisms of antigen processing and the function of class I and II major histocompatibility complex molecules. *Cell Regul* 1990;1:499–509.
303. Amigorena S, Drake JR, Webster P, Mellman I. Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 1994;369:113–120.
304. Qiu Y, Xu X, Wandinger-Ness A, Dalke DP, Pierce SK. Separation of subcellular compartments containing distinct functional forms of MHC class II. *J Cell Biol* 1994;125:595–605.
305. Tulp A, Verwoerd D, Dobberstein B, Ploegh HL, Pieters J. Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature* 1994;369:120–126.
306. West MA, Lucocq JM, Watts C. Antigen processing and class II MHC peptide-loading in human B-lymphoblastoid cells. *Nature* 1994;369:147–151.
307. Sercarz EE, Lehmann PV, Ametani A, Benichou G, Miller A, Moudgil K. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:729–766.
308. Simitsek PD, Campbell DG, Lanzavecchia A, Fairweather N, Watts C. Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J Exp Med* 1995;181:1957–1963.
309. Frosch S, Bonifas U, Reske-Kunz AB. The capacity of bone marrow-derived macrophages to process bovine insulin is regulated by lymphokines. *Int Immunol* 1993;5:1551–1558.
310. Zhong G, Romagnoli P, Germain RN. Related leucine-based cytoplasmic targeting signals in invariant chain and major histocompatibility complex class II molecules control endocytic presentation of distinct determinants in a single protein. *J Exp Med* 1997;185:429–438.
311. Avva RR, Cresswell P. In vivo and in vitro formation and dissociation of HLA-DR complexes with invariant chain-derived peptides. *Immunity* 1994;1:763–774.
312. Urban RG, Chicz RM, Strominger JL. Selective release of some invariant chain-derived peptides from HLA-DR1 molecules at endosomal pH. *J Exp Med* 1994;180:751–755.
313. Kropshofer H, Vogt AB, Stern LJ, Hämmerling GJ. Self-release of CLIP in peptide loading of HLA-DR molecules. *Science* 1995;270:1357–1359.
314. Sette A, Ceman S, Kubo RT, et al. Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen-processing mutant. *Science* 1992;258:1801–1804.
315. Morris P, Shaman J, Attaya M, et al. An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* 1994;368:551–554.
316. Fling SP, Arp B, Pious D. HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* 1994;368:554–558.
317. Denzin LK, Robbins NF, Carboy-Newcomb C, Cresswell P. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1994;1:595–606.
318. Sanderson F, Kleijmeer MJ, Kelly A, et al. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* 1994;266:1566–1569.
319. Marks MS, Roche PA, van Donselaar E, Woodruff L, Peters PJ, Bonifacino JS. A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the β chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J Cell Biol* 1995;131:351–369.
320. Copier J, Kleijmeer MJ, Ponnambalam S, et al. Targeting signal and subcellular compartments involved in the intracellular trafficking of HLA-DMB. *J Immunol* 1996;157:1017–1027.
321. Sanderson F, Thomas C, Neefjes J, Trowsdale J. Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo. *Immunity* 1996;4:87–96.
322. Denzin LK, Hammond C, Cresswell P. HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J Exp Med* 1996;184:2153–2166.
323. Sloan VS, Cameron P, Porter G, et al. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 1995;375:802–806.
324. Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 1995;82:155–165.
325. Sherman MA, Weber DA, Jensen PE. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* 1995;3:197–205.
326. Weber DA, Evavold BD, Jensen PE. Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* 1996;274:618–620.
327. Kropshofer H, Vogt AB, Moldenhauer G, Hammer J, Blum JS, Hämmerling GJ. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J* 1996;15:6144–6154.
328. Katz JF, Stebbins C, Appella E, Sant AJ. Invariant chain and DM edit self-peptide presentation by major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. *J Exp Med* 1996;184:1747–1753.
329. van Ham SM, Gruneberg U, Malcherek G, Broker I, Melms A, Trowsdale J. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs. *J Exp Med* 1996;184:2019–2024.
330. Denzin LK, Sant'Angelo DB, Hammond C, Surman MJ, Cresswell P. Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. *Science* 1997;278:106–109.
331. Kropshofer H, Arndt SO, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Vogt AB. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* 1997;6:293–302.
332. Collins DS, Unanue ER, Harding CV. Reduction of disulfide bonds within lysosomes is a key step in antigen processing. *J Immunol* 1991;147:4054–4059.
333. Deng H, Apple R, Clare-Salzler M, et al. Determinant capture as a possible mechanism of protection afforded by major histocompatibility complex class II molecules in autoimmune disease. *J Exp Med* 1993;178:1675–1680.
334. Castellino F, Zappacosta F, Coligan JE, Germain RN. (submitted for publication).
335. Nadimi F, Moreno J, Momburg F, et al. Antigen presentation of hen egg-white lysozyme but not of ribonuclease A is augmented by the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain. *Eur J Immunol* 1991;21:1255–1263.
336. Peterson M, Miller J. Antigen presentation enhanced by the alternatively spliced invariant chain gene product p41. *Nature* 1992;357:596–598.
337. Ceman S, Sant AJ. The function of invariant chain in class II-restricted antigen presentation. *Semin Immunol* 1995;7:373–387.
338. Stebbins CC, Loss GJ, Elias CG, Chervonsky A, Sant AJ. The requirement for DM in class II-restricted antigen presentation and SDS-stable dimer formation is allele and species dependent. *J Exp Med* 1995;181:223–234.
339. Momburg F, Fuchs S, Drexler J, et al. Epitope-specific enhancement of antigen presentation by invariant chain. *J Exp Med* 1993;178:1453–1458.
340. Davis JE, Cresswell P. Lack of detectable endocytosis of B lymphocyte MHC class II antigens using an antibody-independent technique. *J Immunol* 1990;144: 990–997.
341. Reid PA, Watts C. Cycling of cell-surface MHC glycoproteins through primaquine-sensitive intracellular compartments. *Nature* 1990;346:655–657.
342. Weber DA, Buck LB, Delohery TM, Agostino N, Pernis B. Class II MHC molecules are spontaneously internalized in acidic endosomes by activated B cells. *J Mol Cell Immunol* 1990;4;255–266.
343. Pinet V, Vergelli M, Martin R, Bakke O, Long EO. Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature* 1995;375:603–606.
344. Smiley ST, Laufer TM, Lo D, Glimcher LH, Grusby MJ. Transgenic mice expressing MHC class II molecules with truncated A beta cytoplasmic domains reveal signaling-independent defects in antigen presentation. *Int Immunol* 1995;7:665–677.
345. Castellino F, Zhong G, Germain RN. Antigen presentation by MHC class II molecules: Invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum Immunol* 1997;54:159–169.
346. Nelson CA, Petzold SJ, Unanue ER. Peptides determine the lifespan of MHC class II molecules in the antigen-presenting cell. *Nature* 1994;371:250–252.
347. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: Downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182:389–400.
348. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 1985;314:537–539.
349. Rock KL, Benacerraf B, Abbas AK. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors. *J Exp Med* 1984;160:1102–1113.
350. Mitchell RN, Barnes KA, Grupp SA, et al. Intracellular targeting of antigens internalized by membrane immunoglobulin in B lymphocytes. *J Exp Med* 1995;181:1705–1714.
351. Weiser P, Muller R, Braun U, Reth M. Endosomal targeting by the cytoplasmic tail of membrane immunoglobulin. *Science* 1997;276:407–409.
352. Bonnerot C, Lankar D, Hanau D, et al. Role of B cell receptor Ig alpha and Ig beta subunits in MHC class II-restricted antigen presentation. *Immunity* 1995;3: 335–347.
353. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995;375:151–155.
354. Snider DP, Segal DM. Targeted antigen presentation using crosslinked antibody heteroaggregates. *J Immunol* 1987;139:1609–1616.
355. Lichtman AH, Tony HP, Parker DC, Abbas AK. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. IV. Comparative ability of B cells to present specific antigen and anti-immunoglobulin antibody. *J Immunol* 1987;138:2822–2825.
356. Casten LA, Kaumaya P, Pierce SK. Enhanced T cell responses to antigenic peptides targeted to B cell surface Ig, Ia, or class I molecules. *J Exp Med* 1988;168: 171–180.
357. Amigorena S, Salamero J, Davoust J, Fridman WH, Bonnerot C. Tyrosine-containing motif that transduces cell activation signals also determines internalization and antigen presentation via type-III receptors for IgG. *Nature* 1992;358:337–341.
358. Siliciano RF, Lawton T, Knall C, et al. Analysis of host-virus interactions in AIDS with anti-gp120 T cell clones: Effect of HIV sequence variation and a mechanism for $CD4^+$ cell depletion. *Cell* 1988;54:561–575.
359. Long EO. Antigen processing for presentation to $CD4^+$ T cells. *New Biol* 1992;4: 274–282.
360. Weiss S, Bogen B. MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen.

Cell 1991;64:767–776.

361. Jacobson S, Sekaly RP, Bellini WJ, Johnson CL, McFarland HF, Long EO. Recognition of intracellular measles virus antigens by HLA class II restricted measles virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1988;540:352–353.
362. Jin Y, Shih WK, Berkower I. Human T cell response to the surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg). Endosomal and nonendosomal processing pathways are accessible to both endogenous and exogenous antigen. *J Exp Med* 1988;168:293–306.
363. Malnati MS, Marti M, LaVaute T et al. Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* 1992;357:702–704.
364. Long EO, LaVaute T, Pinet V, Jaraquemada D. Invariant chain prevents the HLA-DR-restricted presentation of a cytosolic peptide. *J Immunol* 1994;153: 1487–1494.
365. Dodi AI, Brett S, Nordeng T, et al. The invariant chain inhibits presentation of endogenous antigens by a human fibroblast cell line. *Eur J Immunol* 1994;24:1632–1639.
366. Cresswell P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 1994;12:259–293.
367. York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996;14:369–396.
368. Rothman JE. Polypeptide chain binding proteins: Catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell* 1989;59:591–601.
369. Alexander J, Payne JA, Murray R, Frelinger JA, Cresswell P. Differential transport requirements of HLA and H-2 class I glycoproteins. *Immunogenetics* 1989;29:380–388.
370. Ortiz-Navarrete V, Hämmerling GJ. Surface appearance and instability of empty H-2 class I molecules under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3594–3597.
371. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991;254:1643–1647.
372. Karttunen J, Sanderson S, Shastri N. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:6020–6024.
373. Sanderson S, Campbell DJ, Shastri N. Identification of a $CD4^+$ T cell-stimulating antigen of pathogenic bacteria by expression cloning. *J Exp Med* 1995;182: 1751–1757.
374. Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: Refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3429–3433.
375. Kozono H, White J, Clements J, Marrack P, Kappler J. Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides. *Nature* 1994;369:151–154.
376. Ignatowicz L, Winslow G, Bill J, Kappler J, Marrack P. Cell surface expression of class II MHC proteins bound by a single peptide. *J Immunol* 1995;154:3852–3862.
377. Matsui K, Boniface JJ, Reay PA, Schild H, Fazekas de St. Groth B, Davis MM. Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* 1991;254:1788–1791.
378. Corr M, Slanetz AE, Boyd LF, et al. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: Affinity, kinetics, and specificity. *Science* 1994;265:946–949.
379. Matsui K, Boniface JJ, Steffner P, Reay PA, Davis MM. Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-E^k complexes: Correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:12862–12866.
380. Alam SM, Travers PJ, Wung JL, et al. T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 1996;381:616–620.
381. Lyons DS, Lieberman SA, Hampl J, et al. A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists. *Immunity* 1996;5:53–61.
382. Altman JD, Moss PAH, Goulder PJR, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996;274:94–96.
383. Plaksin D, Polakova K, McPhie P, Margulies DH. A three-domain T cell receptor is biologically active and specifically stains cell surface MHC/peptide complexes. *J Immunol* 1997;158:2218–2227.
384. Murphy DB, Rath S, Pizzo E, et al. Monoclonal antibody detection of a major self peptide–MHC class-II complex. *J Immunol* 1992;148:3483–3491.
385. Andersen PS, Stryhn A, Hansen BE, Fugger L, Engberg J, Buus S. A recombinant antibody with the antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:1820–1824.
386. Zhong G, Reis e Sousa C, Germain RN. Antigen-unspecific B cells and lymphoid dendritic cells both show extensive surface expression of processed antigen-major histocompatibility complex class II complexes after soluble protein exposure in vivo or in vitro. *J Exp Med* 1997;186:673–682.
387. Dadaglio G, Nelson CA, Deck MB, Petzold SJ, Unanue ER. Characterization and quantitation of peptide-MHC complexes produced from hen egg lysozyme using a monoclonal antibody. *Immunity* 1997;6:727–738.
388. Zhong G, Reis e Sousa C, Germain RN. Production, specificity, and functionality of monoclonal antibodies to specific peptide:MHC class II complexes formed by active processing of exogenous protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 (in press).
389. Eisenlohr LC, Yewdell JW, Bennink JR. Flanking sequences influence the presentation of an endogenously synthesized peptide to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1992;175:481–487.
390. Niedermann G, Butz S, Ihlenfeldt HG, et al. Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity* 1995;2:289–299.
391. Pircher H, Moskophidis D, Rohrer U, Bürki K, Hengartner H, Zinkernagel RM. Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants in vivo. *Nature* 1990;346:629–633.
392. Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, et al. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* 1997;3:212–217.
393. Klenerman P, Rowland JS, McAdam S, et al. Cytotoxic T-cell activity antagonized by naturally occurring HIV-1 Gag variants. *Nature* 1994;369:403–407.
394. Bertoletti A, Sette A, Chisari FV, et al. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* 1994;369:407–410.
395. Nagy ZA, Lehmann PV, Falcioni F, Muller S, Adorini L. Why peptides? Their possible role in the evolution of MHC-restricted T-cell recognition. *Immunol Today* 1989;10:132–138.
396. Lorenz RG, Tyler AN, Allen PM. Reconstruction of the immunogenic peptide RNase (43-56) by identification and transfer of the critical residues into an unrelated peptide backbone. *J Exp Med* 1989;170:203–215.
397. Alexander MA, Damico CA, Wieties KM, Hansen TH, Connolly JM. Correlation between CD8 dependency and determinant density using peptide-induced, L^d-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1991;173:849–858.
398. Hill AVS, Elvin J, Willis AC, et al. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 1992;360:434–439.
399. Swain SL. T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol Rev* 1983;74:129–142.
400. Biddison WE, Shaw S. Possible involvement of the OKT4 molecule in T-cell recognition of class II HLA antigens. *Diagn Immunol* 1983;1:112–115.
401. Pamer EG, Harty JT, Bevan MJ. Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of Listeria monocytogenes. *Nature* 1991;353:852–855.
402. Schafer R, Portnoy DA, Brassell SA, Paterson Y. Induction of a cellular immune response to a foreign antigen by a recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine. *J Immunol* 1992;149:53–59.
403. Shinohara N, Watanabe M, Sachs DH, Hozumi N. Killing of antigen-reactive B cells by class II-restricted, soluble antigen-specific $CD8^+$ cytolytic T lymphocytes. *Nature* 1988;336:481–484.
404. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by $CD4^+$ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994;12:635–673.
405. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive $CD4^+$ T cells. *J Immunol* 1995; 154:5071–5079.
406. Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J Exp Med* 1995; 181:713–721.
407. Reis e Sousa C, Hieny S, Scharton-Kersten T et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 L-independent production of Interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 1997;186:1819–1829.
408. Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 1994;264:961–965.
409. Yewdell J, Bennink J, Smith G, Moss B. Use of recombinant vaccinia viruses to examine cytotoxic T lymphocyte recognition of individual viral proteins. *Adv Exp Med Biol* 1988;239:151–161.
410. Collins DS, Findlay K, Harding CV. Processing of exogenous liposome-encapsulated antigens in vivo generates class I MHC-restricted T cell responses. *J Immunol* 1992;148:3336–3341.
411. Reddy R, Zhou F, Nair S, Huang L, Rouse BT. In vivo cytotoxic T lymphocyte induction with soluble proteins administered in liposomes. *J Immunol* 1992;148: 1585–1589.
412. Takahashi H, Takeshita T, Morein B, Putney S, Germain RN, Berzofsky JA. Induction of $CD8^+$ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. *Nature* 1990;344:873–875.
413. Schild H, Deres K, Wiesmüller KH, Jung G, Rammensee HG. Efficiency of peptides and lipopeptides for in vivo priming of virus-specific cytotoxic T cells. *Eur J Immunol* 1991;21:2649–2654.
414. Kast WM, Roux L, Curren J, et al. Protection against lethal Sendai virus infection by in vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:2283–2287.
415. Rees MA, Rosenberg AS, Munitz TI, Singer A. In vivo induction of antigen-specific transplantation tolerance to Qa1a by exposure to alloantigen in the absence of T-cell help. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2765–2769.
416. Guerder S, Matzinger P. A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance. *J Exp Med* 1992;176:553–564.
417. Mitchison NA. Linked help in the cytotoxic T-cell response revealed by adoptive transfer. *Transplant Proc* 1983;15:2121–2124.
418. Spriggs MK. One step ahead of the game: Viral immunomodulatory molecules. *Annu Rev Immunol* 1996;14:101–130.
419. Ploegh HL. Trafficking and assembly of MHC molecules: How viruses elude the immune system. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1995;60:263–266.
420. Hill A, Jugovic P, York I, et al. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade

host immunity. *Nature* 1995;375:411–415.
421. Ahn K, Meyer TH, Uebel S, et al. Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by simplex virus ICP47. *EMBO J* 1996;15:3247–3255.
422. Tomazin R, Hill AB, Jugovic P et al. Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the binding site of TAP. *EMBO J* 1996;15:3256–3266.
423. Ahn K, Gruhler A, Galocha B, et al. The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* 1997;6: 613–621.
424. Lehner PJ, Karttunen JT, Wilkinson GW, Cresswell P. The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6904–6909.
425. Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 1996;84:769–779.
426. Wiertz EJ, Tortorella D, Bogyo M, et al. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 1996;384:432–438.
427. Machold RP, Wiertz EJ, Jones TR, Ploegh HL. The HCMV gene products US11 and US2 differ in their ability to allelic forms of murine major histocompatibility complex (MHC) class heavy chains. *J Exp Med* 1997;185:363–366.
428. Kerkau T, Bacik I, Bennink JR, et al. The human immunodeficiency virus type I (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J Exp Med* 1997;185: 1295–1305.
429. Pääbo S, Severinsson L, Andersson M, Martens I, Nilsson T, Peterson PA. Adenovirus proteins and MHC expression. *Adv Cancer Res* 1989:52:151–163.
430. Howcroft TK, Strebel K, Martin MA, Singer DS. Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV. *Science* 1993;260:1320–1322.
431. Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 1996;2:338–342.
432. Spriggs MK, Armitage RJ, Comeau MR, et al. The extracellular domain of the Epstein-Barr virus BZLF2 protein binds the HLA-DRb chain and inhibits antigen presentation. *J Virol* 1996;70:5557–5563.
433. Klausner RD. Architectural editing: Determining the fate of newly synthesized membrane proteins. *New Biol* 1989;1:3–8.
434. Nilsson T, Jackson M, Peterson PA. Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 1989;58:707–718.
435. Howcroft TK, Palmer LA, Brown J, et al. HIV Tat represses transcription through Sp1-like elements in the promoter. *Immunity* 1995;3:127–138.
436. Long EO, Burshtyn DN, Clark WP, et al. Killer cell inhibitory receptors: Diversity, specificity, and function. *Immunol Rev* 1997;155:135–144.
437. Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, et al. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* 1995;2:439–449.
438. Raulet DH, Held W, Correa I, Dorfman JR, Wu MF, Corral L. Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors. *Immunol Rev* 1997;155:41–52.
439. Christiansen FT, Witt CS, Ciccone E, et al. Human natural killer (NK) alloreactivity and its association with the major histocompatibility complex: Ancestral haplotypes encode particular NK-defined haplotypes. *J Exp Med* 1993;178: 1033–1039.
440. Malnati MS, Peruzzi M, Parker KC, et al. Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science* 1995;267:1016–1018.
441. Rajagopalan S, Long EO. The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4 exhibits peptide selectivity. *J Exp Med* 1997;185:1523–1528.
442. Yokoyama WM, Daniels BF, Seaman WE, Hunziker R, Margulies DH, Smith HR. A family of murine NK cell receptors specific for target cell MHC class I molecules. *Semin Immunol* 1995;7:89–101.
443. Burshtyn DN, Scharenberg AM, Wagtmann N, et al. Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity* 1996;4:77–85.
444. Nakamura MC, Niemi EC, Fisher MJ, Shultz LD, Seaman WE, Ryan JC. Mouse Ly-49A interrupts early signaling events in natural killer cell cytotoxicity and functionally associates with the SHP-1 tyrosine phosphatase. *J Exp Med* 1997; 185:673–684.
445. Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986;319:675–678.
446. Kees U, Blanden RV. A single genetic element in H-2K affects mouse T cell antiviral function in poxvirus infection. *J Exp Med* 1976;143:450–455.
447. Katz DH, Katz LR, Bogowitz CA. Haplotype preference in lymphocyte differentiation. II. F1 hybrid helper T cells generated with antigen-bearing parental macrophages can cooperate with B lymphocytes of either parent. *Cell Immunol* 1979;42:124–138.
448. Thomas DW, Shevach EM. Nature of the antigenic complex recognized by T lymphocytes: Specific sensitization by antigens associated with allogeneic macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:2104–2108.
449. Doherty PC, Bennink JR. Vaccinia specific cytotoxic T-cell responses in the context of H-2 antigens not encountered in the thymus may reflect aberrant recognition of a virus-H-2 complex. *J Exp Med* 1979;149:150–157.
450. Lemonnier F, Burakoff SJ, Germain RN, Benacerraf B. Cytolytic thymus-derived lymphocytes specific for allogeneic stimulator cells crossreact with chemically modified syngeneic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:1229–1233.
451. Hünig T, Bevan MJ. Specificity of T-cell clones illustrates altered self hypothesis. *Nature* 1981;294:460–462.
452. Schwartz RH. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1985;3: 237–261.
453. Claverie JM, Kourilsky P. The peptidic self model: A reassessment of the role of the major histocompatibility complex molecules in the restriction of the T-cell response. *Ann Inst Pasteur Immunol* 1986;137D:425–442.
454. Ajitkumar P, Geier SS, Kesari KV et al. Evidence that multiple residues on both the alpha-helices of the class I MHC molecule are simultaneously recognized by the T cell receptor. *Cell* 1988;54:47–56.
455. Zerrahn J, Held W, Raulet DH. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell* 1997;88:627–636.
456. Liao NS, Maltzman J, Raulet DH. Positive selection determines T cell receptor V beta 14 gene usage by $CD8^-$ T cells. *J Exp Med* 1989;170:135–143.
457. Jameson SC, Kaye J, Gascoigne NR. A T cell receptor V alpha region selectively expressed in $CD4^+$ cells. *J Immunol* 1990;145:1324–1331.
458. Lucas B, Vasseur F, Penit C. Stochastic coreceptor shut-off is restricted to the CD4 lineage maturation pathway. *J Exp Med* 1995;181:1623–1633.
459. Asmuss A, Hofmann K, Hochgrebe T, Giegerich G, Hunig T, Herrmann T. Alleles of highly homologous rat T cell receptor beta-chain variable segments 8.2 and 8.4: Strain-specific expression, reactivity to. *J Immunol* 1996;157:4436–4441.
460. Sorger SB, Paterson Y, Fink PJ, Hedrick SM. T cell receptor junctional regions and the MHC molecule affect the recognition of antigenic peptides by T cell clones. *J Immunol* 1990;144:1127–1135.
461. Germain RN. Making a molecular match. *Nature* 1990;344:19–22.
462. Bogue M, Candeias S, Benoist C, Mathis D. A special repertoire of α:β T cells in neonatal mice. *EMBO J* 1991;10:3647–3654.
463. Feeney AJ. Junctional sequences of fetal T cell receptor beta chains have few N regions. *J Exp Med* 1991;174:115–124.
464. Schumacher TNM, Ploegh HL. Are MHC-Bound peptides a nuisance for positive selection? *Immunity* 1994;1:721–723.
465. Nikolic-Zugic J, Bevan MJ. Role of self-peptides in positively selecting the T-cell repertoire. *Nature* 1990;344:65–67.
466. Hogquist KA, Gavin MA, Bevan MJ. Positive selection of $CD8^+$ T cells induced by major histocompatibility complex binding peptides in fetal thymic organ culture. *J Exp Med* 1993;177:1469–1473.
467. Ashton-Rickardt PG, Van Kaer L, Schumacher TN, Ploegh HL, Tonegawa S. Peptide contributes to the specificity of positive selection of $CD8^+$ T cells in the thymus. *Cell* 1993;73:1041–1049.
468. Jameson SC, Hogquist KA, Bevan MJ. Specificity and flexibility in thymic selection. *Nature* 1994;369:750–752.
469. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 1994;76:17–27.
470. Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR, et al. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 1994;76:651–663.
471. Ignatowicz L, Kappler J, Marrack P. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* 1996;84:521–529.
472. Miyazaki T, Wolf P, Tourne S, et al. Mice lacking H-2M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* 1996;84:531–541
473. Martin WD, Hicks GG, Mendiratta SK, Leva HI, Ruley HE, Van Kaer L. H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection. *Cell* 1996;84:543–550.
474. Surh CD, Lee DS, Fung-Leung WP, Karlsson L, Sprent J. Thymic selection by a single MHC/peptide ligand produces a semidiverse repertoire of $CD4^+$ T cells. *Immunity* 1997;7:209–219.
475. Pullen AM, Marrack P, Kappler JW. The T-cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens. *Nature* 1988;335:796–801.
476. von Boehmer H, Teh HS, Kisielow P. The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol Today* 1989;10:57–61.
477. Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of $CD4^+CD8^+$TCRlo thymocytes in vivo. *Science* 1990;250:1720–1723.
478. Spain LM, Berg LJ. Developmental regulation of thymocyte susceptibility to deletion by "self"-peptide. *J Exp Med* 1992;176:213–223.
479. Hogquist KA, Jameson SC, Bevan MJ. Strong agonist ligands for the T cell receptor do not mediate positive selection of functional $CD8^+$ T cells. *Immunity* 1995;3:79–86.
480. Vasquez NJ, Kaye J, Hedrick SM. In vivo and in vitro clonal deletion of double-positive thymocytes. *J Exp Med* 1992;175:1307–1316.
481. Pircher H, Rohrer UH, Moskophidis D, Zinkernagel RM, Hengartner H. Lower receptor avidity required for thymic clonal deletion than for effector T-cell function. *Nature* 1991;351:482–485.
482. Racioppi L, Ronchese F, Matis LA, Germain RN. Peptide-major histocompatibility complex class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signaling. *J Exp Med* 1993;177:1047–1060.
483. Valitutti S, Müller S, Dessing M, Lanzavecchia A. Different responses are

elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J. Exp. Med.* 1996;183:1917–1921.

484. Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 1996;273:104–106.
485. Itoh Y, Germain RN. Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intraclonal heterogeneity for individual cytokine responses of CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997;186:757–766.
486. Mannie MD. A unified model for T cell antigen recognition and thymic selection of the T cell repertoire. *J Theor Biol* 1991;151:169–192.
487. Evavold BD, Sloan-Lancaster J, Allen PM. Tickling the TCR: Selective T-cell functions stimulated by altered peptide ligands. *Immunol Today* 1993;14:602–609.
488. Jameson SC, Bevan MJ. T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity* 1995;2:1–11.
489. Madrenas J, Germain RN. Variant TCR ligands: New insights into the molecular basis of antigen-dependent signal transduction and T cell activation. *Semin Immunol* 1996;8:83–101.
490. Marrack P, Kappler J. T cells can distinguish between allogeneic major histocompatibility complex products on different cell types. *Nature* 1988;332:840–843.
491. Bix M, Raulet D. Inefficient positive selection of T cells directed by haematopoietic cells. *Nature* 1992;359:330–333.
492. Pawlowski TJ, Singleton MD, Loh DY, Berg R, Staerz UD. Permissive recognition during positive selection. *Eur J Immunol* 1996;26:851–857.
493. Sebzda E, Kundig TM, Thomson CT, et al. Mature T cell reactivity altered by peptide agonist that induces positive selection. *J Exp Med* 1996;183:1093–1104.
494. Fukui Y, Ishimoto T, Utsuyama M, et al. Positive and negative CD4+ thymocyte selection by a single MHC class II/peptide ligand affected by its expression level in the thymus. *Immunity* 1997;6:401–410.
495. Sebzda E, Wallace VA, Mayer J, Yeung RS, Mak TW, Ohashi PS. Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science* 1994;263:1615–1618.
496. Mannie MD, Rosser JM, White GA. Autologous rat myelin basic protein is a partial agonist that is converted into a full antagonist upon blockade of CD4. Evidence for the integration of efficacious and nonefficacious signals during T cell antigen recognition. *J Immunol* 1995;154:2642–2654.
497. Madrenas J, Chau LA, Smith J, Bluestone JA, Germain RN. The efficiency of CD4 recruitment to ligand-engaged TCR controls the agonist/partial agonist properties of peptide-MHC molecule ligands. *J Exp Med* 1997;185:219–230.
498. van Meerwijk JPM, Marguerat S, Lees RK, Germain RN, Fowlkes BJ, MacDonald HR. Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J Exp Med* 1997;185:377–384.
499. Matzinger P, Guerder S. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* 1989;338:74–76.
500. Schwartz RH. Acquisition of immunologic self-tolerance. *Cell* 1989;57:1073–1081.
501. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994;12:991–1045.
502. Schild H, Rötzschke O, Kalbacher H, Rammensee HG. Limit of T cell tolerance to self proteins by peptide presentation. *Science* 1990;247:1587–1589.
503. Salemi S, Caporossi AP, Boffa L, Longobardi MG, Barnaba V. HIVgp120 activates autoreactive CD4-specific T cell responses by unveiling of hidden CD4 peptides during processing. *J Exp Med* 1995;181:2253–2257.
504. Robbins PF, el-Gamil M, Li YF, et al. Cloning of a new gene encoding an antigen recognized by melanoma-specific HLA-A24-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 1995;154:5944–5950.
505. Takeda S, Rodewald HR, Arakawa H, Bluethmann H, Shimizu T. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 1996;5:217–228.
506. Tanchot C, Lemonnier FA, Perarnau B, Freitas AA, Rocha B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 1997;276:2057–2062.
507. Rooke R, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity* 1997;7:123–134.
508. Brocker T. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J. Exp. Med.* 1997;186:1223–1232.
509. Kirberg J, Berns A, von Boehmer H. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J. Exp. Med.* 1997;186:1269–1275.
510. van Oers NS, Tao W, Watts JD, Johnson P, Aebersold R, Teh HS. Constitutive tyrosine phosphorylation of the T-cell receptor (TCR) z subunit: Regulation of TCR-associated protein tyrosine kinase activity by TCR z. *Mol Cell Biol* 1993;13:5771–5780.
511. Grouard G, Durand I, Filgueira L, Banchereau J, Liu YJ. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature* 1996;384:364–367.

第10章 T细胞抗原受体

Mark M. Davis and Yueh-Hsiu Chien①

341 T 淋巴细胞的识别特性和 T 细胞抗原受体(TCR)的性质一直是免疫学家研究的难点,同时也是有争议的领域。但是,过去 15 年中,在调控 T 细胞识别的分子和基因的鉴定方面取得了巨大进展,最近几年来又得到它们生化和结构的基本信息。尽管 TCR 在结构和基因上与 B 细胞抗原受体[免疫球蛋白(Ig)]有许多相似性,但它们也拥有许多与其特有生物学功能相关的独特特征。

对于经典定义的辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞,这些区别中最重要的地方是由 Zinkernagel 和 Doherty[1,2] 的实验提示的,他们的结果表明细胞毒性 T 细胞识别病毒抗原可能仅仅与感染细胞上某一特定的 MHC 单体型(haplotype)有关。在辅助性 T 细胞中,也有证据表明存在 MHC 限制识别现象[3,4]。我们现在已知该类型 T 细胞的识别涉及对结合到特异 MHC 分子上的抗原片段(如肽)的识别(见第 8、9 章)。由于所有的抗原最终都会被降解,因而这种形式的 T 细胞识别似乎与 B 细胞识别十分互补,因为 B 细胞识别中,病原体可通过模糊抗体结合位点或雇佣"诱饵"分子逃避识别。

TCR 以两种不同的异二聚体形式存在,αβ 或 γδ,两者均与非多态性的 CD3 多肽 γ、δ、ε、ζ 链(在某种情况下为 ζ 的 RNA 剪切突变体 η 链)或与 FcεR Ⅰ γ 链一起表达。CD3 多肽,尤其是 ζ 及其突变体,对细胞内的信

① M. M. Dvais: Department of Microbiology and Immunology, Stanford University School of Medicine, Howard Hughes Medical Institute, Stanford, California 94305.

Y.-H. Chien: Department of Microbiology and Immunology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305.

号至关重要[5]。表达 αβTCR 异二聚体的细胞在人和小鼠的大多数淋巴组织(90% ~ 95%)中占主导地位，它们负责经典的辅助性或细胞毒性 T 细胞应答。多数情况下，αβTCR 配体是一个与Ⅰ类或Ⅱ类 MHC 分子结合的抗原肽。在人和小鼠的多数细胞中，γδ TCR T 细胞数目比 αβ 类型少。但它们在牛、绵羊、鸡的 T 淋巴细胞中占相当比例[6]。对 γδTCR 的结构特征和特异性研究表明它们在抗原识别特性方面比 αβTCR 更类似 Ig。尤其是它们似乎并不需要 MHC 蛋白或其他分子来呈递抗原，相反，似乎直接识别抗原[6]。尽管它们在免疫应答中所起的作用仍不清楚，但这依然是当前一个非常活跃的研究领域，许多有趣的线索正在探索中。 342

TCR 多肽

对负责 T 细胞识别的分子的研究首先集中于获得 T 细胞表面分子的特异性抗血清或单抗。最终有几个研究组鉴定到了“克隆型”的抗血清[7]或单抗[8~12]。其中一些抗体可阻断其所针对的 T 细胞的抗原特异性应答，或当被包被到某个表面时，可以激活特异的 T 细胞。它们可以从不同 T 细胞克隆或由两个相对分子质量为 40 000 ~ 50 000 的糖基化亚基，即被称为 α 和 β 亚单位组成的杂交瘤中免疫沉淀相对分子质量为 85 000 ~ 90 000的由二硫键结合的异二聚体。肽图谱研究表明：从不同特异性 T 细胞中分离得到的异二聚体存在显著多态性，提示这些抗原识别分子可能与 Ig 类似[13,14]。

与这些血清学研究相平行的工作探明了 B、T 细胞基因表达中大约 2% 的微小差别[15]。从小鼠[16,17]和人[18]中分离到了 T 细胞的特异基因，它们有抗体样的 V、J、C 区序列，并且在 T 淋巴细胞中可以重排[16]。对免疫沉淀物的部分序列分析表明此分子为 TCRβ[19]。随后的消减克隆工作很快阐明其他两个候选 TCR cDNA，鉴定为 TCRα[20,21]和 TCRγ[22]。以后不久便确定所有抗原特异的辅助性 T 细胞或细胞毒性 T 细胞均表达 TCRαβ 异二聚体。在 Brenner 等的工作之前，有关 TCRγ 表达于何处一直是个谜[23]。Brenner 等的研究表明它与另一多肽 TCRδ 表达于外周 T 细胞中很小一部分亚群中(5% ~ 10%)。直至在 TCRα 基因座内部，V_α 和 J_α 之间又发现了一个新的 TCR 基因座才弄清楚了 TCRδ 的结构[24]。这一基因部分产物的抗血清很快表明这一分子是 TCRδ[25~27]，基因转移实验提供了 TCRα 与 β 亚单位足以将抗原-MHC 识别从一个 T 细胞传递到另一个 T 细胞的正式证据[28,29]，用 γδTCR 也进行了同样的实验[30]。

如图 10.1 所示，所有 TCR 多肽都有相似的一级结构，有明显不同的 V 区，多样性区(D)(在 TCRβ 和 γ 中)，J 区和 C 区，与 Ig 对应部分类似[31]。它们也拥有许多对于特征性 Ig V 区和 C 区非常重要的氨基酸残基。C_β 区域尤其高度同源，与 C_κ 和 C_λ 氨基酸序列有 40% 同源性[17,18]。TCR 多肽均含有一个单个的 C 区(而 Ig 中可多达 4 个)，之后是一个连接肽或铰链区，通常含半胱氨酸以形成将异二聚体的二条链连接起来的二硫键(某些人的 TCRγδ 同种型缺乏这一半胱氨酸，因而不能被二硫键相连[32])。*N*-连接糖基化位点，对每一条多肽来说从 2 到 4 个不等，未发现额外的 *O*-连接糖。连接肽的 C 端序列是高度疏水的跨膜区，与 *IgH* 基因没有相似性，相反却有一或二个带正电荷的残基，这对于与 CD3 分子相互作用及 T 细胞信号是非常重要的[33]，可能通过与在所有 CD3 跨膜区均发现的酸性氨基酸相互作用。TCR 多肽家族的最新成员是前 T α 链，在早期的胸腺细胞中作为 TCRβ 的分子伴侣发挥作用，与 λ5 在前 B 细胞中的作用类似。这是首次由 Boehmer 及其同事鉴定并克隆的[34,35]。前 Tα 链结构很有趣，由单个 IgC 区样的结构域，随后一个含半胱氨酸的连接肽及含 2 个荷电残基的跨膜区组成。其中精氨酸和赖氨酸的空间位置与其在 TCRα 跨膜区域的定位置完全一致。连接肽的半胱氨酸被认为可以与 TCRβ 形成异二聚体，与 TCRα 跨膜区的相似性使其很可能有接纳 CD3 多肽的能力。在小鼠和人，胞质内的尾巴比任何 TCR 链均长得多，(分别为 37 和 120 个氨基酸)，鼠的序列包括两个可能的磷酸化位点以及与 SH3 区结合区域同源的序列。这些序列在人中不存在，但是其功能重要性也值得怀疑[35]。 343

TCR 结构

如上所述，TCR 多肽的序列与 Ig 序列有许多相似性，因此人们长期以来认为两种异二聚体在结构上可

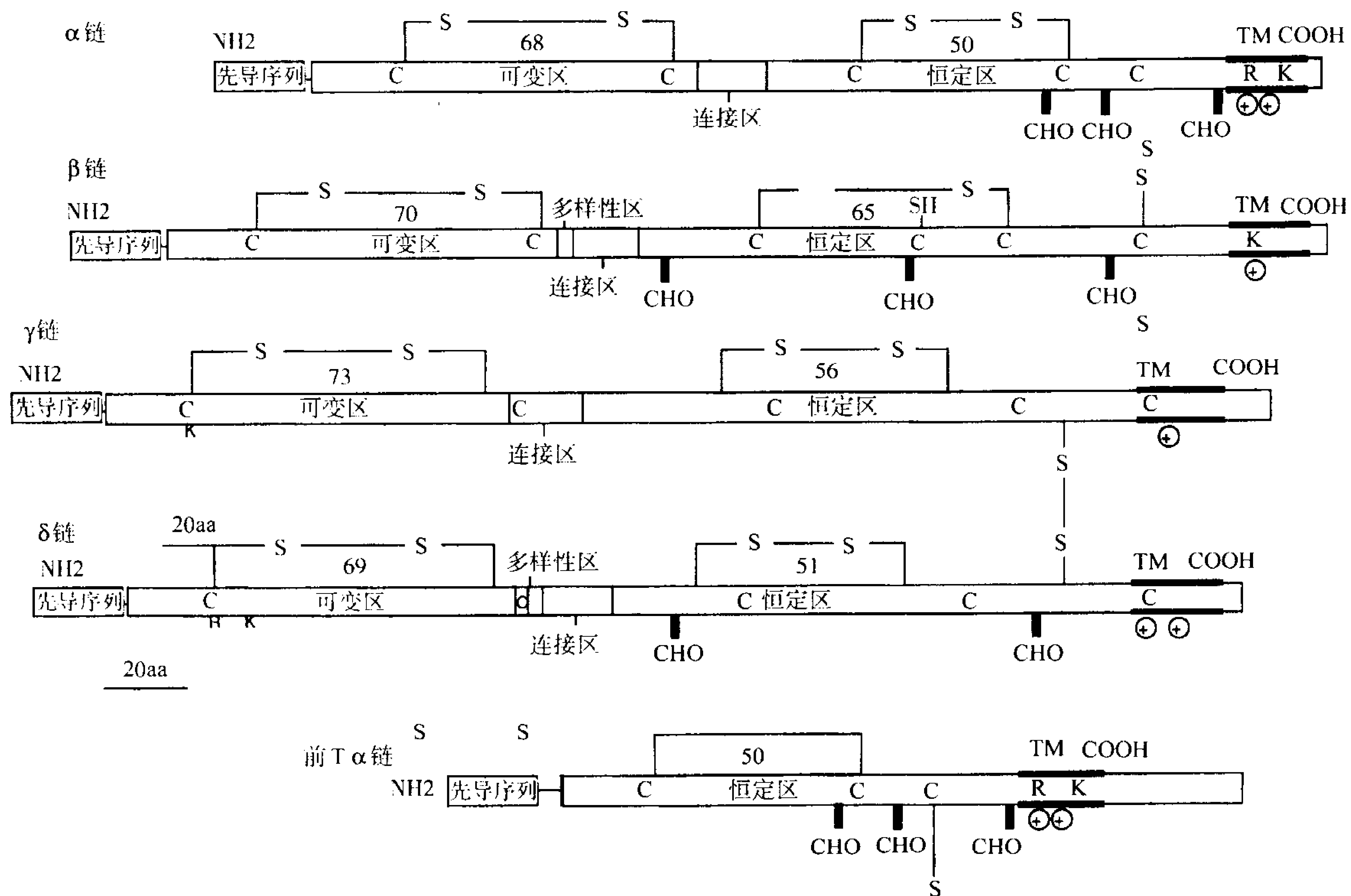


图 10.1 TCR 和前 T α 多肽的结构特征。图中标明了先导序列(L)、可变区(V)、多样性区(D)、连接区(J)和恒定区(C)的基因片段。TM 和黑体水平线标明了可能的跨膜区域。CHO 标明了潜在的碳水化合物的结合位点。C 和 S 指的是形成链内和链间二硫键的半胱氨酸残基。R 和 K 代表跨膜区内的正电荷氨基酸(分别为精氨酸和赖氨酸)。

能是抗体样的[37~39]。这些相似性包括区域内特异的半胱氨酸残基的数目与空间位置,它们在抗体中形成了链间二硫键。许多链内和链间的接触残基同样保守,而且,二级结构预测与 Ig 样的“β 桶”结构非常一致,这包括桶的一侧由 3~4 个反平行的 β 链组成,相对的另一侧由数目相似的链组成,有一个连接 2 个 β 片层(在同一平面的一组 β 链)的二硫键。典型的 V 区结构如图 10.2A 所示,所有的 IgV 区和 C 区结构域都有这个结构。与 C 区相比,V 区(根据惯例,包括 V、D、J 序列)中 β 链的数目有轻微的变化[35]。

344

要得到 TCR 异二聚体及其片段的 X 射线衍射晶体结构非常困难。一个原因是需要将分子设计成可溶形式。另一个原因是许多 TCR 是高度糖基化的,所以去除每条链上的大多数或所有碳水化合物以得到高质量的晶体是必需的。一个变通的方法是在昆虫细胞中表达可溶性 TCR,它们只有少量 *N*-连接糖基,或者在大肠杆菌中表达,它们没有 *N*-连接糖基。Mariuzza 及其同事首次成功地实现了 TCR 的晶体化,首先解析了 $V_\beta C_\beta$ 多肽的结构[40],随后是 V_α 片段[41]。一般来说,这些结构域与 Ig 非常相似,已证明三种都有典型的 β 桶结构。每个 V 区桶的每一个末端,β 片层之间都有 4 个环,其中 3 个形成了 Ig 的互补决定区(complementary-determing region, CDR)。第四个环在 D、E 链之间,表明与超抗原的结合有关。两个 V 区结构域的 6 个 CDR 环形成了 Ig 以及我们随后将讨论的 TCR 的抗原结合表面。尽管图 10.2A 所描述的 V_β 结构域符合典型的 V 结构域 β 片层结构,但 V_α 却明显不同,因其中一个片层被转位到了桶的另一半(如图 10.2B 所示),这使得 V_α 结构域内部少了一个膨起,提示此处允许形成 TCR 的二聚体或组装其高级结构[41]。近来,Garcia 及其同事[43]在一个完整的异二聚体中解决了 C_α 的结构,在经典的 Ig 样结构域有显著变化。此处仅有典型 β 桶的

一半结构，即一套 β 链（或“片层”），其余被截去的结构域呈现出随机线圈结构。这种结构类型在 Ig 超家族中史无前例，对于 C_δ 很可能也是这样，因为它与 C_α 有许多相似之处。这样一种变异结构的功能重要性还不清楚，但人们认为这种不完全形式的 Ig 样结构域可能负责所观察到的 TCR_α 的易变性，使其在表达的调节中灵活性更好。另一种可能的解释是这种改变可被用来设计接纳一个或更多 CD3 分子[43]。有趣的是，近来解析的 V_δ 结构域的结构表明其更像 V_H 样模型[44]，与 CDR3 长度分析及表观配体识别特性相一致（参见下文）。

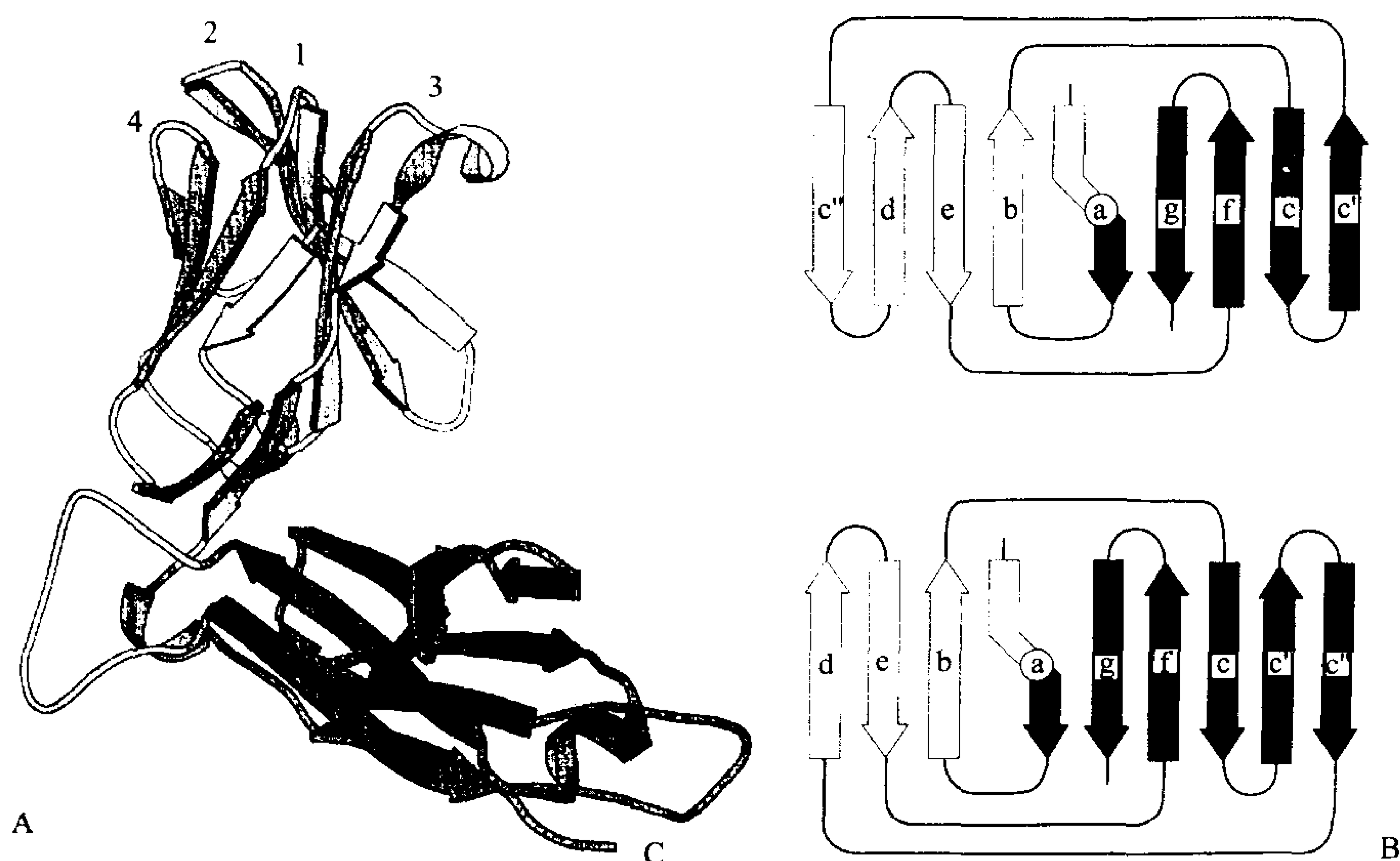
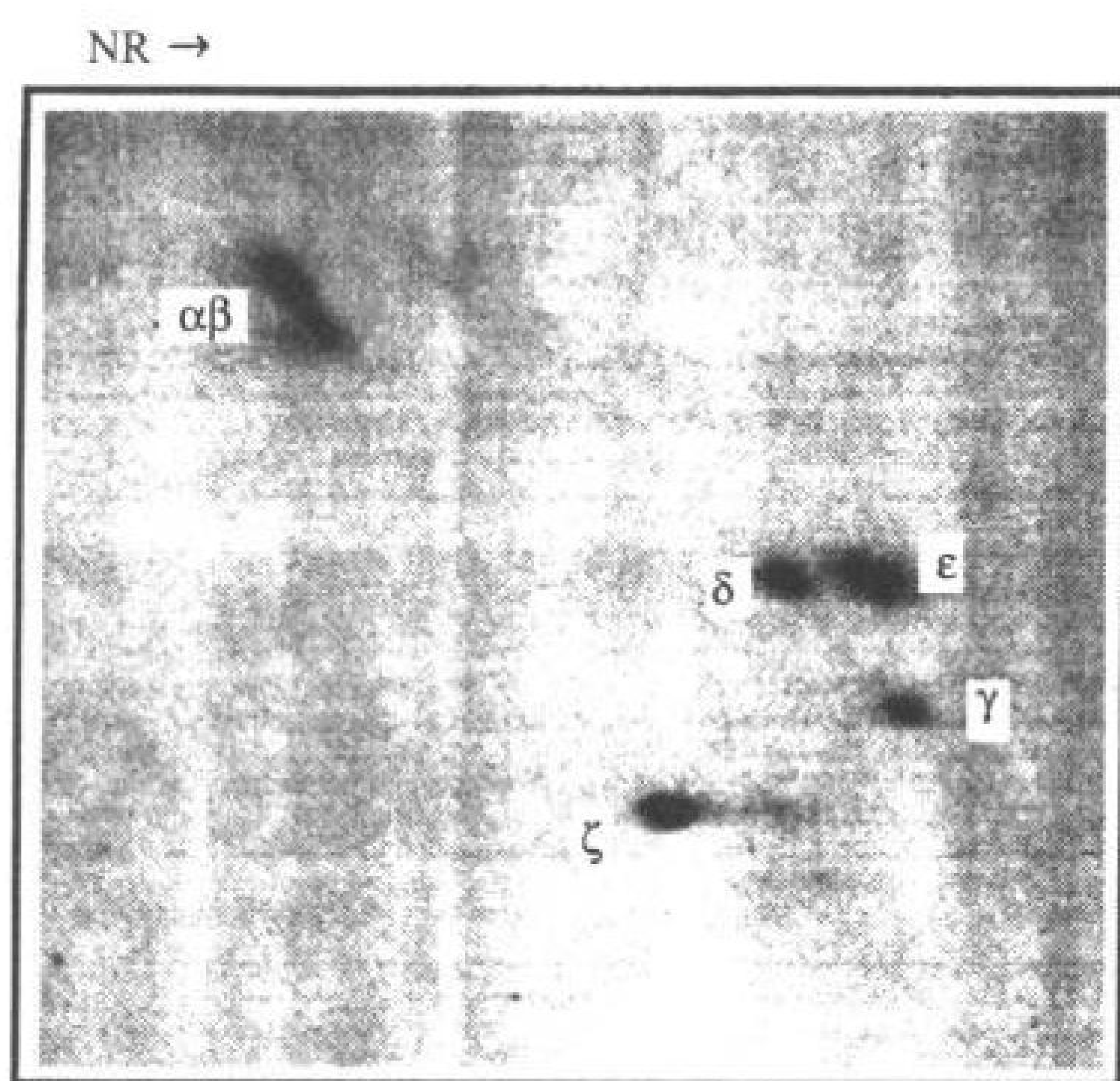


图 10.2　TCRβ 和 V_α。A：第一个 TCR 晶体结构的带状图，表明了 $V_\beta C_\beta$ 多肽的反平行 β 片层。V_β 和 C_β 结构域分别反映了 Ig V 和 C 结构域典型的 8 或 7 个 β 链的“桶”特征，同时也表明了 V_β 末端的 CDR1、2、3 及与超抗原相互作用有关的第 4 个环的位置。B：典型 V 区结构域中 β 链的结构图，与在 V_α 结构域中发现的改变进行比较。

关于完整的异二聚体结构，目前有来自三个 αβ 异二聚体的数据[43,45,46]，表明它们很大程度上与抗体 Fab 段相似（如彩图 10.1 所示）。尽管这些结构的许多特征是与其抗体的对应成分共有的，但出现了几个不同寻常的特征，或许非常重要。①在一个结构中 7 个 *N*-连接糖中的 4 个在衍射中呈现高清晰度[43]，提示它们不能自由移动，因此可能起结构作用，尤其在 $C_\alpha C_\delta$ 相互作用中[45]。这与哺乳动物细胞中若未消除蛋白质的表达，则特定的 C_α 糖不能被清除以及与缺乏糖基化的 TCR 结构中的 C_α 结构域呈现无序状态的突变数据有关[45]。②与抗体的同样区域相比，V_β，特别是 V_α 和 C_α 之间存在更多的接触。③V_α 和 V_β 相互作用的几何学与其说像抗体 $V_H V_L$，不如说更像 C_H3 结构域。④在 V_α 和 V_β 的 CDR3 环之间有一个袋（至少在一例中是这样的[45]），可容纳与 MHC 结合的肽的一个大的侧链。另一个关键问题是 TCR 与配体结合时是否有任何构象的改变。TCR 或 CD3 多肽中构象改变可能为 TCR 动员后跨膜信号转导的机制提供重要线索。研究也提示 TCR-肽-MHC 复合体具有自联的固有能力[48]，所以了解这一聚集体的结构及其怎样与早期的信号事件相关将是非常有趣的。

CD3 多肽

经非离子去污剂 NP_{40} 溶解后，用抗独特型抗体对 TCR 免疫沉淀，结果表明只有 α、β 链组成的异二聚体。



345 图 10.3 TCRαβ CD3 复合物。TCR-CD3 复合物的 SDS-PAGE 分析，应用免疫沉淀和 Goding[50a] 的双相"对角线"电泳方法，T 细胞杂交瘤用 ^{125}I 进行表面标记，并用抗 TCR 的抗体进行免疫沉淀。第一相不用还原剂进行 SDS-PAGE，第二相用还原剂进行 SDS-PAGE。未以二硫键连接的多聚体沿对角线聚集，而以二硫键连接的多聚体当解离为组分链时因分子质量降低而远离对角线。此处表明的是 TCRα、β 和 CD3γ、δ、ε 及 ζ 链。

但是，运用较温和的去污剂，如毛地黄皂甘或 Triton-X100，则表明有五种其他蛋 白质[5,49]。这在双相凝胶电泳中表现得更为明显，其中第一相没有用还原剂，第二相用了还原剂(图 10.3)。结果显示多数蛋白沿对角线迁移，而来自二硫键结合的多聚体蛋白的亚基在对角线之下迁移。用这种技术对小鼠 T 细胞进行的分析表明与 CD3γ(20 000)、CD3δ(25 000)、CD3ε(20 000)一起，有两个 TCR 亚基(α、β)在相对分子质量 40 000处迁移，在对角线下相对分子质量 16 000 处(ζ)有第四个迁移[50](彩图 10.1)。ε 链在对角线之上迁移表明其二硫键完好时比断裂时迁移得要快。这反过来提示链内二硫键保持了分子的紧凑构象。ζ 链的迁移表明它是二硫键结合的同源二聚体；但进一步的研究表明 ζ 链至少以两种形式参与了异二聚体的构成。在小鼠 T 细胞，ζ 链可以与有微小变异的被称为 η 的链以二硫键相结合[51,52]。后一条链是 ζ 基因的可变剪切的变异体[53]。这种可变剪切 ζ 链的种类在人 T 细胞中并未发现有非常多的数量[54]。含有第二种 ζ 链的异二聚体的包含了与 FcεRⅠ(FcεRⅠγ)和 FcγRⅢ(CD16)受体相关的 γ 链[55,56]。

关于总化学计量，目前的证据支持每个 CD3 簇至少有两个 TCR 异二聚体。这基于许多研究，尤其是 Terhorst 及其同事的工作[5]，他们的研究表明在 T-T 杂交瘤中，针对一个 TCRαβ 的单克隆抗体可以共调节另一个 αβ 异二聚体。而且 TCR/CD3 的蔗糖密度梯度离心表明存在一个推测的分子质量为 300kDa 的分子，比预期来自最小的 δ 亚单位复合物(α,β,γ,δ,$ε_2$,$ζ_2$)大了 100 多 kDa。提示在给定的 CD3 复合物中至少存在两个 TCR 的另一个研究是 Scatchard 分析，它表明了一个 T 细胞表面 CD3ε 分子的数目等于 αβTCR 的数目[57~59]。最后，Fernandez-Miguel 等近来的报告表明，在有两个转基因 TCRβ 链的 T 细胞中，针对一个 $V_β$ 链的抗体可以免疫沉淀另一个 $V_β$ 链。同时发现，它们常常非常紧密以致可以允许荧光能量传递，这意味着在一个簇内的两个 TCRβ 彼此在 50Å 内[60]。有趣的是，似乎 TCR 与 CD3 的复合物或者有 CD3γ 或者有 CD3δ，但不能两者都拥有，并且这两种受体类型在不同细胞中表达的比例不同。而且，在表达 FcεRIg 链的细胞中，这两种类型的受体可被进一步分为包含 ζζ 同二聚体和包含 ζFcεRIg 异二聚体的两种[55,56]。因此，如图 10.4 所示，目前最好的证据提示核心簇的化学计量是$(αβ)_2(γ/δε)_2(ζζ)_4$，还有许多如上所述的含有 FcεR 的变异体。每一个复合物有两个异二聚体，这在通过 TCR 触发 T 细胞的集簇性模型方面特别有趣[48]。346

CD3 多肽的序列和结构

图 10.4 阐明了来自基因克隆和序列分析的 γ、δ、ε、ζ 链多肽的主要结构特征[5,61]。γ、δ、ε 链的胞外结构域相互间非常相似。这些结构域含有可形成链内二硫键的半胱氨酸，每一个由单个 Ig 超家族结构域组成。半胱氨酸在这些结构域的空间位置表明它们是为紧密的 Ig 折叠，与 C 区结构域相似。所有的胞外结构域均包含一对空间位置紧密接触的半胱氨酸，恰好在预测的跨膜区的前方，可能会形成分子间二硫键，如上所述。ζ 链胞外结构域仅由 9 个氨基酸组成，并且包含一个负责同源 ζζ 二聚体或 ζFceRIγ 异二聚体中二硫键形成的半胱氨酸。在跨膜区特别显著的是，所有的 CD3 多肽均有一个保守的荷负电的氨基酸，与 TCR 跨膜结构域中所见到的正电荷相互补，同时对正确组装也是必需的[62,63]。

γ、δ、ε、ζ 链的胞内结构域是 TCR 异二聚体的胞内信号结构域[61~64]。这些分子每一个均包含一个可介导细胞活化的氨基酸序列基序[65,66]。在 ζ 链表达缺陷的 T 细胞，应用超抗原 SEA 或 thy-1 的特异抗体可导致大

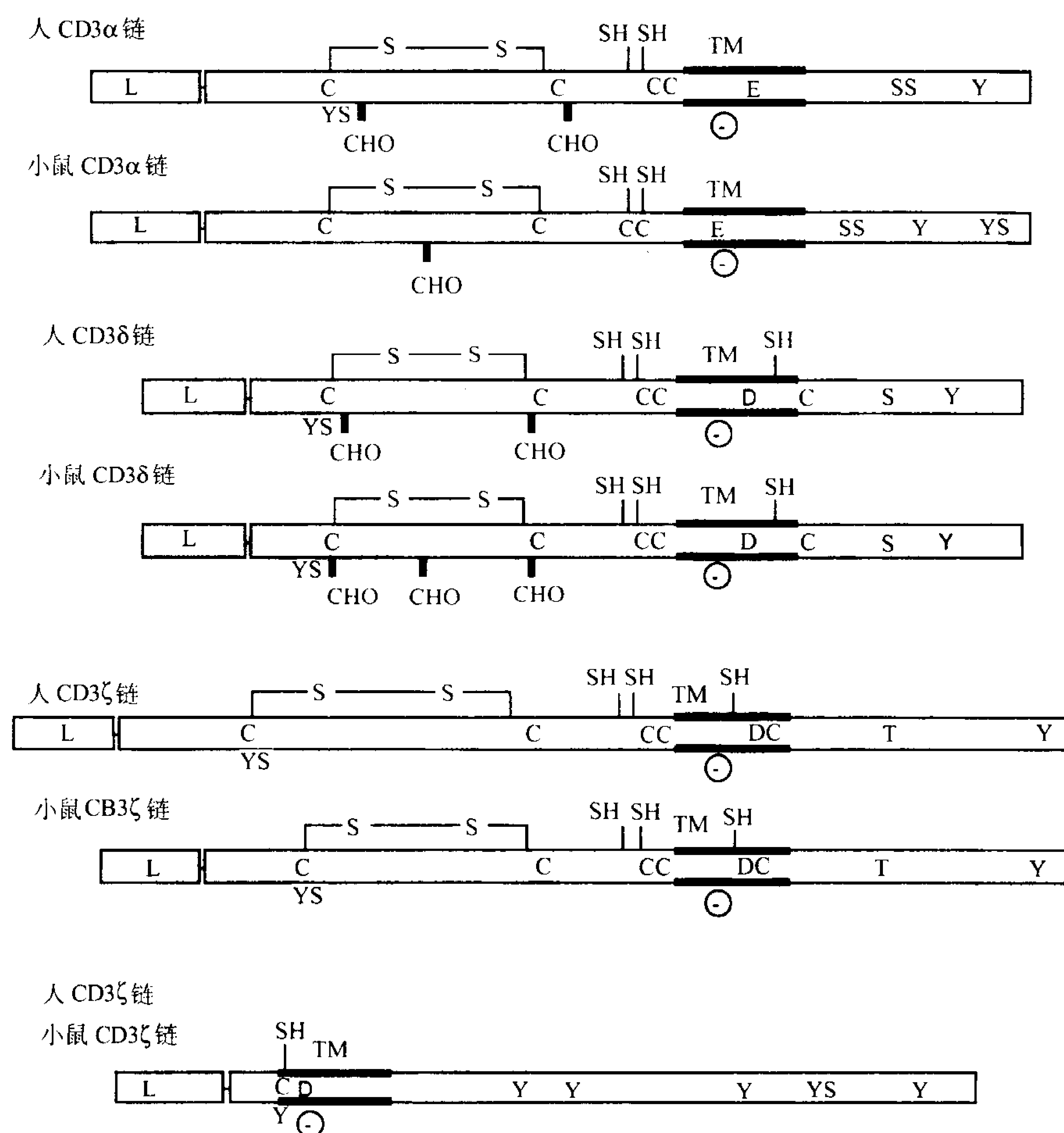


图 10.4 CD3 分子的结构特征。与图 10.1 相同，标明了跨膜区（TM），碳水化合物结合区（CHO）和半胱氨酸残基（C），并且也标明了负电荷的跨膜残基（D 代表天冬氨酸，E 代表谷氨酸）以及可能的磷酸化位点。

量白细胞介素-2（IL-2）的产生。但是，ζ 链是抗原最佳刺激所必需的，负责活化的细胞内序列被包含在少至 18 个氨基酸的范围内，序列为 $X_2YX_2L/IX_7YX_2L/I$[63,64]。这一序列中的两个酪氨酸是介导信号转导所必需的，因为其中任何一个的突变均完全阻止了游离 Ca^{2+} 的移动或细胞裂解活性。这个序列在 ζ 链中出现三次，在 CD3γ、δ、ε 和 FcεRIγ 链中各出现一次。在 γ、δ、ε、ζ 链的胞质结构域也有数对酪氨酸（图 10.5）。这一序列基序也出现在与（Ig）β 细胞受体相关的 mβ-1 和 B29 链及 FcεRIβ 链中[67]。这些胞质区序列的酪氨酸是酪氨酸磷酸化的底物[68,69]，而酪氨酸磷酸化是 T 细胞信号最早期步骤之一并被认为异常地发生在非生产性（nonproductive）的 T 细胞应答中（如拮抗作用，见下文）。当抗原或丝裂原刺激 T 细胞时，也发生 CDR3γ 的丝氨酸磷酸化[70,71]，因而同样可能起重要作用。

TCR/CD3 复合体在细胞内的组装和降解

对新形成的 TCRα 和 β 链与 CD3γ、δ、ε 和 ζ 链的组装及其在细胞内的命运已经进行了详细的研究[5,49,72]。研究集中在细胞表面不能表达 TCR 的突变杂交瘤细胞系及应用受体不同链的 cDNA 进行的转染研究。

在非淋巴细胞系统进行的研究表明 TCRα 可与 CD3δ 和 ζ 链，而非 CD3γ 和 ζ 链进行组装。相反，TCRβ 链可与除 ζ 链以外的任何一种 CD3 链组装。当 ζ 链与 α 或 β 链或三种 CD3 链的任何一种基因转染时，没有成

对相互作用发生。只有当所有 6 个 cDNA 被共转染时,ζ 链才与其他链一起被共沉淀[73]。基于这些数据[5],提出了一个模型,提示 TCRα 链与 CD3δ 和 ε 链配对,TCRβ 链与 CD3γ 和 ε 链配对。ζ 链被认为在组装的后期阶段连接了 TCR 和其他 CD3 多肽。图 10.5 表明 CD3 多肽是如何与两个 TCR 异二聚体相互作用[5]。

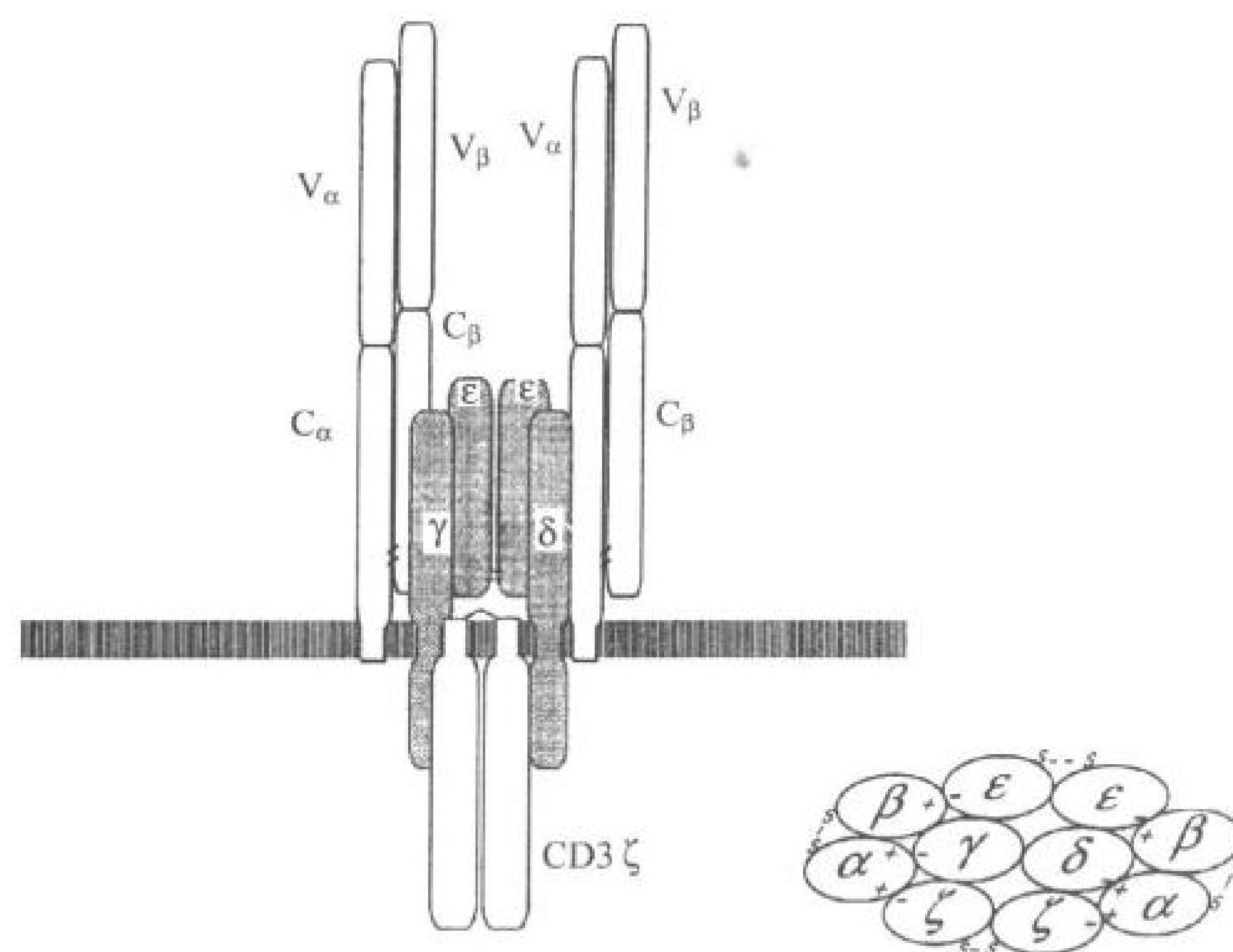


图 10.5 TCRαβ 复合体模型。尽管在给定的簇中 TCR 多肽和 CD3 的精确排列不知道,Terhorst 及其同事根据已有的不完整的资料总结为这一复合体概图。这一模型也与 de la Hera 等的数据一致[60],其数据着重强调了每一个簇内有两个 TCR 异二聚体的观点。(引自参考文献[5]。)

347

脉冲追踪实验已表明所有的 6 条链均在内质网中组装,运输到高尔基体,再传输到质膜。似乎 ζ 链的量是限速步骤,因其合成水平仅为其他链的 10%。这导致绝大多数新合成的 α、β 或 CD3 组分在合成的 4 小时内被降解[74]。其余未被降解的链长期存活,与有限的 ζ 链形成完整的 TCR/CD3 复合物[74]。缺乏 CD3ζ 链的 TCR/CD3 完整地沿内质网和高尔基体迁移,运送到溶酶体内降解。在 CD3γ、δ 链内发现了溶酶体靶向基序,由以双亮氨酸为基础的基序(DKQTLL)和 C 端区域以酪氨酸为基础的基序组成[75]。当转染到 ζ 链缺陷的细胞内时,缺乏这些基序的突变体逃避了溶酶体的运输和降解[76]。

TCR/CD3 复合物的 3 个组分——TCRα、TCRβ 和 CD3δ 在前高尔基体内迅速降解[77~79],而 γ、ε 和 ζ 链在内质网内可稳定数小时。在 β 链内,前高尔基体蛋白分解信号在跨膜区和短的胞质尾内编码。去除 β 链后段的氨基酸会导致在内质网内的滞留[80]。用单条链或成对链的转染子进行的分析表明,CD3γδ 链包含内质网滞留信号。若去除这些信号,通过高尔基体转运,这些链很快在溶酶体内降解。前高尔基体降解途径的免疫重要性在 $CD4^+$ $CD8^+$ 淋巴细胞中最为明显,这些细胞中,尽管 TCR、CD3 和 ζ 链的 mRNA 和蛋白质高水平地合成,而表面的表达却相当低。未成熟胸腺细胞的 TCR 链似乎是有选择性地降解[81]。因此翻译后的调节似乎是控制 TCR 异二聚体在细胞表面表达的一种重要方式。

TCR 基因

如图 10.6 所示,*TCR* 基因片段的结构类似 Ig,同样的重组机制似乎负责将独立的 *V* 和 *D* 片段连接到特定的 *J* 和 *C* 片段。最初被用于描述 Ig 基因,同样也存在于 TCR 中的特征性 7 和 9 核苷酸保守序列邻近 V、D 和 J 区,之间有 12 或 23 个核苷酸间隔的事实,首次表明了这一点[82,83]。自然发生的重组缺陷小鼠[重症联合免疫缺陷(severe combined immune deficiency, SCID)[84]]和用工程方法产生的缺乏重组酶激活基因(RAG)1[85]或 2[86]的小鼠不能正确重排 TCR 或 Ig 基因片段,这是表明这一普遍重排机制的最具结论性的证据。对于 Ig,如果 V 区和 J 区的基因片段处于同样的转录方向,则重组过程中插入的 DNA 被缺失。这种材料的 DNA 环可在胸腺[87,88]——TCR 重组的主要部位见到(见下文)。就 TCRβ[89] 和 TCRδ[90] 而言,在 J 和 C 相反转录方向的 C 的 3′端存在单个的 V 区。因此,这些基因片段通过翻转发生重排。出生后的 TCR 可见到沿 V、

D、J 基因片段的不同连接点[91]以及额外的随机核苷酸(N 区)。在 TCRγ 链的 V-J 连接处也观察到反向重复的额外的几个核苷酸,被认为是 P 元件的插入[92]。

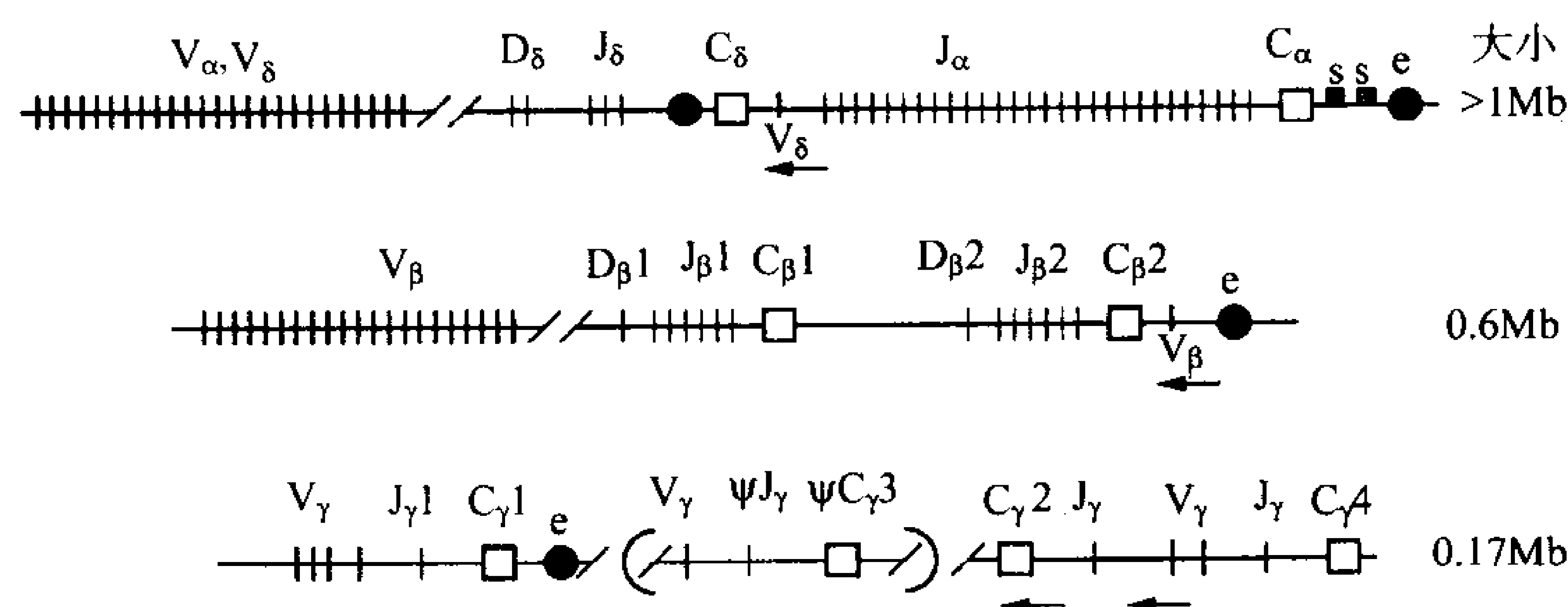


图 10.6 小鼠和人的 TCR 基因结构。TCR 基因的 V、D、J、C 元件的概图。E 代表增强子,S 代表沉默子元件。除了特别标明外,转录方向均为从左到右。右侧标明了每一个基因位点的全长(引自文献)。

TCRα/δ 基因座的结构

在人和小鼠存在单个 α 链 C 区基因,由 4 个外显子组成,编码:①C 区结构域;②16 个氨基酸,包括形成链内二硫键的半胱氨酸;③跨膜区和胞内区结构域;④3′非翻译区[93~95]。现在已绘制了人类完整的 α/δ 基因座图[96],跨度大约为 1.1MB。小鼠的基因座似乎大小相似。小鼠的基因座中,在 C 区上游有 50 个不同的 J 区基因片段(图 10.6)[97]。至少 8 个 J 区基因元件是无功能的,因为存在框内终止密码子或重排、剪切信号可能是缺陷的。在人基因座有数目相似的 α 链 J 区[95,96]。与 Ig 的基因座相比,这一数量非常多的 α 链 J 区可能表明由 TCR J 片段(组成了 CD3 环的主要部分)带来的功能多样性在抗原识别中做出了极其重要的贡献(见下文)。

小鼠和人的 $C_δ$、$J_δ$ 和两个 $D_δ$ 基因片段定位于 $J_α$ 和 $V_α$ 基因片段之间[24,98~100]。小鼠系统中在 $C_δ$ 的 5′端有两个 $J_δ$ 和两个 $D_δ$ 基因片段[24,98],$C_δ$ 基因在 $C_α$ 基因上游大约 75kb 处,但在多 数 5′已知的 $J_α$ 基因片段上游仅约 8kb。人类的基因结构相似,有三个 $D_α$ 和两个 $J_δ$ 基因片段[101]。奇怪的是,在这两个种属中,所有的 D 元件可被用于一个重排的基因中,而不像 TCRβ 或 Ig 重链中是交替的。即在小鼠中,常常发现 $V_δ$、D1、D2、$J_δ$ 重排[91],在人中常常发现 $V_δ$、D1、D2、D3、$J_δ$ 重排[101]。这极大地增加了可利用的接合处或 CDR3 的多样性,尤其是因为在每一个基因片段之间加入额外 N 区的潜力。这个特性使得 TCRδ 成为已知的抗原受体中最具多样性的一个,在一个相对很小的区域中(10~15 个氨基酸)有大约 10^{12}~10^{13}种不同的氨基酸序列[91]。

348

$D_δ$、$J_δ$ 和 $C_δ$ 基因在 $V_α$、$J_α$ 基因片段之间的定位提高了 TCRδ 和 α 可以共享同样的 V 基因片段库的可能性。尽管在 V 基因的使用中有些重叠,但在小鼠系统,共同运用的 $V_δ$ 基因中的 4 个($V_δ1$、$V_δ2$、$V_δ4$、$V_δ5$)与已知的 $V_α$ 序列明显不同,并且尚未发现它们和 $C_α$ 基因有联系[102]。另外 4 个 $V_δ$ 基因家族与 $V_α$ 亚家族(分别是 $V_δ3$、$V_δ6$、$V_δ7$、$V_δ8$ 和 $V_α6$、$V_α7$、$V_α4$、$V_α11$)有重叠或完全一样。

优先使用特定的基因片段来产生 δ 而非 α 链的机制不清楚。尽管某些 $V_δ$ 基因比 $V_α$ 基因(如 $V_δ1$)在位置上更接近 $D_δ$ 和 $J_δ$ 基因片段,但其他 $V_δ$ 基因(如 $V_δ6$)很少由于重排而缺失,因此很可能定位于许多 $V_α$ 基因片段的 5′端[91]。

$V_δ$ 基因片段的一个成员,$V_δ5$ 定位于与转录方向相反的距 $C_δ$3′端 2.5kb 的地方,通过倒转重排[90]。尽管它与 $D_δJ_δ$ 基因片段非常靠近,但 $V_δ5$ 在胚胎 $γ_δ$T 细胞中并不常存在。相反,$V_δ5 \longrightarrow DJ_δ$ 的重排在成年 γδT 细胞中占主导地位。

α/δ 基因座的一个隐含特征是 $V_α$ 与 $J_α$ 的重排缺失了 δ 链基因座的整个 D-J-C 核心。在许多 αβT 细胞中,α 链基因座可在两条染色体上重排,因此不能产生 TCRδ。在多数情况下,这归因于 $V_α \rightarrow J_α$ 的重排,但已有在 TCRδ 缺失过程中有中间步骤的证据的报道[103]。这涉及到一个称为 *TEA* 的元件到 $C_δ$3′端的假 $J_α$3′的重排。TEA 到这个假 $J_α$ 的重排将消除 αβT 细胞中 δ 的基因座。对 TEA 元件的基因靶向作用导致 αβ 和 γδT 细胞表

达的正常水平，但对多数 J_α 的使用受到严格的限制[104]，提示其功能与控制对多数 $5'J_\alpha$ 的重组易接近性有关。

TCRβ 基因座的结构

整个人的 685kb 的 β 链基因座已被全部测序[105]，其结构如图 10.6 所示。一个有趣的特征是 TCRβ 基因座中 J_β-C_β 的串联性质[106~107]。这种排列在所有目前已发现被定性的较高级的脊椎动物中都是保守的（小鼠、人、鸡、青蛙）。小鼠的两个 C_β 编码基因是一样的，在人和其他种属中也几乎是这样。因此，它们不可能代表两个功能明显不同的 C_β 形式。但是，J_β 簇有相对独特的序列，因而这可能是增加 J_β 基因片段数目的机制。与较大数目的 J_α 基因片段一起，αβTCR 的 J 区比 Ig 的 J 区提供了更多的重组多样性（$J_\alpha \times J_\beta = 50 \times 12 = 600$）。

多数 V 区定位于 J 和 C 区的上游，与 D 和 J 基因元件处于同样的转录方向，并通过缺失与 $D_\beta J_\beta$ 重排。与 $V_\delta 5$ 情况相似，单个 V_β 基因，$V_\beta 14$ 定位于 C 区的 3′端，并在转录的相反方向。这样，通过倒转而发生 $V_\beta 14$ 的重排[89]。

在 NZW 品系小鼠，有一个跨越从 $C_\beta 1$ 到包括 $J_\beta 2$ 簇的 β 链基因座的缺失[108]。在 SJL、C57BR、C57L 小鼠，从 $V_\beta 5$ 到 $V_\beta 9$ V 区基因座有一个缺失。这些小鼠也表达另一个 V 基因，$V_\beta 17$，而其他品系的小鼠并不表达。V 基因大约一半的缺失（在 SJL、C57BR、C57L 小鼠）[109]似乎对这些小鼠建立免疫应答并没有特别的影响，而缺失了 $J_\beta 2$ 的小鼠则表现免疫应答受损[110]。

TCRγ 基因座的结构

小鼠 γ 链座的结构如图 10.6 所示[111,112,117]。人 γ 链基因跨越了大约 150kb[113~116]，结构方式与 β 链相似，有两个 $J_\gamma C_\gamma$ 区。V_γ 中至少 6 个 V 区是假基因，定位于 $J_\gamma C_\gamma$ 簇的 5′端。每一个 V 基因都有与 5 个 J 区中任何一个重排的潜在能力。两个人 C_γ 区序列总体非常相似，仅在第二个外显子显著不同。在 $C_\gamma 2$，这个外显子重复 2~3 次，而形成链内二硫键的半胱氨酸缺失。因此，表达 $C_\gamma 2$ 的人 T 细胞有特别大的 γ 链（55 000Da），并且不与其 δ 链形成二硫键[113]。

小鼠 γ 链的基因结构与人的非常不同，它有 3 个跨越了大约 205kb[117]的独立的重排基因座[111,112]。在 4 个小鼠 γ 基因中，BALB/c 小鼠的 $C_\gamma 3$ 明显是假基因，在几个小鼠品系，包括 C57BL/10，$J_\gamma 3$ $C_\gamma 3$ 区域缺失。$C_\gamma 1$ 和 $C_\gamma 2$ 编码序列上非常相似。这两个基因的主要区别是 $C_\gamma 2$ 基因 5-氨基酸的缺失，位于与 δ 链形成二硫键的半胱氨酸残基的 N 端的 C Ⅱ外显子中。$C_\gamma 4$ 基因序列与其他 C_γ 基因显著不同（66%氨基酸序列一致性）。而且，$C_\gamma 4$ 序列，在 C Ⅱ 外显子中，在与 $C_\gamma 2$ 基因 5-氨基酸缺失相似的位置上有一个 17 个氨基酸残基的插入子（与 $C_\gamma 1$ 相比）（G. Kershard, S. M. Hedrick，未发表的结果）。

每一个 C_γ 基因与一个单个的 J_γ 基因片段相关。$J_\gamma 1$ 和 $J_\gamma 2$ 的序列在氨基酸水平是一致的，而 $J_\gamma 4$ 与 $J_\gamma 1$ 和 $J_\gamma 2$，在 19 个氨基酸残基中有 9 个不同。

小鼠 V_γ 基因通常在相同的转录方向与非常近端的 $J_\gamma C_\gamma$ 基因重排。$V_\gamma 1.1$ 与 $J_\gamma 4$ 重排；$V_\gamma 1.2$ 与 $J_\gamma 2$ 重排；$V_\gamma 2$、$V_\gamma 3$、$V_\gamma 4$、$V_\gamma 5$ 与 $J_\gamma 1$ 重排。有趣的是，似乎在 γδT 细胞个体发生过程中和在不同的成年组织细胞中不同的 V_γ 基因被重排，并优先表达[92,118]。

转录调控

349

对 TCR 基因的转录调节已进行了广泛的研究，首先在 TCRβ 基因座的 $C_\beta 2$ 的 3′端发现了增强子序列[119,120]。随后在其他 TCR 基因座也发现了增强子序列[121]，如图 10.6 所示。这些 TCR 增强子彼此都有相似的序列。发现某些结合到 TCR 基因的转录因子也可调节 Ig 基因的表达。Sleckman 及其同事的工作[122]表

明 TCRα 增强子($E_α$)不仅对 α 链基因座的正常重排和表达是必需的，而且对成熟 TCRδ 转录子的正常水平的表达也是必需的[122]。Lauzurica 和 Krangel[124] 的工作也同样有趣，表明在转基因小鼠中，含小基因座的人 TCRδ 增强子能在 αβT 细胞及 δT 细胞中同样重排，但含 $E_α$ 的构件体仅在 αβT 细胞中有活性。与 Ig 基因相似，启动子序列定位于 V 基因片段的 5′端，尽管 B 细胞中和肿瘤细胞[125] 中经常发生 D→$J_β$ 的重排和转录，$V_β$ 的重排和(或)转录对 T 细胞似乎高度特异。除了增强子，似乎 $C_α$3′端[126,127] 及 $C_γ$1 基因座[128] 也存在“沉默子”序列，已提示这些抑制子位点可关闭这些基因的表达，影响 T 细胞向 αβT 细胞或 γδT 细胞的分化。

染色体的定位及与疾病有关的转位

在小鼠和人，不同 TCR 基因座的染色体定位已得到描述，结果总结如表 10.1[129]。在造血细胞肿瘤中，一个重要因素是染色体转位，这导致了正常关闭基因的开放或正常开放基因的失活。因此，B 或 T 淋巴细胞肿瘤常常与染色体内或染色体间的 Ig 或 TCR 基因座的重排有关，有些情况下，与两者都有关[130,131]。

表 10.1　人和小鼠的 T 细胞受体、Ig 及相关基因座的染色体定位

	小鼠染色体	人染色体
TCR-α	14	14(q11-q12)
TCRδ	14	14(q11-q12)
IgH	12	14(qter)
TCRβ	6	7(q35)
CD4	6	12
CD8	6	2(p11)
Igκ	6	2(p12)
TCRγ	13	7(p14)
CD3γ	9	11(q23)
CD3δ	9	11(q23)
CD3ε	9	11(q23)
CD3ζ	1	1
Thy1	9	11(q23)
Igλ	16	22(q11.2)
MHC	17	6(p21)
前 Tα	17	6

这些转位似乎是由 V(D)J 重组酶介导的，表明这一途径的固有危险性和高度调节的必要性。在 α/δ 基因座，这样的重排是极为普通的，或许是因为按照基因表达，这一基因座跨越了最长的发育窗口。在 T 细胞发生过程中，TCRδ 是第一个，TCRα 是最后一个被重排的基因(更详细的描述见下文)。而且，TCRα/δ 基因座大于 1Mb，这样就提供了比 TCRβ 或 TCRγ 大的重排靶点。在人中，TCRα/δ 和 Ig 重链基因座位于同一染色体上，已在某些人肿瘤材料中观察到 V_H→Jα 的重排(通过倒转)[132,133]，其功能重要性还不知道。

特别常见的是染色体 8-14 的转位[t(8;14) (q24;q11)]，它将 α/δ 基因座连接到 c-myc 基因，与许多小鼠骨髓瘤和人伯基特淋巴瘤中的 C-myc → Ig 重链的转位相类似[130,131]。在一个细胞系，发生了 $J_α$ 区编码序列和 c-myc 3′区的重排[134]。在 T 和 B 细胞恶性瘤中，C-myc 到 Ig 重链或 TCRα/β 的转位似乎增加了 C-myc 的表达，并可能是具有肿瘤细胞特性的不被调节的细胞生长的一个重要因素。其他已发现转位到 TCRα/β 基因座的可能的原癌基因是：含 LIM 区域的转录因子 Ttg-1[135] 和 Ttg2[136,137]，涉及到神经元的发育；螺旋-环-螺旋蛋白 Lyl-1[138,139] 和 Scl[140,141]，它们涉及到早期造血细胞的发育；同源异型盒基因 Hox11[142]，通常在肝是有活性的。不清楚这些特定转位如何有助于恶性化，但推测它们可引起基因表达的畸变，有助于细胞生长或逃避正

常调节。在感染了 HTLV-I 病毒的 T 细胞白血病病人,存在大量类似的转位,人们认为 HTLV-I 本身并不直接引起白血病,但通过引起其感染的 T 细胞的异常重排而发生作用,有些变成恶性的。

另一个经常表现 TCR 和 Ig 基因座转位的疾病是毛细血管扩张性共济失调综合征(ataxia telangiectasia, AT),一种以供给失调、毛细血管扩张、免疫缺陷、肿瘤发生率增加、对电离辐射敏感性增强为特征的常染色体隐性疾病。AT 病人的外周血淋巴细胞有高频率的与染色体 7 和 14[143] 有关的转位。这些位点与 TCRγ、β、α 基因座和 Ig 重链基因座[144,145] 相对应。因此,AT 病人的一个特征是对含有 TCR 和 Ig 重排信号的基因不加区分地进行错误倾向的重排。

等位基因排斥

对于 Ig,只有一个重链基因座的等位基因和一个轻链的等位基因被重排和表达,此现象被称为等位基因排斥(见第 5 章和第 6 章)。关于 αβTCR 的表达,目前的数据表明,尽管 TCRβ 链表现等位基因排斥[146],TCRα 并不表现[147,148],某些成熟的 T 细胞表达两种功能性的 TCRα。因为在任何抗原受体形成框内连接的机率仅为 1/3,一个 T 细胞有两个重排 TCRα 的可能性仅为($1/3 \times 1/3 = 1/9$)或 11%。但是,即使这种情况发生了,两个 TCRα 链不可能与单个被表达的 TCRβ 同等地形成异二聚体,因此仅有一个异二聚体被表达。

350

资料强烈提示,前 TCR 异二聚体(如前 Tα:TCRβ)在阻断进一步的 TCRβ 重排中起重要作用,这样确保那一基因座的等位基因排斥[149,150]。特别是,与野生型小鼠相比,前 Tα 缺陷的小鼠,有两个 TCRβ 重排的细胞的数目显著增加[149]。

αβ、γδ 谱系的定型

在 T 细胞发育中的一个重要问题是关于 αβ、γδ 细胞谱系的关系,即是什么控制胸腺干细胞分化成为 αβ 或 γδT 细胞? 已提出两种不同模型。其中被称为顺序重排模型(sequential rearrangement model)[24] 的认为,前体细胞首先对 γ 和 δ 链的基因进行重排。那些不能形成功能性的 TCRγ 或 δ 链的细胞将发育为 αβ 谱系并重排 TCRα 和 TCRβ 的基因座。第二种被称为独立谱系模型(separate lineage model),认为 T 细胞在重排前即分化为两个谱系。支持顺序重排模型的一个例子是研究发现 δ 链经常被重排在已经进行了 α 链重排的染色体上[151],但随后更为广泛的研究发现多数含有未被重排的序列[152]。支持独立谱系模型的进一步证据来自表达重排的 TCRγ 和 δ 链基因的转基因小鼠。这些小鼠中,尽管所有的前体细胞均表达功能性的 γδ 基因,胸腺中也有正常数量的 αβT 细胞[153]。如果 γδTCR 的成功表达可阻断 α 和 β 位点的重排,这与人们所期待的相反。在另一例对早期 αβ 前体淋巴细胞的研究中发现,一半细胞中 TCRδ 根本没有重排,但 TEA 转录子被表达[154],恰好在 $V_\alpha \rightarrow J_\alpha$ 的重排之前。在 γδTCR 或 αβTCR 缺陷的小鼠,对余留谱系的发育没有明显的影响[155~157]。总之,几乎文献中的所有数据均支持独立谱系模型而不是顺序重排模型。

其他的遗传机制

还未在 TCR 基因中发现的抗体多样化的一个重要机制是体细胞超变。在抗体,这种形式的突变典型地增加了抗原特异性 Ig 的亲和力几个数量级,对蛋白抗原从 $10^{-6} \sim 10^{-9}$mol/L。现在已知结合其他细胞表面配体的多数细胞表面受体,包括 TCR,亲和力在 mmol 范围,但它们通过同时激活多个受体来补偿相对低的亲和力(如增加结合价)及通过被限制的、大的二维体积(如在两个细胞间)发挥作用。拥有这种受体的细胞极可能需要弱的(但高特异性的)相互作用以便它们可很快解离[158,159]。甚至推测 TCR 中见到的快速解离率放大了数目少的配体的效应(如系列动员模型;参见下文)。

对 αβ 或 γδTCR 的自然分泌形式也缺乏确凿的证据。此外对这样的分子有无明显作用存在争议,因其亲和力太低以至无多大用处。对于多数 TCR,蛋白浓度必须特别高(在 mg/ml 的范围)才能获得与血清抗体相似的效果。

在抗体而非 TCR 中见到的第三个机制是 C_H 转换,允许不同的 Ig 同种型保持给定的 V 区特异性,并使之

与不同的C区相连,C区在溶液中有不同的特性(如补体固定、嗜碱性粒细胞结合等)。因没有分泌形式的TCR,所以这种机制的作用不明显。

αβTCR-配体相互作用的生物化学

尽管很早就知道T细胞识别肽与MHC分子相关,但表明这是由于TCR结合到肽-MHC复合物的正式生化证据只是在过去的几年才成为可能。获取此测定结果的困难部分在于MHC和TCR分子的内在膜结合性质。另一个主要的问题是亲和力相当低,K_{ds}仅为$10^{-4} \sim 10^{-7}$ mol/L,极不稳定以致不能用常规方法测定(图10.7)。

正常膜结合分子的问题可以用表达可溶性形式的TCR和MHC来绕道解决,这种形式的分子对结构的研究也是必需的(见上文)。对于TCR已经用多种方法得到解决,包括用糖脂连接的信号序列替换跨膜

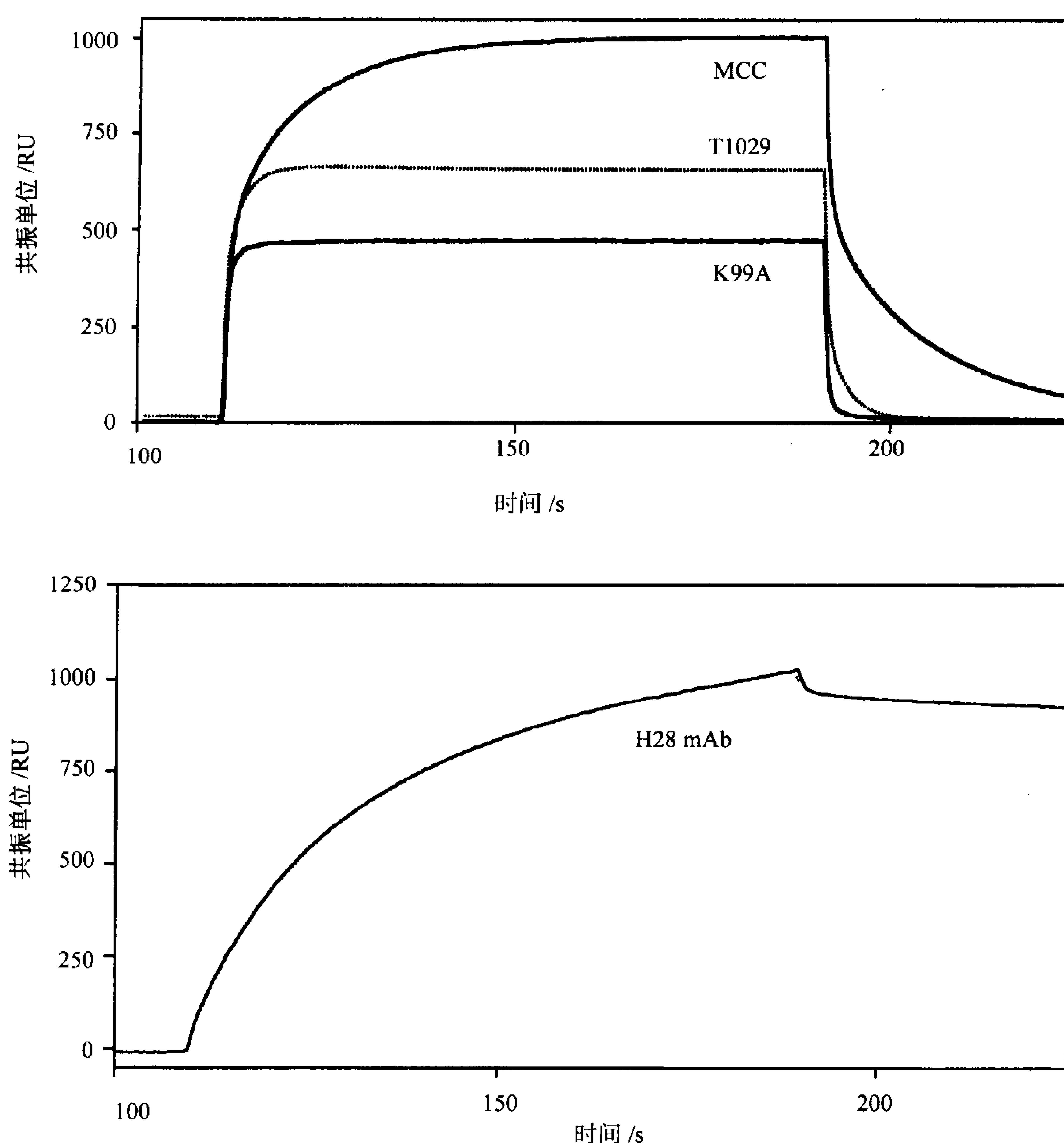


图10.7 TCR与肽-MHC复合物的结合。上图表示TCR特异性结合结合在小鼠MHC Ⅱ类分子I-EK上的细胞色素C肽的典型表面等离共振分析图。此处可溶性的TCR被固定于固相支撑物上,溶液中不同的肽-MHC复合物流经其表面。上图代表与I-EK结合的初始肽MCC,一种强有力的激动剂[88~103],T102S代表弱的激动剂,K99为一个无效肽(见表10.1和表10.2)。以上与图解中的下图进行比较,下图表示结合到同一TCR C_α的特异抗体。注意,较陡的初始相是对结合率的测定,极稳定的衰减相是对解离率的测定。X轴为时间,单位是秒,Y轴是人为定义的共振单位。(经D.S.Lyons允许使用。)

区[160]，在昆虫或哺乳动物细胞中表达没有跨膜区的链[43,161]，或联合应用半胱氨酸诱变和大肠杆菌表达[48]也起到很好的作用。不幸的是，没有一种方法对所有的 TCR 异二聚体起作用。可溶性 MHC 分子的产生有很长的历史，开始用酶裂解去污剂处理的天然分子[162]及某些可应用到 TCR 的同样方法，如 gpi 连接[163]、大肠杆菌表达和重新折叠[164,165]以及昆虫细胞表达截断的分子[166,167]。对某些 MHC Ⅱ类分子在昆虫中稳定表达必需的一个有趣变异是在 β 链的 N 端额外加一个共价肽[168]。

Matsui 等[169]和 Weber 等[170]首次对 TCR 与肽-MHC 复合物的亲和力进行了测定。Matsui 及其同事用高浓度的可溶性肽-MHC 阻断标记的抗 TCR Fab 片段与针对这些复合物特异性的 T 细胞的结合，得到 K_d 值约为 50μmol/L 的几种不同 T 细胞和两种不同细胞色素肽-I-E^k 复合体(如表 10.1 所示)。Weber 及其同事用可溶性 TCR 抑制 T 细胞识别 flu 肽 - I-E^d 复合体，得到 K_D 值约为 10μmol/L。随后在一个自身反应性肽-Ⅰ类 MHC 系统中用抗体竞争法得到更高的亲和力(K_D 值约为 0.1μmol/L)[171]。最后一个系统可能是非常重要的：自身反应性肽与Ⅰ类 MHC 很快解离(L^d)，或许是为了选择比通常亲和力更高的 TCR。尽管这些测定代表 TCR 生物化学的重要开始，但并未给出 TCR-配体相互作用动力学的直接信息(尽管间接测定在文献 171 中有报道)。幸运的是，表面等离共振设备的发展，尤其是 BIAcore(Pharmacia Biosenor Up alla，瑞典)，对弱的毫摩尔相互作用有很高的灵敏度[172]，这使得该领域有了迅猛的发展。用这种技术，一种成分共价交联到一个表面，然后含配体的缓冲液流过其表面。即使大约 5% 的表面结合物质足以引起表面金电子共振状态发生可检测的改变。这种方法可对结合和解离速率进行直接测定(即动力学参数)，并且有完全无细胞的优势。图 10.7 表明所得到的共振谱的类型，将特定肽-MHC 复合物在溶液中对 TCR 的弱但特异的结合和抗体对相同 TCR 的结合方式进行对比。用这种方法测定的细胞色素 c/I-E^k/2B4 TCR 亲和力[173]与先前基于细胞测定得到的结果非常匹配(表 10.2)，从而明确表明单个 TCR 和装载在 MHC 分子上的肽单独对这种相互作用已足够，并且以可溶性形式表达并没有影响这些分子之间相互结合的能力。除证实了先前某些亲和力的测定结果外[174~178]，表面等离共振技术已成为目前可选择的测定 TCR 与其配体结合动力学的方法(除了非常高亲和力的 TCR[179])。表 10.2 也可看出，这些测定表明尽管 TCR 结合到肽-MHC 分子的速率从很慢[1000 L/(mol·S)]到中等快[200 000 L/(mol·s)]不等，其解离速率则在相对窄的范围(0.5~0.01/s)或在 25℃时 $t_{1/2}$ 为 1~60 秒，与识别其他细胞上膜分子的其他膜结合受体相似[158,159]。在Ⅰ类 MHC 限制的 TCR，2C，若引入可溶性的 CD8 分子，这种相当快的解离状态相当稳定(10 倍)[180]。Renard 等在其独特的基于细胞的 TCR 标记分析中也见到了同样的 CD8 稳定效应[181]。用可溶性 CD4 进行的相似的 BIAcore 实验未产生可比较的结果(J.Hampl 和 J.Boniface，未发表结果)，但这种重组分子与细胞表面的天然形式相比存在某些缺陷总是可能的。尽管以上所引用的BIAcore测定因设备限制均在 25℃下进行，但在 37℃解离速率很可能要快得多(10~20 倍)(J.Boniface和 Z.Reich，个人通信[181])。

表 10.2 T 细胞受体与配体的结合

	配体	K_D/(μmol/L)	K_{on}/[L/(mol·s)]	K_{off}/S^{-1}	方法	参考文献
Th 细胞						
5C.C7	MCC/E^k	50	–	–	抗 TCR-comp.	Matsui 等[169]
2B4	MCC/E^k	50	–	–	抗 TCR-comp.	Matsui 等[169]
2B4	MCC/E^k	30	–	–	抗 p/MHC-comp.	Matsui 等[173]
2B4	MCC/E^k	90	600	0.057	B1A1	Matsui 等[173]
228.5	MCC 99E/E^k	50	–	–	抗 TCR-comp.	Matsui 等[169]
14.3.d	Flu H1N1/E^d	~10	–	–	Sol.TCR	Weber 等[170]
14.3.d	SEC1,2,3	5.4~18.2	>100 000	>0.1	B1A1	Malchiodi 等[244]
HA1.7	HA/DR1	>25	–	–	B1A1	Seth 等[175]
HA1.7	SEB	0.82	13 000	0.001	B1A1	Seth 等[175]
Tc 细胞						
2C	P2Ca/L^d	0.5	11 000	0.0055	抗 TCR comp.	Sylulev 等[171]
2C	P2Ca/L^d	0.1	210 000	0.026	B1A1	Corr 等[174]

续表

	配体	K_D/(μmol/L)	K_{on}/[L/(mol·s)]	K_{off}/S^{-1}	方法	参考文献
2C	QL9/L^d	0.065	53 000	0.003	标记的 MHC	Sykulev 等[179]
4G3	POV/L^b	0.65	22 000	0.02	标记的 MHC	Sykulev 等[179]
42.12	OVA/K^b	6.5	3 135	0.02	B1A4	Alam 等[176]
2C	P2Ca/L^d	3.3	8 300	0.027	B1A1	Garcia 等[180]
HY	M80/D^b	23.4	6 200	0.145	B1A1	Garcia 等[180]
HY	CD8α/β + M80/D/^{b}	2.0	5 100	0.01	B1A1	Garcia 等[180]
2C	CD8α/β + p2Ca/L^d	0.32	12 000	0.0 038	B1A1	Garcia 等[180]

注:在竞争实验中,BIA1 = TCR 胺耦合,BIA2 = TCR 半胱氨酸耦合,BIA3 = MHC-肽耦合,BIA4 = TCR 使用 H57 抗体耦合和 MHC 通过胺化学耦合。

根据 TCR 与其配体结合的特性,我们现在对 T 细胞应答的预测到了何种程度?近年来关于 T 细胞反应性的一个最吸引人的发现是可改变的肽配体现象。这些是抗原肽的单个氨基酸变异体,它们改变了 T 细胞应答的性质或程度(部分激动剂)或阻断了对正常刺激配体的应答(拮抗剂)[182,183]。有关这些被改变肽的反应机制的讨论集中于是否是与 TCR 和(或)CD3 分子的构象或是否是与亲和力或动力学特性有关。根据手头的数据,我们现在可以说,多数但不是所有的 T 细胞应答与其 TCR 的结合特性密切相关。尤其是,Sykulev 等[171]首次注意到高亲和力的肽变异体引出了更强的 T 细胞应答。随后,Matsui 等[173]发现在一系列三种激动肽中,增加解离率与降低激动反应性相关。Lyons 等[178]在同一抗原系统(蛾细胞色素 c/E^k)的发现将这种相关扩展到拮抗肽。他们也表明尽管拮抗肽与最弱的激动肽相比 在亲和力上仅有微弱的差别,但其解离率可相差 10 倍或更多(表 10.3)。MHC Ⅱ 类限制系统的这些数据得到 Alam 等在 MHC Ⅰ 类系统研究[176]的极大支持,他们也观察到拮抗配体和激动配体相比,亲和力下降和解离速率增加(仅一例例外,如表 10.3 所示)。Al-Ramadi 等[177]在一套相关的肽-MHC 配体中也见到了一个无关项,提示其他因素如(TCR/CD3 构象)可能有助于激动或拮抗效应。Kessler 等的基于细胞的 TCR 标记系统中,对不同强度的相关肽配体的研究也发现普遍的,但不是绝对的,受体占有和刺激能力之间的关联[184]。因此,尽管有弱 T 细胞应答和快速解离及低亲和力的普遍趋势,但似乎并不是一个绝对的规律,其他因素如构象可能在某些情况下更为重要。

353

表 10.3　弱的激动-拮抗结合

T 细胞	配体	类型	K_D/(mol/L)	K_{off}/S^{-1}	$T_{1/2}$	方法	参考文献
2B4	MCC/E^k	强激动	90	0.057	12	B1AA	Matsui 等[173]
			40	0.063	11	B1A2	Lyons 等[178]
2B4	PCC/E^k	激动	80	0.09	8.0	B1A1	Matsui 等[173]
2B4	MCC 102S/E^k	弱激动	240	0.36	2.0	B1A2	Lyons 等[178]
2B4	MCC 102N/E^k	弱激动	320	0.44	1.6	B1A2	Lyons 等[178]
2B4	MCC 99/E^k	拮抗	500	4.8	0.15	B1A2	Lyons 等[178]
			330	–	–	B1A3	
2B4	MCC 102G/E^k	拮抗	1500	5.1	0.14	B1A2	Lyons 等[178]
			900 ~ 1200	–	–	B1A3	
2B4	MCC 99Q/E^k	弱拮抗	2100	–	–	B1A3	Lyons 等[178]
42.12	OVA/K^b	强激动	6.5	0.02	24.5	B1A4	Alam 等[176]
42.12	OVA E1/K^b	弱激动	22.6	0.068	7.3	B1A4	Alam 等[176]
42.12	V-OVA/K^b	拮抗	29.8	0.039	12.9	B1A4	Alam 等[176]
42.12	OVA R4/K^b	拮抗	57.1	0.146	3.4	B1A4	Alam 等[176]
42.12	OVA K4/K^b	无效	> 360	> 0.2	< 2.5	B1A4	Alam 等[176]

注:对 BIAcore 方法的解释见表 10.2。

表 10.2 和表 10.3 中所总结的结合特性仅有很小差别的配体是如何引起象激动或拮抗这样如此不同的 T 细胞信号结果呢？如 Mckeithan[185]和 Rabinowitz 等[186]所注意到的，任何多步骤系统如 T 细胞识别，均有将细胞表面接受信号的微小差别在信号途径的终末即核内的转录时放大到更大差别的内在能力。这样，可能在一个门槛发挥拮抗作用，而在另一个门槛发挥激动作用。如 Lyons 等所提出的，拮抗配体可作用到激活途径足够远的地方以致消耗掉某些关键底物[178]。但提示的另一个可能性是某些拮抗肽可能通过阻断细胞表面的 TCR 簇而更早发挥作用[48]。

有关这一数据的另一个争论点是 Lanzavecchia 及其同事的系列动员模型[187,188]。这一模型提出较少数目的肽-MHC 复合物可引发 T 细胞活化的一个方法是通过以顺序方式短暂结合许多 TCR。基于 TCR 下调的估计提示一个肽-MHC 复合物可接连地结合多达 200 个 TCR 分子[187]。尽管这里所综述的解离速率表明 TCR 结合很可能是非常短暂的，事实上，它们不支持更久的相互作用会更好地支持这种提法。这是由于迄今为止，在任何一个系统中对 TCR-肽-MHC 复合物稳定性提高所做的所有改进均导致更为强烈的 T 细胞应答，而不是围绕某个最适值呈正态分布。

CD4 和 CD8 的作用

CD4 和 CD8 在 T 细胞对激动和拮抗肽反应中的作用是什么？在辅助性 T 细胞应答中，CD4 的存在极大地增加了所产生的细胞因子的数量，在某些情况下，决定了是否存在应答[189]。CD4 的多数效应似乎来自将 lck 募集到 TCR/CD3 复合物。而且，即使对不能结合 lck 的 CD4 分子，也有极其重要的正效应，这样似乎对 TCR-配体的相互作用也起作用。CD8 也极大地放大了 Ⅰ 类 MHC 特异的 T 细胞应答[183]，CD8 提高了 TCR-肽-MHC 复合体的稳定性约 10 倍(表 10.2)。总之，似乎每一个辅助受体分子有两个作用：提高 TCR-配体的相互作用及通过募集 lck 而增强信号。与此一致的数据表明 CD4 的存在可将拮抗肽转变为弱的激动肽[190,191]。Hampl 等细胞色素系统的数据表明尽管 CD4 的存在几乎可使弱的激动肽与最好的肽同样有效，但对拮抗肽的作用却很小或没有作用，因而对这一点提出了新的置疑。

这些结果提示 CD4 的动员不是自发的也不是与 TCR 结合同步的，而是较迟被募集到已经存在的 TCR-肽-MHC 复合物(或寡聚物)中，如 Madrenas 等提示的[193,194]。在某些情 况下，拮抗肽-MHC 复合物稳定期很长，足以使 CD4 发挥作用，此时 T 细胞可受到刺激，但在 Hampl 等的实验中，TCR-配体的结合时间不足以使 CD4 影响结果。

354

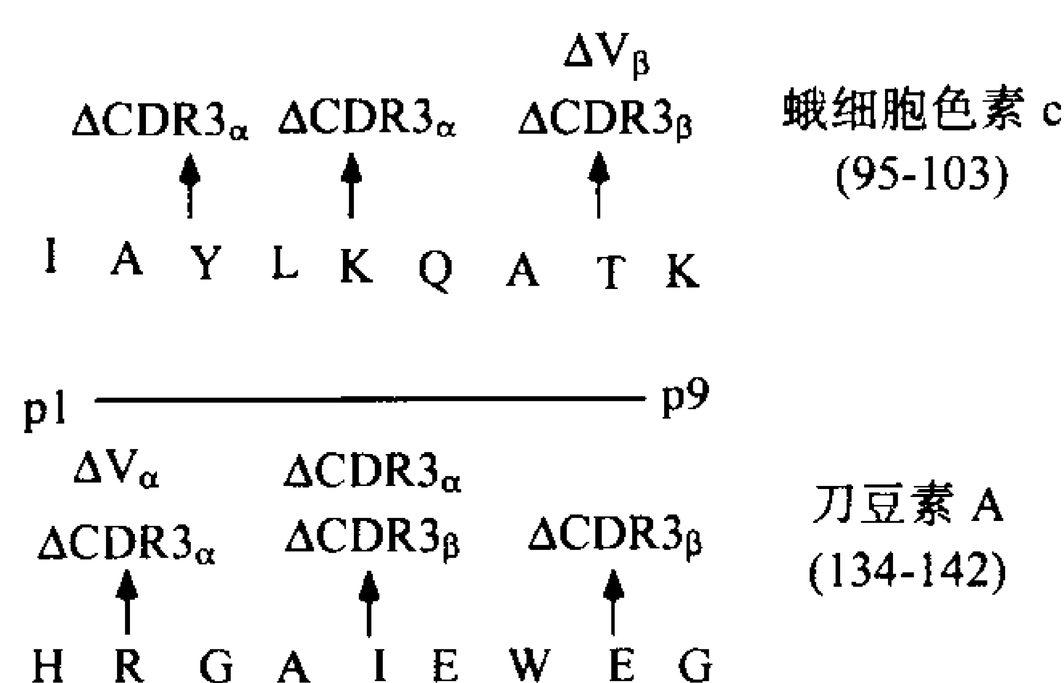


图 10.8 TCR CDR3 和 V_α/V_β 的使用对抗原肽改变的敏感性。此处总结了 Jorgenson 等[199,200]和 Sant' Angelo等[201]的数据，他们用影响 T 细胞识别但不影响 MHC 结合的、残基改变的抗原肽(MCC 或 CVA)免疫单链转基因小鼠(TCRα 或 TCRβ)。结果表明，这样的改变总是影响 V_α 或 V_β 的 CDR3 序列，或两者均影响，似乎存在明显的拓扑学，其中 V_α 控制 N 端区域，而 V_β 负责肽的 C 端区域。

TCR-肽-MHC 相互作用的拓扑学

对 TCR 序列多样性的分析已表明绝大多数氨基酸变异位于与抗体的 CDR3 区域相对应的 V 区和 J 区基因片段之间的区域[195]，这导致 V_α 和 V_βCDR3 环组成了与结合到 MHC 抗原肽接触的主要部位的模型的建立[38,195,196]。许多实验支持这一模型，其研究表明 TCR 的 CDR3 序列是重要的特异性预测器[195]。Engel 和 Hedrick[197]和 Katayama 等[198]的精细突变研究也支持这种模型，其研究表明单个 CDR3 点突变可改变 TCR 的特异性[197]，CDR3 移植能将供体的 TCR 特异性赋予受体[198]。此外，Jorgensen 等[199,200]建立了 TCR-配体相互作用的新方法，他们将给定肽中影响 T 细胞识别但不影响 MHC 结合的单个氨基酸进行改变。用这些变异肽免疫识别原始肽的 TCRα 或 β 链小鼠，并对应答的 T 细胞进行分析。用单个 TCRα 或 β 的转基因小鼠所得到的 T 细胞中一半受体是不变的，而在与它配对的链中有相当

大的变异。这一研究结果与来自Sant' Angelo等另一系统研究工作[201]结果非常相似：肽 TCR 敏感残基的每一个突变触发了 V_α、V_β CD3 序列或两者的改变，在某些情况下也改变了 V_α 或 V_β 的基因片段(如图 10.8 所总结的)。更令人吃惊的一个 CDR3-肽相互作用的例子发生在细胞色素 c 系统，在这个系统中，肽 TCR 决定簇中央的 Lys →Glu 改变引发了 V_αCDR3 环 Glu →Lys 电荷的倒转，证明这两个分子通过 Lys →Glu 直接接触[199]。

355

另一个有趣的发现是从肽 N 端向 C 端残基进行的 $V_\alpha \rightarrow V_\beta$ 的优先顺序级。这导致Jorgensen等[199,200]提出TCR-肽-MHC 相互作用的线性拓扑学，其中 V_α 和 V_β 的 CDR3 环在肽上方呈线状排列。Sant' Angelo等[201]推测了 TCR 的方向，认为 CDR3 环与肽是垂直的。这是部分基于 V_αCDR1 和肽 N 端残基相互作用的一些有趣的数据的提示。Sun 等基于对大量 MHC Ⅰ类突变体及其对 TCR 反应性的影响提出了第三种定位[202]。与上两种模型相比，这一模型产生了 TCR 在 MHC 上的粗略对角线足迹。另一方面，广泛的Ⅱ类 MHC 突变研究不能揭示一致的 TCR 相互作用足迹，进一步发现，TCR 敏感模式显著地易变，并高度依赖肽或 TCR CDR3 区域的序列[203]。

Garcia 等[43]和 Garboczi 等[45]的工作开始解决这一矛盾，他们几乎是同时解析了两个不同的 TCR-肽-MHC Ⅰ类复合物的晶体结构。这些研究表明在粗略对角线构象中 TCR 结合表面更像一个装备在两个相对的Ⅰ类 MHCα 螺旋"高点"的抗体。彩图 10.2 表明了一个这样的结构，CDR3 环位于肽的上方中央，但 V_α CDR1 和 V_β CDR1 也分别处于与 N 端和 C 端肽残基接触的位置。这样的 V_α CDR1 和 N 端残基的接触在 Garboczi 等的结构中也可见到，但 Garcia 等的结构在这一点的清晰度不够。尽管需要更多的结构，尤其是 TCR 与Ⅱ类 MHC-肽复合物，所得的结果已与上面引用的肽免疫和突变实验结果相当一致，表明所有的 TCR-肽-MHC 复合物大致拥有相同的拓扑学结构。一个新突变模型的研究也表明了这一相同的定位[204]。这种定向识别组成了不同于抗体-抗原相互作用的主要改变，可能源于活化过程中 CD4/CD8 分子掺入的需要。MHC Ⅰ类-CD8 复合物的结构是理解这一过程是如何完成的首要步骤[205]。

αβTCR 和超抗原

超抗原的发现是研究 αβT 细胞反应性中出现的一个最有趣也是最未料到的领域。尽管一种特定的抗原肽在天然有机物中可能仅被 100 000 个中的一个或更少的 T 细胞识别，而给定超抗原可刺激 1% ~ 20% 的 T 细胞[206~208]。稍后将对此进行更为详细的讨论。其中的生物学基础是超抗原结合到 T 细胞上的 TCR V_β 区域，同时结合到呈递细胞的 MHC Ⅱ类分子(尽管不是在结合肽的沟槽)。这允许单个的超抗原，如表 10.4 中的 SEA，刺激每一个表达 V_β1、3、10、11、12 或 17 的鼠 T 细胞(大约 15% 的 αβT 细胞)，不管 V_β 与哪种 V_α 配对，表达哪种 CDR3 序列。很明显，这是一类独特的 T 细胞刺激分子。

Kappler 及其同事首先发现在一小鼠品系中，表达某一特异性 V_β 的 T 细胞被清除[209,210]，从而首先认识了超抗原的效应。该发现表明这种效应是由于次要组织相容性基因座，已知为 Mls 的某种等位基因所致，因为其产物有刺激特异 V_βT 细胞的能力，并引起表达这种特定等位基因的小鼠品系中那些 T 细胞的清除[212~214]。对这些基因座的广泛克隆研究揭示其为小鼠乳腺肿瘤病毒家族的反转录病毒[215~218]。并且不同的家族成员结合不同的 V_β 结构域(如表 10.4 所示)。同时，Janeway 及其同事[220]表明葡萄球菌肠毒素能以 V_β 特异的方式多克隆激活初始 T 细胞，而不需抗原处理。许多这样的肠毒素已被广泛地阐明了特性[221~227]。不像典型的Ⅱ型膜蛋白 MMTV，肠毒素是分泌型的。随后，从其他细菌中[耶尔森氏菌属假结核菌(*Yersinia pseudotuberculisis*)[228,229]，链球菌(*Streptococcus*)[230]，支原体(*Mycoplasma*)[231,232]]分离了具有超抗原特性的蛋白质。有证据表明其他哺乳动物病毒也存在超抗原一样的活性，如狂犬病毒(rabies)[233]、Epstein Barr 病毒[234]、巨细胞病毒(cytomegalovirus)[235]；寄生虫也如此，如恶性疟疾[236]，鼠弓形虫(*toxoplasma gondii*)[237]。但真正的分子还未被鉴定。由于如此多的病原体或寄生虫拥有这种分子，明显地通过趋于一致的进化方式，因而必定

存在某些选择性优势，但在多数情况下，关于这种优势可能是什么没有结论性的证据。一个例外是 MMTV 超抗原，已表明多克隆 T 细胞刺激允许病毒更为有效地感染被 T 细胞激活的 B 淋巴细胞[238,239]。这可能是个特例，但多数学者提示超抗原主要起扰乱和占据免疫系统的作用，而使病原体逃避特异的靶向引导的清除，已提示大剂量的超抗原和多种休克综合征有关，如食物中毒，或中毒性休克[206-208]，但这可能不是它们的日常目的，因为这违背宿主和寄生虫共生的普遍规律。

表 10.4　内源性和外源性超抗原的 V_β 特异性

细菌性超抗原	人 V_β 特异性	参考文献	鼠 V_β 特异性	参考文献
SEA	ND		1,3,10,11,12,17	[222]、[223]
SEB	3,12,14,15,17,20	[167]、[168]	(3),7,8.1,8.3,(11),(17)	[222]、[226]、[227]
SEC_1	12	167	7,8.2,8.3,11	[222]
SEC_2	12,13,14,15,17,20	[167]、[168]	8.2,10	[222]
SEC_3	5,12	167	(3),7,8.2	[222]
SED	5,12	167	3,7,(8.2),8.3,11,17	[222]
SEE	5.1,6.1-6.3,8,18	167,168	11,15,17	[222]
TSST-1	2	167	15,16	[222]
ExFT	2	168	10,11,15	[222]
Strep M	2,4,8	230	ND	
内源性原病毒	**V_β 特异性**	**Mls 型[a]**	**染色体**	**参考文献**
Mtv-1	3	c,4a	7	见综述[207]、[208]
Mtv-2	14	NA	18	
Mtv-3	3,17	c	11	
Mtv-6	3,17	c,3a	16	
Mtv-7	6,7,8.1,9	a,1a	1	
Mtv-8	11,12	f,DvbⅡ.1	6	
Mtv-9	5,11,12	f,Etc-1	12	
Mtv-11	11,12	f,DvbⅡ.3	14	
Mtv-13	3	c,2a	4	
Mtv-43	6,7,8.1,9	Mls 样	ND	
外源性病毒	**V_β 特异性**	**Mls 型**		**参考文献**
MMTV-C3H	14,15	NA		[216]、[217]
MMTV-SW	6,7,8.1,9	Mls 样		[221]
Rabies			可疑的	[233]
EBV			可疑的	[234]
CMV			可疑的	[235]
其他病原体	**V_β 特异性**	**名称**		**参考文献**
支原体属	h17,6,8.1,8.3	MAM		[231]、[232]
鼠弓形虫			可疑的	[237]
疟原虫			可疑的	[236]

括弧内的 V_β 与商业而非重组的肠毒素有反应性[197]。
NA，没有可应用的；ND，未测定。
[a]在发现表型为内源性反转录病毒之前使用的术语。

已提示超抗原可能涉及触发自身免疫性疾病。这一假设是表达某种 V_β 的 T 细胞被病原体超抗原激活，随后，在这些被激活的细胞中，自身反应性的 T 细胞被某种特定的组织抗原刺激。尽管类风湿性关节炎[240]和 Kawasaki 氏病[241]已报道含有超抗原样占主导地位的特定 V_β 细胞，然而其他研究者不能证实这些报道[242]。但有一例人超抗原的报道，像 Mls 基因座一样是一种可特异性刺激 $V_\beta 7$T 细胞的内源性反转录病毒，在Ⅰ型糖尿病早期阶段的胰岛细胞浸润过程中被表达[243]。

尽管超抗原结合 TCR 与 MHC 的生化和 TCR-肽-MHC 相互作用相似[177,244]，拓扑学却完全不同。尤其是，已发现 Mls-la 呈递到 T 细胞受 V_β 区域的外表面突变的极大影响(22、70、71 位氨基酸)。这种突变并不影响肽-MHC 识别[245,246]。相反，由 Patten 及其同事的 CDR 移植实验[247]已提示 $V_\beta3$ 的 CDR1 和 CDR2 在细菌中的超抗原反应性。相似地，其他研究者也发现不同超抗原结合相同 TCR 的部位不同，但无人发现与 CDR3 序列有关。 356

超抗原 SEC2 和 SEC3 与小鼠 TCR V_β 链复合物的 X 射线衍射晶体结构已有报道[248]。与 Patten 等的数据相似[247]，这些细菌超抗原结合到 CDR1、CDR2 以及某些 V_β 区域的外表面。如彩图 10.3 所示，当对超抗原-MHC 结构建模，产生的 TCR/SAg/MHC 复合物可以从 MHC 结合沟槽中替换部分 TCR(但不是全部)[248]，这样使得相互作用对 TCR-肽的特异性极大地不敏感，正如 Jorgensen 等所提示的[200]。因为这仅仅是 TCR/SAg 复合物结构的首例报道，其他分子的作用完全有可能不同。尤其是，因为 Mls 抗原结构及与 MHC 结合的方式与 SAg 明显不同，所以其结合 V_β 区域的方式很可能也是独特的。

为何超抗原仅与 V_β 链相互作用？一种可能性是 V_β 链提供了惟一的 TCR 可接触表面，或许因为 CD4 阻断了 V_α 一侧(如由抗体阻断实验所提示的)。第二种更引人注目的可能性是超抗原可引发一种 T 细胞活化极少使用的重要生理机制。例如，不成熟的胸腺细胞仅表达低水平的 TCR，然而对抗原很敏感。或许存在一种细胞内蛋白，将 TCRβ 链与 MHC 分子连接成为一个整体，使它们能正常结合和识别[249]。

第二种类型的受体：γδ-CD3

γδT 细胞的鉴定

尽管 αβT 细胞最先是基于功能特征如提供 T 细胞辅助或引发细胞毒性来定义的，但 γδTCR 表达细胞不是经细胞分析或血清学分析发现的，相反是通过基因克隆鉴定的。因而，对这些细胞的多数工作是致力于理解其所识别的对象及其在免疫系统中如何发挥作用。尽管已有相当的进展，但这些问题多数仍未解决。此处将综述这些谜一样细胞的某些突出特性。

在小鼠，γδT 细胞在胚胎胸腺首先出现，比 αβT 细胞早整整两天，但在以后的几周，αβT 细胞很快占主导地位。在成年小鼠和人，γδT 细胞仅代表了胸腺细胞及所有二级淋巴器官中淋巴细胞很小一部分[250,251]。但是，发现它们在许多组织黏膜如皮肤[252]、小肠[253]、雌性生殖道[254]及肺[255]中大量存在。 357

γδT 细胞中已被广泛研究的一群是 $CD4^-$ $CD8^-$ 的 γδT 细胞，它们有树突细胞的形态，植被于皮肤的表皮[252,256]，这些细胞被称为树突表皮细胞(dendritic epidermal cell，DEC)。奇怪的是，这些细胞中 90% 表达相同 V_γ 和 V_δ 序列 TCR[256]。已表明这源自以下事实：大多数 DEC 是在胚胎生活的第 15～17 天产生的[119]。在发育的这一阶段，优先进行 $V_\gamma3$ 的重排，很少或没有终末脱氧核苷酸转移酶的表达，结果没有了 N 区的多样性。而且，已表明 V 区末端和 J 区[257]始端之间的核苷酸同质性可使基因重排的机制发生偏斜。因此有人对 γδ 序列库在这一阶段的有限性提出置疑，但有如此多的一致序列又表明除了所引用的这些，要么存在某种额外的重组机制要么是强有力的选择导致了这种独特结果。

这些 DEC 识别的对象是什么？实验已表明它们可对小鼠角质细胞，或对直接加入 DEC 的角质细胞提取物做出反应[258]，目前还不知道所识别的决定簇的性质。其他内皮间淋巴细胞(intraepithelial lymphocyte，IEL)也有明显的受体表达。雌性生殖道上皮及小鼠舌中的 γδT 细胞优先表达 $V_\gamma4$ 和 $V_\delta1$[254]。在 BALB/c 小鼠，多数 TCRδ 序列是相同的[259]，但其他 TCR 序列却是多样的。其他品系中并未见到这种现象。

另一个已被广泛研究的 γδT 细胞群位于小肠上皮细胞[253]。肠道 IEL 由一群 αβT 细胞和一群 γδT 细胞组成。目前不清楚这些肠道 IEL 的功能，它们表型是 $CD4^-$ $CD8^-$ 或 $CD4^-$ $CD8^+$。不像 $CD8^+$ αβT 细胞，γδIEL 中 CD8 分子表达 CD8α 链而不表达 CD8β 链[260,261]。IELs γδTCR 使用不同的 V_γ 和 V_δ，γ 和 δ 链的 CDR3 区在长度和序列上表现出显著的多样性，这提示它们可识别范围很广的配体。

γδTCR 的表达与不同解剖部位的上皮细胞间的关系的起因是什么？这是否反映了免疫功能？它是独特的归巢过程的结果？还是揭示了个体发生学的某些方面？目前手头还没有这些问题的具体答案。

γδT 细胞对宿主免疫防御的贡献不同于 αβT 细胞

早期的研究表明 γδT 细胞可分泌许多细胞因子，引起细胞裂解，因此有与 αβT 细胞相似的潜在功能。其在上皮细胞的优势定位也提示它们可能负责“第一线防御”[262]。某些细菌和某种烈性仙台病毒株的感染早期，在 αβT 细胞应答之前就观察到了 γδT 细胞升高[263,264]，这一现象支持了这一假说。但在其他感染模型中，当病毒已被清除后[265]，炎症晚期有 γδT 细胞在炎症病灶处聚集，提示它们可能对感染时受损或应激的细胞作出反应。与此一致的是某些 γδT 细胞可在体外杀伤病毒感染的细胞，但这种识别不是病毒特异性的[266]。

近来，用 αβ 或 γδT 细胞缺陷的小鼠来仔细分析这些细胞在免疫防御中对细胞内病原体（细菌、原虫及病毒）的作用[267~270]。通过使用抗 αβ 或 γδT 细胞的单抗或经同源重组破坏 TCR 基因诱导了这些细胞的缺陷。发现 γδT 细胞发挥的功能取决于感染的类型。在如 BCG 和沙门氏菌感染的模型中，αβ 而非 γδT 细胞对控制感染是必需的。在其他情况下，如在 M.结核杆菌和单核细胞增多性利斯特氏杆菌，γδT 细胞可补偿 αβT 细胞的缺陷。有趣的是，在利斯特氏杆菌和蠕虫感染中，缺乏 γδT 细胞并不改变病原体的侵入，但导致感染组织内不同的病理改变[267~270]。这提示 γδT 细胞可能调节免疫和非免疫细胞来维持宿主组织的完整性[271]。某些 γδT 细胞可产生角质细胞生长因子及趋化因子[258]，同时调节上皮细胞发育[272]，并影响 αβT 细胞应答[273~276]。这些结果与对 γδT 细胞识别要求的分析相容，因为这些细胞可介导细胞免疫功能而不需要抗原呈递及特异的抗原呈递细胞[6]。因此它们有通过直接识别其他淋巴细胞或受损的细胞和(或)组织而引发免疫应答的能力。尽管所有这些实验都指明了 γδT 细胞在免疫系统中的独特作用，但 γδT 细胞的特异性和这些细胞在病理情况下的准确效应仍未阐明。注意到 γδT 细胞的功能主要在小鼠和人中进行了重点研究，但它们在鸟类和偶蹄动物[251,262]中的功能更多。因此，这些种属中 γδT 细胞也可能有其他功能。

γδT 细胞的抗原识别不需要呈递

过去几年中，许多研究表明，与 αβT 细胞相比，γδT 细胞在抗原识别上有显著不同。某些 γδT 细胞似乎识别完全不同类型的抗原。更特别的是，这些实验提示许多 γδT 细胞识别的抗原并不需要处理呈递，而且也不必是蛋白质[6]。

因为多数 αβT 细胞识别在细胞内加工和由 MHC 分子呈递的蛋白抗原，最初认为 γδT 细胞也遵循这一普遍的模式。尽管早期的工作表明经典的 MHC 分子并不涉及 γδT 细胞对抗原的识别，但人们仍然认为非经典的 MHC 分子，热激蛋白等诸如此类的尚未被鉴别的表面分子可能起相似的作用。

过去几年里，已经用 3 种可对结果进行准确解释的模型系统对 γδT 细胞的识别要求进行了评价。它们是：①T 细胞克隆 LBK5 对小鼠 MHCⅡ类分子 IE^k 的识别[277]；②T 细胞克隆 G8 对小鼠非经典 MHC 分子 T10 和 T22 的识别[277,278]；③T 细胞克隆 TgI4.4 对单纯疱疹病毒糖蛋白 gI 的识别[279]。

358

已表明 IE^k 编码的蛋白可结合肽，T10 和 T22 分子与经典的 MHCⅠ类分子同源，因而认为它们也是如此。进一步发现，上述三种蛋白有降解为肽及被呈递识别的潜能。令人惊奇的是，在三种情况下，结合到这些蛋白的肽，以及它们来源的肽都被不 γδT 细胞克隆识别。相反，蛋白抗原被直接识别，而无需处理。这其中的一个例子是表 10.5 中所表明的，它表明了温度敏感的内吞区室（endocytic compartment）突变对 αβT 细胞识别蛋白抗原和 LBK5 识别 IE^k 的影响[277]。内体突变体破坏细胞色素 c 的呈递，但对 γδT 细胞识别没有影响。另外，突变 IE 分子的抗原表位图（图 10.9）表明 IEα 和 IEβ 链 α 螺旋中氨基酸残基影响 αβT 细胞识别，但不影响 LBK5 的刺激[257]。

表 10.5 温度敏感的内吞区室突变体对 αβT 细胞识别抗原和 LBK-5 识别 IE^k 影响

	2B4 肽(αβ)		2B4 蛋白(αβ)		A1A10(αβ)		LBK5(γδ)	
	34℃	39℃	34℃	39℃	34℃	39℃	34℃	39℃
IE^k-CHO	+ + +	+ + + +	+ + +	+ +	+ +	+ + +	+ +	+ + +
IE^k-G8.1(末端 1)	+ + +	+ + + +	+ +	0	+	0	+ +	+ + +
IE^k-25.2.2(末端 2)	+ + +	+ + + +	+ + +	+	+	0	+ +	+ + +
IE^k-G7.1(末端 d3)	+ + +	+ + + +	+ +	0	+	0	+ +	+ + +

注:引自参考文献[277]。

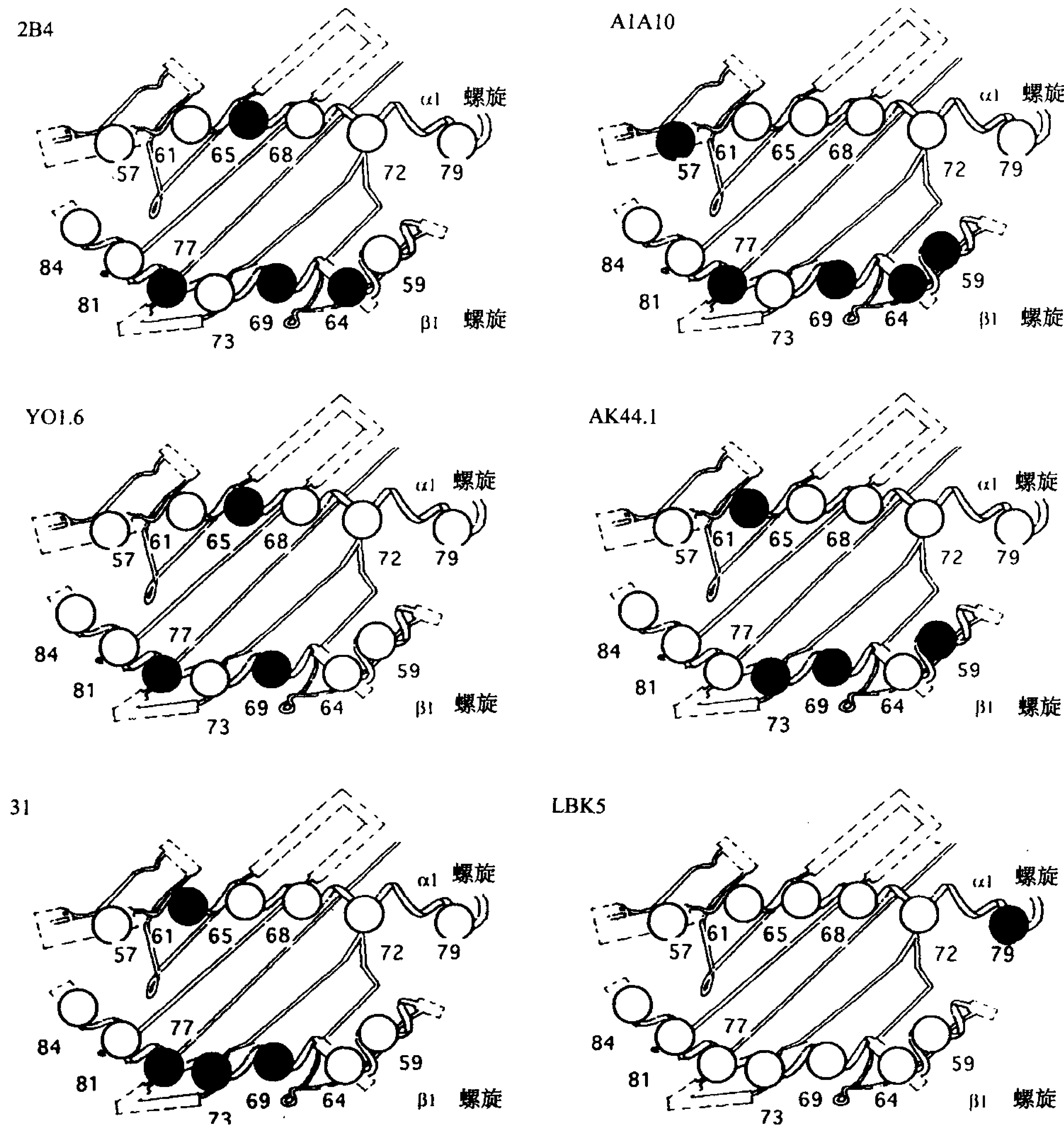


图 10.9 γδTCR 不识别与 αβTCR 相同的表位。此处表明的是 IE^k 分子 α 螺旋中一系列突变对 T 细胞识别的影响。实心圈标表示识别被抑制。此研究中的一个 γδ T 细胞,LBK5,并不识别中心肽结合槽部分。这也与何种肽占据这一位置无关相一致(见正文)。(引自参考文献[277]。)

有趣的是,T10 和密切相关的 T22 分子(94%的相似性)被鉴定为另一个 γδ 细胞克隆 KN6 的配体[280,281]。尽管 G8 是用 B10.BR 脾细胞免疫的 BALB/c 裸鼠所产生的,而 KN6 来源于双阴性的 C57BL/6 胸腺细胞。因此,这些非典型的 Ⅰ 类分子可被认为是 γδT 细胞的天然配体。不仅 T10 和 T22 的一级结构表明它们缺乏对经典 MHC 分子结合肽来说非常重要的必需结构特征[282],但结果也表明大肠杆菌表达的 T10 和 $β_2$ 微球蛋白

能够在无外源性肽加入的情况下折叠成稳定的复合物。这种折叠物在刺激 G8 方面是全能的[283]。因此，不仅 G8 在没有肽存在时识别 T10，而且 T10 和 T22 似乎也不结合肽。

非肽类抗原可刺激 γδ T 细胞

从健康人外周血及结核型麻风病人或类风湿性关节炎病人得到的 γδT 细胞对热灭活的分枝杆菌做出应答。前者主要的 T 细胞刺激成分不是分枝杆菌热激蛋白，而是含磷酸盐的非肽分子[284~287]。尽管一致认为磷酸盐是必要的成分，但不同的实验室用不同的分枝杆菌敏感克隆鉴定到的化合物似乎在结构上明显不同（表 10.6）。非磷酸盐部分包括独特的碳水化合物，磷酸盐部分包括 5′-三磷酸胸腺嘧啶核苷或 γ 磷酸位被特征未明的低分子质量结构替代的尿嘧啶核苷、异戊烯焦磷酸和相关的含异戊间二烯基焦磷酸衍生物。合成的磷酸盐链烯基和含异戊间二烯基的衍生物、焦磷酸盐以及来源于核苷和 dNTP 的 γ-单乙基衍生物[287]。尽管这些化合物的相对生物重要性仍有待阐明，但很明显，一组主要的刺激物是含磷酸盐的非肽类物质。同时也很清楚含多磷酸盐的化合物可以以不同的效率刺激不同的克隆。

表 10.6　刺激人 $V_{\gamma}9\delta2(V_{\gamma}2V_{\delta}2)$ T 细胞的非肽分枝杆菌抗原[a]

名称	结构	参考文献
磷酸碳水化合物	末端磷酸化的不同寻常的碳水化合物	Schoel 等[284]
TUBag3	X-尿苷-5′三磷酸	J. J. Fournie，个人通讯
TUBag4	X-胸苷-5′三磷酸	Constant 等[285]
异戊烯焦磷酸	$CH2-C(CH3)CH_2CH_2$-PPi	Tanaka 等[287]

[a]所有复合物已经从分枝杆菌提取物中分离，并需要进行对刺激活性所需的某些类型的磷酸化。未知结构“X”，当被磷酸化时，是 TUBag 化合物中活性最小的刺激组分。“X”不是含异戊间二烯基的或链烯基的衍生物（J. J Fournie，个人通讯。）

一个重要的发现是所有这些化合物在微生物和哺乳动物细胞中都可找到。Constant 等推测哺乳动物的 TTP-X 和 UTP-X 共轭化合物可能参与 DNA 和 RNA 的补救合成途径，因而可能涉及与 DNA 或 RNA 合成有关的代谢途径，如细胞增殖。这样的分子适合作为 γδT 细胞配体的应激抗原或保守的初级刺激物[262]。Taknka 等推测这些 γδT 细胞在识别微生物病原体和造血肿瘤细胞之间存在联系，这一点已通过共同的含异戊间二烯基的焦磷酸中间物、异戊烯基及相关的含异戊间二烯基的焦磷酸衍生物得到印证。这些化合物存在于正常哺乳动物细胞中，在脂代谢中可作为合成法呢焦磷酸的前体物质。哺乳动物细胞中，加入的法呢基被认为是膜相关 ras 蛋白的一种关键修饰，并且是转化活性所必需的。γδT 细胞在人的分枝杆菌感染病灶部位聚集并能对病毒和细菌感染的细胞应答，提示这些 γδT 细胞可对一些病原体与转化、受损、应激细胞的共有抗原做出应答。

γδ T 细胞的其他抗原特异性

对 γδT 细胞反应活性的早期研究表明经典 MHC 分子不是这些细胞的主要配体[251]。但有人发现它们可识别经典 MHC 分子或相关的分子如 TL、Qa^d 或 CD1，混合淋巴细胞反应中这种克隆的频率非常低，大约为 $1/10^5$，比产生同种异体反应的 αβT 细胞频率要低得多（1/10）。在许多情况下，这些 γδ T 细胞也显示出多数同种异体反应的 αβT 细胞中未见到的广泛的交叉反应，这与它们识别的特性存在根本不同相一致。

359

两例报告提出 γδ T 细胞的识别可能涉及细胞表面的复合抗原：①在表达 $Qa\text{-}1^b$（而不是 $Qa\text{-}1^a$）分子的刺激细胞存在情况下，γδT 细胞杂交瘤对人工合成的异分子聚合物 Glu-Tyr 做出反应[290]；②来自早期类风湿关节炎病人滑膜液的人 γδT 细胞克隆对破伤风毒素（tetanus toxin，TT）有应答[291]。TT 应答需要表达 MHC Ⅱ类分子的细胞 DRw53 存在，并可被抗 DRw53 的抗体抑制。在这两种情况下，不清楚 Glu-Tyr 聚合体和 TT 是否被呈递，如果被呈递加工，需要何种类型的抗原呈递加工过程也不清楚。除了这些特异性，已有报道，分枝杆菌 60kDa 热激蛋白及其来源的肽[292]、SEA[293]以及在有热激蛋白存在情况下，来源于 Ig 轻链的肽[294]能使 γδT 细胞产生应答。

CDR3 的长度分布分析表明 γδTCR 更像免疫球蛋白

在试图找到 γδT 细胞和 αβT 细胞识别上存在这些奇怪差别的分子基础时，Rock 等[295]描述了 CDR3 在三个不同的免疫受体链的长度分布：Ig、αβTCR 和 γδTCR，如图 10.10 所示。发现 α 和 βTCR 多肽的长度几乎相同，有非常限制的长度分布。相反，尽管 Ig 轻链的 CDR3 短得多并更为限制，而其重链的 CDR3 长度很长并且可变。X 射线衍射晶体结构分析表明 Ig 的 CDR3 环对抗原结合非常关键[36]，对于 αβTCR，它们似乎在接触结合到 MHC 分子的抗原肽方面尤其重要[45,197~201]。对 α 和 βCDR3 的长度限制可能反映了这种功能需要。令人惊奇的是，δ 链的 CDR3 长度长而且可变，而 TCRγ 链却短得多而且被限制。在这个方面，γδTCR 的 CDR3 长度分布与 Ig 非常相似，而与 αβTCR 明显不同。因此，γδTCR 作为一组，在抗原识别特性上可能更像 Ig。

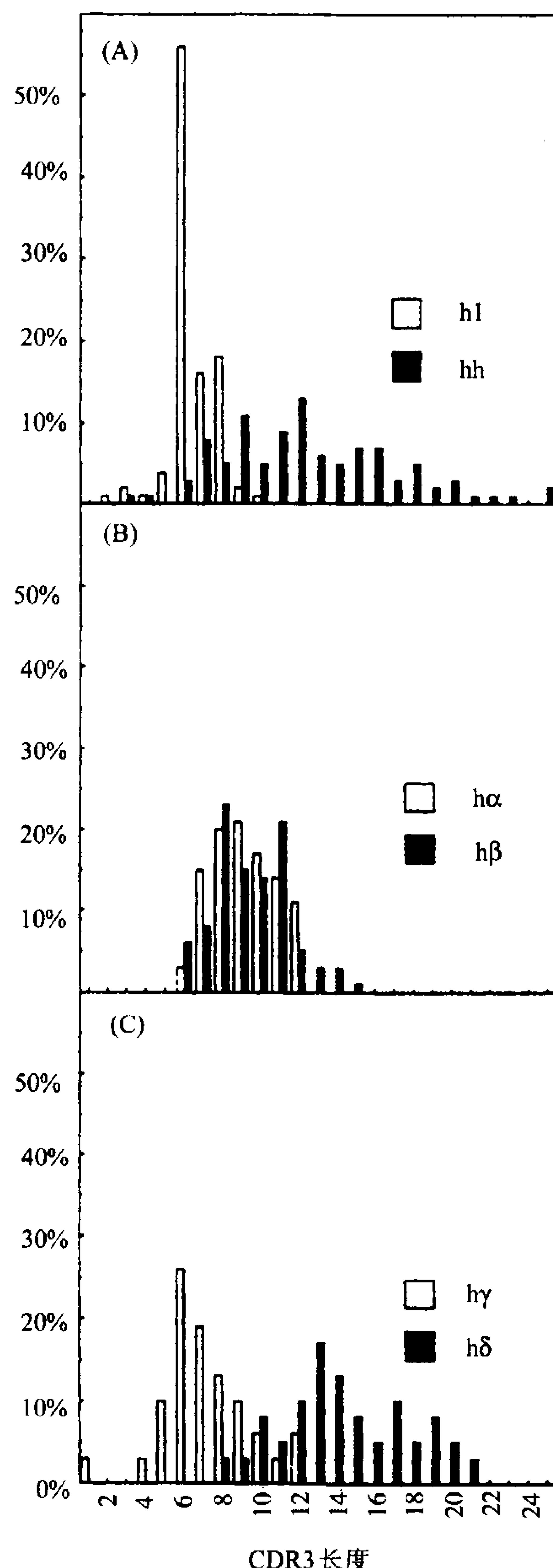


图 10.10 A-C CDR3 长度分布表明 γδTCR 的特性更像抗体。这些直方图显示了人抗原受体基因 CDR3 的长度分布，覆盖了从 V 区 C 端的保守半胱氨酸到 J 区第一个保守的甘氨酸。（差两个氨基酸。）（引自参考文献[295]。）

观察到 γδT 细胞克隆识别混合淋巴细胞反应中异源 MHC 分子的频率非常低（与 αβ 同种异体反应性克隆相比），并且多数克隆表现出高度的交叉反应（这在 αβ 同种异体反应性克隆中很少见）[6]，这一现象与 γδTCR 的识别更像 Ig 的提议一致，均集中在 MHC 分子的共同特征上。值得注意的是，LBK5 的特异性（IE^b 和 IE^k，而非 IE^d）与前面所描述的抗 IE 的抗体完全一样[296,297]。

360

沿着这条线，已发现对分枝杆菌提取物有反应的来自健康供体的人 γδT 细胞克隆表达有多种结合序列（CDR3）[298]的 $V_\gamma 9$ 和 $V_\delta 2$。这是天然发生的识别磷酸胆碱的小鼠 B 细胞中使用 Ig 受体的回忆反应。发现只有非常限制的 Ig 重链（$V_H 11$、$V_H 12$ 或 Q52）和轻链 V 区基因片段被使用，与可变的 CDR3 连接序列（K. Seidl. Ph. D. thesis, Stanford University, 1995）偶联。在后一情况下，对 V 基因的限制使用可能更重要，因为成百上千个 V_H 基因片段是可以用来引发 Ig 应答的。

δTCR 识别更像 Ig 的提示并不排除某些 γδT 细胞可识别与 αβT 细胞相似或相同配体的可能性。例如，我们可制备针对不同 MHC 亚型或独特肽-MHC 复合物的特异性抗体[299,300]。

如早先所讨论的，考虑到有助于连接区（CDR3）可变的所有元件，如使用的 D 和 J 元件的数目，D 元件可读框，连接多样性，N 区的核苷酸，据计算可能的 CDR3 的数目在 γδTCR 是最多的，Ig 是最少的（不考虑体细胞突变），αβTCR 居中[195]。这提示 γδTCR 有识别更广泛不同抗原的潜能。

活化时需要多价配体

γδTCR 和 αβTCR 的细胞表面表达需要 CD3 分子参与。因此，通过抗原受体的信号要求是多价抗原，以使动员的受体交联。细胞表面分子可被这样识别，但可溶性抗原必须形成多价形式。表明这种需要的例子是：

γδT 细胞可识别细胞表面分子 IE^k、T10/T22 和 HSV gI 蛋白，但只有当结合到塑料板上，可溶形式的蛋白才可被识别(例如，以多价形式呈现)。有趣的是，小的含磷酸盐化合物对具有分枝杆菌提取物反应活性的 γδT 细胞克隆的刺激需要细胞-细胞之间的接触(图 10.4)，并且所有细胞类型均可诱导这种识别。

需要多价抗原提示可溶性抗原(如含磷酸盐的化合物)的识别与细胞表面的特定分子相关。了解对可溶性抗原的结合和展示是否通过表面的多种不同分子或仅通过有限的几组分子来完成，以及它们是否形成了抗原受体识别的部分表位是非常重要的。

尽管上述的识别多数来自模型系统的观察结果，但对分枝杆菌抗原的鉴定很明显来自“生理相关”事件。测定这些规则在其他系统中的通用性，尤其是病理系统，将是非常有趣的。这使得我们能够更好地定义 γδT 细胞的作用，包括 γδT 细胞的识别对象以及这种识别在病理情况下产生的结果。

γδT 细胞的特异性问题在理解这些细胞的发育中也是非常重要的。尽管 γδTCR 转基因小鼠实验已提示如同 αβT 细胞一样，它们也存在阴性和阳性选择，其他实验却表明选择方式完全不同[303]。有趣的是，在病原体和哺乳动物细胞中均发现有从分枝杆菌提取物分离得到的磷酸盐。因而，它们既是自我，也是非我。但有这种特异性的 γδT 细胞似乎并未从正常库中排除。

CDR3 多样化：TCR 和免疫球蛋白对抗原互补作用的普遍策略

在对产生 TCR 和 Ig 的基因重排详细分析时观察到的一个有趣的现象，对于给定 TCR 的一条或两条链的 CDR3，其多样性怎样比其他 CDR 多得多？图 10.11 为人 Ig 和 αβTCR、γδTCR 异源二聚体多样性概图。就 αβTCR 而言，V_α 和 V_β 的 CDR3 环中均存在这种多样性的集中，并且结构数据[43,45]已证实这些环主要位于抗原肽中心上方(见前面章节)。尽管 αβTCR 中，这种多样性集中主要存在于许多可能的抗原肽接触区域似乎是合情合理的，但对解释 Ig 或 γδTCR 却困难得多。很明显，这一现象背后必定存在某些化学或结构逻辑。Cunningham、Wells[304] 和 Clackson、Wells[305] 的研究提供了这可能是什么的线索。他们依据 X 射线衍射晶体学的测定结果系统地突变了人生长激素和其受体界面的所有氨基酸(到丙氨酸)。有趣的是，即使在 X 射线衍射结构分析表明多数残基的氨基酸侧链被包埋在另一侧的情况下，每一侧的大约 30 个突变中仅 1/4 对结合亲和力有影响。这些研究对蛋白晶体结构的阐明提出了一个重要警告：尽管在给定的相互作用中，鉴定哪些氨基酸是重要的非常有价值，但并不表明哪些是最重要的。这是可以推测的，因为在许多位置“适合”并不

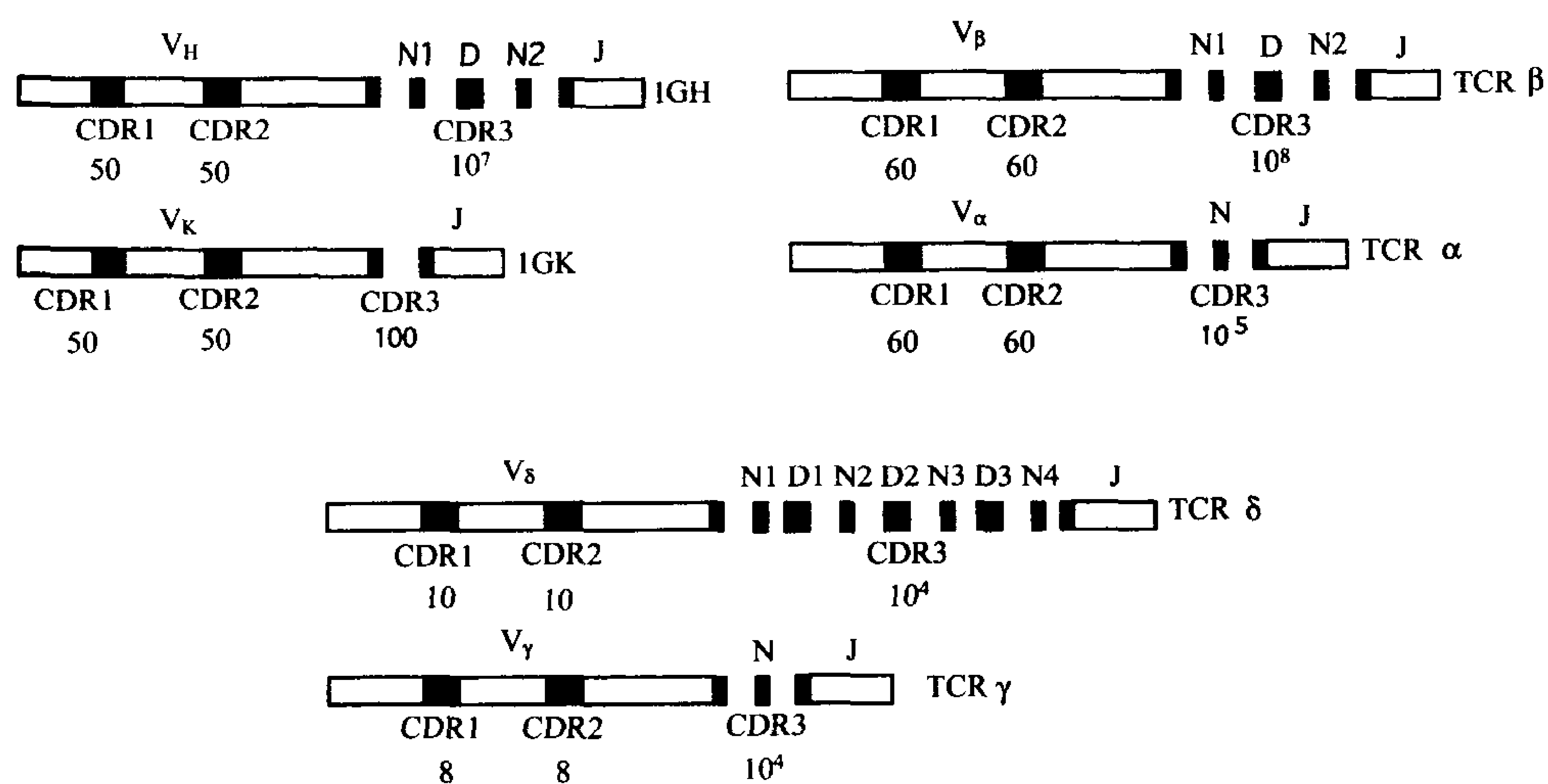


图 10.11 人抗原受体分子中，对可能的序列多样性进行推算所得出的 Ig 和 TCR 多样性“图”。对于每一基因片段的连接，额外的 N 区被认为贡献了 0~6 个核苷酸，很少利用这种多样性形式的 IgK 链除外。(引自参考文献[306]。)

“恰恰”足以对相互作用增加显著的结合能量。此文中我们提出了一个新的模型[306]，在此模型中，Ig 或 TCR 的主要抗原特异性来自它最多样的 CDR3 环。对于抗体，我们设想对抗原的多数特异性接触由 V_H CDR3 完成，其他的 CDR 提供了接触机会，通常对结合能量和特异性仅有微弱的贡献力。一旦遇到抗原，克隆选择激活特定的 B 细胞，体细胞突变将改善 CDR1 和 CDR2 的结合，把典型的低亲和力抗体转变为高亲和力型，正如 Berek 和 Milstein[307] 以及近来 Patten 等[308] 所观察到的。这一模型提示，假如全部 CDR3 多样性可能获得，就像 Taylor 等[309] 以及我们实验(J.L.Xu 和 M.M.Davis，未发表)所观察到的，那么 TCR 或 Ig 基因座中即使单个 TCR 或 IgV 区就有可能容纳多数抗原。关于 γδTCR，我们期望与典型配体结合的多数特异性存在于 CDR3-肽的接触，而 CDR1 和 CDR2 区域只做不很重要的接触。γδTCR 的情况更像抗体，只是没有体细胞突变带来的亲和力提高。我们对 TCRδCDR3 中所见到的极端多样性有一个特别的解释：即它必须高度特异地识别蛋白表面和小的非肽分子。或许缺乏体细胞突变迫使它在最初的库容方面提供了更大的多样性。

尽管对这一假设的直接验证刚刚开始，但作为抗原-受体特异性的普遍机制及有趣的分子遗传谜团的答案，其前景似乎相当光明。

结论

自从 20 世纪 80 年代初期 TCR 首次被鉴定以来，关于其遗传学、生化、结构和功能方面的信息已积累形成了一个独特领域。尽管确实取得了进展，但许多问题依然未解决：γδT 细胞通常“看”的是什么，它们起什么作用？在正常的应答过程中超抗原的确切作用是什么，这对病原体和(或)寄生虫有什么益处？TCR 特异性的结构-化学基础是什么？结合配体后 TCR/CD3 分子发生了哪种类型的重排或构象的改变？这些和其他问题将是今后多年进一步研究的内容。

致谢

我们非常感谢 Stephen Hedrick 博士允许我们在他以前杰出工作的基础上完成这一章的编写，感谢哈佛 Hughes 医学研究所和 NIH 对研究的资助。我们也感谢 H. Li，R.Mariuzza，C.Garcia 和 I.Wilson 提供了 TCR 结构图，感谢 D.Lyons 为本章绘制了精美的插图。

(郭　波 译)

参考文献

1. Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitized T-lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 1974;251:547.
2. Zinkernagel R, Doherty P. H-2 compatibility requirement for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: different cytotoxic T cell specificities are associated with structures from H-3K or H-2D. *J Exp Med* 1975;141:1427.
3. Shevach EM, Rosenthal AS. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. II. Role of the macrophage in the regulation of genetic control of the immune response. *J Exp Med* 1973;138:1213.
4. Katz DH, Hamaoka T, Benacerraf B. Cell interactions between histoincompatible T and B lymphocytes. II. Failure of physiological cooperative interactions between T and B lymphocytes from allogeneic donor strains in humoral response to hapten-protein conjugates. *J Exp Med* 1973;137:1405.
5. Terhorst C, Spits H, Stall F, Exley M. T lymphocyte signal transduction. In: Hames BD, Glover DM, eds. *Molecular immunology*, 2nd ed. Oxford: IRL Press, 1996.
6. Chien Y-H, Jores R, Crowley MP. Recognition by γ/δ T cells. *Annu Rev Immunol* 1996;14:511.
7. Infante AJ, Infante PD, Gillis S, Fathman CG. Definition of T cell idiotypes using anti-idiotype antisera produced by immunization with T cell clones. *J Exp Med* 1982;155:1100.
8. Allison JP, McIntyre BW, Bloch D. Tumor-specific antigen of murine T lymphoma defined with monoclonal antibody. *J Immunol* 1982; 129:2293.
9. Meuer SC, Fitzgerald KA, Hussey RE, Hodgdon JC, Schlossman SF, Reinherz EL. Clonotypic structures involved in antigen specific human T cell function: relationship to the T3 molecular complex. *J Exp Med* 1983;157:705.
10. Haskins K, Kubo R, White J, Pigeon M, Kappler J, Marrack P. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1983;157:1149.
11. Kaye J, Procelli S, Tite J, Jones B, Janeway CAJ. Both a monoclonal antibody and antisera specific for determinants unique to individual cloned helper T cell lines can substitute for antigen and antigen-presenting cells in the activation of T cells. *J Exp Med* 1983;158:836.
12. Samelson LE, Germain RN, Schwartz RH. Monoclonal antibodies against the antigen receptor on a cloned T cell hybrid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:6972.
13. MacIntyre BW, Allison JP. Biosynthesis and processing of murine T-cell antigen receptor. *Cell* 1984;38:654.
14. Kappler J, Kubo R, Haskins K, et al. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells in mouse and man. V. Identification of constant and variable peptides. *Cell* 1983;35:295.
15. Davis MM, Cohen DI, Nielsen EA, DeFranco AL, Paul WE. The isolation of B and T cell-specific genes. In: Vitteta E, ed. *B and T cell tumors*, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, vol. 24. New York: Academic Press, 1982: 215.
16. Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 1984;308:149.
17. Hedrick SM, Nielsen EA, Kavaler J, Cohen DI, Davis MM. Sequence relationships between putative T-cell receptor polypeptides and Igs. *Nature* 1984;308: 153.
18. Yanagi Y, Yoshikai Y, Leggett K, Clark SP, Aleksander I, Mak TW. A human T

cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* 1984;308:145.
19. Acuto O, Fabbi M, Smart J, et al. Purification and NH2-terminal amino acid sequencing of the beta subunit of a human T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3851.
20. Chien Y, Becker DM, Lindsten T, Okamura M, Cohen DI, Davis MM. A third type of murine T-cell receptor gene. *Nature* 1984;312:31.
21. Saito H, Kranz D, Takagaki Y, Hayday A, Eisen H, Tonegawa S. A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1984;312:36.33.
22. Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday AC, Eisen HN, Tonegawa S. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 1984;309:757.
23. Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, et al. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 1986;322:145.
24. Chien YH, Iwashima M, Kaplan KB, Elliott JF, Davis MM. A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* 1987;327:677.
25. Loh EY, Lanier LL, Turck CW, et al. Identification and sequence of a fourth human T cell antigen receptor chain. *Nature* 1987;330:569.
26. Born W, Miles C, White J, et al. Peptide sequences of T-cell receptor delta and gamma chains are identical to predicted Cx and gamma proteins. *Nature* 1987; 330:572.
27. Bonyhadi M, Weiss A, Tucker PW, Tigelaar RE, Allison JP. Delta is the Cx gene product in the $\gamma\delta$ antigen receptor of dendritic epidermal cells. *Nature* 1987;330:574.
28. Dembic Z, Haas W, Weiss S, et al. Transfer of specificity by murine α and β T-cell receptor genes. *Nature* 1986;320:232.
29. Saito T, Weiss A, Miller J, Norcross MA, Germain RN. Specific antigen-Ia activation of transfected human T cells expressing murine Ti ab-human T3 receptor complexes. *Nature* 1987;325:125.
30. Havran WL, Chien YH, Allison JP. Recognition of self antigens by skin-derived T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Science* 1991;252:1430.
31. Novotny J, Tonegawa S, Saito H, Kranz DM, Eisen HN. Secondary, tertiary, and quaternary structure of T-cell specific immunoglobulin-like polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:742.
32. Brenner MB, McLean J, Scheft H, et al. Two forms of the TCR gamma protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1987;325:689.
33. Tan L, Turner J, Weiss TM. Regions of the T cell receptor alpha and beta chains that are responsible for interactions with CD3. *J Exp Med* 1991;173:1247.
34. Groettrup M, Ungewiss K, Azogui O, et al. A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor β chain and a 33 kDa glycoprotein. *Cell* 1993;75:283.
35. Saint-Ruf C, Ungewiss K, Groettrup M, Bruno L, Fehling HJ, von Boehmer H. Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 1994;206:1208.
36. Davies DR, Metzger HA. Structural basis of antibody function. *Annu Rev Immunol* 1983;1:87.
37. Novotny J, Tonegawa S, Saito H, Kranz DM, Eisen H. Secondary, tertiary, and quaternary structure of T-cell-specific immunoglobulin-like polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:742.
38. Chothia C, Boswell DR, Lesk AM. An outline structure of the T cell receptor. *EMBO J* 1988;7:3745.
39. Beale D, Coadwell J. Unusual features of the T cell receptor C domains are revealed by structural comparisons with other members of the immunoglobulin superfamily. *Biochem Physiol* 1986:85:205.
40. Bentley GA, Boulot G, Karjalainen K, Mariuzza RA. Crystal structure of the beta chain of a T cell antigen receptor. *Science* 1995;267:1984–1987.
41. Fields BA, Ober B, Malchiodi EL, et al. Crystal structure of the V alpha domain of a T cell antigen receptor. *Science* 1995;270:1821–1824.
42. Bentley GA, Mariuzza RA. The structure of the T cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 1996;14:563.
43. Garcia KC, Decagon M, Stanfield RL, et al. The structure of an $\alpha\beta$ T-cell receptor at 2.5Å. *Science* 1996;274:209.
44. Li H, Lebedeva MI, Llera AS, Fields BA, Brenner MB, Mariuzza RA. Structure of the Vδ domain of a human $\gamma\delta$ T cell antigen receptor. *Nature* 1998;391:502.
45. Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 1996;384:134–140.
46. Housset D, Mazza G, Gregoire C, Piras C, Malissen B, Fontecilla-Camps JC. The three-dimensional structure of a T-cell antigen receptor V alpha V beta heterodimer reveals a novel arrangement of the V beta domain. *EMBO J* 1997;14: 4205–4216.
47. Strong RK, Penny DM, Feldman RM, et al. Engineering and expression of a secreted murine T cell receptor with reduced N-linked glycosylation. *J Immunol* 1994;153:4111.
48. Reich Z, Boniface JJ, Lyons DS, Borochov N, Wachtel EJ, Davis MM. Ligand-specific oligomerization of T-cell receptor molecules. *Nature* 1997;387:617–620.
49. Klausner RD, Lippincott-Schwartz J, Bonifacino JS. The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:403.
50. Samelson LE, Harford HB, Klausner RD. Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* 1985;43:223.
50a. Goding, JW. A symmetrical surface IgG on MOPC-21 plasmacytoma cells contains one membrane heavy chain and one secretory heavy chain. *J. Immunol* 1982;128:2416.
51. Orloff DG, Frank SJ, Robey FA, Weissman AM, Klausner RD. Biochemical characterization of the eta chain of the T-cell receptor. *J Biol Chem* 1989;264: 14812.
52. Jin YJ, Clayton LK, Howard FD, et al. Molecular cloning of the CD3 eta subunit identifies a CD3 zeta-related product in thymus-derived cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3319.
53. Clayton LK, DAdamio L, Howard FD, et al. CD3 eta and CD3 zeta are alternatively spliced products of a common genetic locus and are transcriptionally and/or post-transcriptionally regulated during T-cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5202.
54. Rodewald HR, Arulanandam AR, Koyasu S, Reinherz EL. The high affinity Fc epsilon receptor gamma subunit (Fc epsilon RI gamma) facilitates T cell receptor expression and antigen/major histocompatibility complex-driven signaling in the absence of CD3 zeta and CD3 eta. *J Biol Chem* 1991;266:15974.
55. Orloff DG, Ra CS, Frank SJ, Klausner RD, Kinet JP. Family of disulphide-linked dimers containing the zeta and eta chains of the T-cell receptor and the gamma chain of Fc receptors. *Nature* 1990;347:189.
56. Koyasu S, DAdamio L, Arulanandam AR, Abraham S, Clayton LK, Reinherz EL. T cell receptor complexes containing Fc epsilon RI gamma homodimers in lieu of CD3 zeta and CD3 eta components: a novel isoform expressed on large granular lymphocytes. *J Exp Med* 1992;175:203.
57. Exley M, Wileman T, Mueller B, Terhorst C. Evidence for multivalent structure of T cell antigen receptor complex. *Mol Immunol* 1995;32:829.
58. Blumberg RS, Ley S, Sancho J, et al. Structure of the T-cell receptor: evidence for two CD3 epsilon subunits in the T-cell receptor-CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7220.
59. Jin YJ, Koyasu S, Moingeon P, Steinbrich R, Tarr GE, Reinherz EL. A fraction of CD3 epsilon subunits exists as disulfide-linked dimers in both human and murine T lymphocytes. *J Biol Chem* 1990;265:15850.
60. Fernandez-Miguel G, Alarcón B, Iglesias A, Sanz E, de la Hera A. Multivalent structure of an $\alpha\beta$ T cell receptor. *(submitted for publication)*.
61. Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 1988;6:629.
62. Cosson P, Lankford SP, Bonifacino JS, Klausner RD. Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs. *Nature* 1991;351:414.
63. Hall C, Berhout B, Alarcon B, et al. Requirements for cell surface expression of the human TCR/CD3 complex in non-T cells. *Int Immunol* 1991;3:359.
64. Alarcon B, Ley SC, Sanchez-Madrid F, et al. The CD3-gamma and CD3-delta subunits of the T cell antigen receptor can be expressed within distinct functional TCR/CD3 complexes. *EMBO J* 1991;10:903.
65. Letourneur F, Klausner RD. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science* 1992;255:79.
66. Letourneur F, Klausner RD. T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell-receptor zeta family proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8905.
67. Wegener AM, Letourneur F, Hoeveler A, Brocker T, Luton F, Malissen B. The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* 1992;68:83.
68. Romeo C, Amiot M, Seed B. Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor zeta chain. *Cell* 1992;68:889.
69. Klausner RD, Samelson LE. T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell* 1991;64:875.
70. Cantrell DA, Davies AA, Crumpton MJ. Activators of protein kinase C down-regulate and phosphorylate the T3/T-cell antigen receptor complex of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:8158.
71. Patel MD, Samelson LE, Klausner RD. Multiple kinases and signal transduction. Phosphorylation of the T cell antigen receptor complex. *J Biol Chem* 1987;262:5831.
72. Ashwell JD, Klausner RD. Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 1990;8:139.
73. Manolios N, Letourneur F, Bonifacino JS, Klausner RD. Pairwise, cooperative and inhibitory interactions describe the assembly and probable structure of the T-cell antigen receptor. *EMBO J* 1991;10:1643.
74. Minami Y, Weissman AM, Samelson LE, Klausner RD. Building a multichain receptor: synthesis, degradation and assembly of the T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2688.
75. Letourneur F, Klausner RD. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 1992;69:1143.
76. Frank SJ, Niklinska BB, Orloff DG, Mercep M, Ashwell JD, Klausner RD. Structural mutations reveal a novel role for the TCR zeta chain in cell activation. *Science* 1990;249:174.
77. Chen C, Bonifacino JS, Yuan L, Klausner RD. Selective degradation of T cell antigen receptor chains retained in a pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* 1988; 107:2149.
78. Alarcon B, Berkhout B, Breitmeyer J, Terhorst C. Assembly of the human T cell receptor-CD3 complex takes place in the endoplasmic reticulum and involves intermediary complexes between the CD3-gamma, delta, epsilon core and single

T cell receptor alpha or beta chains. *J Biol Chem* 1988;263:2953.
79. Bonifacino JS, Suzuki CK, Lippincott-Scwartz J, Weissman AM, Klausner RD. Pre-golgi degradation of newly synthesized T cell antigen receptor chains: intrinsic sensitivity and the role of subunit assembly. *J Cell Biol* 1989;109:73.
80. Wileman T, Carson GR, Concino J, Ahmed A, Terhorst C. The γ and ε subunits of the CD3 complex inhibit pre-Golgi degradation of newly synthesized T cell receptors. *J Cell Biol* 1990;110:973.
81. Bonifacino JS, Suzuki CK, Klausner RD. A peptide sequence confers retention and degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* 1990;247:79.
81a. Davis MM, Chien Y. T Cell receptors. In *Molecular Immunology*, 2ed. Glover D and Homes D, eds. 1996. Oxford: IRL Press, pp. 101–131.
82. Chien Y, Gascoigne NRJ, Kavaler J, Lee NE, Davis MM. Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene. *Nature* 1984;309:322–326.
83. Kavaler J, Davis MM, Chien Y. Localization of a T-cell receptor diversity-region element. *Nature* 1984;310:421–423.
84. Bosma M. B and T cell leakiness in the SCID mouse mutant. *Immunodefic Rev England* 1992;3:261.
85. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992;68:869.
86. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992;68:855.
87. Fujimoto S, Yamagishi H. Isolation of an excision product of T-cell receptor alpha-chain gene rearrangements. *Nature* 1987;327:242.
88. Okazaki K, Davis DD, Sakano HT. Cell receptor beta gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell* 1987;49:477.
89. Malissen M, McCoy C, Blanc D, et al. Direct evidence for chromosomal inversion during T-cell receptor beta-gene rearrangements. *Nature* 1986;319:28.
90. Iwashima M, Green A, Davis MM, Chien Y-H. Variable region (Vδ) gene segment most frequently utilized in adult thymocytes is 3′ of the constant region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:8161.
91. Elliott JF, Rock EP, Patten PA, Davis MM, Chien Y. The adult T-cell receptor δ-chain is diverse and distinct from that of fetal thymocytes. *Nature* 1988;331: 627–631
92. Heilig JS, Tonegawa S. Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature* 1986;322:836.
93. Hayday AC, Diamond DJ, Tanigawa G, et al. Unusual organization and diversity of T-cell receptor alpha-chain genes. *Nature* 1985;316:828.
94. Winoto A, Mjolsness S, Hood L. Genomic organization of the genes encoding mouse T-cell receptor alpha-chain. *Nature* 1985;316:832.
95. Yoshikai Y, Clark SP, Taylor S, et al. Organization and sequences of the variable, joining and constant region genes of the human T-cell receptor alpha-chain. *Nature* 1985;316:837.
96. Boysen C, Simon MI, Hood L. Analysis of the 1.1-Mb human alpha/delta T-cell receptor locus with bacterial artificial chromosome clones. *Genome Res* 1997;4: 330.
97. Koop BF, Wilson RK, Wang K, et al. Organization, structure, and function of 95 kb of DNA spanning the murine T cell receptor Cα/Cδ region. *Genomics* 1992; 13:1209.
98. Chien Y, Iwashima M, Wettstein DA, et al. T-cell receptor δ gene rearrangements in early thymocytes. *Nature* 1987;330:722–727.
99. Band H, Hochstenbach F, McLean J, Hata S, Krangel MS, Brenner MB. Immunochemical proof that a novel rearranging gene encodes the T cell receptor δ subunit. *Science* 1987;238:682.
100. Hata S, Brenner MB, Krangel MS. Identification of putative human T cell receptor δ complementary DNA clones. *Science* 1987;238:678.
101. Hata S, Satyanarayana K, Devlin P, et al. Extensive junctional diversity of rearranged human T cell receptor δ genes. *Science* 1988;250:1541.
102. Raulet DH. The structure, function, and molecular genetics of the γ/δ T cell receptor. *Annu Rev Immunol* 1989;7:175.
103. de Villartay JP, Lewis D, Hockett R, Waldmann TA, Korsmeyer SJ, Cohen DI. Deletional rearrangement in the human T-cell receptor a-chain locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:8608.
104. Villey I, Caillol D, Seiz F, Ferrier P, de Villartay JP. Defect in rearrangement of the most 5′ TCR-Jα (TEA): implications for TCR α locus accessibility. *Immunity* 1996;5:331.
105. Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 1996;272:5269:1755.
106. Gascoigne NR, Chien Y, Becker DM, Kavaler J, Davis MM. Genomic organization and sequence of T-cell receptor beta-chain constant and joining-region genes. *Nature* 1984;310:387.
107. Malissen M, Minard K, Mjolsness S, et al. Mouse T cell antigen receptor: structure and organization of constant and joining gene segments encoding the beta polypeptide. *Cell* 1984;37:1101.
108. Noonan DJ, Kofler R, Singer PA, Cardenas G, Dixon FJ, Theofilopoulos AN. Delineation of a defect in T cell receptor beta genes of NZW mice predisposed to autoimmunity. *J Exp Med* 1986;163:644.
109. Chou HS, Nelson CA, Godambe SA, Chaplin DD, Loh DY. Germline organization of the murine T cell receptor beta-chain genes. *Science* 1987;238:545.
110. Woodland DL, Kotzin B, Palmer E. Functional consequences of a T cell receptor Dβ2 and Jβ2 gene segment deletion. *J Immunol* 1990;14:379.
111. Hayday AC, Saito H, Gillies SD, et al. Structure, organization, and somatic rearrangement of T cell gamma genes. *Cell* 1985;40:259.
112. Garman RD, Doherty PJ, Raulet DH. Diversity, rearrangement, and expression of murine T cell gamma genes. *Cell* 1986;45:733.
113. Lefranc MP, Forster A, Rabbitts TH. Genetic polymorphism and exon changes of the constant regions of the human T-cell rearranging gene gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9596.
114. Lefranc MP, Forster A, Baer R, Stinson MA, Rabbitts TH. Diversity and rearrangement of the human T cell rearranging gamma genes: nine germ-line variable genes belonging to two subgroups. *Cell* 1986;45:237.
115. Huck S, Dariavach P, Lefranc MP. Variable region genes in the human T-cell rearranging gamma (TRG) locus: V-J junction and homology with the mouse genes. *EMBO J* 1988;7:719.
116. Strauss WM, Quertermous T, Seidman JG. Measuring the human T cell receptor gamma-chain locus. *Science* 1987;237:1217.79.
117. Vernooij BT, Lenstra JA, Wang K, Hood L. Organization of the murine T-cell receptor gamma locus. *Genomics* 1993;3:566.
118. Havran WL, Allison JP. Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T cell antigen receptors. *Nature* 1988;335:443.
119. McDougall S, Peterson CL, Calame K. A transcriptional enhancer 3′ of C β 2 in the T cell receptor β locus. *Science* 1988;241:205.
120. Krimpenfort P, de Jong R, Uematsu Y, et al. Transcription of T cell receptor β-chain genes is controlled by a down-stream regulatory element. *EMBO J* 1988;7:745.
121. Leiden JM. Transcriptional regulation of T cell receptor genes. *Annu Rev Immunol* 1993;11:539.
122. Sleckman BP, Bardon CG, Ferrini R, Davidson L, Alt FW. Function of the TCRα enhancer in αβ and γδ T cells. *Immunity* 1997;7:505.
123. Lauzurica P, Krangel MS. Temporal and lineage-specific control of T cell receptor alpha/delta gene rearrangement by T cell receptor alpha and delta enhancers. *J Exp Med* 1994;179:1913.
124. Lauzurica P, Krangel MS. Enhancer-dependent and -independent steps in the rearrangement of a human T cell receptor delta transgene. *J Exp Med* 1994; 179:43.
125. Waldmann TA, Davis MM, Bongiovanni KF, Korsmeyer SJ. Rearrangements of genes for the antigen receptor on T cells as markers of lineage and clonality in human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med* 1985;313:776.
126. Winoto A, Baltimore D. αβ lineage-specific expression of the T cell receptor α gene by nearby silencers. *Cell* 1989;59:649.
127. Diaz P, Cado D, Winoto A. A locus control region in the T cell receptor α/δ locus. *Immunity* 1994;1:207.
128. Ishida I, Verbeek S, Bonneville M, Itohara S, Berns A, Tonegawa S. T-cell receptor γδ and γ transgenic mice suggest a role of a γ gene silencer in the generation of αβ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3067.
129. Kronenberg M, Siu G, Hood LE, Shastri N. The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 1986;4:529.
130. Korsmeyer SJ. Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu Rev Immunol* 1992;10:785.
131. Finger LR, Harvey RC, Moore RC, Showe LC, Croce CM. A common mechanism of chromosomal translocation in T- and B-cell neoplasia. *Science* 1986;234:982.
132. Baer R, Chen K-C, Smith SD, Rabbitts TH. Fusion of an immunoglobulin variable gene and a T cell receptor constant gene in the chromosome 14 inversion associated with T cell tumors. *Cell* 1986;43:705.
133. Denny CT, Yoshikai YU, Mak TW, Smith SD, Hollis GF, Kirsch IR. A chromosome 14 inversion in a T cell lymphoma is caused by site-specific recombination between immunoglobulin and T cell receptor loci. *Nature* 1986;320:549.
134. Boehm T, Greenberg JM, Buluwela L, Lavenir I, Forster A, Rabbitts TH. An unusual structure of a putative T cell oncogene which allows production of similar proteins from distinct mRNAs. *EMBO J* 1990;9:857.
135. McGuire EA, Hockett RD, Pollock KM, Bartholdi MF, O'Brien SJ, Korsmeyer SJ. The t(11;14)(p15;q11) in a T cell acute lymphoblastic leukemia cell line activates multiple transcripts, including *Ttg-1*, a gene encoding a potential zinc finger protein. *Mol Cell Biol* 1989;9:2124.101.
136. Royer-Pokora B, Loos U, Ludwig W-D. *Ttg-2*, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif is overexpressed in acute T-cell leukaemia with the t(11;14)(p13;q11). *Oncogene* 1991;6:1887.
137. Boehm T, Foroni L, Kaneko Y, Perutz MF, Rabbitts TH. The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4367.
138. Visvader J, Begley CG, Adams JM. Differential expression of the LYL, SCL and E2A helix-loop-helix genes within the hemopoietic system. *Oncogene* 1991;6:187.
139. Begley CG, Aplan PD, Davey MP, et al. Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor δ-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2031.
140. Chen Q, Chen J-T, Tsai L-H, et al. The tal gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein. *EMBO J* 1990;9:415.
141. Finger LR, Kagan J, Christopher G, et al. Involvement of the TCL5 gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma. *Proc Natl Acad Sci*

USA 1989;86:5039.
142. Hatano M, Roberts CWM, Minden M, Crist WM, Korsmeyer SJ. Deregulation of a homeobox gene *HOX11*, by the t(10;14) in T cell leukemia. *Science* 1991;253:79.
143. O'Conner RD, Brown MG, Francke U. Immunologic and karyotypic studies in ataxia-telangiectasia: specificity of break points on chromosomes 7 and 14 in lymphocytes from patients and relatives. In: Bridges BA, Harnden DG, eds. *Ataxia-telangiectasia-a cellular and molecular link: Cancer, neuropathology and immune deficiency*. New York: John Wiley and Sons, 1982:259.
144. Aurias A, Dutrillaux B. Probable involvement of immunoglobulin superfamily genes in most recurrent chromosomal rearrangements from ataxia telangiectasia. *Hum Genet* 1986;72:210.
145. Lipkowitz S, Stern MH, Kirsch IR. Hybrid T cell receptor genes formed by interlocus recombination in normal and ataxia-telangiectasis lymphocytes. *J Exp Med* 1990;172:409.
146. Uematus Y, Ryser S, Dembic Z, et al. In transgenic mice the introduced functional T cell receptor beta gene prevents expression of endogenous beta genes. *Cell* 1988;52:831.
147. Padovan E, Casorati G, Dellabona P, Meyer S, Brockhaus M, Lanzavecchia A. Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science* 1993;262:422.
148. Malissen M, Trucy J, Jouvin-Marche E, Cazenave PA, Scollay R, Malissen B. Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol Today England* 1992;13:315.
149. Aifantis I, Buer J, von Boehmer H, Azogui H. Essential role of the pre-T cell receptor in allelic exclusion of the T cell receptor β locus. *Immunity* 1997;7:601.
150. O Shea CC, Thornell AP, Rosewell IR, Hayes B, Owen MJ. Exit of the pre-TCR from the ER/cis-golgi is necessary for signaling differentiation, proliferation, and allelic exclusion in immature thymocytes. *Immunity* 1997;7:591.
151. Takeshita S, Toda M, Yamagishi H. Excision products of T cell receptor gene support a progressive rearrangement model of the alpha/delta locus. *EMBO J* 1989;8:3261.
152. Winoto A, Baltimore D. Separate lineages of T cells expressing the alpha beta and gamma delta receptors. *Nature* 1989;338:430.
153. Dent AL, Matis LA, Hooshmand F, Widacki SM, Bluestone JA, Hedrick SM. Self-reactive gamma delta T cells are eliminated in the thymus. *Nature* 1990;343:714.
154. Wilson A, de Villartay J-P, MacDonald HR. T cell receptor δ gene rearrangement and T early α (TEA) expression in immature αβ lineage thymocytes: implications for αβ/γδ lineage commitment. *Immunity* 1996;4:37.
155. Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, et al. Mutations in T-cell receptor genes α and β block thymocyte development at different stages. *Nature* 1992;360:225.
156. Philpott KL, Viney JL, Kay G, et al. Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor αβ-expressing cells. *Science* 1992;256:1448.
157. Itohara S, Mombaerts P, Lafaille J, et al. T cell receptor delta gene mutant mice: independent generation of alpha beta T cells and programmed rearrangements of gamma delta TCR genes. *Cell* 1993;72:337.
158. van der Merwe PA, Barclay AN. Transient intercellular adhesion: the importance of weak protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci* 1994;19:354–358.
159. Boniface JJ, Davis MM. The affinity and kinetics of T-cell receptor binding to peptide/MHC complexes and the analysis of transient biomolecular interactions. In: Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C, Herzenberg LA, eds. *Handbook of Experimental Immunology*, 5th ed. Cambridge, MA: Blackwell Scientific, 1996.
160. Lin AY, Devaux B, Green A, Sagerström C, Elliott JF, Davis MM. Expression of T cell antigen receptor heterodimers in a lipid-linked form. *Science* 1990;249: 677–679.
161. Gregoire C, Lin SY, Mazza G, Rebai N, Luescher IF, Malissen B. Covalent assembly of a soluble T cell receptor-peptide-major histocompatibility class I complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;14:7184–7189.
162. Parham P, Lomen CE, Lawlor DA, et al. Nature of polymorphism in HLA-A,-B, and-C molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:4005–4009.
163. Wettstein, DA, Boniface JJ, Reay PA, Schild H, Davis MM. Expression of a functional Class II MHC heterodimer in a lipid-linked form with enhanced peptide/soluble MHC complex formation at low pH. *J Exp Med* 1991;174:219–228.
164. Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in Escherichia coli and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3429–3433.
165. Altman JD, Reay PA, Davis MM. Formation of functional class II MHC/peptide complexes from subunits produced in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10330–10334.
166. Jackson MR, Song ES, Yang Y, Peterson PA. Empty and peptide-containing conformers of class I major histocompatibility complex molecules expressed in Drosophila melanogaster cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:12117–12121.
167. Stern LJ, Wiley DC. The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty alpha beta heterodimers in the absence of antigenic peptide. *Cell* 1992; 68:465–477.
168. Kozono H, White J, Clements J, Marrack P, Kappler J. Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides. *Nature* 1994;369: 151-154.
169. Matsui K, Boniface JJ, Reay PA, Schild H, Fazekas de St Groth B, Davis MM. Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptor. *Science* 1991;254:1788–1791.
170. Weber S, Traunecker A, Oliveri F, Gerhard W, Karjalainen K. Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature* 1992;356:793–796.
171. Sykulev Y, Brunmark A, Jackson M, Cohen RJ, Peterson PA, Eisen HN. Kinetics and affinity of reactions between an antigen-specific T cell receptor and peptide-MHC complexes. *Immunity* 1994;1:15–22.
172. Malmqvist M. Biospecific interaction analysis using biosensor technology. *Nature* 1993;361:186.
173. Matsui K, Boniface JJ, Steffner P, Reay PA, Davis MM. Kinetics of T cell receptor binding to peptide-MHC complexes: correlation of the dissociation rate with T cell responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12862–12866.
174. Corr M, Slanetz A, Boyd L, et al. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science* 1994;265, 946–949.
175. Seth A, Stern LJ, Ottenhoff THM, et al. Binary and ternary complexes between T-cell receptor, class II MHC and superantigen *in vitro*. *Nature* 1994;369: 324–327.
176. Alam SM, Travers PJ, Wung JL, et al. T cell receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 1996;381:616–620.
177. Al-Ramadi BK, Jelonek MT, Boyd LF, Margulies DH, Bothwell ALM. Lack of strict correlation of functional sensitization with the apparent affinity of MHC/peptide complexes for the TCR. *J Immunol* 1995;155:662–673.
178. Lyons DS, Lieberman SA, Hampl J, et al. T cell receptor binding to antagonist peptide/MHC complexes exhibits lower affinities and faster dissociation rates than to agonist ligands. *Immunity* 1996;5:53–61.
179. Sykulev Y, Brunmark A, Tsomides TJ, et al. High-affinity reactions between antigen-specific T-cell receptors and peptides associated with allogeneic and syngeneic major histocompatibility complex class I proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994b;91:11487–11491.
180. Garcia K, Scott C, Brunmark A, et al. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/ MHC class I molecule complexes. *Nature* 1996;384:577–581.
181. Renard V, Romero P, Vivier E, Malissen B, Luescher IF. CD8 beta increases CD8 coreceptor function and participation in TCR-ligand binding. *J Exp Med* 1996; 184:2439–2444.
182. Kersh GJ, Allen PM. Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. *Nature* 1996;380:495.
183. Jameson SC, Bevan MJ. T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity* 1995;2:1.
184. Kessler BM, Bassanini P, Cerottini J-C, Luescher IF. Effects of epitope modification on T cell receptor-ligand binding and antigen recognition by seven H-$2K^d$-restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a photoreactive peptide derivative. *J Exp Med* 1997;185:4:629.
185. McKeithan K. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5042–5046.
186. Rabinowitz JD, Beeson C, Lyons DS, Davis MM, McConnell HM. Kinetic discrimination in T cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;93:1401–1405.
187. Vallitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 1995;375: 148–151.
188. Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable threshholds. *Science* 1996;273:104–106.
189. Janeway CA Jr. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:645–674.
190. Mannie MD, Rosser JM, White GA. Autologous rat myelin basic protein is a partial agonist that is converted into a full antagonist upon blockade of CD4. Evidence for the integration of efficacious and nonefficacious signals during T cell antigen recognition. *J Immunol* 1995;154:2642–2654.
191. Vidal K, Hsu BL, Williams CB, Allen PM. Endogenous altered peptide ligands can affect peripheral T cell responses. *J Exp Med* 1996;183:1311–1321.
192. Hampl J, Chien Y, Davis MM. CD4 augments the response of a T cell to agonist but not to antagonist ligands. *Immunity* 1997;7:1–20.
193. Madrenas J, Chau, LA, Smith J, Bluestone JA, Germain RN. The efficiency of CD4 recruitment to ligand-engaged TCR controls the agonist/partial agonist properties of peptide-MHC molecule ligands. *J Exp Med* 1997;185:219.
194. Madrenas J, Germain RN. Variant TCR ligands: new insights into the molecular basis of antigen-dependent signal transduction and T-cell activation. *Semin Immunol* 1996;8:83.
195. Davis MM, Bjorkman PJ. T cell antigen receptor genes and T cell recognition. *Nature* 1988;334:395.
196. Claverie JM, Prochinicka CA, Bouguelert L. Implications of a Fab-like structure for the T-cell receptor. *Immunol Today* 1989;10:10.
197. Engel I, Hedrick SM. Site-directed mutations in the VDJ junctional region of T cell recptor beta chain cause changes in antigenic peptide recognition. *Cell* 1988;54:473.
198. Katayama CD, Eidelman FJ, Duncan A, Hooshmand F, Hedrick SM. Predicted complementarity determining regions of the T cell antigen receptor determine antigen specificity. *EMBO J* 1995;14:927.
199. Jorgensen JL, Esser U, Fazekas de St Groth B, Reay PA, Davis MM. Mapping T cell receptor/peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature* 1992;355:224.

200. Jorgensen JL, Reay PA, Ehrich EW, Davis MM. Molecular components of T-cell recognition. *Annu Rev Immunol* 1992;10:835.
201. Sant, Angelo DB, Waterbury G, Preston-Hurlburt P, et al. The specificity and orientation of a TCR to its peptide-MHC class II ligands. *Immunity USA* 1996;4:367.
202. Sun R, Shepherd SE, Geier SS, Thomson CT, Sheil JM, Nathenson SG. Evidence that the antigen receptors of cytotoxic T lymphocytes interact with a common recognition pattern on the H-2Kb molecule. *Immunity USA* 1995;3:573.
203. Ehrich EW, Devaux B, Rock EP, Jorgensen JL, Davis MM, Chien Y. T cell receptor interaction with peptide/MHC and superantigen/MHC ligands is dominated by antigen. *J Exp Med* 1993;178:713–722.
204. Chang H-C, Smolyar A, Spoerl R, et al. Topology of T cell receptor-peptide/class I MHC interaction defined by charge reversal complementation and function analysis. *J Mol Biol* 1997;271:278.
205. Gao GF, Tormo J, Gerth UC, et al. Crystal structure of the complex between human CD8 alpha and HLA-A2.*Nature* 1997;387:630.
206. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990;248:705.
207. Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM. Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol* 1991;9:745.
208. McDonald KR, Acha-Orbea H. Superantigens of mouse mammary tumor virus. *Annu Rev Immunol* 1995;13:459.
209. Kappler JW, Wade T, White J, et al. A T cell receptor V beta segment that imparts reactivity to a class II major histocompatibility complex product. *Cell* 1987;49:263.
210. Kappler J, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987;49:273.
211. Kappler JW, Staerz U, White J, Marrack P. T cell receptor Vβ elements which recognize Mls-modified products of the major histocompatibility complex. *Nature* 1988;332:35.
212. MacDonald HR, Schneider R, Lees RK, et al. T-cell receptor Vβ use predicts reactivity and tolerance to Mlsa-encoded antigens. *Nature* 1988;332:40.
213. Happ MR, Woodland DL, Palmer E. A third T-cell receptor β-chain variable region gene encodes reactivity to Mls-1a gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6293.
214. Pullen AM, Marrack P, Kappler JW. The T cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self antigens. *Nature* 1988;335:796.
215. Woodland DL, Happ MP, Gollob KJ, Palmer E. An endogenous retrovirus mediating deletion of αβ T cells. *Nature* 1991;349:529.
216. Marrack P, Kushnir E, Kappler J. A maternally inherited superantigen encoded by a mammary tumour virus. *Nature* 1991;349:524.
217. Choi Y, Kappler JW, Marrack P. A superantigen encoded in the open reading frame of the 3′ long terminal repeat of mouse mammary tumour virus. *Nature* 1991;350:203.
218. Dyson PJ, Knight AM, Fairchild S, Simpson E, Tomonari K. Genes encoding ligands for deletion of Vβ11 T cells cosegregate with mammary tumour virus genomes. *Nature* 1991;349:531.
219. Frankel WN, Rudy C, Coffin JM, Huber BT. Linkage of *Mls* genes to endogenous mammary tumour viruses of inbred mice. *Nature* 1991;349:526.
220. Janeway CAJ, Yagi J, Conrad PJ, et al. T-cell responses to Mls and to bacterial proteins that mimic its behavior. *Immunol Rev* 1989;107:61.
221. Held W, Shakhov AN, Waanders G, et al. An exogenous mouse mammary tumor virus with properties of Mls-1a (Mtv-7). *J Exp Med* 1992;175:1623.
222. Callahan JE, Herman A, Kappler JW, Marrack P. Stimulation of B10.BR T cells with superantigenic staphylococcal toxins. *J Immunol* 1990;144:2473.
223. Takimoto H, Yoshikai Y, Kishihara K, et al. Stimulation of all T cells bearing V beta 1, V beta 3, V beta 11 and V beta 12 by staphylococcal enterotoxin A. *Eur J Immunol* 1990;20:617.
224. Kappler J, Kotzin B, Herron L, et al. V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 1989;244:811.
225. Choi YW, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P, Kappler J. Interaction of Staphylococcus aureus toxin "superantigens" with human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8941.
226. White J, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler JW, Marrack P. The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 1989;56:27.
227. Yagi J, Baron J, Buxser S, Janeway CAJ. Bacterial proteins that mediate the association of a defined subset of T cell receptor: CD4 complexes with class II MHC. *J Immunol* 1990;144:892.
228. Stuart PM, Woodward JG. Yersinia enterocolitica produces superantigenic activity. *J Immunol* 1992;148:225.
229. Abe J, Takeda T, Watanabe Y, et al. Evidence for superantigen production by Yersinia pseudotuberculosis. *J Immunol* 1993;151:4183.
230. Tomai M, Kotb M, Majumdar G, Beachey EH. Superantigenicity of streptococcal M protein. *J Exp Med* 1990;172:359.
231. Cole BC, Kartchner DR, Wells DJ. Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from Mycoplasma arthritidis. VII. Responsiveness is associated with expression of a product(s) of the V beta 8 gene family present on the T cell receptor alpha/beta for antigen. *J Immunol* 1989;142:4131.
232. Friedman SM, Crow MK, Tumang JR, et al. Characterization of the human T cells reactive with the Mycoplasma arthriditis-derived superantigen (MAM): generation of a monoclonal antibody against Vβ17, the T cell receptor gene product expressed by a large fraction of MAM-reactive human T cells. *J Exp Med* 1991;174:891.
233. Lafon M, Scott-Algara D, March PN, Cazenave P-A, Jouvin-Marche E. Neonatal deletion and selective expansion of mouse T cells by exposure to rabies virus nucleocapsid superantigen. *J Exp Med* 1994;180:1207.
235. Dobrescu D, Ursea B, Pope M, Asch AS, Posnett DN. Enhanced HIV-1 replication in Vβ12 T cells due to human cytomegalovirus in monocytes: evidence for a putative herpesvirus superantigen. *Cell* 1995;82:753.
236. Yao Z, Maraskovsky E, Spriggs MK, Cohen JI, Armitage RJ, Alderson MR. Herpesvirus saimiri open reading frame 14, a protein encoded by T lymphotropic herpesvirus binds to MHC class II molecules and stimulates T cell proliferation. *J Immunol* 1996;156:3260.
237. Denkers EY, Caspar P, Sher A. Toxoplasma gondii possesses a superantigen activity that selectively expands murine T cell receptor V beta 5-bearing CD8+ lymphocytes. *J Exp Med* 1994;180:985.
238. Held W, Waanders GA, Shakhov AN, Scarpellino L, Acha-Orbea H, MacDonald HR. Superantigen-induced immune stimulation amplifies mouse mammary tumor virus infection and allows virus transmission. *Cell* 1993;74:529.
239. Golovkina TV, Chervonsky A, Dudley JP, Ross SR. Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* 1992;69:637.
240. Howell MD, Diveley JP, Lundeen KA, et al. Limited T-cell receptor beta-chain heterogeneity among interleukin 2 receptor-positive synovial T cells suggests a role for superantigen in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10921.
241. Paliard X, West SG, Lafferty JA, et al. Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* 1991;253:325.
242. Abe J, Kotzin BL, Jujo K, et al. Selective expansion of T cells expressing T-cell receptor variable regions V beta 2 and V beta 8 in Kawasaki disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4066.
243. Conrad B, Weissmahr RN, Boni J, Arcari R, Schupbach J, Mach B. A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* 1997;90:303.
244. Malchiodi EL, Eisenstein E, Fields BA, et al. Superantigen binding to a T cell receptor β chain of known three-dimensional structure. *J Exp Med* 1995;182:1.
245. Pullen AM, Wade T, Marrack P, Kapper JW. Identification of the region of T cell receptor beta chain that interacts with the self-superantigen Mls-la. *Cell* 1990;61:1365.
246. Cazenave P-A, Marche PN, Jouvin-Marche E, et al. Vβ17 gene polymorphism in wild-derived mouse strains: two amino acid substitutions in Vβ17 region greatly alter T cell receptor specificity. *Cell* 1990;63:717.
247. Patten PA, Rock EP, Sonoda T, Fazekas de St Groth B, Davis MM. Transfer of putative CDR loops of T cell receptor V domains confers toxin reactivity, but not peptide specificity. *J Immunol* 1993;150:2281–2294.
248. Fields BA, Malchiodi EL, Li H, et al. Crystal structure of a T cell receptor beta-chain complexed with a superantigen. *Nature* 1996;384:188.
249. Hedrick SM, Eidelman FJ. T lymphocyte antigen receptors. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*, 3rd ed. New York: Raven Press, 1993:383–420.
250. Lew AM, Pardoll DM, Maloy WL, et al. Characterization of T cell receptor gamma chain expression in a subset of murine thymocytes. *Science* 1986;234:1401.
251. Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* 1993;11:637.
252. Sting G, Gunter KC, Tschachler E, et al. Thy-1+ dendritic epidermal cells belong to the T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2430.
253. Goodman T, Lefrancois L. Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. *Nature* 1988;333:855.
254. Itohara S, Farr AG, Lafaille JJ, et al. Homing of γδ thymocyte subset with homogeneous T-cell recpetors to mucosal epithelia. *Nature* 1990;343:754.
255. Augustin A, Kubo RT, Sim GK. Resident pulmonary lymphocytes expressing the γ/δ T-cell receptor. *Nature* 1989;340:239.
256. Asarnow DM, Kuziel WA, Bonyhadi M, Tigelaar RE, Tucker PW, Allison J. Limited diversity of γδ antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells. *Cell* 1988;55:837.
257. Feeney AJ. Predominance of VH-D-JH junctions occurring at sites of short sequence homology results in limited junctional diversity in neonatal antibodies. *J Immunol* 1992;149:222.
258. Boismenu R, Havran W. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science* 1994;266:1253.
259. Sim, G-K, Augustine A. Dominate expression of BID, an invariant undiversified T cell receptor δ chain. *Cell* 1990;61:397.
260. De Geus B, Van den Enden M, Coolen C, Nagelkerken L, Van der Heijden P, Rosing J. Phenotype of intraepithelial lymphocytes in euthymic and athymic mice: implications for differentiation of cells bearing a CD3-associated γδ T cell receptor. *Eur J Immunol* 1990;20:291.
261. Cron RQ, Gajewski TF, Sharrow SO, Fitch FW, Matis LA, Bluestone JA. Phenotypic and functional analysis of murine CD3+, CD4-, CD8- TCR-gamma/delta-expressing peripheral T cells. *J Immunol* 1989;142:3754.
262. Allison JP, Havran WL. The immunobiology of T cells with invariant γδ antigen receptors. *Annu Rev Immunol* 1991;9:679.
263. Ohga S, Yoshokai Y, Takeda Y, Hiromatsu K, Nomoto K. Sequential appearance of γδ- and αβ-bearing T cells in the peritoneal cavity during an i.p. infection with Listeria monozytogenes. *Eur J Immunol* 1990;20:533.

264. Ferrick D, Schrenzel M, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin W, Lepper H. Differential production of interferon-γ and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by γδ T cells in vivo. *Nature* 1995;373:255.
265. Kaufmann S. Bacterial and protozoal infections in genetically disrupted mice. *Curr Opin Immunol* 1994;6:518.
266. Carding S, Allan W, Kyes S, Hayday A, K B, Doherty P. Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by gamma/delta + T cells. *J Exp Med* 1990;172:1225.
267. Hiromatsu K, Yoshikai Y, Matsuzaki, G et al. A protective role of γ/δ T cells in primary infection with Listeria monocytogenes in mice. *J Exp Med* 1992;175:49.
268. Viney J, Dianda L, Roberts S, et al. Lymphocyte proliferation in mice congenitally deficient in T-cell receptor alpha beta + cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11948.
269. Mombaerts P, Arnoldi J, Russ F, Tonegawa S, Kaufmann S. Different roles of αβ and γδ T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature* 1993;365:53.
270. Kaufmann S, Ladel C. Role of T cell subsets in immunity against intracellular bacteria: experimental infections of knock-out mice with Listeria monocytogenes and Mycobacterium bovis BCG. *Immunobiology* 1994;191:509.
271. Kaufmann, SHE. γ/δ and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2272.
272. Komano H, Fuijura Y, Kawaguchi M, et al. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial γδ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:
273. Kaufmann S, Blum C, Yamamoto S. Crosstalk between alpha/beta T cells and gamma/delta T cells in vivo: activation of alpha/beta T-cell responses after gamma/delta T-cell modulation with the monoclonal antibody GL3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9620.
274. McMenamin C, Pimm C, McKersey M, Holt P. Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific gamma delta T cells. *Science* 1994;265:1869.
275. Wen L, Roberts S, Viney J, et al. Immunoglobulin synthesis and generalized autoimmunity in mice congenitally deficient in alpha beta(+) T cells. *Nature* 1994;369:654.
276. Horner A, Jabara H, Ramesh N, Geha R. Gamma/delta T lymphocytes express CD40 ligands and induce isotype-switching in B lymphocytes. *J Exp Med* 1995;181:1239.
277. Schild H, Mavaddat N, Litzenberger C, et al. The nature of major histocompatibility complex recognition by γδ T cells. *Cell* 1994;76:29.
278. Weintraub B, Jackson M, Hedrick S. Gamma delta T cells can recognize nonclassical MHC in the absence of conventional antigenic peptides. *J Immunol* 1994;153:3051.
279. Sciammas R, Johnson R, Sperling A, et al. Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR gamma delta cell. *J Immunol* 1994;152:5392.
280. Van Kaer L, Wu M, Ichikawa Y, et al. Recognition of MHC TL gene products by gamma delta T cells. *Immunol Rev* 1991;120:89.
281. Ito K, Van Kaer L, Bonneville M, Hsu S, Murphy D, Tonegawa S. Recognition of the product of a novel MHC TL region gene (27b) by a mouse gamma delta T cell receptor. *Cell* 1990;62:549.
282. Teitell M, Cheroutre H, Panwala C, Holcombe H, Eghtesady P, Kronenberg M. Structure and function of H-2 T (Tla) region class I MHC molecules. *Crit Rev Immunol* 1994;14:1.
283. Crowley MP, Reich Z, Mavaddat N, Altman JD, Chien Y. The recognition of the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule, T10, by the gamma delta T cell, G8. *J Exp Med* 1997;7:1223.
284. Schoel B, Sprenger S, Kaufmann S. Phosphate is essential for stimulation of V gamma 9V delta 2 T lymphocytes by mycobacterial low molecular weight ligand. *Eur J Immunol* 1994;24:1886.
285. Constant P, Davodeau F, Peyrat M, et al. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 1994;264:267.
286. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, et al. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8175.
287. Tanaka Y, Morita C, Tanaka Y, Nieves E, Brenner M, Bloom B. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* 1995;375:155.
288. Janis EM, Kaufman SHE, Schwartz RH, Pardoll DM. Activation of γδ T cells in the primary immune response to mycobacterium tuberculosis. *Science* 1989; 244:713.
289. Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM, et al. Lymphocytes bearing antigen-specific γδ T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* 1989; 339:544.
290. Vidovic D, Roglic M, McKune K, Guerder S, MacKay C, Dembic Z. Qa-1 restricted recognition of foreign antigen by a gamma delta T-cell hybridoma. *Nature* 1989;340:646.
291. Holoshitz J, Vila LM, Keroack BJ, McKinley DR, Baynme NK. Dual antigenic recognition by cloned human γ-δ T-cells. *J Clin Invest* 1992;89:308.
292. Born W, Hall L, Dallas A, et al. Recognition of a peptide antigen by heat shock reactive γδ T lymphocytes. *Science* 1990;249:67.
293. Loh EY, Wang M, Bartkowiak J, et al. Gene transfer studies of T-cell receptor-γ/δ recognition. Specifity for staphylococcal enterotoxin-A is conveyed by V-γ-9 alone. *J Immunol* 1994;152:3324.
294. Kim HT, Nelson EL, Clayberger C, Sanjanwala M, Sklar J, Krensky AM. Gamma delta T cell recognition of tumor Ig peptide. *J Immunol* 1995;154:1614.
295. Rock E, Sibbald P, Davis M, Chien Y. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J Exp Med* 1994;179:323.
296. Lerner E, Matis L, Janeway CJ, Jones P, Schwartz R, Murphy D. Monoclonal antibody against an Ir gene product? *J Exp Med* 1980;152:1085.
297. Ozato K, Mayer N, Sachs D. Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to mouse H-2 and Ia antigens. *J Immunol* 1980;124:533.
298. Fisch P, Malkovsky M, Kovats S, et al. Recognition by human Vγ9/Vδ2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* 1990;250: 1269.
299. Porgador A, Yewdell JW, Deng Y, Bennink JR, Germain RN. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* 1997;6:715.
300. Dafaglio G, Nelson CA, Deck BM, Petzold SJ, Unanue ER. Characterization and quantitation of peptide-MHC complexes produced from hen egg lysozyme using a monoclonal antibody. *Immunity* 1997;6:727.
301. Lang F, Peyrat M, Constant P, et al. Early activation of human Vγ9Vδ2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J Immunol* 1995;154:5986.
302. Morita CT, Beckman EM, Bukaurki JF, et al. Direction presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human γδ T cells. *Immunity* 1995;3:495.
303. Iwashima M, Green A, Bonyhadi M, Davis M, Allison J, Chien Y. Expression of a fetal γδ T-cell receptor in adult mice triggers a non-MHC-linked form of selective depletion. *Int Immunol* 1991;3:385.
304. Cunningham BC, Wells JA. Comparison of a structural and a functional epitope. *J Mol Biol* 1993;234:554.
305. Clackson T, Wells JA. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* 1995;267:383.
306. Davis MM, Chien Y, Arden B. The logic of immune recognition: correlating the genetics of antigen receptors with their function. *Proc Natl Acad Sci USA (submitted)*.
307. Berek C, Milstein C. The dynamic nature of the antibody repertoire. *Immunol Rev* 1988;105:5.
308. Patten PA, Gray NS, Yang PL, et al. The immunological evolution of catalysis. *Science* 1996;271:1078.
309. Taylor LD, Carmack CE, Huszar D, et al. Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM. *Int Immunol* 1994;6:579.

第11章　T淋巴细胞的分化与生物学

Christophe Benoist and Diane Mathis①

T细胞生物学的关键要素

T细胞以多种方式行使细胞免疫功能 • T细胞通过细胞表面高变受体识别抗原 • α:βT细胞识别结合于MHCⅠ、Ⅱ类分子的肽片段,通过这种方式识别抗原 • 并非全部,而是大多数T细胞产生于胸腺 • 初始α:βT细胞在次级淋巴组织中循环,直至与抗原相遇 • T细胞可以划分为两个主要的细胞系(每一细胞系还可细分)和一些小的细胞系

从前的和现在的重要工具与技术

细胞表面标志 • 多克隆有丝分裂原和超抗原 • T细胞克隆与杂交瘤 • 胚胎胸腺组织培养 • 放射骨髓嵌合体 • 转基因小鼠 • 基因靶定小鼠

T细胞信号转导

胸腺:何物,何为?

年轻成年小鼠的胸腺:基质细胞 • 年轻成年小鼠的胸腺:胸腺细胞 • T细胞分化路径 • 胚胎T细胞的发生 • 胚胎胸腺的发育 • 胚胎胸腺细胞的分化

T细胞生命周期中的重要事件

T细胞系的定向发育 • TCR基因的重排 • 前TCR介导的选择作用 • α:β/γ:δ抉择 • 阳性选择:自身MHC限制性谱系的形成 • 阴性选择:自身耐受谱系的形成

T淋巴细胞的外周循环

环路 • 黏附作用

T细胞应答

效应T细胞的功能

辅助B细胞 • 炎症刺激 • 细胞溶破作用 • γ:δ细胞 • 非常规T细胞 • 调节

T淋巴细胞记忆

T细胞的动态平衡和寿命

结论与展望

参考文献

T淋巴细胞是免疫系统中最具多样性、多效性的细胞,它们循环于血管、淋巴管之间,居留于胸腺、脾、淋巴结等典型的淋巴器官之中。而且在一些原来认为较少存有T细胞的部位,如皮肤、肠道、肝脏等,也可以发现大量的T细胞。这些细胞具备许多功能:杀伤不需要的细胞、调节免疫系统各组成部分的活性、分泌调节分子。而且还存在着一些T细胞亚群,它们的性质还未得到充分的认识,这也许暗示着还有其他的功能有待发现。因此,本章还难以对T细胞的性质、活性进行总体描述。我们将从准备阶段开始,先列举一些T细胞生物学的基本特点,并概述一些在阐述过程中起关键作用的技术和工具。其中大多数内容将在本章下文或其他章节中更为详细的论述。 367

① C. Benoist and D. Mathis: Department of Immunology, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 76400 Strasbourg, France.

T细胞生物学的关键要素

T细胞以多种方式行使细胞免疫功能

高等生物在受到外来抗原攻击时,可以引发先天免疫和获得性免疫应答。这种获得性免疫主要由两股力量组成:由B淋巴细胞分泌抗体介导的体液免疫和主要由T淋巴细胞组成的细胞免疫。我们通常研究的许多免疫反应都是由细胞免疫引起的,包括细胞介导的淋巴溶破作用(cell-mediated lympholysis CML)、迟发型超敏反应(delayed-type hypersensitivity,DTH)、同种移植排斥、移植物抗宿主(graft-versus-host,GVH)病。而且细胞免疫在许多自身免疫反应中也起主要作用。

细胞免疫包括广泛的细胞应答和细胞-细胞相互作用。现在知道,T细胞可以作为杀伤细胞直接杀伤靶细胞、可以向这类杀伤细胞提供"辅助"、活化免疫系统中其他的细胞(如巨噬细胞)、辅助B细胞产生抗体应答反应、下调免疫系统中多种细胞的活性、分泌细胞因子、趋化因子和其他介质。不同类型T细胞的主要作用经常不同。这些不同的作用共同形成了T细胞活性的多样性。因此可以形成T细胞多种不同的分类方式:杀伤/辅助细胞亚群(基于主要的效应功能)、Ⅰ型/Ⅱ型辅助细胞(基于所分泌的细胞因子)、初始/活化/记忆细胞群(基于与抗原作用后的表现)。根据特殊的细胞表面标志表达的倾向性,可以对不同的T细胞类型进行区分,一个典型的例子就是:大部分辅助细胞表达CD4分子,缺失CD8分子,而大部分杀伤细胞则刚好相反。

368

关于细胞免疫更为详尽的论述,请见第1章。

T细胞通过细胞表面高变受体识别抗原

当T淋巴细胞表面受体识别特别的抗原时,引发自身活化。关于T细胞受体(T-cell receptor, TCR)结构和功能的认识很大程度上来自对B细胞受体和免疫球蛋白的类推。与B细胞相似,T细胞作为一个整体,可以对成千上万种不同的抗原作出应答,而单一T细胞通常只能对一种抗原发生反应。即使由于交叉反应,也只能对有限数目的抗原发生反应。其原因在于,TCR是一些具有巨大多样性的分子,而每一个T细胞表面通常只表达一种TCR分子。

TCR多样性与Ig多样性在产生机制上存在很大的相似性。每个TCR都由两条高变链构成,要么α和β链,要么γ和δ链,它们都属于Ig超家族(图11.1)。其编码基因由众多分散的基因片段组成,这些基因片段的重组产生了序列的高度可变性。例如鼠的β基因,含有254个V片段(variable segment ,V)、两个D延长区(diversity stretch, D)、12个J片段(joining segment, J)共同并置在染色体中,V、D、J中各一个片段与C区(constant region, C)的外显子进行拼接,共同转录。在一般情况下,这些片段的重排基本上是随机的,但也存有例外,特别是对于γ:δTCR的重排。不同片段拼接的同时,酶促性核苷酸的增加与减少产生了更大的多样性。最后由于不同的αβ链和γδ链的配对,又进一步加强了TCR的可变性。这个配对过程除了某些γ:δ和特殊种类的α:βTCR之外(见下文),在很大程度上是随机进行的。应答期的B细胞,基因发生特征性的体细胞突变,但是现在还没有确凿的证据说明功能性T细胞TCR基因也存在类似的突变现象。另外由于TCR的V片段相对有限,这就使得TCR的多态性主要集中于互补决定区3(complementary determining region -3, CDR3)。

通过所谓的同型排除(isotypic exclusion)和等位排除(allelic exclusion)机制,使每一个T细胞表面只表达一种TCR分子,但对这两种机制尚缺乏理解。同型排除确保每个T细胞只表达α:β或γ:δ链,这就意味着对于一个T细胞,两个细胞系中只能选择其一。等位排除使T细胞一对染色体的两个重排产物中只有其一得以表达。正如下文将述,同型和等位排除都不是一个绝对的过程。

TCR的可变链缺少一个胞内延长区,不能把TCR与配体结合的信号转入胞内。该功能是由一条称之为CD3的恒定链复合体完成的。这个复合体包括两条ε链、一条γ链和δ链、两条ζ样链组成(图11.1)。这些

链的功能区都处于细胞质内，并可与信号转导分子相互作用。CD3 组分的不同组合可能形成多种信号发生模式，可以对大量不同的信号进行转导。另外，在可变 TCR 链胞内转运以及在细胞表面有效表达的过程中，CD3 复合体也发挥着关键性的作用。

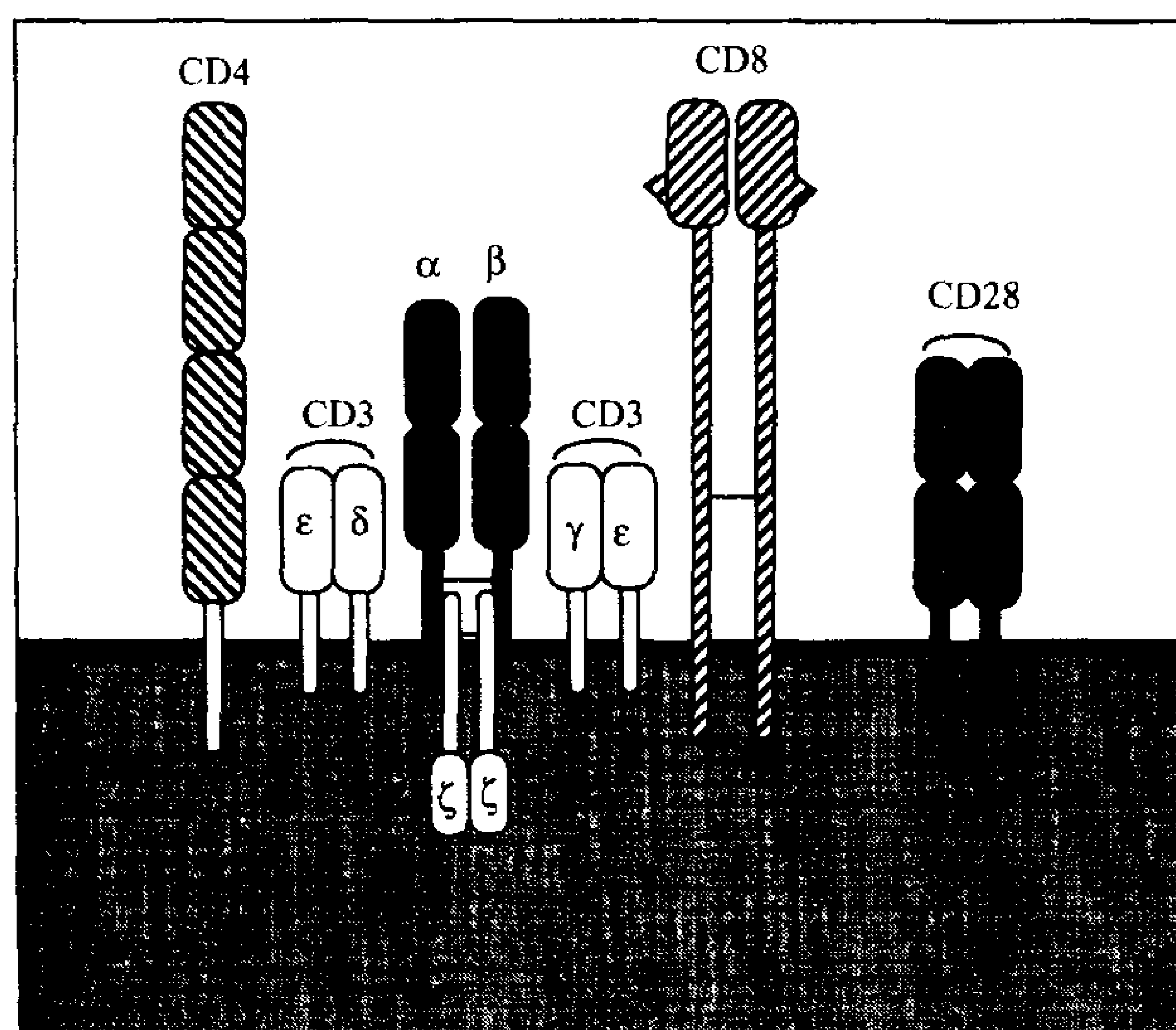


图 11.1 α:βTCR 及相关分子。图解显示 α:βTCR、各种 CD3 亚基、CD4/CD8 共受体以及 CD28 共刺激分子。目前尚不知道 CD3 的确切结构，本图所示为当前的公认结构。

α:β 细胞表面 TCR 几乎总是与 CD4 或 CD8 共同受体联系在一起（图 11.1）。这些共同受体分子与抗原性配基的恒定区结合（下节详述），而且两者都具有可以结合信号转导分子 $p56^{lck}$ 的胞内区。现在认为，共同受体可以提高 TCR 与配体相互作用的亲和力，或促进与配体结合时信号的发生。虽然看上去 CD4 和 CD8 的功能类似，但其结构却不同。大多数 γ:δ 细胞不表达共同受体。

TCR 通过与之相联系的 CD4 和 CD8 分子引发的刺激信号，尚不足以使初始 T 细胞（naive T cell）增殖、分泌效应性细胞因子，还需要第二信号/共刺激信号的协同。T 细胞表面的 CD28 分子可以与 B 细胞、巨噬细胞、树突细胞（dendritic cell, DC）等专职抗原呈递细胞（antigen-presenting cell, APC）的 B7-1 和 B7-2 分子结合，经典地提供这个共刺激信号（图 11.1）。然而在一些情况下，特别是应答已经启动的情况下，一种称之为 CTLA-4 的 CD28 同系物可与 B7-1/2 相互结合，提供共刺激信号，不过它更有可能对 T 细胞的活性发挥负性影响。在缺失共刺激信号的条件下，TCR 所引发的信号不仅不能刺激初始 T 细胞，实际上反而产生一种无反应状态，即所谓的无反应性（anergy）。在这种情况下，即使再次提供完整的刺激和共刺激信号，细胞也不能产生有效的应答。

TCR 的结构详见第 10 章，共刺激信号详见第 13 章。

α:βT 细胞识别结合于 MHC Ⅰ、Ⅱ 类分子的肽片段，通过这种方式识别抗原

与 B 细胞不同的是，抗原只有与一种由主要组织相容复合体（the major histocompatibility complex, MHC）编码的分子相结合，才能被 α:βT 细胞识别，而只有具备恰当的等位基因变异的 T 细胞才能对这种抗原进行识别。这个现象称为 MHC 限制性（MHC restriction），发现于 20 世纪 70 年代，随后就引起了免疫学家的兴趣。然而，直到最近 20 年，MHC 限制性的分子基础才逐渐明了。这些成绩很大程度上得益于 MHC 基因的克隆和序列分析，以及对它所编码蛋白质进行的 X 射线晶体衍射分析。

如上所述，成熟 α:βT 细胞可以根据是否表达 CD4 或 CD8 共同受体分子而划分为两个主要亚群。CD4+ 和 CD8+ 细胞在主要效应功能、识别的抗原所结合的 MHC 分子类型方面，以及它们所监视抗原的类型都有所不同。

CD8+ α:βT 细胞通过直接杀伤作用，主要负责对靶细胞的清除。如被病毒感染的细胞和表达有肿瘤特

异性新抗原(tumor-specific neoantigen)的细胞。CD8+细胞受体识别结合有特殊抗原的特殊MHCⅠ类分子后,产生应答(图11.2)。全身所有类型的细胞基本上都表达典型的Ⅰ类分子。它们由一条重链/α链和一条不为MHC编码的轻链/β_2微球蛋白(β_2 microglobulin, β_2m)组成。膜远端的α1、α2片段具有高度的多态性(polymorphic)。而α3的多态性较低,并且具有Ig样结构。β_2m也具有Ig样结构,其序列基本上是不变的。X射线晶体衍射研究显示,大多数的多态性残基构成了一个槽的壁和底,而这个槽的尺度适合于一个短肽。事实上,有可能把体外人工合成的肽加载到某些突变细胞表面“空载”的MHC Ⅰ类分子上,也有可能把一组异源性肽从正常细胞表面MHC Ⅰ类分子上洗脱下来。与Ⅰ类分子结合的肽通常长约8~10个氨基酸,并且有特定的序列基序(sequence motif)。这个基序的序列随着MHC分子的同型、等位型的不同而有所变化,这种变化是对结合槽中结构性口袋的反映。这些肽几乎全部来源于靶细胞内合成的蛋白质,而且主要是位于细胞质内的蛋白质。蛋白酶体(proteosome)将胞质蛋白分解成肽片段,后者在抗原加工相关转运分子(transporter associated with antigen processing, TAP)的辅助下主动转移进入内质网腔(endoplasmic reticulum, ER),与Ⅰ类分子重-轻链的聚体结合,并获得稳定性。肽-Ⅰ类分子复合体通过经典转运途径转移到细胞表面,进而可以被CD8⁺细胞表面受体识别。在识别过程中,TCR可变链对应于肽和Ⅰ类分子结合槽的多形性残基,而CD8分子结合于Ⅰ类分子α3的恒定区序列。

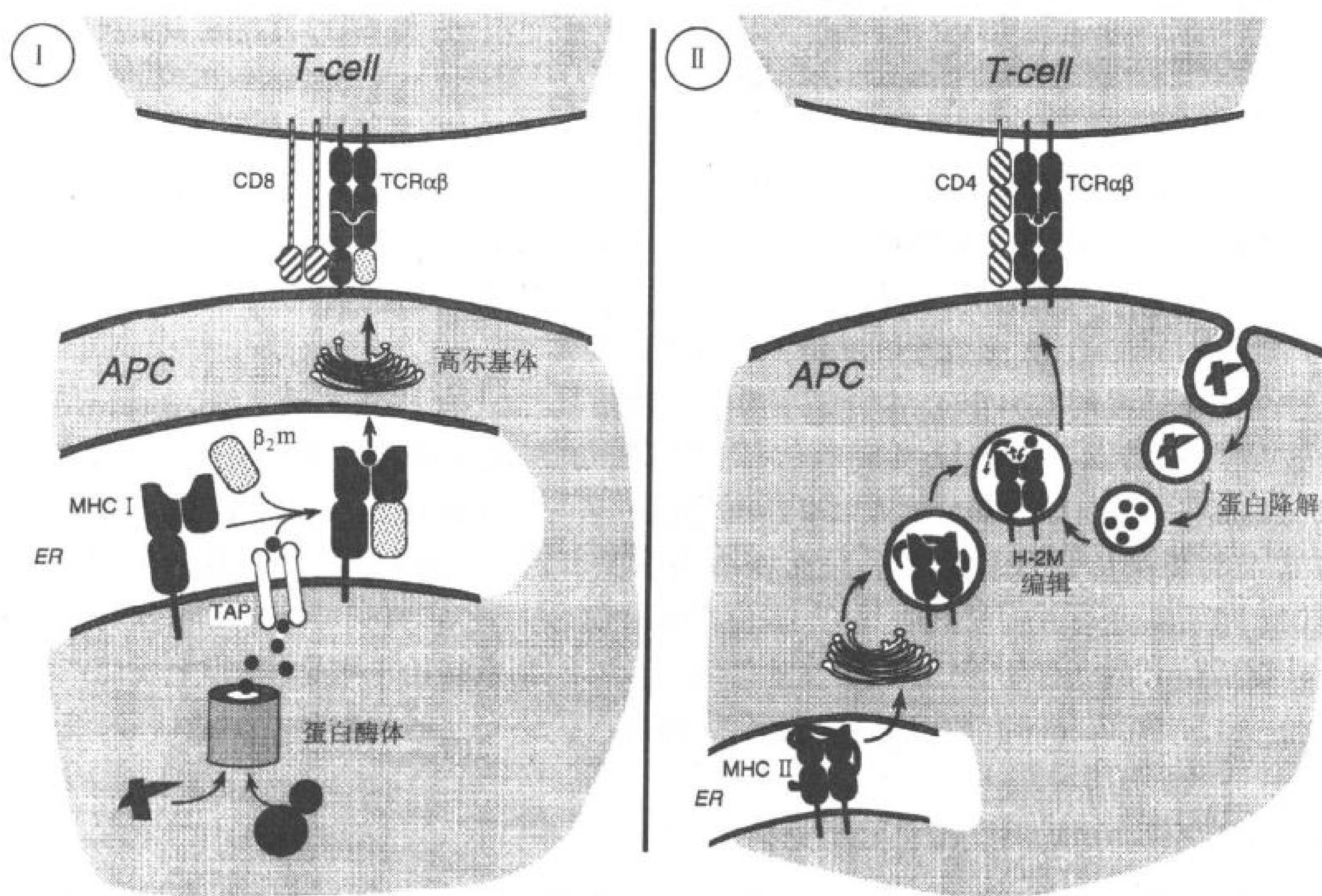


图11.2 MHC Ⅰ和MHC Ⅱ类限制性抗原的呈递。左图显示肽同MHC Ⅰ类分子的组装,并被CD8⁺T细胞表面α:βTCR识别的过程。胞浆蛋白被蛋白酶体降解产生肽,TAP转运分子将其运至内质网腔。右图显示肽同MHC Ⅱ类分子的组装,并被CD4⁺T细胞表面TCR识别的过程。图中所示,内质网中与MHC Ⅱ分子形成二聚体的分子为恒定链(Ⅰi)。当二聚体到达内体区室时,只有一个Ii的短片段与MHC Ⅱ结合槽相连,这个短片段称之为CLIP。在内体区室中来源于蛋白质的肽将CLIP替换,这个过程与H-2M分子有关。

另一方面,通过直接细胞-细胞接触或分泌介质对免疫系统中其他的细胞进行调节,这是CD4⁺α:βT细胞的主要功能。在体内只有有限的一些细胞表达MHC Ⅱ类分子,特别是B细胞、巨噬细胞、树突细胞等专职APC。当结合在这些MHC Ⅱ类分子上的肽被CD4⁺细胞的TCR识别时,引发CD4⁺T细胞应答(图11.2)。Ⅱ类分子由一条α和一条β链组成,并且都属于Ig超家族。与MHCⅠ类分子类似,Ⅱ类分子的两个膜远端α1、

β1 区也具有高度多态性,其中可等位变化的残基是肽结合槽的主要组成部分。近期的 X 射线晶体衍射数据显示,Ⅰ、Ⅱ类分子具有大体相似的结构,但后者的结合槽较浅,两端较开放。所以Ⅱ类分子结合肽的范围更广,通常长约 13~15 个氨基酸,但有时要远长于此。另外一个结果表明,Ⅱ类分子的序列基序不那么严格,这表明肽片段也许可以在结合槽内滑动。结合于 Ⅱ类分子的肽产生于溶酶体途径,既可以来源于内源性合成的蛋白质,也可以来源于经内化作用而从周围环境中捕获的蛋白质或病原。Ⅱ类分子的 α、β 链在 ER 合成之后,与一条恒定链(invariant chain, Ii)结合,后者可以阻止Ⅱ类分子与 ER 内的肽结合,并且具有将Ⅱ类分子-Ii 复合体靶向于内体区室(endosomal compartment)的双重作用。在内体区室中,通过一个主动过程由囊泡蛋白酶(vesicular protease)降解蛋白质而产生的异源性肽替代 Ii(现在已经不是一个完整的 Ii 片段了)。而后通过一个未知机制将肽-MHC Ⅱ复合体转移至细胞表面,在那里它可被 $CD4^+$ T 细胞识别。在这个识别过程中,TCR 可变链识别抗原肽和Ⅱ类分子结合槽周边的多态性区域;CD4 共同受体结合Ⅱ类分子 α2、β2 的恒定区。

这样,根据 $CD8^+$ 细胞/Ⅰ类限制性,$CD4^+$ 细胞/Ⅱ类限制性的二分法,免疫系统就可以将混杂在一起的抗原,根据不同的途径进行有效的区分,并且利用最为恰当的效应细胞将这些抗原清除(图 11.2)。

MHC Ⅰ、Ⅱ类分子都可以被 γ:δT 细胞识别,但这并非是必要条件。进一步讲,目前并未鉴定出 γ:δT 细胞所识别的肽类抗原,但却发现它可以识别一类含有磷酸盐的非肽类小分子物质。γ:δT 细胞与配体的相互作用和 α:βT 细胞对肽-MHC 复合体的识别之间表现出显著的差异性,前者更让人联想起抗原抗体之间的相互作用。

TCR 配体的产生与识别详见第 8、9 章。

并非全部,而是大多数 T 细胞产生于胸腺

胸腺是产生 T 细胞的首要器官,位于胸腔上部。主要包括两种组分,即各种不同类型的基质细胞和处于不同分化阶段的 T 淋巴细胞。后者也称胸腺细胞(thymocyte)。基质细胞包括上皮细胞、树突细胞、巨噬细胞。这些细胞组织在一起形成不连续的结构和功能区域。它们产生大量的可溶性介质,表达用于驯育(educate)胸腺细胞的 MHC Ⅰ、Ⅱ类分子。T 细胞是在弱限定性的祖细胞(poorly defined progenitor)阶段进入胸腺的,这种细胞仍具有分化成其他一些淋巴细胞系的潜能。T 细胞在胸腺内成熟之后移出胸腺,这些细胞可以对呈递于自身 MHC 分子上的外来抗原发生应答,而对呈递于自身 MHC 分子的自身抗原不发生反应。从祖 T 细胞进入胸腺到成熟 T 细胞从胸腺输出,这期间运行着一个精确的分化程序,同时也发生了大规模的增殖和分类,这就使得胸腺中产生的细胞只有其中一小部分可以出现于外周组织。这期间发生的重要事件概括如下:

① 决定发育成 T 细胞而不是其他类型的细胞,如自然杀伤细胞(natural killer ,NK)或树突细胞;
② TCR 基因的重排,产生功能性受体;
③ 决定成为 α:β 还是 γ:δ 细胞;
④ 决定成为Ⅰ类限制性 $CD8^+$ 细胞还是Ⅱ类限制性 $CD4^+$ 细胞;
⑤ 谱系塑形(shaping of the repertoire)使 T 细胞倾向于识别结合于自身 MHC 分子的外来抗原(自身 MHC 限制性、阳性选择);
⑥ 谱系净化(purging of the repertoire)使对呈递于自身 MHC 分子的自身抗原具有反应性的大多数细胞得以清除或失活(自身耐受,阴性选择)。

有些 T 细胞也可以在胸腺外产生。最典型的例子就是小肠上皮内淋巴细胞(the intestine -intraepithelial lymphocyte, IEL)这个大的细胞群,它们是在原位产生的。这些细胞即使可以被释放于正常动物的循环之中,其数量也很少,至少在小鼠的体内是这样。

胸腺内外的 T 细胞分化将在本章下文更为详尽的介绍,亦可参见第 14 章。

初始 α:βT 细胞在次级淋巴细胞中循环,直至与抗原相遇

从胸腺移出之后,大多数 α:βT 淋巴细胞进入一个监视体内外来抗原的细胞池中。初始 T 细胞池由较长

寿命的静息小细胞组成，其寿命在鼠体内为数月，在人体内为数年。这些细胞通过脾、淋巴结、派尔集合淋巴结(Peyer's patch)在血流和中央淋巴管之间持续循环。这些次级淋巴器官具有复杂的结构，可以促进过路 T 细胞与专职 APC 相互作用。巨噬细胞呈递大多数由血中滤出的特殊可溶性抗原，而未成熟的树突细胞则从附近的组织或细胞表面捕获抗原，抗原的捕获反过来又促进了 DC 的成熟，并向区域淋巴结迁移，最后成为成熟的树突细胞并将其捕获的抗原进行呈递。

如果一个特定的 T 细胞在次级淋巴器官中，与其所对应的、呈递于专职 APC 上的抗原相遇，这个 T 细胞则被滞留于次级淋巴器官中，并发生活化、增殖，其子代细胞进行分化。这个过程称为启动(priming)。其结果产生一些表型的变化，包括活化条件和敏感性的改变、分泌效应细胞因子、表现出其他的效应功能、迁移性质的改变、寿命的改变。在外周淋巴器官中启动的 T 细胞可以迁移至抗原最初暴露的部位，如上皮、黏膜的表面、炎症的部位。在那里它们被同种性质的抗原再次刺激，结果表现出细胞毒性或细胞因子分泌等效应功能。

371

大多数活化细胞都将成为短寿的效应细胞，但有一部分进入长寿命的记忆 T 细胞池。记忆 T 细胞可以在缺失共刺激信号的条件下，对更低浓度的抗原攻击作出更迅速的应答。

外周 α:βT 细胞在抗原攻击前后的活性将在本章下文中论述，亦可参见第 26、31 章。

T 细胞可以划分为两个主要的细胞系(每一细胞系还可细分)和一些小的细胞系

根据编码 T 细胞 TCR 基因片段的不同，将 T 淋巴细胞划分为两个主要的细胞系。目前我们研究的大多数免疫反应是由 α:βT 细胞产生的。虽然 γ:δT 细胞也可以对抗原攻击发生应答，但这个结论基本上是在人工实验条件下得到的。α:β 和 γ:δ 淋巴细胞不仅表达的受体链不同，而且在其他一些性质上也存在差异：① 发育过程中出现的时间；② 胸腺中分化的路径；③ 体内的分布；④ 多样性；⑤ 应答抗原的类型以及抗原识别的方式；⑥ 行使的应答功能。

这两个主要的 T 细胞系还可以进一步划分。如前所述，大多数 α:βT 细胞可以根据 CD4、CD8 共同受体表达的不同划分为两个亚群。这就是我们通常所指的传统 T 细胞，本章将集中大量篇幅阐述这些细胞的产生和行为。根据所产生细胞因子的不同，又可将这两个亚群进一步细分。其中对 $CD4^+$ 辅助细胞的划分是确立最早、维持最好的一种划分方式。T 辅助细胞 1(Th1)分泌致炎细胞因子(IFN-γ)、肿瘤坏死因子(TNF)家族中的一些细胞因子；而 T 辅助细胞 2(Th2)产生的细胞因子主要刺激 Ig 的应答(IL-4、-5、-6、-9、-10)。并且这种倾向性有自我加强的趋势：IL-10 阻碍 Th1 细胞活性，IL-4 刺激 Th2，而 IFN-γ 抑制 Th2 细胞。现在还不清楚，Th1/Th2 的划分是对应于一种简单的二分法，还是对应于两个极端，而在这两个极端之间可以找到细胞因子产生的中间模式。另外不断积累的证据表明，有可能存在其他类型的辅助细胞。效应细胞功能的不同在极大程度上决定着动物对特殊病原引起的微生物入侵的应答能力。是 Th1 还是 Th2 细胞在应答中占据优势地位，这在应答的最初几天就已经确定了，而且这种选择显示出了对抗原剂量、局部细胞因子平衡以及 APC 类型的依赖性。

γ:δT 细胞作为一个群体，包含几个不同亚群，它们在发育的过程中间歇地出现，并且表达有特殊的 TCR 链，具有不同的组织定位。在淋巴器官和肠道中可以发现一些不同 TCR 谱系的 γ:δT 细胞。可以在皮肤外上皮(external epithelia)(DEC 细胞)、肺以及舌、生殖道等多种黏膜中发现一些 γ:δ 细胞，它们表达的 TCR 基本不具有多态性。它们的产生和功能将在本章下文中继续多次讨论。

一些较小的 T 淋巴细胞系也已经得到了描述，某些细胞系逐渐引起了人们的注意。其中首要的一个细胞系表达通常发现于 NK 细胞的表面标志，据此称之为 NK-T 细胞。大多数鼠 NK-T 细胞的 TCR，其 V_β 片段只是所有可能片段的一个有限亚群，而 α 链基本上是单态的，人 NK-T 细胞的 TCRα 链具有轻微的可变性。NK-T 细胞在胸腺中的分化仿佛遵循一条非经典的路径，但有些 NK-T 细胞也许是在胸腺外产生的。这些 NK-T 细胞在胸腺中的选择和在外周的活性都依赖于非典型 Ⅰ 类分子，特别是 CD1。它们的功能目前还不清楚，但可能与细胞因子分泌的非常规倾向性(an unusual profile of cytokine secretion)有关。

本章下文将对非传统，特别是 γ:δT 细胞将作多方论述。

从前的和现在的重要工具与技术

纵观数年时光，有些工具和技术对于 T 淋巴细胞分化和生物学的研究发挥了关键性的作用。而且某些方法使我们对一些重要问题的理解产生了“量子跃迁”般的效应。这些工具和技术中，有一些是免疫学领域独创的，但大多数则是巧妙地借鉴了其他领域的方法。本节将对其中最具意义的部分进行讨论。

细胞表面标志

T 淋巴细胞在其表面表达数百种不同的蛋白质，其中一些蛋白质的表达随着 T 细胞成熟的不同阶段或具有的不同功能而发生变化。这样的蛋白质经过特异性抗体，通常为单克隆抗体(mAb)标记后，可以作为 T 细胞特定分化阶段和效应细胞分类的标志。抗细胞表面标志抗体的单独或联合应用，可以对 T 细胞的一个亚群进行显示、纯化、清除、封闭。应用流式细胞仪可以对多达 6 个荧光 mAb 标记的标志进行检测，这是目前 T 细胞亚群最为复杂的显示和纯化方法。

表 11.1 列举了 T 淋巴细胞研究中常用的细胞表面标志。

表 11.1　T 细胞表面标志

CD 名称	T 细胞上的分布	功　能	别 名
CD1a,b,c,d	皮质的胸腺细胞	MHC Ⅰ样分子	
CD2	大多数胸腺细胞和 T 细胞	黏附分子，结合 CD58(LFA-3)	LFA-2
CD3	胸腺细胞和 T 细胞	TCR 复合体的组成部分	
CD4	胸腺细胞亚群、辅助性和炎症性 T 细胞	针对于 MHC Ⅱ类分子的 TCR 共受体	L3T4
CD5	胸腺细胞和 T 细胞	T 细胞活化；结合于 CD72	Ly1
CD7	胸腺细胞和 T 细胞	未知	
CD8	胸腺细胞亚群、细胞毒性 T 细胞	针对于 MHC Ⅰ类分子的 TCR 共受体	Lyt2,3
CD11a	分布广泛	黏附分子；结合于 CD54(ICAM-1) ICAM-2 和 ICAM-3	LFA-1
CD25	未成熟胸腺细胞和 T 细胞	IL-2 受体的亚基	Tac, IL-2Rα
CD28	胸腺细胞和 T 细胞	正性调节 T 细胞活化，为 B7-1 和 B7-2 的配体	
CD44	胸腺细胞亚群、活化的 T 细胞	黏附，结合透明质酸 (hyaluronic acid)	Pgp-1
CD45	胸腺细胞和 T 细胞亚群	酪氨酸磷酸酶；放大 TCR 信号；由于不同剪切方式产生多种同种型酶(isoform)	LCA, B220
CD49d	胸腺细胞	α4 整合素；结合纤连蛋白(fibronectin), Mad, CAM-1, VCAM-1	VLA-4
CD54	分布广泛	黏附分子，结合 CD11A/CD18，整合素 LFA-1, CD11b/CD18，整合素 Mac-1	ICAM-1
CD58	分布广泛	黏附分子；结合 CD2	LFA-3
CD62L	T 细胞，主要为初始 T 细胞	介导内皮上的滚动作用；结合 CD34, GlyCAM	L 选择素 LAM-1, LECAM-1
CD90	胸腺细胞和 T 细胞(小鼠) 前胸腺细胞(prothymocyte)(人)	未知	Thy-1
CD95	不确切；活化的 T 细胞	产生凋亡；结合 Fas-L	Apo-1, Fas
CD117	未成熟胸腺细胞	干细胞因子(stem cell factor, SCF)受体	c-kit
CD119	成熟 T 细胞	IFN-γ 受体亚基	IFN-γR
CD124	成熟 T 细胞	IL-4 受体亚基	IL-4Rα
CD127	未成熟 T 细胞，成熟 T 细胞	IL-7 受体亚基	IL-7Rα
CD152	活化的 T 细胞	负性调节 T 细胞活化；B7-1 和 B7-2 的配体	CTLA-4
CD154	活化的 T 细胞，主要是活化的 $CD4^+$ T 细胞	T 细胞辅助作用；CD40、CD95 的配体	CD40-L Fas-L

多克隆有丝分裂原和超抗原

对任何特定抗原具有反应性的T细胞，在通常情况下只占整个T细胞库的很小一部分。因此，监视T细胞的活化行为、阐明可能发生的生物化学变化，这些都很难实现。然而有些试剂可以刺激T细胞库中大多数的组分，这些试剂的应用使得这个问题得以克服。其中的一类试剂就是多克隆有丝分裂原，如植物血凝素和刀豆素A。它们通过可变性TCR非依赖性机制使几乎所有的T细胞发生有丝分裂，这些试剂已经广泛应用于T细胞活化过程的体外研究。其中的另一类试剂是超抗原(superantigen, SAg)，包括细菌内毒素和内源性反转录病毒基因组的产物[1]。超抗原可以在TCR β链亚群的胞外CD3区和MHC结合槽表面的一个区域之间进行桥联，这个区域几乎总是暴露于MHC结合槽的表面。通过这种桥联，极低剂量的超抗原就可以刺激大量的T细胞。T细胞对超抗原的应答与对肽类抗原的反应方式相似，但又不完全一致。虽然超抗原是研究胸腺和外周阴性选择的重要工具，但在一些体外环境中也得到一定的应用。

372

T细胞克隆与杂交瘤

体外平面接种启动的细胞(primed cell)，并对其进行规则的间断性刺激。利用这些方法已经可以建立单一抗原反应性的长寿T细胞株。并通过有限稀释法对表达单一TCR的T细胞克隆进行分离。由于T细胞克隆可以长期保持抗原反应的特异性，受抗原刺激后的行为易于分析，而且这些行为仿佛也与体内抗原刺激T细胞所发生的反应相一致，所以T细胞克隆是研究的有利工具。但是维持这些细胞株的工作冗长乏味，而且细胞株生长缓慢。

T细胞杂交瘤则易于生产和繁殖。先用抗原刺激一个T细胞群，然后将这个细胞群与一个T细胞淋巴瘤细胞株融合，该瘤细胞株不表达可变的TCR链，这样就产生了杂交瘤细胞。随后通过有限稀释法进行克隆。杂交瘤细胞生长迅速而且通常不具有抗原刺激依赖性。这些细胞通过分泌易于检测的细胞因子对抗原刺激产生应答。然而杂交瘤细胞存在很大的缺憾：它的遗传具有不稳定性；来源于淋巴瘤细胞的基因组会对刺激引发的表型和行为产生影响；而且也不适于体内转移实验的研究。

尽管T细胞克隆和杂交瘤具有各自的缺点，但由于众多的优点，许多实验都把只表达单一特异性TCR的T细胞克隆或杂交瘤细胞作为研究工具。而且我们关于T淋巴细胞特异性和效应功能的了解很大程度上来源于这些实验研究[2]。

胚胎胸腺组织培养

在发育的第14天以前，从小鼠胚胎中取出的胸腺仅含有上皮基质细胞和未成熟的胸腺细胞。如果将胚胸腺在适当的体外条件下进行培养，胚胸腺中未成熟的胸腺细胞可以沿着通常的途径很正常地进行分化，最终产生完全成熟的T细胞[3]。胚胎胸腺器官培养(fetal thymus organ cultures, FTOC)已经提供了关于胸腺细胞分化的许多重要信息。

373

嵌合系统(chimeric system)是对FTOC进行改进而产生的一项常用技术。该系统利用射线或2-脱氧鸟苷酸(2-deoxyguanosine)处理切得的胸腺，破坏其中未成熟的胸腺细胞，并用来源于其他个体的前体细胞进行替代。散-聚系统(disaggregation -reaggregation system)是另一项常用的改良技术，在这一系统中，切得器官的细胞经酶处理而呈分散状态，清除其中的某些细胞成分或补充外源性成分之后，再使其汇集于培养的胸腺样器官当中[4]。

放射骨髓嵌合体

动物经过适当计量的X射线或γ射线电离辐射处理，所有的造血细胞基本上都被破坏了，但初级和次级淋巴器官的上皮基质细胞依然存在，而且仍具有功能。这就使得从另一动物向该照射动物的造血干细胞

转移成为可能，而这些造血干细胞通常从骨髓中获得。这样就产生了一个嵌合体，它体内包含所有淋巴细胞群在内的血细胞根本上只来源于供体(图 11.3)。也可以将来源于多个供体的细胞转入同一宿主体内而产生一个混合骨髓嵌合体。放射骨髓嵌合体在T细胞库选择的研究中被极为广泛地应用，突出表现在 MHC 限制性法则的阐明过程中，这将在下文述及。

由于在几项研究中显露出放射对宿主非造血细胞的损伤，最近开始流行一种经过改进的方案，其目的就是避免这种损伤的发生。在这些方案中，某些携带有自然或人工突变的宿主，先天性缺失造血细胞，或仅仅缺失淋巴细胞。其中最为常用的是重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)突变小鼠和重组活化基因(recombination activator genes, RAG)零突变(null mutation)小鼠。这样造血干细胞就可以移入未经或仅经过轻微辐射处理的宿主体内。SCID 小鼠还可作为人类淋巴器官碎片的宿主，这些碎片中含有一些干细胞，这使得人类免疫系统的某些方面得以在小鼠体内重现[5]。

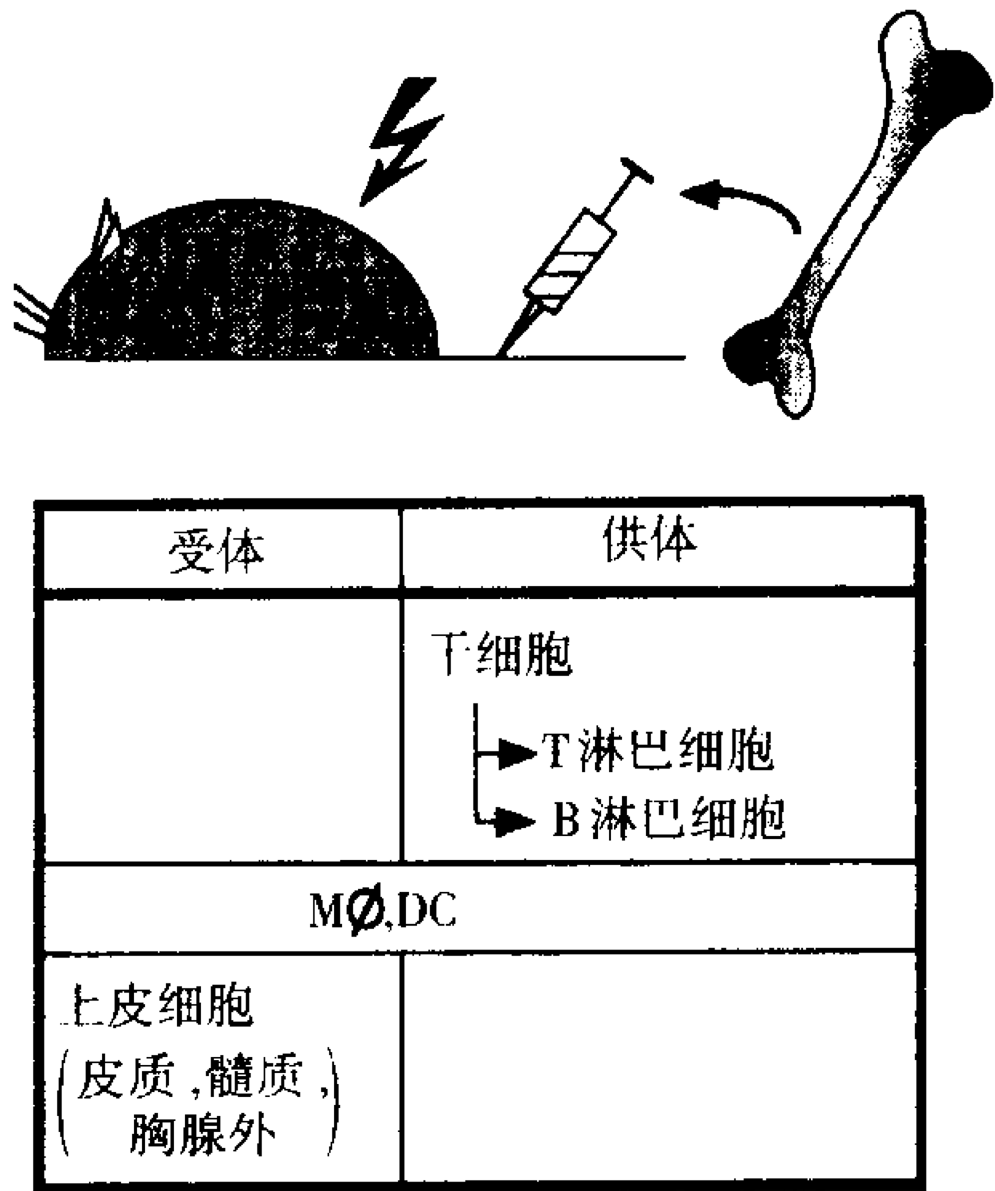


图 11.3　放射骨髓嵌合体的结构。辐射破坏了小鼠的造血细胞，但处于初级、次级淋巴器官中的上皮细胞并未破坏。将来源于另一只小鼠并含有造血干细胞的骨髓注入该小鼠，一两个月后就形成了骨髓嵌合动物。该动物的淋巴细胞来源于供体，APC 来源于两者(巨噬细胞具有很强的抗辐射性)，上皮细胞来源于受体(MΦ，巨噬细胞；DC，树突细胞)。

转基因小鼠

利用转基因技术将外源性遗传物质插入小鼠的基因组中，这在目前已经是常规实践了[6]。首先将克隆的 DNA 片段注入受精卵中，后者植入寄养母体的子宫内。在它的某些子代中，注入的基因与基因组稳定地整合，再以这些小鼠为基础，可以繁育出一株转基因小鼠系。但是目前还无法控制 DNA 整合的位点以及整合片段的数量。这就使得不同转基因小鼠系在不同的水平上存在差异，而且由于小鼠系的建立基础(founder)不同，转基因表达的精确模式也有所差异。然而转基因小鼠还是在许多研究中得到广泛应用，如基因调控元件分析、使特定类型的细胞表达目标蛋白质、目标蛋白过表达或失表达所引发效应的评价，以及通过合成显性-隐性突变而抑制特定蛋白的表达。

TCR 转基因小鼠的发展，有力地促进了T细胞分化的研究，突出地表现在阐明阳性选择和阴性选择过程的实验研究当中[7]。先将一个已经重排的 TCRα、β 基因插入小鼠的基因组中，由于等位排除的作用，原有的内源性 TCR 基因座(TCR loci)被排除，使整个T细胞库都高度倾向于转基因编码 TCR 的特异性。在正常个体的T细胞库中，任意特定的特异性T细胞的出现频率为 $10^{-6} \sim 10^{-4}$ 分之一，而在 TCR 转基因小鼠中可达 1% ~ 10%，甚至高达整个T细胞库的 90% 以上。出现率的高低取决于内源性 TCR 基因座等位排除的有效性。SCID 和 RAG 突变小鼠的内源性 TCR 基因不能进行重排，将 TCR 基因转入这些小鼠中，可以产生单克隆小鼠[8]。

通过对原核转录系统的改造，已经可以使转基因无论在表达水平还是在表达时间上都具有可控性，这是转基因技术的最新进展。其中一个十分成功的例子是对大肠杆菌 tet 操纵子元件的改造，建立了四环素可控系统(tetracycline-regulatable system)[9,10]。

基因靶定小鼠(gene-targeted mice)

在小鼠基因组的特定区域内，可以特异地进行删除、插入、替代操作，这些技术虽然很耗时，但也被常规应用于研究当中[11]。要建立这样的系统，首先要在体外设计出带有期望突变的目标基因，并将突变的目标基因连接于靶向载体，后者引入未分化的胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)。由于细胞内基因与靶向载体之间的同源重组，使目标基因的期望突变导入 ES 细胞。接下来将带有突变的 ES 细胞注入胚泡中，后者再被植入寄养母体子宫内。这些 ES 细胞具有形成所有细胞系的潜能，包括生殖细胞系。在生殖细胞系中带

有突变修饰区域的后代处于杂合子状态，经过交配和繁育可以产生带有纯合突变的动物。这些在特异基因中带有靶定突变的动物，在目前所有的免疫学领域中都是重要的研究工具，而且由于这些动物的应用，经常使得实验变得更精确，方法更新颖[12]。但是必须时刻注意的是，突变基因的某些产物可能会具有冗余的功能，而且基因的某些突变也可能会引起相应表型的长期改变。

有些突变，特别是零突变，经常会在小鼠的某个发育阶段产生致命性的影响。甚至由于这些致死事件的过早发生，以致于不能对免疫系统进行评价。但是如果用带有 RAG 缺陷的胚泡替代标准的胚泡，并将带有纯合零突变的 ES 细胞注入其中，就可以构建一个嵌合体，在这个嵌合体中可以对免疫系统发育和功能的某些方面进行研究[13]。在缺失 RAG 产物的小鼠体内，由于不能产生 Ig 和 TCR，使得 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的分化在非常不成熟的阶段就被彻底阻断了。在嵌合体中，非淋巴细胞来源于 ES 细胞和胚泡细胞，这使动物得以存活。但是由于所有突破 RAG 阻碍的淋巴细胞均来源于 ES 细胞，所以它们也都带有令人感兴趣的突变。

374

也可以利用原核生物位点特异性重组元件，在时间和空间上对设计的突变进行控制，这是基因靶向技术更为新近的进展。其中最引人注目的是源自 P1 噬菌体的 cre-loxP 系统[14,15]。该系统的建立需要两株小鼠系：在其中的一株小鼠系中，将基因的靶定区域夹在两个重组酶特异性识别位点（loxP）的序列之间。在另一株小鼠系中，通常利用转基因技术，但有时也通过对选定区域进行插入的办法将重组酶（cre）基因引入细胞，并使 cre 以一种细胞特异性或可诱导的方式进行表达。然后对两株小鼠系进行杂交，这就可以对靶基因的删除或修饰进行控制[9,16,17]。还可以将 cre 与类固醇受体的配体结合链进行融合，并在第二株小鼠系中表达这种融合蛋白，使 cre 的活性可以被激素调控，这是另外一个可供选择的方案[18]。

T 细胞信号转导

肽-MHC 复合体的识别是关系到 T 细胞生物学许多方面的关键事件。TCR 与肽-MHC 复合体的结合，促使 TCR 与其他一些膜表面蛋白相互协同，簇集在一起[19]。尔后向细胞核释放信号，引发转录程序的改变。由于 T 细胞内信号转导的复杂性对于理解 T 细胞的分化至关重要，所以下文将对其进行概述。

TCR 的信号发生是一个高度可变性、高度适应性的过程。这是 T 细胞信号转导领域中的核心概念之一[20,21]。肽-MHC 配体触发的信号，可以产生几种可能结果中的任意一种。而这些肽-MHC 配体对 TCR 的亲和力只存在细微的差别[22,23]。对于早期的胸腺细胞来说，肽-MHC 复合体与 TCR 的结合可以使其增殖或无能。因此信号转导的系统必须能够放大 TCR 配基中的细小差别，如热力学性质的不同、它们引起的 TCR 构象变化不同。TCR 不是以开关模式发送信号的，它更像一个强大的高增益晶体管，可以使上百个，甚或更多的基因激活[24]。因此只有一个快速分支成若干平行信号途径的转导系统才能实现这些功能，其中包括 Ca^{2+}、蛋白激酶 C（protein kinase C, PKC）、ras 等平行途径，在这些信号途径之间存在广泛的对话（cross-talking），最终由同一家族的转录因子将这些途径汇集在一起。与大多数生物过程相似，来自 TCR 的信号在细胞内的转导过程以磷酸化的级联反应为基础，并依据其背景（context）的不同而产生正性或负性的结果。这是 T 细胞信号转导领域中的另外一个核心概念。

图 11.4 对同心信号冲击波进行了图解。在肽-MHC 复合体与 TCR 结合之后，信号从 TCR 向外辐射。随着辐射距离的增大，我们对信号途径及它们之间相互整合作用的整体把握性降低，这可能是一种较为恰当的表述。CD3 亚基胞内区存在免疫受体酪氨酸磷酸化活化基序（immunoreceptor tyrosine-phophorylated activation motif, ITAM）。它们处于信号冲击波的中心位置。ITAM 具有共同的序列 YXXL/I（X6-8）YXXL/I，这些序列也存在于其他活性分子如 Ig 转导复合体（the Ig transduction complex）。ITAM 是活化事件的焦点。依次发生的磷酸化使 ITAM 产生了一些可以与下游因子的 SH2 区结合的位点。虽然复合体中每个 ITAM 在结构上存在同源性，并在很大程度上可以相互替换，但它们产生的信号却存在显著的差异。同时，这种差异也标志着信号不同处理方式的开始。下一个水平是蛋白酪氨酸激酶（the protein tyrosine kinases, PTK），我们对这些分子已

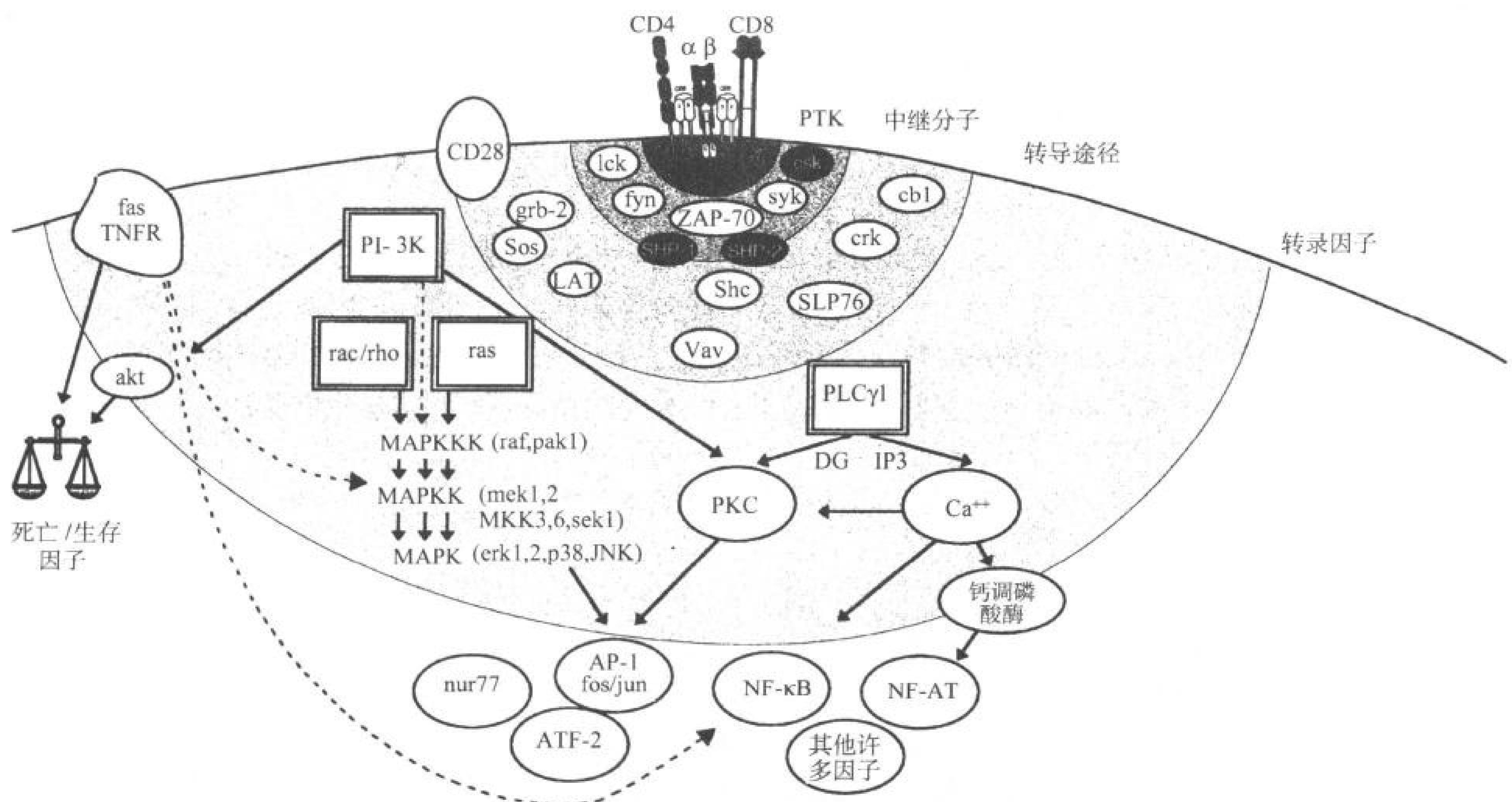


图 11.4 T细胞的信号转导:从 TCR 到基因控制。这是一幅描述参与活化信号传递的分子图解。该活化信号源自 TCR 与 MHC-肽复合体的结合。信号级联的顶端是 CD3 胞内部分的 ITAM 位点,它是几种酪氨酸激酶磷酸化的焦点,一些磷酸酶或激酶(黑色标志)在此水平实行负性调控。下一环节的多种中继分子单独或联合将酪氨酸磷酸化信号转导入主要活化途径:ras 或 rac/rho G 蛋白(这里通用 MAPKKK,MAPKK 和 MAPK 因子表示,但其中包含一些由不同输入信号引发的不同的磷酸化级联)。下游的 S/T 激酶级联经由 PI-3 激酶(PI-3K)或磷脂酶 C(长方体)的磷脂代谢途径。这些途径终止于多种形式的转录因子的活化,包括转录因子的诱导合成、通过磷酸化活化、脱抑制、促进转录因子蛋白的分解、诱导核转位。该图同时也指出了传递到细胞生存和死亡控制蛋白家族的伴随信号。

经有了较深刻的了解[25,26]。这些分子包括 src 家族激酶(lck/fyn 对)和 ZAP70/syk 激酶对。Lck 通过与 CD4、CD8 共同受体胞内区结合而抵达信号发生复合体,并使 ITAM 磷酸化。ZAP70/syk 激酶的 SH2 区可与磷酸化的 ITAM 结合,尔后被 lck/fyn 激酶磷酸化。当 ZAP70/syk 并置时,也可以产生自身磷酸化作用。这一系列的激酶都是信号发生必需的,但在每一个分子对中,并非两个分子都缺一不可,对于 T 细胞分化的每一个步骤来讲,至少其中的一个成员是绝对必需的[27~30]。在信号转导级联的这一水平上,已经发现了对影响因素的缓冲作用(dampening influence):CSK 激酶可以使 lck/fyn 的调节性氨基酸磷酸化,从而抑制其活性[31]。这个磷酸可被 CD45 的磷酸酶活性去除,进而对 TCR 的信号发生产生促进作用[32]。还有些调节性的磷酸酶,如 SHP-1、SHP-2,缓冲 ZAP-70 的磷酸化作用,其结果也缓冲了 TCR 诱导的活化作用[33~35]。

PTK 的下游是一组中继分子(adaptor molecule),在酪氨酸磷酸化事件与下游主要途径之间发挥衔接作用。这些分子主要含有 SH2/SH3 区,而且大多数并非 T 细胞所特有。这些分子之间的联系很难以理解:例如 grb2 通过 SOS 中继将信号经典地馈入 ras 途径,但它却还可以与 Shc、LAT、cb1、SLP76 等中继分子相互作用[21,36]。与此类似,在下游发现的主要信号途径都很难同各个中继分子存在一一对应的关系。这些中继分子之中有许多是 T 细胞生理所必需的。据推测,也许正是这些分子的联合作用传递着来自 TCR 的不同信号。

中继分子将信号馈入主要的下游信号途径,这些途径也普遍存在于多种生物(从酵母到哺乳动物)的信号转导系统中。这些信号途径包括:

① 磷脂酶 C-γ1(phospholipase C-γ1, PLC-γ1)被募集至细胞膜,分解磷脂,生成 1,4,5-三磷酸肌醇(inositol-1,4,5-triphosphate, IP_3)和甘油二脂(diacylglycerol,DG)。IP_3 引发细胞内源钙库 Ca^{2+} 的释放,而 Ca^{2+} 是宣告 T

细胞活化的第二信使,并激活某些钙依赖性酶/钙调磷酸酶(calcium-dependent enzyme, CaMK/calcineurin)的活性,后者直接影响转录因子的活化。钙调磷酸酶途径可以引起 NF-AT 的释放、磷酸化和核转位,这是该途径中最好的一个研究实例[37]。DG 可以刺激 PKC 家族。PKC 是一个具有不同生物化学性质的酶的大家族,可以对 T 细胞的生理产生不同的影响,既可以激活有丝分裂原反应性转录因子(mitogen-response transcription factor)而产生正性影响,也可以与 PKA 对话产生负面影响[19,38~40]。

② ras 和 rac/rho 是 GTP 结合蛋白,处于丝氨酸/苏氨酸激酶(S/T 激酶)级联反应的顶端(MAPKKK 活化 MAPKK,后者再活化 MAPK)。在每一级联中都存在许多类似的 S/T 激酶,它们被来自 ras 或 rac/rho 的信号有差别地触发[36],这些激酶最终使转录因子或细胞周期控制因子磷酸化而影响基因的表达。

③ PI-3 激酶(phosphoinositide-3-kinase ,PI-3K)被活化后,所产生的磷脂产物进一步激活一些其他的酶,如 PKC、S/T 级联,特别是 PKB/c-akt ,它通过与 bcl 家族相互作用而具有抗凋亡的作用[41,42]。

与较高水平的信号转导相似,这些途径之间确实也存在着对话,例如 Ca^{2+} 可以影响钙敏感性 PKC 异构体的活性、PI-3K 影响 PKC 的活性。

376

TCR 的触发作用产生一些活化分子,而在 T 细胞不同的分化阶段表达 T 细胞系特异性转录因子,这两者之间的相互作用更是难以在转录因子水平进行全面的描述。已经对少数几个 T 淋巴细胞特异性启动子进行了十分细致的研究。研究较透彻的应属 IL-2 增强启动子复合体[24]。前述的活化途径最终都归结于基因活化因子,如 fos/jun(AP1)、ATF、NF-AT、NF-κB 家族。这些分子间通常形成二聚体,共同对肽-MHC 复合体与 TCR 的结合产生应答:进入细胞周期、凋亡、细胞因子基因的表达、活化或抑制、分化阶段特异性基因的表达。有些 T 细胞特异性转录因子已经得到阐述[43,44]。而且有些敲除实验表明,有些与 T 细胞生理相关的不同事件,对某些转录因子(如 Tcf-1、LKLF、IRF-1、Ets-1)具有特异的依赖性[45~48]。但是目前我们还无法对 T 细胞特异性转录因子作出完整的描述。

当然,TCR 启动的错综复杂的应答过程只是 T 细胞必须整合的信号中的一部分。T 细胞的命运还取决于细胞因子与受体的结合,这些信号主要是通过 JAK/STAT 途径[49]或 TNFR/Fas 介导的复杂的死亡途径转导[50,51]。

T 细胞活化的进一步细节及信号发生的各个方面,请参见第 12 章。

胸腺:何物,何为?

处于血液淋巴循环和脾淋巴结中的大多数 T 淋巴细胞是在胸腺中产生的。脊椎动物的胸腺位于胸腔上部、心脏的表面,并向颈底部延伸。胸腺左右对称,分为两叶,并在中线相互结合。胸腺主要包含有不同分化阶段的 T 细胞/胸腺细胞和各种不同类型的支持细胞,后者构成基质。

20 世纪 60 年代发现新生期胸腺切除小鼠的淋巴细胞数量减少,免疫功能低下,不能清除感染的病毒,不产生对移植皮肤的排斥。这使人们第一次认识到,胸腺是淋巴细胞的主要产生场所[52]。而且德乔治综合征(DiGeorge syndrome)患儿的胸腺缺失与淋巴细胞池、免疫应答之间的联系,也引起了人们的广泛关注[53]。稍后,一些以鸡为研究对象的早期实验将免疫系统根本性地划分为两个部分:T 细胞与 B 细胞。同时也认识到胸腺只生产淋巴细胞中的一部分,即 T 细胞[54]。

在过去的几十年中,我们对胸腺的复杂性和胸腺细胞分化的了解有了很大的进步,这主要得益于利用小鼠进行的研究。所以我们以一个结构性的快照,即对年轻成年小鼠稳定状态的胸腺进行描绘,作为本节的开端。首先描述基质细胞,尔后是胸腺细胞,最后通过对年轻成年个体 T 细胞分化途径、胚胎胸腺发育、胚胎胸腺细胞分化的追踪,提供一幅更为动态的图景。必要时还将引述来自人类和进化学上更为原始物种胸腺的有关信息。

年轻成年小鼠的胸腺:基质细胞

年轻小鼠的两叶胸腺由结缔组织包被,后者从中隔(septate)反复折入,将胸腺分割成许多小叶,每个小

叶都由胸腺细胞和基质填充(图 11.5)。根据 mAb 染色和形态学分析,估计基质细胞具有很大的异质性[55~57]。最引人注目的是由不同类型上皮细胞构成的广泛网络结构,在这个网络中散布着一些间充质细胞(mesenchymal cell),主要包括成纤维母细胞(fibroblast)、巨噬细胞、树突细胞[确切地说应该是指突状细胞(interdigitating cell)]等血细胞,还有 B 细胞,大多数为 B-1 亚群,主要集中分布于小叶的中隔端。

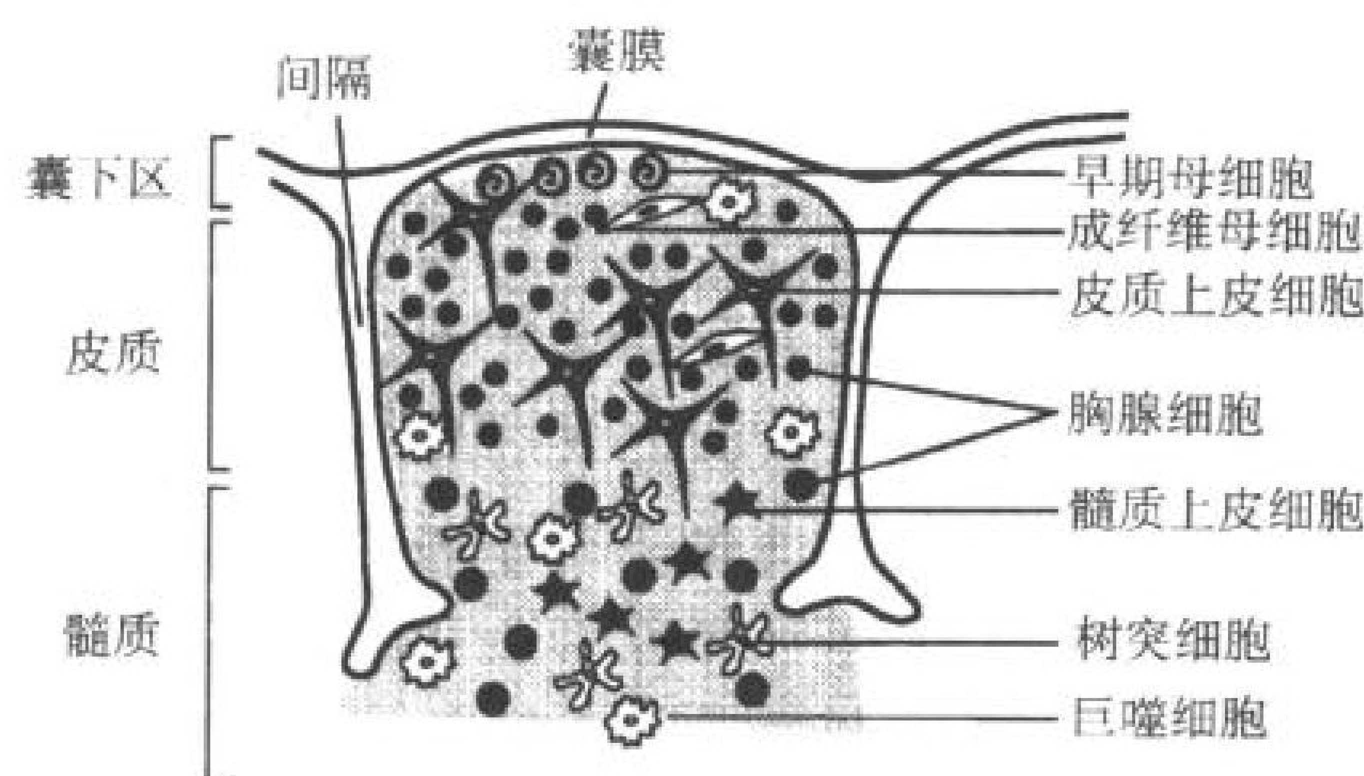


图 11.5 胸腺的组织结构。该图所示为一单小叶的切面,描述了基质细胞的不同形式:皮质和髓质上皮细胞、树突细胞、巨噬细胞、成纤维细胞。事实上其中的某些细胞,如髓质上皮细胞,包含不同的细胞类型[56]。图中也描述了胸腺细胞从囊下区的母细胞(blast),到皮质区的静息状小细胞,再到髓质区大细胞的成熟过程。

我们将看到,这些基质细胞分布于三种具有不同功能的结构区域中(图 11.5),并根据这些结构区域中哪些细胞占据优势,对它们进行鉴别。这些结构区域从外到内依次为:以一篮篮的网状上皮细胞为特征的囊下区;以蜘蛛状、板状上皮细胞网络为特征的皮质区;以短粗上皮细胞和众多 DC 构成的网络为特征的髓质区。有些次要的基质细胞在这三个区域中的分布也是不均匀的:成纤维母细胞主要分布于皮质;巨噬细胞分布于皮质、髓质;B 细胞分布于皮髓交界区。这三个基质区的 MHC 分子染色模式亦不同,从而反映出所含细胞类型的不同:囊下区淡染;皮质区缘于上皮细胞网络而呈网状染色;髓质区则由于 DC 和上皮细胞的一个亚群而呈弥漫性染色。

377

细胞外基质(extracellular matrix,ECM)作为胸腺基质的一种成分,无疑是非常重要的,但是它的重要性直到不久以前才被人们认识到[57,58]。ECM 是由上皮细胞和成纤维母细胞分泌的,主要包括某些胶原蛋白、氨基葡聚糖(glucosaminogly-can),以及糖蛋白(如纤粘连蛋白、层粘连蛋白)。

虽然基质细胞和胸腺细胞是胸腺的主要成分,但并非惟一成分。在胸腺中已经发现了结缔组织、神经组织、血管、淋巴管,甚至原始的肌细胞。这些细胞在其活性受到关注的时候,就再不能被容忽视了,这一点应该引起注意。

年轻成年小鼠的胸腺:胸腺细胞

年轻成年小鼠的胸腺含有数亿个胸腺细胞,包括未分化的原细胞、完全分化的各类 T 细胞、各个不完全成熟阶段的胸腺细胞。根据细胞表面标志的表达谱,可以对不同类型的胸腺细胞进行鉴定[59]。其中最常见的表达谱是 CD4 和 CD8(图 11.6),经过流式细胞分析,证明存在四个主要的细胞群。

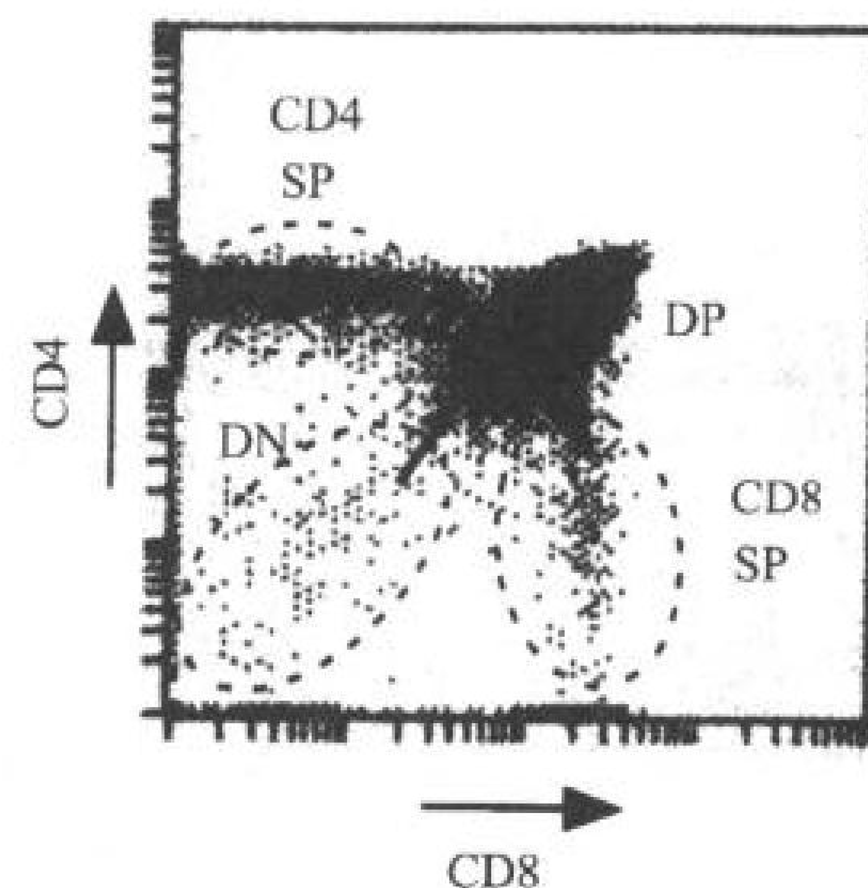


图 11.6 胸腺细胞的流式细胞分类分析。源自 6 周龄小鼠的胸腺细胞用 CD4、CD8 mAb 染色,这两种 mAb 由两种不同的荧光标记,激发后可以对两种共受体进行检测。上图显示了四个大的胸腺细胞群:DN、DP、CD4SP、CD8SP。T 细胞分化的主要流向由箭头指出:DN→DP→CD4SP/CD8SP。经 M. Correia Neves 授权引用。

① $CD4^-CD8^-$ 双阴性(double-negative, DN)细胞占胸腺细胞的 5%。这是一个具有很大异质性的群体,可以根据 TCR 的表达进一步划分。其中一个小的亚群表达 $\gamma:\delta$TCR,含有较为成熟的 $\gamma:\delta$ 系胸腺细胞。另一个亚群表达 $\alpha:\beta$TCR,其中包含 NK-T 前体细胞。除此之外,它的起源和命运还是个秘密。另外一个较大的 DN 亚群既不表达 $\alpha:\beta$ 也不表达 $\gamma:\delta$,故称之为三阴性亚群(the triple-negative, TN/$CD4^-$ $CD8^-$ TCR/$CD3^-$)。根据 CD44 和 CD25 的表达,还可以将 TN 进一步划分为四个组分:即 $CD44^+$ $CD25^-$、$CD44^+$ $CD25^+$、$CD44^{lo}$

CD25⁺、CD44⁻ CD25⁻。这些组分之间存在一些重要的差异，表现在：TCR-β 基因的重排状态、细胞表面 β 链的表达、分裂细胞的比例、对间质细胞的依赖性[60]、对各种细胞因子的应答与依赖性[61]。

② CD4⁺ CD8⁺ 双阳性细胞(double-positive，DP)是胸腺细胞的主要组分(约占 80%)。含有重排后的 TCR-α、-β 基因，并在表面以极低水平表达 α:βTCR/ CD8 复合体。多数 DP 处于静止状态，但也有相当比例的母细胞(blast)处于分裂之中。胸腺中的凋亡细胞多数是 DP 细胞[62]，而且 DP 也对糖皮质激素等死亡诱导剂特别敏感。

③ CD4⁺ CD8⁻、CD4⁻ CD8⁺ 单阳性细胞(single -positive，SP)约占胸腺细胞的 15%。两亚群之间的比例关系由基因控制，在不同的小鼠系和不同人类个体之间有所不同[63,64]。根据 TCR 的表达可以对这两个 SP 亚群进一步划分：低水平表达 CD3 的未成熟组分(ISP)所占比例较小；高水平表达 α:βTCR 并与 CD3 结合的成熟组分所占比例较大。未成熟组分在 CD4⁺ CD8⁻、CD4⁻ CD8⁺ 亚群中占据的比例不同，在人体中前者大于后者[65]，而各小鼠系间存在差别，不过在大多数小鼠的体内后者大于前者[66]。ISP 的主要部分是分裂细胞；而成熟细胞多处于静息状态，但可以测知一部分细胞处于分裂状态。成熟细胞以不同水平表达多种表面标志，如热稳定抗原(heat stable antigen，HSA)、花生凝集素受体(peanut agglutinin receptor，PNAr)、CD69 活化分子。这些表面分子的表达与该细胞免疫活性(immunocompetence)水平的变化相平行。有些外周细胞经活化后重新返回胸腺，它们构成了另外一个较小的 SP 细胞组分[67]。

T 细胞分化路径

前两节构成了一个 T 细胞分化的快照：一幅关于年轻成年小鼠稳态胸腺的静止图象。但是由于 T 细胞分化事件的多样性、相互关联性，而且，胸腺细胞分化路径时常具有错综的复杂性，因此要把这幅快照转换成更为动态的观察，具有极大的挑战性。早期根据表面标志开放、关闭的逻辑推理，试图构建出 T 细胞的分化路径，但却经常导致错误的结果。现在已经很清楚地认识到，必须通过实验对每一个亚群的来源和去向进行评估。这种评估已经得以实现：首先纯化特定的亚群，将其转入 FTOC 系统，甚或注入适当宿主的胸腺，而后对其行为进行监视；还可以用核酸前体 ^{3}H-胸腺嘧啶核甙(^{3}H-thymidine，TdR)或溴脱氧尿核甙(bromodeoxyuridine，BrdU)标记分裂细胞，并随时间观察标记细胞到不同细胞亚群的流向，这是另外一个有用的方法。如下所述，在过去的几年中，由于这些方法的应用，使我们对 T 细胞分化路径的阐明虽然还不完整，但却更为详细了[59](图 11.7)。

378

T 细胞分化的第一个阶段是 T 祖细胞进入胸腺。这是在许多方面了解得最少的一个步骤。已知 T 细胞最终源于造血干细胞，而造血干细胞主要产生于胚胎和成年骨髓。目前就连祖细胞如何进入胸腺、它们处于何种确切的定向发育(commitment)程度都不甚了解。在受照成年小鼠中观察到前体细胞通过小静脉进入髓质和皮髓交界处[68]，还不清楚未受照小鼠中情形是否如此。祖细胞作为一个细胞群，不仅可以产生 T 淋巴细胞，还可以产生 NK 细胞、B 淋巴细胞、树突细胞。当然也不用奇怪，这些早期的 T 前体细胞的 TCR 基因仍处于生殖细胞状态。

TN 阶段发生了许多分化的重要事件，包括定向发育成 T 细胞、TCR 基因重排的启动、通过阳性选择得以继续成熟、α:β/γ:δ 抉择。如前所述，根据 CD44、CD25 的表达将 TN 划分为四个组分。CD44⁺ CD25⁻ 和一部分低水平表达 CD4 的细胞，其成熟程度最低，被认为包含有最早的胸腺内 T 祖细胞[69,70]。CD44⁺ CD25⁻ 细胞具有未经重排的 TCR 基因，可以产生 NK、B 细胞、DC 及 T 细胞。CD44⁺ CD25⁻ 亚群缺乏分裂象，但在随后的 CD44⁺ CD25⁺ 中情况发生了剧烈变化，后者在 c-kit、IL-7 等细胞因子的影响下迅速分裂[71]。CD44⁺ CD25⁺ 依然具有未经重排的 TCR 基因，可以产生 DC，但不能产生 NK 和 B 细胞。CD44^{lo}CD25⁺ 亚群不仅发生了 β、γ、δ 基因重排，这是最早可以检测到的 TCR 基因重排，此时 α 基因重排尚未发生；而且也至少出现了 CD3 的某些亚基[72~74]。该亚群不能产生 T 细胞以外的其他细胞类型，是 T 细胞系分化的重要控制点。一些 CD44^{lo} CD25⁺ 细胞在表面持续表达功能性 γδTCR，并分支出来，产生 γδ 细胞系。而另外一些 CD44^{lo} CD25⁺ 细胞则在表面表达功能性 TCRβ 链，后者与恒定的前 TCRα 链(pre-TCR α，PTα)、CD3 的某些亚基结合形成前 TCR(pre-

图 11.7　胸腺中 α:βT 细胞的分化途径。从上到下依次为：主要胸腺细胞的移行；特殊阶段图示的放大，图左显示按 CD44/CD25 对 TN 细胞的划分以及前体细胞的分化潜能，图右显示 SP 细胞表面标志的演化；TCR 基因重排的完成和细胞表面表达 TCR 复合体的情况；各阶段持续的平均时间；各阶段细胞占胸腺细胞的比例；各阶段细胞居留的解剖定位。标有问号的虚线箭头表明发现 $CD44^- CD25^-$ 细胞可以生成 γ:δT 细胞[242]，但目前既不知道 CD25 的丢失发生于定向发育成 γ:δ 细胞系之前还是之后，也不知道这种细胞与发育成 αβT 细胞的 $CD44^- CD25^-$ 是否完全相同。另一个虚线箭头表示一个尚存争议的发现：一些处于母细胞状态的 DP 细胞(blasting DP)可以直接生成 SP 细胞[286]。

TCR)，这些细胞将一直发育成 α:β 细胞。然而大部分 $CD44^{lo}$ $CD25^+$ 细胞并不选择这两条路径，而是很快死亡。大多数 $CD44^{lo}$ $CD25^+$ 是处于静息状态的细胞。由 $CD44^{lo}$ $CD25^+$ 发展到 $CD44^-$ $CD25^-$ 阶段的过程中，伴有 TCR 基因重排的关闭、细胞迅速分裂的启动。$CD44^-$ $CD25^-$ 开始逐渐表达 CD4 和 CD8 分子，并开放 TCR-α 基因进行重排。

对于 ISP 阶段的了解较少。小鼠的 $CD4^-$ $CD8^+$ 细胞经悬浮培养会自然地转向 $CD4^+$ $CD8^+$ 细胞。因此认为 ISP 的出现可能仅仅是反映了 CD4、CD8 膜表面表达动力学性质的不同。但是在一些工程化鼠系中，ISP 阶段的胸腺细胞分化却出现了阻断或暂停[45,75]。

379

DP 也是一个重要分化事件频发的阶段：成功的 TCR-α 基因重排、阳性选择产生自身MHC 限制性、CD4 / CD8 抉择、阴性选择产生自身耐受。这些事件使得 DP 亚群处于高度消耗状态，将有 95% 以上的细胞不能完成成熟过程，其中大部分是由于阳性选择失败而死亡[62]。DP 细胞如果不能表达与基质细胞 MHC 相互作用的 TCR，它将在产生后的 3 ~ 4 天内死于凋亡。DP 根据 TCR 与 MHC Ⅰ/MHC Ⅱ 分子的相互作用完成它的 $CD4^-$ $CD8^+$ / $CD4^+$ $CD8^-$ 抉择。虽然从 DP 到 SP 的确切路径仍存在争议，但是这些路径已经显示出其中的复杂性，而且决定 DP 细胞成为两种成熟细胞的路径可能不是平行的。有些 DP 细胞由于表达的 TCR 对结合于基质细胞 MHC 分子上的自身肽具有过强的反应性，而被一种称为克隆清除的过程致死。

SP 是胸腺细胞成熟的最后阶段。这个阶段以无反应性 $CD3^{int}HSA^{hi}PNA^{hi}$ 细胞为开端，以完全能力(fully competent)$CD3^{hi}HSA^{lo}PNA^{lo}$细胞为结局。但这个演化过程中的细节仍是未知的。如果 SP 细胞遇到了由新型基质细胞表面 MHC 呈递的自身抗原，这些细胞有可能通过克隆清除过程产生进一步的阴性选择。但是这种作用即使对于该亚群中最不成熟的细胞，其效率都可能是有限的[76]。通过一个未知的 Gi 蛋白依赖性主动过程，完全成熟的 SP 细胞经由皮髓交界处的血管、淋巴管移出胸腺[77]。移出胸腺的 SP 细胞将进一步完成一些成熟过程。效应能力(functional competence)和表面标志的演化已经证实了这个过程的存在[78,79]。

胸腺中T细胞的分化是一个复杂事件，也是一个长时间的过程[80]。据估计，TN阶段约需14天[80]；DP阶段约需3～4天[81,82]；SP阶段需7～14天[83～85]。最后的这个数值更让人费解：胸腺细胞约有1/3的生命周期滞留在终末SP阶段，它在干什么呢？

胸腺细胞不同的分化阶段处于胸腺的不同区域。囊下区含有DN细胞，居留着大部分的快速分裂胸腺细胞。多数DP细胞分布于皮质，并与上皮细胞网紧密接触。髓质中含有SP细胞。胸腺细胞对基质细胞的接触和可溶性介质具有依赖性。在缺失间质细胞的情况下，$CD44^+$细胞无法产生[60]。在缺失皮质上皮细胞的情况下，DP也无法向SP转化[86]，这都是一些很好的例证。但是基质细胞也同样具有胸腺细胞依赖性，在缺失$CD44^+ CD25^-$以后各阶段胸腺细胞的情况下，小鼠的胸腺皮质发生异常[87]，而且在缺失SP细胞的动物中，也不能发育出正常的胸腺髓质[55,88]。

胸腺细胞在移入胸腺、胸腺内移动、移出胸腺时是怎样进行运动的；又有哪些可能的可溶性介质、基质细胞表面配体、胸腺细胞表面受体控制着这些过程，关于这些方面的任何信息都很难获得。近期的研究表面α4整合素(α4-integrin)参与了T祖细胞的从骨髓释放和向成年胸腺内种植的过程[89]，而且α4/α5整合素与纤连蛋白(fibroneltin)的相互作用参与了胸腺细胞从皮质到髓质的运动过程[90]。但是关于这个问题，还有许多细节尚待了解。

这一节主要对成熟α:βT细胞的分化路径进行了集中描述，并也指明了γ:δ细胞系分化的分支点。但是这条路径上的某些阶段并未给予表述，原因是我们对其知之甚少。而且表达α:βTCR的DN亚群的由来，以及这些细胞进一步成熟的分化路径，我们同样一无所知。

胚胎T细胞的发生

监视小鼠在发育中胸腺细胞的演化过程，可以对胸腺细胞的分化进行另外一番动态观察。这个方法的优点在于整个演化过程是从头开始的，最先分化的一组细胞在一系列特定的事件下是相对同步的，所以可以实现对这些细胞的追逐。但是在小鼠体内，这个方法并不容易实施。因为许多关键过程发生于出生之前。这就迫使我们对一系列状态下的胚胎进行研究，或是建立体外培养系统，胸腺细胞可以在这些系统中继续发育。当以人为研究对象时，这个方法会产生更大的问题。因为人与小鼠相比，有更多的关键性过程发生于出生前，而且新生期与青春期的胸腺之间只存在较小的差异。尽管如此，胚胎学方法还是十分成功，并且在T细胞分化的某些方面发挥了启示作用。

胚胎胸腺的发育

约在胚龄第9天(the ninth day of fetal life, fd9)，以第三鳃裂(branchial cleft)外胚层和第三或第四咽袋(pharyngeal poach)内胚层的内陷为标志，小鼠的胸腺开始发育[57]。两个内向生长的胚层逐渐相互接触，外胚层包绕内胚层。大约在fd11，两个对称的内陷合拢形成胸腺原基(thymic rudiment/anlage)。目前普遍认为内外胚层是正常胸腺发育必需的，分别产生髓质和皮质的上皮细胞。这个观念很大程度上得自于早期关于裸鼠(nudemouse)的形态学研究，其结论是，外胚层的不可生长性导致了裸鼠胸腺的缺失[91]。但是以鸟为研究对象的移植实验得到了相反的观察结果：只要间充质细胞存在，咽内胚层就可以产生正常的胸腺[92]。最近，编码一种转录因子，即快速螺旋裸化因子(winged -helix nude, WHN)，的基因被认为是裸突变(nude mutation)的靶基因[93]，并且已经对裸鼠的胸腺发育做了更为细致的分析[94,95]。在缺失WHN的情况下，胸腺原基虽然可以发育，但却被原始的上皮细胞填充，这些细胞既没有被特化，也没有被分隔到胸腺的各个亚区。

在胸腺发育的过程中，间充质细胞不仅具有结构性的作用，而且也具有重要的诱导作用[96]。有些间充质细胞来源于神经脊(the neural crest)，它们的有丝分裂和增殖与内外胚层的内陷有关，而且在发育过程中，器官逐渐被间充质细胞包绕，这些细胞最初来自神经脊，其后源于中胚层[97]。实验性切除胚胎神经脊导致胸腺发育不全[98]。最近的一项研究将小鼠的一个Hox基因(Hoxα-3)进行人工突变，结果显示：该转录因子参与了间充质细胞对胸腺发育的影响过程，这个基因突变既影响了间充质细胞诱导周围细胞分化的能力，也影

响了自身的分化能力[99]。有趣的是,Hoxα-3 敲除小鼠的表型与德乔治综合征患者的表现十分相似[100]。

最终胸腺原基长入血管,该过程与来源于中胚层的间充质细胞有关。从血管中释放包括淋巴原细胞在内的多种造血起源细胞。这些细胞不仅可以产生胸腺细胞,也可以产生一些 NK、B 细胞、DC 以及巨噬细胞和(或)它们的前体细胞。至此,所有的成分都已经具备了,但胸腺尚未分化出囊下区、皮质区和髓质区。此时的胸腺,大部分为皮质占据,其间散布着髓质"岛"。直至即将出生、成熟 α:βT 细胞开始产生之际,才出现界限明确的髓质区。这个观察使我们清楚地回忆起近期在敲除小鼠体内的发现。这些缺失 RAG 或 MHC 的小鼠系不能产生成熟的 T 细胞,而且其胸腺发育不良[55,88]。囊下区直至出生一周后才出现[56]。新生期的胸腺对外周循环细胞具有较高的通透性,而且新生小鼠对耐受的诱导更为敏感。但是目前还不知道这种囊下区的迟发性是否可以解释新生期胸腺的高通透性[101],也不清楚这种迟发性与新生期耐受诱导的高敏感性之间有何种程度的联系。

简言之,胸腺的发育是一个复杂的过程,依赖于多种胚胎起源细胞(cell of embryonic origin)。早期阶段严格依赖于上皮-间充质细胞间的相互作用,而晚期阶段则依赖于上皮细胞-胸腺细胞间的相互作用。

胚胎胸腺细胞的分化

原 T 细胞最早于 fd11 通过血流由卵黄囊或胚肝转入胸腺[102,103]。这些细胞快速增殖,但仅进行很有限的分化,基本上处于 TN 阶段。最初,γ:δ 分化路径占据优先地位,产生了几个批次的特化 T 细胞,它们表达完全均质性(homogeneous)的 TCR ,属于 $V_\gamma5^+$ 和 $V_\gamma6^+$ 亚群。但也有些细胞开始沿着复杂而漫长的 α:β 路径进行分化。最早可以在 fd14-fd15 检测到 TCR-β 基因座 VDJ 基因重排的完成,并从 fd15-fd16 开始在表面表达 CD4 和 CD8。在接下来的几天里,DP 细胞开始成为主体细胞群。在 fd18-fd19 开始出现最早的具有完全功能的 SP 细胞。$CD8^+$ 的出现较 $CD4^+$ 约晚 1 天。出生时的胸腺(fd20)在许多方面与成年胸腺相似,但也存在一些细节上的差异。

许多研究者设想,可以通过阐明胚胎发育中胸腺细胞的成熟过程,直接类推成年胸腺内的 T 细胞分化路径。虽然通过对胚胎系统的研究,可以得到一些重要的信息,而且这些信息也适用于成年个体。但是我们正在越来越多地面对两个生命阶段之间的差异性。早期的例证来自细胞水平:种植于胚胎和成年胸腺中的干细胞起源部位不同,产生特殊 T 细胞特别 $V_\gamma5^+$ 细胞的能力不同[104];胚胎胸腺细胞更具增殖性,即使处于非常成熟的阶段,仍可继续分裂[105];胚胎胸腺细胞较成年胸腺细胞分化更为迅速;在两种不同状态下,产生 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 细胞的比例不同[106];在阴性选择中,胚胎胸腺细胞较少被清除[107]。几乎与此同时,发现胚胎 TCR 谱系较成年狭窄得多,而且对于 α:β 和 γ:δT 细胞都是如此[108]。V 片段的程序化利用(programmed V segment usage)、普遍的同源指导性重组(homology-directed recombination)以及脱氧核糖核酸末端转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)的延迟表达都对这种谱系的狭窄性发挥一定的作用。近年来,敲除鼠在分子水平上为这种差异性的存在提供一个例证:胚胎和成年胸腺细胞的分化对转录因子 Ikaros[109]、TCF-1[45]、信号分子如 Rho[110]、细胞因子如 IL-7、黏附分子如 α4 整合素[89]具有不同的依赖性。因此必须时刻意识到,胚胎胸腺中胸腺细胞的成熟过程也许不能作为成年个体胸腺细胞成熟的精确模型。

年轻成年个体的胸腺,其 T 细胞输出量达到高峰,随着年龄的增长,从三月龄小鼠开始,胸腺开始萎缩,T 细胞输出减少[111]。这个称之为胸腺演化的过程,在不同动物种系之间进展的速度不同,而且在一定的条件下可以逆转[112]。目前还不知道胸腺演化的机制及其存在的理由。考虑到基质细胞和胸腺细胞间的相互依赖性,胸腺演化的主要原因可能是基质细胞或胸腺细胞的衰退。

T 细胞生命周期中的重要事件

T 细胞分化的实验与研究已经在上文进行了基本的阐述,现在我们将对胸腺细胞成熟过程中 6 个关键事件做进一步的研讨,其中的每一事件又包含许多细节。在过去的几年中,这些事件受到了广泛的关注,并

在转基因、基因靶定小鼠体外培养、细胞记数分析等新技术的刺激下，在某些突出问题的解决上取得了明显的进展。

T细胞系的定向发育

对T细胞分化最早期事件的认识可能是最不清楚的。人们渴望知道原T细胞是从哪里来的，又是怎样被诱导进入胸腺的；是通过什么途径进入胸腺的，它们的定向发育状态如何。当然，如果它们是多能干细胞，那么是在什么时候，又是怎样形成这种持续定向发育状态的。然而，这些问题多数还得不到满意的解答[102,103]。

所有的淋巴细胞都是造血干细胞的终末分化细胞，T淋巴细胞当然不能例外。胸腺祖细胞由造血器官提供，随着小鼠的发育，造血器官也有所变化。胚胎期，肝是主要的造血器官，而后被骨髓替代。胚肝和骨髓来源的祖细胞具有不同的性质，突出表现为产生匀质性 γ:δT 细胞群的能力不同，这种细胞群出现于发育的早期[104]。然而目前还基本上不知道，这些祖细胞是利用何种受体、配体，通过何种途径进入胸腺的。然而通过基因敲除和单克隆抗体阻断实验，有几种分子已经得到了阐明，另有几种分子成为有希望的研究对象[89,113]。但是这些结果遭到了其他一些实验的挑战，所以这些分子还存有争议。整合素可能是个例外，在从成年骨髓选择T前体细胞的过程中，这个分子必不可少，但T前体细胞在胚胎胸腺中的种植和功能的有效发挥都不依赖于这个分子[89]。还不清楚祖细胞是如何精确进入胸腺的。在重建受照小鼠免疫系统的过程中，胸腺髓质和皮髓交界处的大静脉内可以发现新的移植细胞[68]，但尚不能确定这种情况是否也适用于未照射动物以及动物发育的所有阶段。最近一项有关鸟的研究表明，前体细胞可以通过跨囊和皮髓途径进入胸腺[114]。

381

胚肝和成年骨髓中是否存在淋巴细胞定向或T细胞定向发育细胞；胸腺中是否可以找到未定向发育的细胞，通过对这两个问题的考察，我们可以对原T细胞的定向发育状态从两个极端窥其一斑。关于第一个问题的答案是模棱两可的。在胚肝中可以检测到具有淋巴细胞定向发育性状的细胞[115]，这些细胞具有原T、B细胞的表面标志表达谱，并且可以进行 PTα 和前B细胞受体(pre-B cell receptor, pre-BCR)VpreB链的合成转录。但是这些细胞也可以产生一些非淋巴细胞，特别髓样细胞系(myeloid lineage)。目前还不知道淋巴祖细胞和髓样祖细胞是否起源于同种细胞，也不知道同一细胞或细胞系是否同时具有T和B细胞两种分化潜能。虽然在胚胎中确实没有检测到T细胞定向发育过程中发生的TCR基因重排[115,116]，但是成年骨髓中确实存在介于造血干细胞和完全成熟T细胞之间的中间状态细胞[117]，而且在生殖细胞系中也可以检测到TCR基因的转录[118,119]。不过这些毕竟不是TCR基因重排的确切证据。造血器官中也许存在从属于胸腺的淋巴定向祖细胞，但不存在T细胞定向发育的前体细胞。前述的第二个问题是，在胸腺中是否存在非定向的祖细胞，答案依然介于两可之间。源于fd12的胸腺细胞既可以发育成淋巴细胞，也可以发育成非淋巴细胞，主要为髓样细胞[120,121]。与之相反，较为成熟的动物[121]或成年个体[69,70,122,123]的胸腺细胞很少发育成髓样细胞及其他非淋巴细胞。因此，胸腺中仍有可能存有定向性很低的祖细胞，同时也不能肯定地认为不同的前体细胞活性均源自单一细胞。

我们不仅可以从两端，还可以从中间对原T细胞的定向状态进行结构性的观察，为此有些学者对胚胎血细胞的前体细胞潜能进行了评估，试图在通向胸腺的路上捕捉到祖细胞。目前已经阐明胚胎血细胞中存有多能祖细胞和T细胞定向祖细胞[124~127]。

目前尚不能确定进入胸腺的祖细胞处于何种定向发育状态。不过至少在细胞群体水平，胸腺中似乎清楚地存在着 NK[128]、B[70,120,123,129,130]和 DC[131]的前体细胞。而且人体T、NK共同祖细胞的存在事实上已经在单细胞水平得到阐明[132]。这些前体细胞均以 $CD44^+$ $CD25^-$ TN 状态存在，只有DC前体细胞可以出现在 $CD44^+$ $CD25^-$ 阶段中[129,130]。在以后的分化阶段中就只能找到T前体细胞了。这些结果最简单但并非惟一的解释是，T细胞系的决定性定向发育发生于 $CD44^{lo}CD25^+$ TN 阶段，这与TCR基因重排在时间上相一致。

值得注意的是，由于前体细胞数量稀少，种类繁多，许多问题难以阐明，所以上述结论无法令人满意。好

在最近的基因靶定小鼠技术为研究开辟了一条新路，某些转录因子的敲除实验已经发挥了一定的启示作用[133]。对 ets 家族 PU.1 基因进行靶突变，导致淋巴和髓样细胞的缺失，但并不对其他血细胞和非血细胞系产生影响[134]。Ikaros 基因编码一种锌指蛋白，利用显性-隐性突变(dominant - negative mutation)技术关闭 Ikaros，其结果是阻断淋巴细胞的分化，而对髓样细胞没有影响[132,135]。PU.1 的另外一个突变[136]和 Ikaros 的一个单一零突变(a simple null mutation)[109,135]引起了人们的注意。这些突变对于成人的细胞分化是允许的，但对于胚胎和 T 细胞则不然。在这两种突变体中，γδT、NK、DC 细胞的某些亚群同时出现了缺失。GATA-3 基因也编码一种锌指蛋白，它的关闭使 T 细胞无法渡过成熟的启始阶段，导致 T 细胞出现异常，而其他血细胞却不受影响[136]。从祖细胞到 T 细胞的定向发育过程中，还有许多突出的课题有待解决，希望通过这些已经进行的和即将进行的转录因子基因突变研究，能够使这些问题得到彻底的解决。

TCR 基因的重排

TCR 基因通常可以划分为 V、D、J、C 四个基因座(TCR loci)。从一个未定向胸腺细胞到 T 细胞的选择分化与各个 TCR 基因座的重排之间存在一定的关系。目前这种关系的紧密程度还不得而知，但这种选择至少是由各个 TCR 基因座的重排做出的，而 TCR 基因的重排恰好发生于 α:β/γ:δ 和 $CD4^+/CD8^+$ 抉择的时刻。

机制

TCR-α、-β、-γ、-δ 与 Ig 基因重排的机制基本相似[137]。以 TCR-β 为例(图 11.8A)，$D_β$ 与 $J_β$ 片段首先发生重排，位于两条染色体上的 4 个 $D_β$ 片段均可与 J 等概率重组，因此每个 $J_β$ 可以与 $D_β$ 形成四种可能的组合。随后 $V_β$ 片段也可以与 $D_β$-$J_β$ 片段并置在一起。由于上述原因，每个 $V_β$ 片段也可以与 $D_β$-$J_β$ 形成四种可能的功能性 $V_β$-$D_β$-$J_β$ 重排。这些经重排后的片段进一步与 C 片段连接，所得片段中的外显子经过 RNA 剪切而连接在一起。TCR-α 基因(图 11.8)只包括 V、J 片段，但是由于存在大量的可能性 V 和 J 片段，所以依然提示 TCR-α 的 重排具有多样性。在 TCR -α 基因座之间嵌有 TCR-δ 基因，后者具有形成多样性的多种能力，其多样性在所有 TCR 基因座中是最大的。其原因是，重排后的 TCR-δ 基因中可以连入两个 $D_δ$ 片段，而且 $V_α$ 和 $J_α$ 片段也可参与其中。在 TCR-δ 重排过程中，V、D 片段首先连接在一起，而后再接上 J 片段。由于 TCR-δ 基因位于 $V_α$、$J_α$片段之间，这就意味着的 TCR-δ 的重排将被 TCR-α 基因的重排所阻断。TCR-γ 基因有 4 个分离的可重组基因域(图 11.8C)，其中三个是有功能的。每一个基因域拥有自己的 V、J 片段，却没有 D 片段。而且 TCR-γ 的基因域也最乏多样性的潜能。

所有的 TCR 基因在重排过程中，可以通过下述两种机制产生更多的多样性。第一种机制是 TdT 酶的模

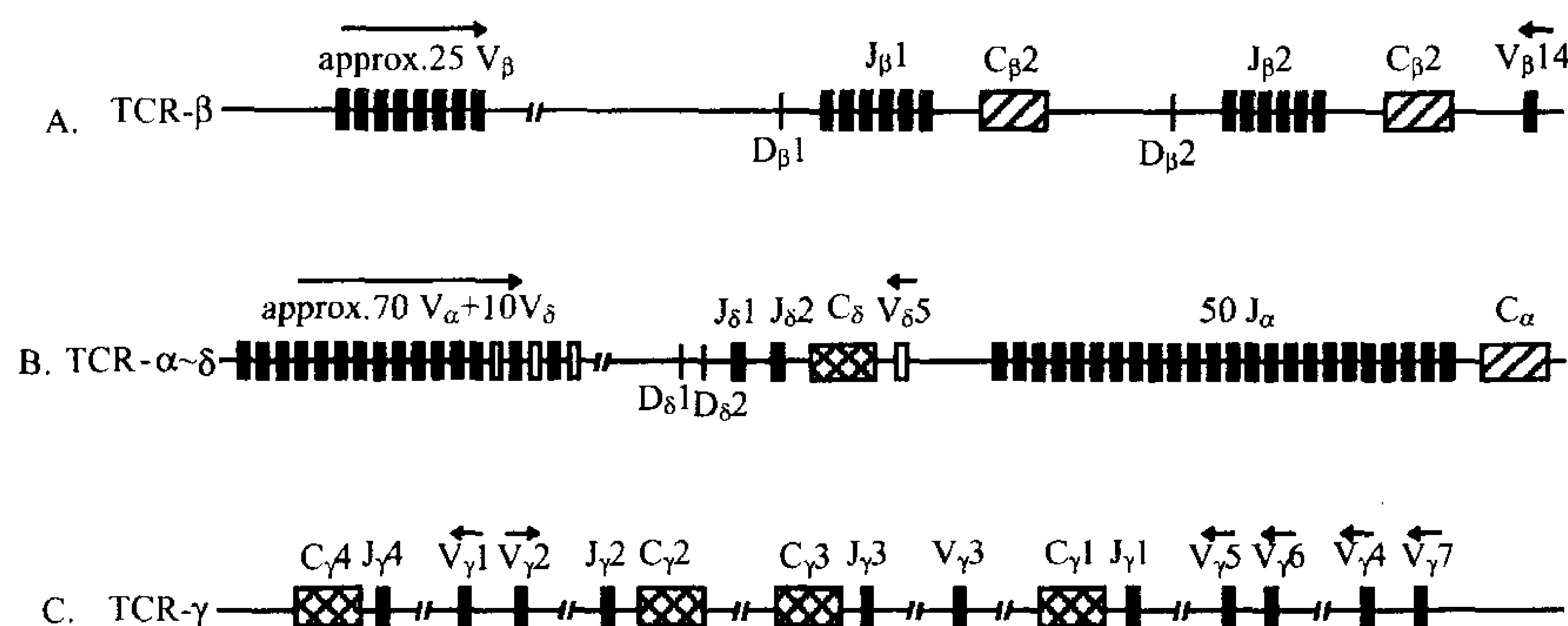


图 11.8 A-C TCR 基因的组织结构。粗杠代表可变可连接片段，$V_γ$ 片段除外，它们用空的粗杠表示。细杠表示多态性片段，点框表示常片段，转录方向由各图上的箭头标明。$C_γ3$ 片段为假基因，另外由于 $J_β1$ 和 $J_β2$ 的某些片段($J_β1.7$ 和 $J_β2.7$)无功能，故未列出。图中命名法源自 Heilig 和 Tonegawa[534]。

板非依赖性核苷酸加成。这种加成机制产生了所谓的 N 区多态性[138,139]。TdT 在小鼠出生之后才表达[140]，而人则在胚胎发育 3 个月后开始表达。因此新生儿的胸腺处于一种相对早熟的状态，还在胎儿出生之前就可以检测到 T 细胞中的 N 区多态性[141]。第二种机制是核酸外切酶介导的核酸外切作用，这种外切作用发生于 TCR 基因拼接过程中，从而产生更多的多态性。

382 虽然目前只了解了 TCR 和 Ig 基因重排的酶学概况，但是由于这个领域的快速进展，可以想像，在不久之后，我们将看到一幅更为详细的图景。一些淋巴细胞特异性分子（如 RAG 的两个产物）以及一些机体普遍表达的蛋白质（如 DNA 依赖性蛋白激酶的 Ku 催化亚基）都在这幅图景中充当一定的角色，这已经被突变小鼠的研究所清楚阐明[142~147]，并且被体外的重组系统进一步强有力地证实[148]。

胸腺发育中的控制

胸腺发育过程中各个 TCR 基因座的重排并非随机发生，而是遵循一种高度程序化的流程[149]。小鼠的第一批次成熟 T 细胞优先表达 γ:δ 受体，而实质上最初的一批细胞仅表达由一条 $V_\gamma 5 J_\gamma 1\ C_\gamma 1$ 和一条 $V_\delta 1\ D_\delta 2\ J_\delta 2$ 链组成的单一受体，而且这两条链也不具备明显的 N 区多态性。这些细胞于 fd14 开始出现，直到 fd17 一直保持优势地位，并从 fd18 开始衰退。定位于表皮的均质性 $V_\gamma 5^+$ 细胞形成了树突状表皮细胞（dendritic epidermal cell，DEC）的优势种群。随后几天出现第二批次的 γ:δ 细胞，其 TCR 由一条均质性 $V_\gamma 6\ J_\gamma 1\ C_\gamma 1$ 和一条 $V_\delta 1 D_\delta 2 J_\delta 2$ 组成，它们定位于舌和再生部位的表皮层。这些细胞在出生时开始衰退，并由表达特异性受体的 γ:δT 细胞群替代，这些 TCR 可具有 V_γ1、2、4、7 片段，含有丰富的 N 区多态性。异质性 γ:δ 细胞主要存在于胸腺、脾和其他淋巴器官。同样是在出生前后，α:βT 细胞开始取得优势，并最终占据胸腺细胞的 95%以上。出生后的 T 细胞就不再呈批次出现，而是持续地产生了。

各批次产生的胸腺细胞，其 TCR 基因重排模式具有不同的特征，但对于这些特征模式的控制因素却不甚了解。在细胞水平上可以推测，不同的 T 祖细胞群具有形成不同 T 细胞群的倾向。已有证据表明，要形成 DEC，其祖细胞必须来自胚肝而不是成年骨髓，而且必须在胚胸腺而不是在成年胸腺中完成成熟过程[104]。在分子水平上认识到，由于染色质结构的不同，使得重排的机制具有不同的实现途径，TCR-γ 基因座不同的重排方式正是反映了这种实现途径的不同性[150]。最初两个批次的胸腺细胞，其受体的表达具有均质性，这无疑表明 TdT 表达的启始被延迟。这种延迟的结果不仅造成了 N 区多态性的缺失，而且也在某种程度上促使各同源序列短片段位点上的连接更具均一性，即同源指导性重组[138]。

我们还不知道在人类 T 细胞库的发展过程中，是否也有类似的 T 细胞成批产生的特征。成人的淋巴器官中存在大量的 γ:δ 细胞，尤其是 $V_\gamma 9^+\ V_\delta 2^+\ \gamma_\delta$ 细胞，它们在外周血中占有明显的比例优势。但是这种细胞于何时开始产生，直到现在还不得而知[151]。

T 细胞分化中的控制

T 细胞分化过程中 TCR 基因座重排同样受到高度调控[152]。第一个完整的重排发生于 TN 阶段的 $CD44^{lo}$ $CD25^+$ 亚群，可以检测到 TCR-β、-γ、-δ 基因的重排。如果这些重排可以在细胞表面组装功能性 γ:δ 受体，则细胞继续发育成为成熟的 γ:δ 细胞；如果可以产生功能性 β 链，并且与 PTα、CD3 亚基进一步在细胞表面组装成前 TCR，则产生终止 TCR-β 基因重排的信号，细胞也将遵循 α: β 路径进一步分化。本章将就此问题进行更为详细的讨论。β 链的等位排除在 TCR-β 转基因小鼠体内非常高效[153]，但对于正常动物特别是人，这种排除的有效性也许并非 100%[154,155]。最后，可测知的 TCR-α 重排发生于 DP 阶段。在重排的过程中，成功的 V-J 连接可以发生于同一染色体内，也可发生于两条染色体之间，而且一个细胞内可以同时存在一种以上的 V-J 重排产物，称之为多重重排（multiple rearrangement）[156]。TCR-α 的 V-J 重排引起 TCR-δ 基因片段的缺失，因

383 此一旦两条染色体的 TCR-α 基因都发生了重排，就不可逆地决定了胸腺细胞只能发育成 α: β 细胞。在 TCR 重排过程中，即使表面可以表达功能性 α: β 受体，TCR-α 的重排也不会被关闭，这种状态可以一直持续到受

体能够识别自身 MHC 分子而通过阳性选择[157]。这就是说，并不发生 TCR-α 的等位排除。这使得成熟的 T 细胞可以同时表达一种以上的 α：β 受体[158～160]。但是由于一种受体的装配效率可能比其他受体高，而且单一细胞很少有机会同时表达两种都能与自身 MHC 分子相互作用的受体，因此在 α：β 受体的表达上就总是存在着一种功能性排除机制，使得大多数 T 细胞只表达一种 α:βTCR[160～162]。

目前对分化过程中导致 TCR 基因重排开放与关闭的分子机制还知之甚少[163,164]。但可以肯定的是，RAG 转录和 RAG 产物表达的控制在其中发挥关键作用。胸腺细胞分化的早期阶段对 IL-7 具有依赖性，据推测这反映了 IL-7 对 RAG 转录的直接控制[165,166]，但仍存有争议[167]。RAG 产物在 $CD44^{lo}CD25^{+}$ 之前或之中的表达，激活了 TCR-β、-γ、-δ 基因的重排；RAG-2 的产物随着前 TCR 的表达而迅速降解；分化进入 $CD44^{-}CD25^{-}$ 阶段，启动细胞的分裂[168]；RAG-1、-2 的转录也同时关闭[169]。RAG-1、-2 的第二个转录高峰发生于 DP 阶段[169]，终止于阳性选择的成功完成[157,170,171]。但是 RAG 表达的控制不能解释基因座特异性重排（locus-specific rearrangement）。

TCR 基因的染色质结构是控制 TCR 重排的另一个重要因素，TCR 基因染色质结构的不同使得不同 TCR 基因座具有各自不同的重排实施机制（accessibility to the recombination machinery）[172]。目前已经将这种重排实施机制与重排前基因座的细胞系特异性或阶段特异性转录联系起来了。这些特异性转录受控于每个基因座内部的转录控制元件。在转基因或敲除系统中，插入或清除增强子元件，都可以严重地影响重排[173～179]。但是即便如此，转录和重排之间的关系也不是绝对的。例如 TCR-γ 增强子对重排的影响已经归因于其中个别的转录因子结合位点[178,179]，但是在恢复重排装置的过程中，这些增强子不仅只是转录因子的结合位点，还可以具有其他作用。

作为同型排除的一种反映，TCR 基因的重排被永久地关闭了，其中的机制尚待阐明。不过该机制中可能也包括对重排实施机制的控制作用。尽管重排关闭过程中最初的一些事件已经开始得到阐明，但是其下游的事件还一无所知。

前 TCR 介导的选择作用

几年前，我们就已经注意到，胸腺细胞分化的 TN 阶段存在着一个质控点，该点以 $CD44^{lo}CD25^{+}$ 到 $CD44^{-}CD25^{-}$ 的转化为标志[103]。B 细胞分化过程中也存在着非常类似的控制点[180]。

SCID 小鼠存在从 TN 到 DP 的转化障碍，但将重排后的 TCR-α/β 基因导入 SCID 小鼠，可以使其产生完全成熟的 T 细胞。这为胸腺细胞分化早期 TCR 控制的转化作用（TCR-controlled transition）提供了第一个真正有意义的线索[8]。更为诱人的是，单独将重排后的 TCR-β 基因导入 SCID，可部分地打破 T 细胞成熟障碍，允许细胞发育到 DP 阶段，却不能发育成 SP[181]。这种成熟障碍被精确地定位于 $CD44^{lo}CD25^{+}$ 阶段；并且发现，在编码 αβTCR/CD3 复合体结构部分或信号部分的基因中带有零突变或显-隐性突变的几株小鼠系中，存在不同程度的成熟障碍，这些突变的基因包括 RAG[142,143]、TCR-β[182]、CD3-ε-γ-ζ[183～187]、$p56^{lck}$[188,189]、CD45[190,191]、ZAP-70/Syk[192]、rho[110,193]、MEK-1[194]。某些药物如酪氨酸激酶抑制剂[195]、环磷酸腺苷 AMP 类似物[196]、免疫抑制剂脱氧精胍菌素（deoxyspergualin）[197]，也可以干扰胸腺细胞的分化，尤其是在这一控制点上。通过导入 TCR-β 转基因[181,198]、转入可合成有活性产物的 $p56^{lck}$[199,200] 或 $P21^{ras}$[201] 基因、单克隆抗体与 CD3-ε 链的偶联[72～74]，都可以消除这些药物对分化的阻断作用。

早期的研究试图明确这种控制的运用会导致细胞表面复合体的何种特征，这一目标目前只得到了部分实现。TCR-β 链的重要性在最初就被认识到了[181,182,198,202]，而且生化研究也很快阐明，这种重要性至少体现在 CD3 的某些亚基上[202,203]。虽然曾在一段时期内，CD3 各亚基在这种控制中的作用存有争议，但最近的敲除试验已经表明，这种重要性涉及到 CD3-ε、CD3-γ、CD3-ζ[183～187]，但不涉及 δ[204]。这个阶段表达的 TCR-β 与一条称之为 pTα 的恒定多肽链配对，生物化学的研究也已阐明了这个配对分子的重要性[205,206]。目前 pTα 的基因已经克隆，经分析认为 pTα 为 Ⅰ 型跨膜蛋白，具有 Ig 样的胞外区[206]。pTα 基因的敲除导致类似于 TCR-β 缺失动物的表型[207]。如果以类似的前 B 受体作为比较模型，会发现目前认识到的复合体缺少一条类似于

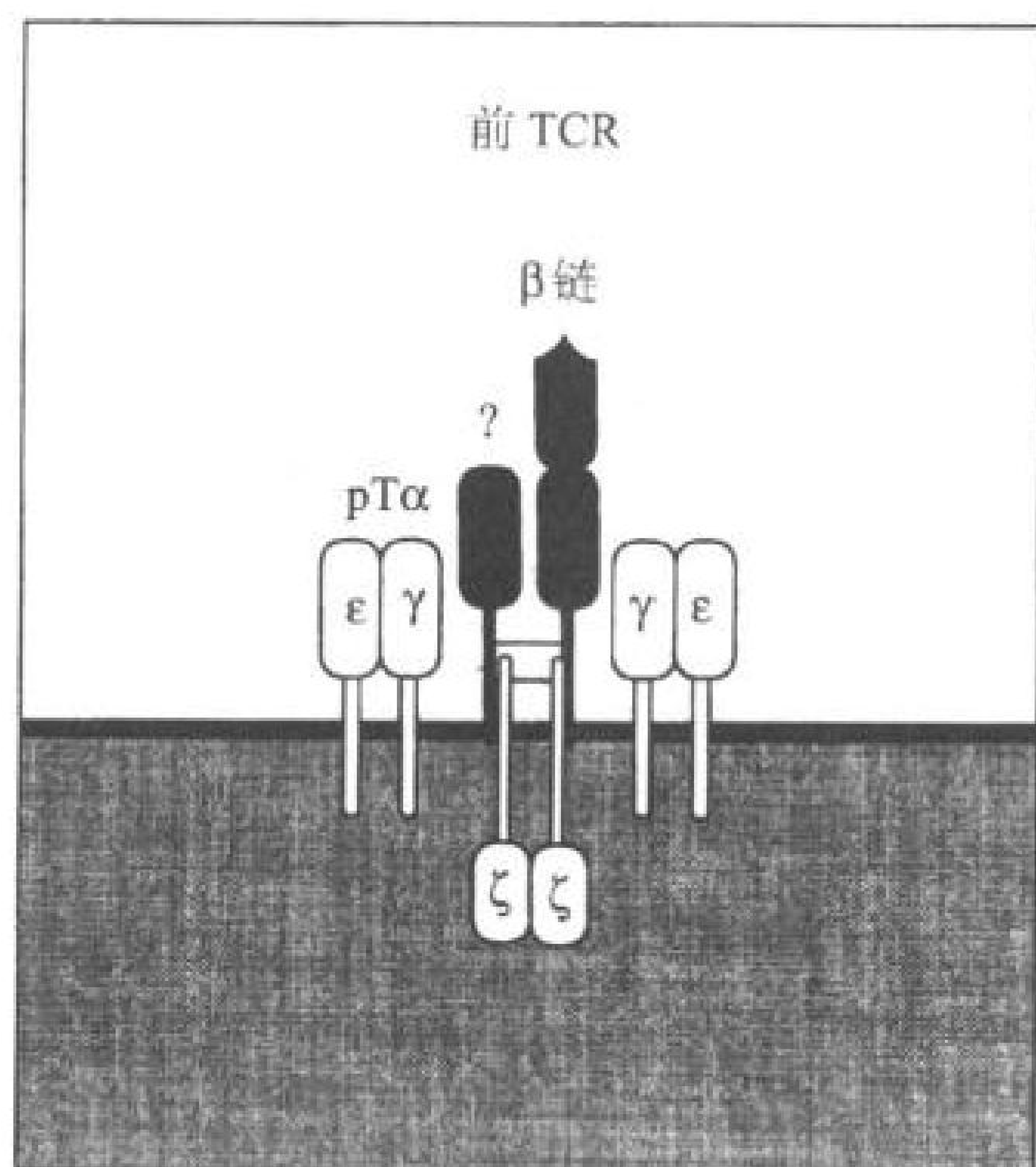


图 11.9 前 TCR。问号标注之处代表一个可能的前 TCR 亚基。其依据是，与前 BCR 类比，存在一个未成对的 Ig 样 β 链，这在 Ig 超家族中是很少发生的。目前尚不知道 CD3 的确切结构，此图乃是汇集敲除动物实验的结果而成，细节见文。

384

Vpre-B 的 Ig 链(图 11.9)，这也许意味着还有其他的亚基有待发现。人类的 pTα 链已经阐明，在整体上与上述结构基本相同，但胞内区却存在很大差异[208]，而且其表达高峰出现在胸腺细胞分化的 ISP 阶段，较其他动物有所延迟[209]。

前 TCR 介导分化控制的机制如何，有关这方面的信息还不足以对许多问题作出明确的解答。受体是否需要与特定的配体结合，还是只需在细胞表面进行组装即可发挥控制作用，这个问题还没有明确的答案。受体必须从 ER 转出，但是受体并不一定需要 V_β 外显子[210,211]。目前也不清楚控制信号如何进行转导。TCR-β 没有胞内区，pTα 虽然具有可以结合信号分子的胞内区，但序列并不保守[208]，而且可有可无[200]。在胸腺细胞产生的过程中，前 TCR 可以独立于 CD3-δ 发挥功能，而 α:βTCR 则对 CD3-δ 具有依赖性[204]。这一事实提示，这两种受体复合体介导的信号转导之间存在差异。而且某些药物对于早期和晚期成熟事件的作用是不同的，这也进一步支持了上述观点[197,212,213]。$p56^{lck}$ 在一定程度上也参与了控制信号的转导[188,189,199,200]，但还不知道它是否通过与前 TCR 直接作用而发挥效应。控制信号转导的 ras 途径已经阐明[110,193,194,201]。

那么前 TCR 控制到底是一个怎样的过程，又会导致怎样的结果呢？从 $CD44^{lo}CD25^+$ 到 $CD44^-CD25^-$ 的发育过程中发生了几件重要的事件，包括 TCR-β 等位排除、具有功能性重排 TCR-β 细胞的富集(β 选择)[168,214,215]、细胞快速分裂的启动、CD4 和 CD8 受体的表达以及 TCR-α 基因重排的启动。pTα/前 TCR 在关闭 TCR-β 进一步重排的机制中发挥重要作用[216~218]，这虽曾有争议，但目前已经是明确的结论。因此细胞要想有效地渡过 $CD44^{lo}CD25^+$ 阶段就必须表达前 TCR[182,207]，前 TCR 的表达也许是细胞分裂的启动信号[168,219]。同时，只有表达前 TCR 才能获得正常的 $CD4^+CD8^+$ 细胞群，这也是十分自然的事[142,143,182,183,207]。但是前 TCR 与细胞分化之间的关系存在两种可能的解释。一种解释认为前 TCR 的表达是分化过程中的一道真正的关卡。另一种解释认为前 TCR 的缺陷仅仅是对细胞扩增的一种抑制。TCRαβ 和 TCRγδ 可以替代前 TCR 的作用，但仅限于经过基因处理的动物[182,207,220~222]。而且许多与前 TCR 无明显关联的实验性干预，如 γ 辐射[223,224]、P53 突变[225,226]，都可以使 TN 细胞发展成为 DP 细胞，不过通常仅能生成较小的 DP 群体。最后，虽然前 TCR 对 TCR-α 基因的重排具有促进作用[182,183,222]，但是在前 TCR 缺失的情况下，TCR-α 的重排仍可以低水平地进行。

通过分析前 TCR 对上述不同过程的强烈影响，我们会意识到，前 TCR 主要发挥质量控制监视器的作用。当 TCR-β 重排产生一个功能性 β 链时，它在细胞表面与受体的另一部分组装在一起；前 TCR 的表达在某种程度上讲是关闭 TCR-β 进一步重排的信号，同时也可能是使表达特定 β 链的细胞发生增殖、扩增的信号；进一步的分化导致了 TCR-α 基因的重排。另一方面，如果 TCR-β、TCR-γ 、TCR-δ 重排不成功，则发生细胞凋亡[219,227]。简言之，前 TCR 介导了表达功能性 β 链细胞的阳性选择，并且提高了功能性 α:βTCR 组装的成功率。

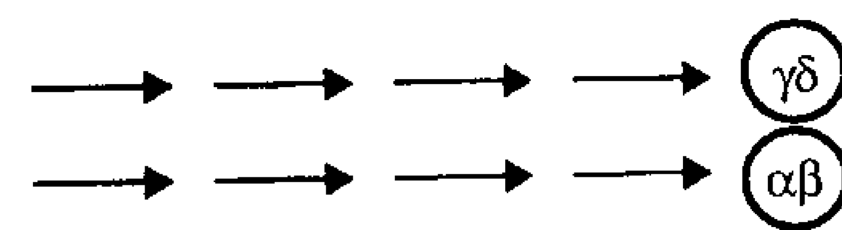
α:β/γ:δ 抉择

动物外周组织中存在两种差异显著的 T 细胞群。根据表达抗原特异性受体链的不同，将它们划分为 α:β 和 γ:δ 细胞。这些细胞均是源于造血干细胞的终末分化细胞，在胸腺和 一些胸腺外场所发育而来。那么，一个正在发育的 T 祖细胞是什么时候，又是怎样抉择生产何种细胞的呢？在个体胚胎发育早期，这种抉择具有强烈的倾向性，以至于根本不存在选择余地。最早出现的两批次 T 细胞是在干细胞水平程序化产生的，主要是 γδ 细胞。第一批细胞主要表达由均质性 $V_\gamma5$ 组成的受体，第二批次表达由均一的 $V_\gamma6$ 组成的受

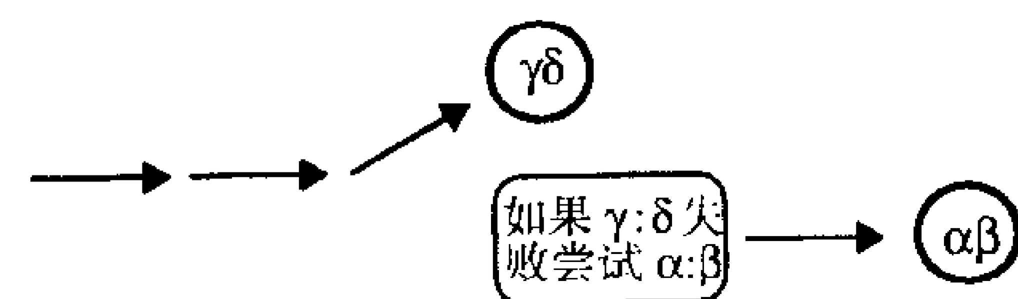
体[104,149,228]。而后才开始产生表达异质性 TCR 的 α:β 或 γ:δT 细胞,这时虽然具有产生 α:β 细胞的倾向性,但是必须得做出 α:β/γ:δ 的选择了。

已经提出了三种基本模型对 α:β/γ:δ 抉择进行解释(图 11.10)。第一种是独立模型,认为两类 T 细胞从独立的原细胞分化而来,当然这两种原细胞最终还是来源于造血干细胞。这种模型认为,要么存在干细胞的异质性,要么造血干细胞很早,甚至在进入胸腺以前就分化出两种不同的 T 祖细胞系。第二种是序贯模型,与前者相反,该模型认为两种 T 细胞具有共同的前体细胞,处于成熟过程中胸腺细胞首先试图成为 γ:δ 细胞,但如果不能产生功能性 TCR-γ 、-δ 重排,它将继续试图成为 α:β 细胞。个体发育过程中 γ:δ 细胞的产生早于 α:β 细胞,根据这一事实可以设想出 γ:δ→α:β 的顺序。第三种为竞争模型,同样假设存在共同的前体细胞,而且在胸腺细胞的某个分化窗(a window of thymocyte differentiation)中,两类细胞都可以产生。但是由于某些分子参数(molecualer paremeter),尤其是受体表达的不同,使每个原细胞做出 α:β/γ:δ 抉择。

1. 独立模型



2. 序贯模型



3. 竞争模型

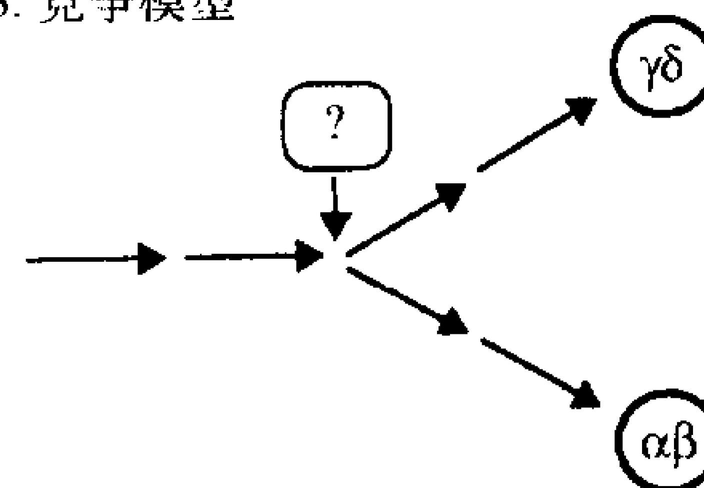


图 11.10 α:β/γ:δT 细胞定向发育模型,详见本文。第三种模型中的问号表示分化过程的决定窗(defined window)中存在着一个未知因素,它决定一个细胞的 α:β/γ:δ 发育方向,受体的表达可能是这样的一个但不是惟一的因素。

385

TCR-δ 基因完全位于 TCR-α 基因内部,成功的 TCR-α 重排可以将 TCR-δ 基因环状删除。早期的研究试图根据这一事实对三种模型进行鉴定。成熟的 α:β T 细胞中可以找到载有重组后 δ 基因的染色体外环状 DNA,这与第二、三种模型相符,但与第一种模型矛盾。然而不幸的是某些实验的结果与此相反[229~232]。另一种方法是分析转基因小鼠的 T 细胞库。有些实验表明,α:βTCR 转基因的导入不影响 γ:δ 细胞的产生,该结果支持第一种模型,而有违于后两种模型。但是,与之相反的结果也已经有所报道[233~236]。

最近对 α:β 与 γ:δ T 细胞内重排的 TCR 基因进行了一系列分析,对这些模型做出了最为可信的鉴定。首先,发现成熟的和成熟中的 α:β 细胞中存有经重排的 γ 、δ 基因,读框内的序列已被清除,处于无功能状态[237~239]。这暗示着具有功能性 γ 、δ 重排的细胞是从 α:β 路径分支出去的。并与独立模型不相容。其次,发现在 γ:δ 细胞的读框内存有 β 基因;甚至存有一些经重排的 α 基因,但主要处于读框之外[215,238,240,241]。进一步的转移实验表明,γ:δ 细胞最迟可于 TN 的最后阶段由胸腺细胞产生,这晚于前 TCR 介导的 β 选择(原文为"TCR 介导的阳性选择"),而这种选择可使胸腺细胞沿着 α:β 途径继续发育[242]。这些发现使序贯模型成为最简单的解释,同时也满足了竞争模型的基本要求。

一个简化的可能过程是这样的:β、γ、δ 重排均开始于 $CD44^{lo}CD25^{+}$ 的启始阶段,如果可以产生一个功能性 β 链,并与 pTα 形成前 TCR 复合体,细胞将选择 α:β 方向发育;如果形成一个功能性 γ:δTCR ,细胞通常沿 γ:δ 方向发展。由于前一种情况包括较少的重排事件,所以有可能很轻易地就成为发生频率最高的事件。然而也许直到 TCR-α 重排完成,δ 基因片段已被排除的时候,细胞才会不可逆地定向发育成 α:β 细胞。由此可见,一个功能性 γ:δTCR 可能是在功能性 β 链形成之前、同时、甚或之后才产生。目前还不知道是何种力量将已经向 α:β 发育的细胞转向 γ:δ 途径。甚至从真正意义上讲,TCR 的确切作用还不清楚:TCR 决定着细胞系的发育,还是仅仅作为细胞系的组成标志。虽然在 γδT 细胞分化过程中,好像并不存在与 α:β 前 TCR 相对应的 γ:δ 前 TCR 复合体,当然也没有可以与 pTα 结合的 TCR-γ、TCR-δ 链[207]。但是在 $CD44^{lo}CD25^{+}$ 到 $CD44^{-}CD25^{-}$ 的转化过程中,对带有功能性 γ:δ 重排的细胞确实存在一定程度的阳性选择作用[243]。人们设想,应该存在某些基因座特异性转录控制元件(locus-specific tran scriptional control element)[234,235,244,245],其作用类似于 Notch 基因的产物[246],决定或巩固 α:β/γ:δ 选择,但是目前还缺乏支持这两方面的确切证据。

阳性选择:自身 MHC 限制性谱系的形成

过去的20多年中,胸腺在T细胞谱系选择过程中的作用一直都是免疫学中最具吸引力、最富争论性的课题。最具吸引力是因为这个课题在发育生物学中处于独一无二的地位。在这个领域中,发育着的器官必须适应基因的可变性,这种可变性表现为生殖细胞 MHC 和体细胞 TCR 的多态性。这使得器官的发育不只是遵从生物体同源基因中已经预设好的程序。同时,系统必须具备选择性识别抗原-MHC 配体的能力。如果免疫系统有可能与这种配体相遇的话,这种相遇也只有在稍后的发育阶段才能发生。最富争论性,是因为这个领域内总是存在提示性的推测和激烈的讨论。虽然早期的争论大多数都已尘埃落定,其中包括胸腺中阳性选择是否存在的争论。但是阳性选择在细胞水平和基因水平的基本机制却仍然是交流活跃的话题。

阳性选择促进分化进一步发展,这已经被普遍接受。阳性选择可以使一个未成熟的短寿命 DP 细胞逃避程序性细胞死亡,进而发育成一个终末分化的长寿命 SP 细胞。这个选择过程是由胸腺细胞表面 TCR 与胸腺基质细胞表面 MHC 分子间的相互作用介导的。这是个严格的选择过程,选择的结果仅保留 DP 细胞群的一小部分。同时,阳性选择也与细胞系定向发育相一致。根据 TCR 与何种 MHC 分子相互作用,该过程作出 CD4/CD8 SP 选择 。

胸腺选择存在一个内在的佯谬:阳性选择和阴性选择/自身耐受都依赖于 TCR 与胸腺基质细胞的肽-MHC 复合体的相互作用。因此,任何一种对胸腺驯育过程(thymic education)的理性观察都必须同时研究这两种选择过程。

阳性选择是否存在,为何存在?

阳性选择的概念是根据各种实验结果并经历20余年的发展而最终形成的。这个概念最初源于对T细胞功能自身 MHC 限制性的必要解释[247]。历经数年的四亲小鼠(tetraparental mice)和骨髓嵌合体的研究表明:T细胞功能的自身 MHC 限制性并不意味着T细胞与 APC 的 MHC 基因型必须匹配;这种限制性是T细胞对成熟环境适应的结果[248,249]。根据该观点形成了适应性分化(adaptative differentiation)的概念[250],并且最终得到了子 F_1 代→亲本嵌合试验(seminal F_1→ parent chimera experiment)的有力支持[251]。在这个实验中,将 A × BF_1 代造血细胞移植入宿主(A 或 B)形成嵌合体,A × BF_1 代T细胞在宿主体内成熟,这种T细胞对 A 、B 靶细胞的溶破能力具有宿主 MHC 限制性(图 11.11,上)。有些理论认为,对自身 MHC 识别的驯育发生在胸腺而不是外周组织。但这种观点很快被胸腺移植试验的结果推翻[252~255](图 11.11,底)。这种状况维持了几年,在这期间由于胸腺阳性选择理论与一些实验结果相矛盾,而且该理论还有人为引入的嫌疑,因此,有些理论对胸腺选择提出了强烈的质疑。其中包括抑制细胞或异基因应答可以干扰阳性选择、外周组织而并非胸腺影响T细胞谱系的形成等理论[256]。不过随后的实验发现,特异的 MHC Ⅱ类分子可以提高表达有特异 V_β 区的成熟T细胞出现的频率[257,258]。而且发现,利用等位基因特异性 mAb(allele-specific mAb)阻断 F_1 小鼠的 MHC 分子,可以抑制具有该等位基因限制性的辅助和细胞毒性T细胞的出现[259,260]。这些结果都为阳性选择提供了进一步的支持。

386 TCR 转基因小鼠的建立为阳性选择理论提供了决定性的证据。这种小鼠可以产生大量的表达特定受体的淋巴细胞,而这种淋巴细胞是一个抗原特异性和 MHC 限制性均已知的T细胞克隆。这些淋巴细胞的行为可以被很稳定地追踪,而且可以反映它们在成熟环境中所具有的功能。从这些研究中可以得到关键性的结论:只有原始的T细胞克隆与小鼠表达的 MHC 等位基因相对应,才可以观察到表达转基因 TCR 的成熟T细胞[261~265]。如果与转基因 TCR 相对应的 MHC 等位基因缺失,未成熟的 DP 细胞就不能发育成 SP 细胞(图 11.12)。如果将 TCR 基因转入 SCID 或 RAG 缺陷的动物,上述结果非常明显。在这种情况下,内源性 TCR① 基因的重排不可能发生,所有的分化过程都必须由转基因 TCR 受体介导。在 F_1 代动物体内,可以发生明显

① 原文为"TCR-α"。——译者注

的阳性选择作用[262,263]。利用转基因技术只导入一种编码 MHC 的基因,该 MHC 分子可以与前述的转基因 TCR 相互作用,结果同样可以诱导阳性选择过程[264]。这个结果更为重要,因为它排除了阴性选择对观察结果干扰的可能性。

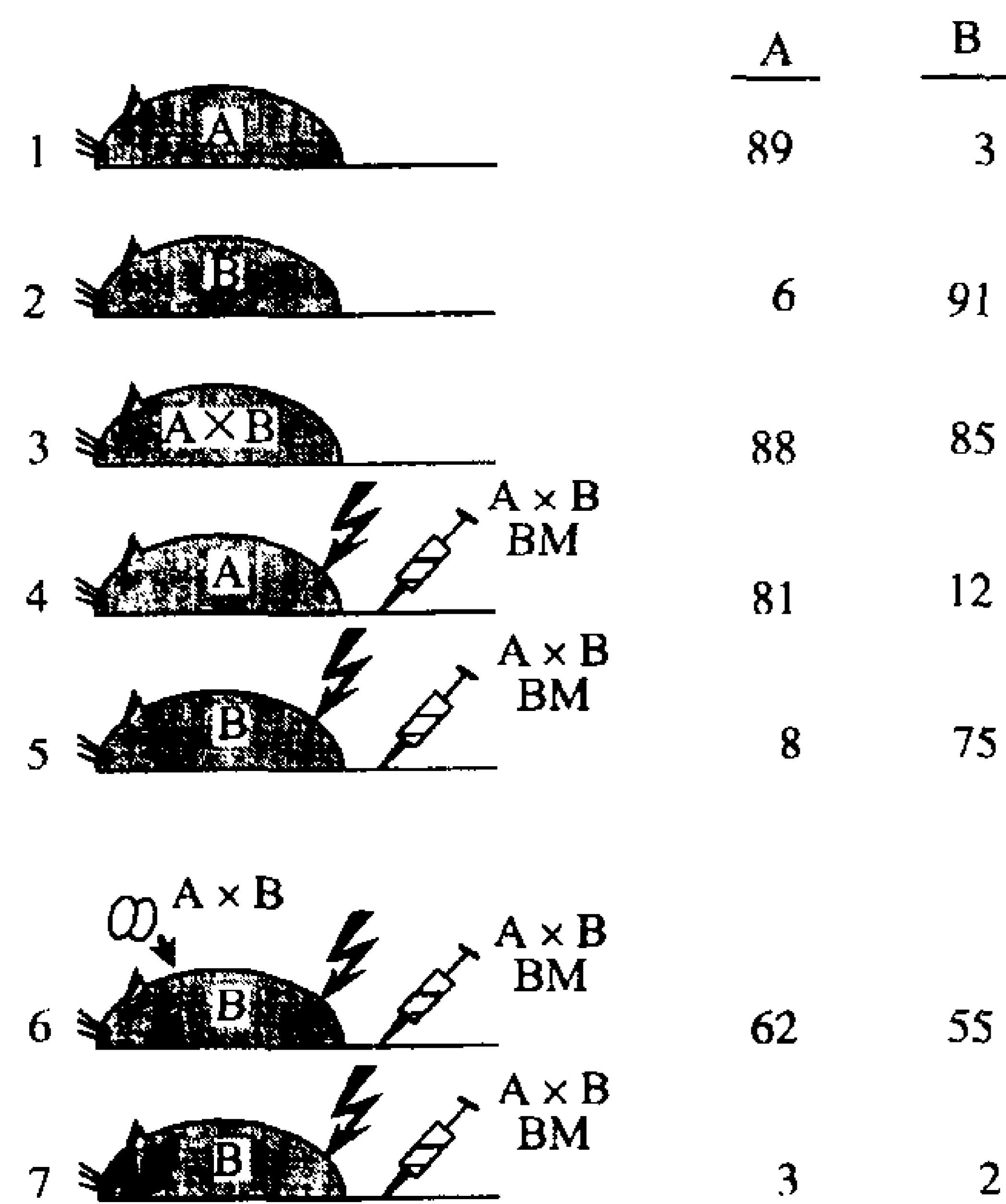


图 11.11 自身 MHC 等位限制性在胸腺中的产生。该图描述了 Bevan、Zinkernagel 以及合作者进行的一个理想化的杂交实验[251~253]。他们首先阐明了胸腺选择对 MHC 限制性谱系的重要性。带有病毒或次要组织相容性抗原的细胞在引入体内后都可引起强烈的 CTL 反应,这些实验检测了不同小鼠对 A 或 B 基因型靶细胞的溶破能力。1~3 行:基本的反应 MHC 限制性。特定小鼠的 T 细胞只能溶破相同单体型的靶细胞,A×B F_1 代小鼠的 T 细胞对两种靶细胞都具有溶破作用。4、5 行:宿主的 H-2 抗原决定免疫的反应性。致死剂量照射小鼠,利用预处理清除成熟 T 细胞的 A×B F_1 小鼠骨髓前体细胞进行重建,由这些前体细胞发育的 T 细胞虽然与两种靶细胞具有相同的单体型基因型,但却只能溶破 MHC 等位基因都与宿主匹配的靶细胞。这些结果最明确地显示,T 细胞谱系依照与宿主 MHC 相匹配的原则形成,称之为适应性分化。(这些概念首先见于 Jerne 关于 TCR 基因体细胞突变理论的文章中,之后才广为流传,但后者的理论是十分错误的)。这些结果并未表明宿主的哪一部分引起此效应,但这个问题被胸腺移植实验阐明(6、7 行):与第 5 行相似,将 F_1 骨髓与亲本 B 小鼠嵌合,不同的是,骨髓植入之前切除宿主胸腺,并替以 F_1 小鼠的胸腺。其结果如第 3 行,如果靶细胞具有 MHC 等位基因,则 T 细胞可以对该靶细胞的抗原发生反应。如第 7 行所示,不进行胸腺移植就观察不到该反应的发生。这确证了胸腺移植为 T 细胞反应所必需。

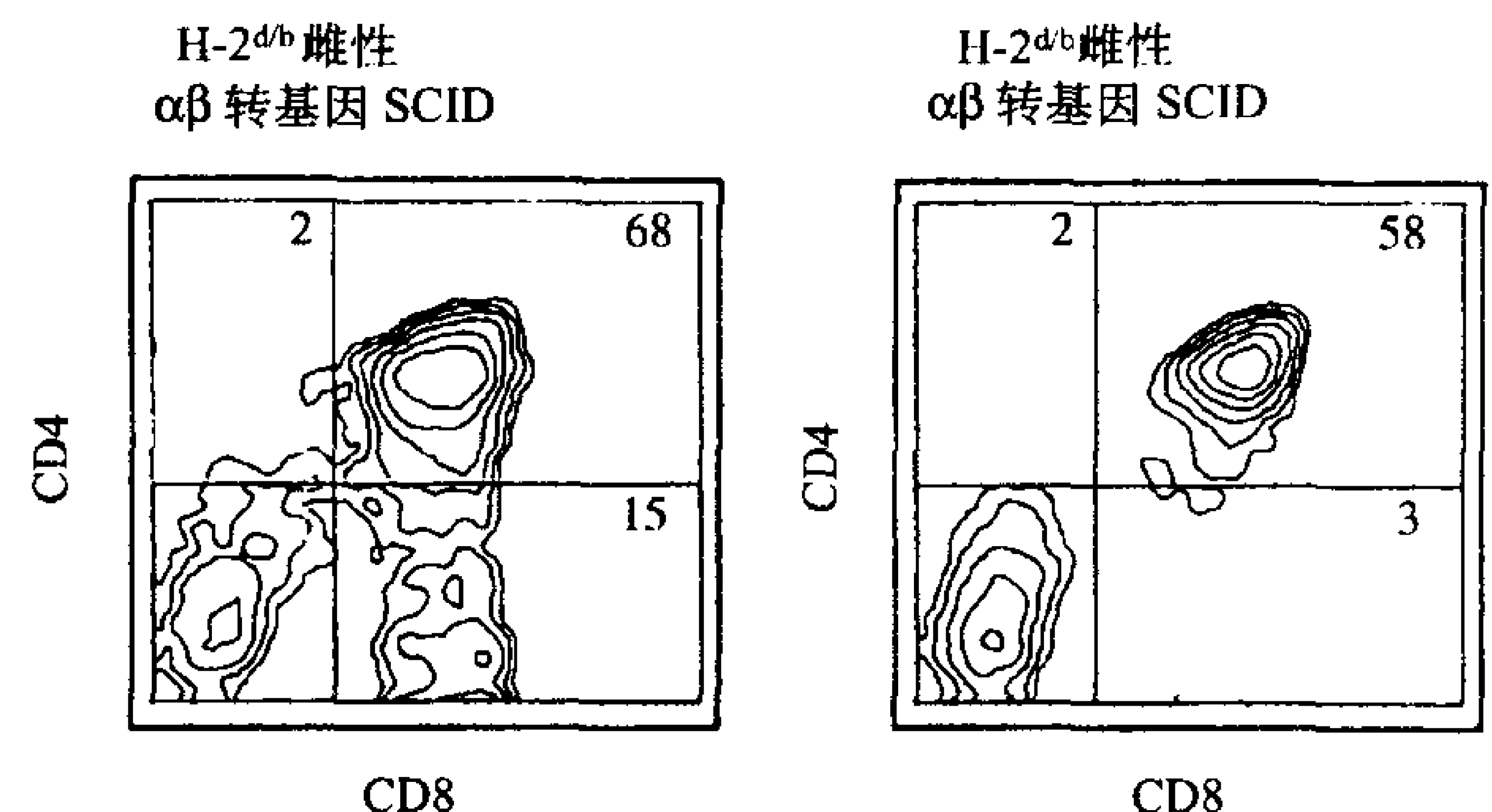


图 11.12 TCR 转基因小鼠中胸腺选择的阐明。这个经典实验构建的转基因小鼠可以在绝大多数胸腺细胞上表达单一的 TCR,该 TCR 具有 $H\text{-}2^b$ MHC 单体型 MHC Ⅰ类分子限制性。来源于不同 MHC 等位基因背景转基因小鼠的胸腺细胞,经 CD4、CD8 染色后进行流式细胞分析发现:相对于图 11.6 所示的正常分化而言,$H\text{-}2^b$ 阳性小鼠存在强烈的 $CD4^- CD8^+$ 成熟倾向(左图)。这说明胸腺细胞的成熟与受体的限制特异性存在明显的关联。在 $H\text{-}2^b$ 缺失的情况下,选择并不存在,胸腺细胞都集中于未成熟的 DP 细胞群(右图)。经 Teh 等授权引用[261]。

这些研究还得出一些其他的结论:产生的 SP 细胞,其表型与受体的限制性相匹配,即当转基因 TCR 为 MHCⅠ类限制性时,细胞发育成 $CD8^+$ SP,而当转基因 TCR 为 MHCⅡ类限制性时,细胞发育成 $CD4^+$ SP。这些发现表明,参与阳性选择的 MHC 分子类型控制着分化期细胞的基因转录程序。我们将对这个决策过程作如下讨论。

基因靶定动物实验进一步加强了转基因小鼠实验的说服力。小鼠 MHCⅠ分子的缺失阻碍了 $CD8^+$ 细胞在胸腺中的发育[266,267],而 MHCⅡ分子的缺失也导致了 $CD4^+$ 细胞的缺失(图 11.13)[268,269],这一发现极具说服力。突变动物放射嵌合试验也表明,放射抗性胸腺基质细胞表面的 MHC 分子是介导选择的主要元件[270,271],这与预想的结果相一致。随后的实验将 MHCⅡ基因导入,对 MHCⅡ分子的缺失进行弥补,$CD4^+$ SP 细胞重新产生,这一结果进一步巩固了前一实验的结论[272]。

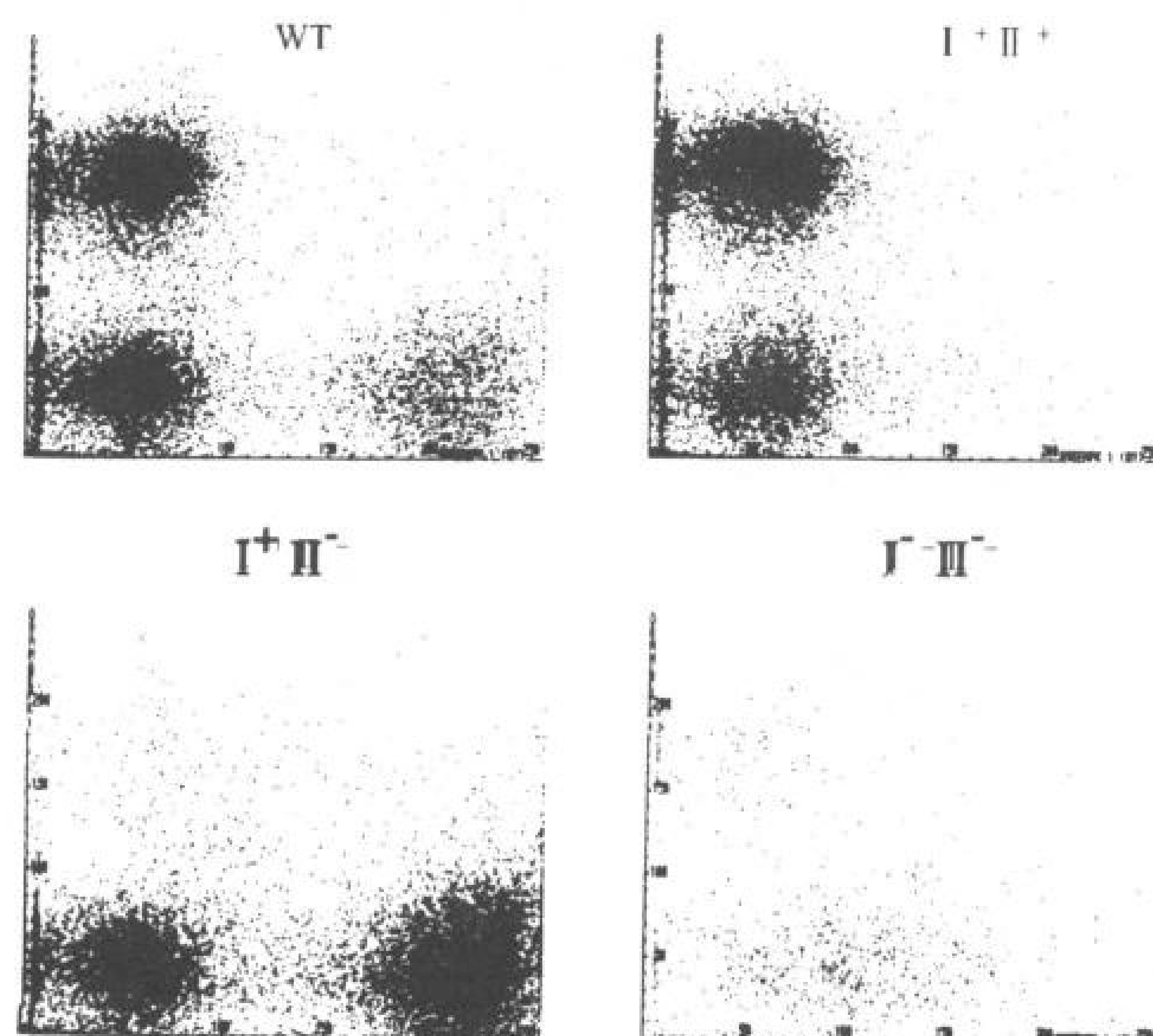


图 11.13 MHC 缺陷小鼠中阳性选择的证据。此分析中小鼠的 MHC Ⅰ(β_2m 敲除)或 MHC Ⅱ(Aβ 敲除)或两者皆缺失。淋巴结 T 细胞经抗 CD4 和 CD8 试剂染色，并显示于上图。注意到在 MHC Ⅰ缺失的情况下 CD8⁺消失；在 MHC Ⅰ缺失的情况下 CD4⁺消失；在 MHC Ⅰ、Ⅱ都缺失的情况下 CD4⁺、CD8⁺都消失。图中十分少量的细胞表示具有替代作用的 MHC 样分子的选择作用。经 Chan 授权引用。

那么，为什么要进行阳性选择呢？事后观之，好像很显然需要这样一个过程。TCR 与 B 细胞受体(BCR)不同，后者可以直接识别抗原，任何一个结构稳定的表面 Ig 都具有识别外来抗原表位的潜能。而 TCR 必须与动物 MHC 分子具有一定程度的相容性，才能识别抗原分子。由于物种的 MHC 分子具有异种型、同种异型、等位型差异，而且也没有理由认为 TCR 各基因片段的重排产物都能自发地与其中一种 MHC 分子相匹配。因此必须通过某种程度的筛选，挑选出那些"有用的"细胞[273]，这些细胞的 TCR 能与个体的 MHC 分子相互作用，而且它的共同受体(CD4/CD8)也与该 MHC 分子相匹配。显然，胸腺选择是一个高度浪费的过程，大量的 DP 中，只有一小部分(正常小鼠约为 3%)能够成熟并被输送到外周组织中，其主要原因是多数细胞阳性选择的失败[62]。当然，阴性选择也引起一些细胞的损失[274~276]。选择过程中也包含一定程度的竞争作用，利用转基因技术使小鼠表达一种可与自身 MHC 作用的 TCR，这种受体本应该允许所有的细胞通过选择而最终成熟，但事实上只有其中的小部分细胞得以成熟[82]。这种低效性也许反映了基质细胞为阳性选择提供场地(nich)的有限性[277]。

387

应该注意到，目前对阳性选择的描绘还只是出于一种构想，而且嵌合和转基因小鼠试验的结果也并非绝对确定不变。早期的一些放射嵌合试验显示，有些实验中的反应是由于胸腺基质细胞中 MHC 等位基因缺失造成的。某些 TCR 转基因试验也发现，虽然宿主 MHC 等位基因与导入的 TCR 不相容，但同样也可以启动阳性选择[278]。一些转基因小鼠，甚至该小鼠表达与转基因 TCR 相容的 MHC 分子，也只表现出较低水平的阳性选择率[279]。另一方面，CD4/CD8 的倾向性(bias)也远非绝对，表达 MHCⅡ限制性 TCR 的真正 CD8⁺可以在一些转基因动物体内少量成熟[280,281]。因此可以认为 TCR/MHC 相互作用的等位特异性也并非绝对，这就解释了为什么不匹配的骨髓移植可以成功。更进一步讲，就目前所知还找不出任何的现实理由可以认为这样严格的选择特异性有存在的必要。因为与 MHC 高度多态的肽结合槽相比，与 TCR 对应的 MHC 表面只具有有限的等位可变性(allelic variation)。而且据报道，将 CD4 分子人为地导入 CD8⁺细胞，这使 CD8⁺表面大部分 MHCⅠ限制性受体同样可以识别 MHCⅡ限制性抗原[282]。这些发现有助于从概率论的角度理解阳性选择过程：一个给定的 TCR-MHC 作用水平，决定了细胞以一定的概率被选中，进入 CD4/CD8 分化途径；也决定了细胞以多大的概率被淘汰。考虑到淋巴细胞群的巨大规模，即使看似不可能发生的事件也会发生。在胸腺中启动的阳性选择过程也许在外周组织中将继续存在，因为持续的 TCR-MHC 结合是 T 细胞生存所必需的[283]。

细胞分化的路径

胸腺细胞分化增殖的早期事件产生了大量表达功能性 TCR-β 链的 DP 细胞。DP 细胞 TCR-α 基因功能性

重排成功后,可以赋予这些细胞进一步增殖的潜能。功能性 TCR 的表达标志着 DP 细胞进入了阳性选择过程,其结果是少部分被选中发育成成熟的 SP 细胞,大多数 DP 不能通过这个阶段而凋亡。DP 细胞的平均寿命为 3~4 天,被选中的细胞在 DP 阶段滞留 3 天后变为成熟的 SP 细胞[82],被筛除的细胞则发生凋亡。这些现象都可以在皮质中得到观察[62]。阳性选择是一个不伴有增殖的分化过程。将 TCR 基因转入表达与之相容的 MHC 分子的动物体内,可以导致成熟胸腺细胞的过量产生,其原因是可以进一步分化的细胞多了,而不是因为阳性选择的通过优先刺激了细胞分裂增殖[82]。

细胞表面 TCR 的表达是选择的一个基本要求。无论是处于细胞周期中的大 DP 细胞还是静息状态的小 DP 细胞,都可以参与选择过程,但只有其中特殊的 DP 亚群才能被选中。不过在这一点上还存有争议[284~286]。随着选择过程的发生,可以检测到由于选择而产生的一些早期效应,其中最为显著的是胸腺细胞表面 TCR 水平的上调[287]。这种上调发生于 TCR-α 链转录后水平,是由发育调控的,而不是由于某个基因转录水平的增加而引起的[288]。早期阶段过后,出现了许多胸腺细胞表型的修饰(表 11.2),其中最富戏剧性,也最具重要性的是关闭了其中的一个共同受体。这个事件在选择过程中发生得相当迟后,而且两个共同受体可能还会暂时混杂在一起,并伴有再表达、再关闭的过程,这将在以后进行讨论。CD4 分子的关闭是由于一个具有静息子作用的内含子受到了影响,这个静息子在 DP 中处于无活性状态,但在 CD8SP 中被激活[289,290]。由于功能性 α:βTCR 的组装,产生了一些其他的变化,其中包括参与 TCR 重排的 RAG、TdT 基因的关闭[140,157,170,291]。其余的变化则表现为表面蛋白质的改变,如 CD44、CD69 表达的增加,这些蛋白质通常在活化的成熟 T 细胞表面发现。同时,这也好象反映出 TCR 具备了新的信号转导功能[292]。这些细胞还获得了一些成熟 T 细胞必须的表面分子,如 CD28 共刺激分子、CD5、CD45 及 MHCI,或是表达一 些未知功能的蛋白质,如 HAS、PNAr 。最后,细胞内的凋亡控制因子 Bcl-2 家族蛋白发生了重要变化。在 DP 中 Bcl-2 只有很低水平的表达,但经过阳性选择后 Bcl-2 被标志性地诱导表达[293,294]。这与 DP 对多种凋亡诱发因子敏感性的丧失有关,这些诱发因子包括辐射、肾上腺皮质激素、高亲合抗体引起的 TCR 交联。目前设想,正是由于抗凋亡因子表达水平的提高才导致了被选中细胞的凋亡豁免。但是对于凋亡豁免的解释也不应该过于简单化,因为 DP 中的凋亡过程是复杂的,在死亡的各种途径中会受到各种正性的或负性的干扰[295],而且 Bcl-2 也不能完全避免凋亡[294,296~298]。

表 11.2 阳性选择导致的表型改变

CD4、CD8	早期,诱导两者在表面轻度表达其后,其中的一个被完全关闭。
TCRαβ、CD3	非常早期,表面蛋白而不是 mRNA 大幅升高
RAG、TdT	关闭
Bcl-2	↑
CD69、CD44	开放,但并不是在所有的细胞 CD4SP > CD8SP
CD5	↑
CD28	↑
MHC Ⅰ	↑
HAS	↓
PNAr	↓进行性降低,在完全成熟的 SP 缺失

388

可以在 DP 细胞中检测到一些阳性选择相关基因的转录模式发生变化,这些变化包括 CD69 的诱导、$CD3^{int}$DP 中 RAG、TdT 基因表达水平的调低。RAG、TdT 表达水平的调低作用并不是背景性的,而是具有 $CD3^{int}$ 选择性[170,292]。而且如果重新诱导 RAG 的表达,可以干扰 TCR/MHC 的相互作用,从而阻碍了选择的过程[292,300]。此外,散-聚嵌合 FTOC 表明,发育中的胸腺细胞并不以扫描皮质上皮细胞的方式寻找合适的配体,而是始终结合于单个细胞或小的细胞团[277,301]。因此,必须把阳性选择作为一个漫长的过程来考虑,阳性选择的信号转导需要历经许多小时。这不同于抗原对成熟 T 细胞的激活,后者只需抗原与 T 细胞短暂(小于 1 小时)相遇既可。

阳性选择也诱使细胞的定位发生了改变:被选中的细胞由皮质移行到髓质。但目前还不清楚这种迁移发生于选择的哪个阶段,迁移的分子机制是什么[58,90]。

过去的几年中,阳性选择过程中细胞系的定向发育一直都是吸引人却又富于争议的课题。面对选择,细胞有四种命运:因被忽略而致死、以 $CD4^+$ 细胞方式存活、以 $CD8^+$ 细胞方式存活、未被选中而死亡。但是与

TCR 相容的 MHC 分子的种类又是如何与成熟 T 细胞的类型相匹配的呢？这是一个具有挑战性的问题，而且在细胞水平上回答这个问题具有重要意义，因为这关系到我们对阳性选择过程中基因控制问题的理解。不过目前这个问题的答案还远非明了，其中的一个难点是，要了解细胞系定向发育的细胞路径，就必须能够“捕获”在这些路径上发育着的细胞，而这一点始终难以实现。在这项研究中，有些学者利用已有的知识对细胞路径进行推测，但是这些已有知识也许都是值得怀疑的。另外的研究者直接利用试验进行研究，可惜所采用的研究方案要求在细胞表面加装受体，这就有可能影响细胞的行为。

根据二分法对分化过程中的选择(CD4/ CD8 的关闭)进行简单的划分，这也许是不恰当的。而且在 CD4 和 CD8 SP 产生过程中的细胞迁移在时间和空间上可能都是无法定位的。在时间上，CD4SP 的产生要快于 CD8 SP[302]；在空间上，CD8 SP 好像要经过曲折的路径才能到达髓质[303]。大部分现有数据与前述的各种定向发育模型在总体上是不相符的(图 11.14)；CD4/ CD8 细胞系的产生不是因为在 TCR 重排过程中细胞收到了来自共同受体的信号；基本的随机模型存在本质性的错误(见图 11.14 说明)。不过目前下述事实是清楚的：

① TCR-MHC 信号是必需的，如果没有它就什么都不会发生；

② 共同受体信号输入是重要的，但并非必需；

③ 错配的定向发育在两个细胞系内都可发生：Ⅱ类限制性 CD8 SP、Ⅰ类限制性 CD4SP；

④ 细胞表面共同受体水平并不能很好地反映细胞系的定向分化状态；

⑤ 细胞系的定向发育要比简单的两路分裂更为复杂，例如，存在不只一条通向 CD8 SP 的路径。

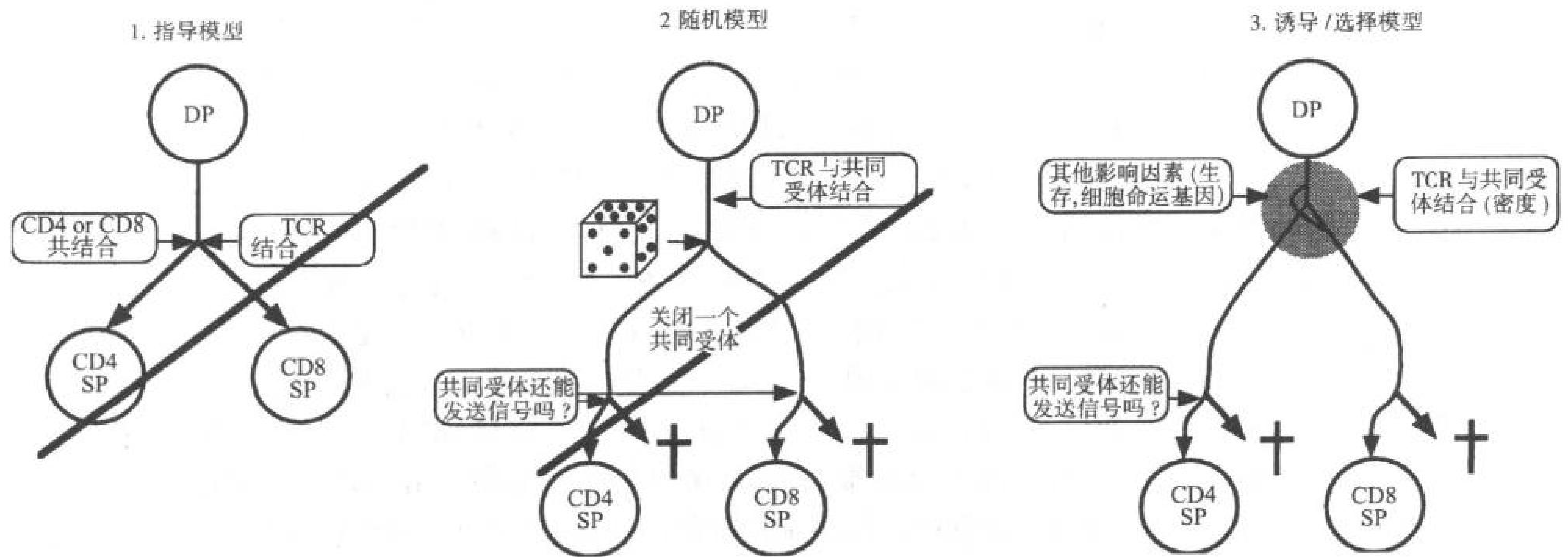


图 11.14　阳性选择中细胞系的定向发育模型。上图描绘了细胞和分子决策过程的三种不同解释，阳性选择中通过此决策过程使 T 细胞或向 $CD4^+$ 或向 $CD8^+$ 方向分化。第一种模型认为，细胞通过感知与 TCR(更确切地说应该是共同受体)结合的 MHC 分子类型，决定细胞的分化方向。该模型曾较为满意，但现在已不受支持，因为确实可以证明在 MHC 错配的情况下分化得以进行，而且转基因加强共受体的表达可以恢复分化的效率。而且在不考虑较低分化效率的情况下，可以认为在共同受体敲除小鼠体内仍可以进行成熟细胞的分化。这些数据和关于错配选择中间途径(mismatched selection intermediates)的描述都支持第二种模型，这个模型认为阳性选择的早期事件根本上以随机的方式引导定向发育。但也认为，其中一个共同受体的关闭进一步加强了单个细胞的选择效果，而且只有共同受体与 TCR 特异性相匹配的细胞才能存活。细胞系选择的随机观念可能天生地不和胃口，“上帝不是掷骰子决定宇宙和阳性选择的”，而且一些观察结果并不支持该模型。例如，改变 TCR/MHC 相互作用的亲和力可以产生不同的分化流向，而且细胞生存/命运基因也可以改变早期定向发育事件之间的平衡。第三种模型综合了细胞系选择的诱导性因素和共同受体表达的明显波动性，同时认为定向发育，至少向 CD8 细胞的发育，可以遵从多条途径。

有一种观点与大多数的数据相符。这种观点认为细胞是在如下状态进行分化的：细胞的分化不直接依赖于共同受体的性质，而更依赖于一些其他的影响因素和微环境因素。前者包括 TCR-MHC 信号的理化性

质,如信号密度、动力学参数、有效性[281];后者包括细胞存活① /死亡转换基因(fate switch gene)的产物[293,294,304]。其次,该观点还认为,细胞选择的效果是很确定的,只有那些表达共同受体、且共同受体又与TCR的限制性MHC分子相匹配的细胞才能完成成熟过程,并从胸腺输出。

阳性选择的定位

阳性选择过程中,向正在分化的胸腺细胞提供自身MHC分子的细胞具有何种性质,这是一个很有价值的问题。我们的问题是:是否存在不同类型的阳性施选细胞(positively selecting cell),这些细胞的主要作用是向DP提供MHC分子采样。这些特化的细胞以不同的方式加工蛋白质,并且表达有利于生存而不利于死亡的共刺激分子/黏附分子。

一些讨论支持了皮质上皮细胞在阳性选择过程中具有特殊作用的观点。因为事实上选择中的DP被皮质上皮网包绕,所以这个观点很直观。加之各方面证据对该观点的支持,也使该观点具有了试验基础。这些证据包括:首先,将预先清除造血成分的胸腺或不含任何造血前体细胞的fd10胸腺原基植入裸鼠体内,裸鼠可以产生正常的T细胞群[305,306];其次,在表达单一MHC基因(compartmentalized MHC gene)的转基因小鼠中,皮质上皮细胞施选分子的表达为阳性选择所必需[272];最后,在散-聚FTOC中只有胸腺上皮细胞才能启动阳性选择过程[307]。在考察皮质上皮细胞在阳性选择中的作用时,发现它们与树突细胞、巨噬细胞具有不同的抗原加工途径,前者的特征是不适于加工外源性抗原,这一点非常有趣[308~310]。

390

但是存在一些与上述观点相矛盾的发现。例如,将野生型和MHC缺陷型小鼠构建成骨髓共生嵌合体,在这种嵌合体中MHCⅡ分子限制性的阳性选择符合放射抗性基质细胞的基因型[271];与之相反,表达MHC Ⅰ的血细胞具有明显的阳性施选$CD8^+$细胞的能力,尽管这种施选的效率要比MHC Ⅰ阳性上皮细胞施选效率低得多[270]。

选择的Ⅰ类/Ⅱ类二分法来源于对早期的放射嵌合试验的总结[311,312]。在其他一些试验中,向自身MHC缺陷小鼠的胸腺内注入表达MHC分子的细胞,可以诱导阳性选择,而且与注入细胞的类型无关,甚或成纤维母细胞系(fibroblast lines)也可以发挥作用[313~315]。但是注入细胞表面的MHC分子有可能转移到胸腺细胞表面,也有可能通过形成胸腺细胞-皮质上皮细胞-注入细胞的三细胞作用而诱导选择。这个实验方案无法排除上述两种可能。不过这些结果毕竟向皮质上皮细胞在选择中的优势地位提出了挑战。综合考虑,皮质上皮细胞可能在阳性选择过程中发挥主要作用。即使仅考虑到皮质上皮是胸腺内主要的MHC的阳性细胞,并且与发育中的胸腺有紧密的解剖接触,上皮细胞也应该是选择中的优势细胞。但是这并不意味着阳性选择仅有惟一的一份肽/表面表型谱系可供选择。

配体

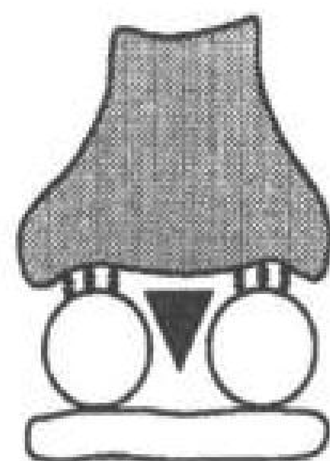
参与阳性选择的MHC配体有何种确切的性质呢?与身体的其他部位一样,胸腺中的MHC分子是与肽结合在一起的,这些肽来自对自身蛋白质的加工。那么,这些肽在阳性选择过程中是否发挥作用,这种作用与成熟T细胞的刺激作用又有什么联系呢?如图11.15所示,成熟过程中胸腺细胞表面的TCR与MHC分子相结合,可以相信,这种MHC分子既可以载有任意的多肽,也可以载有多肽中的一个特殊亚群,甚或只载有一种多肽。应该说,这个问题又回到了单/双受体的讨论[316],即在TCR上是否存在一些区域被MHC单独占领而另外的一个区域与肽结合,这两个区域在阳性选择过程中又有什么重要作用。进一步讲,这个问题的最终答案将阐明胸腺阳性选择与阴性选择的差别以及自身反应性(self reactivity)在T细胞谱系塑形中的作用。

在过去的十几年中,这个问题没有得到完全解决,其研究主要集中于实验方法的构思。其中一个巧妙的方法是将肽加载到一种突变小鼠的FTOC上,这个突变干扰了肽对MHC的加载或MHCI的表面表达(TAP、β_2m突变)。这个系统在研究各种多肽对表达单一转基因TCR胸腺细胞的选择能力时非常有效[317],并从中

① lpr突变导致Fas缺失,这使SCID小鼠的T细胞得以成熟,并伴有生成$CD8^+$细胞的倾向。这可能是关于该问题最早的观察之一[536]。

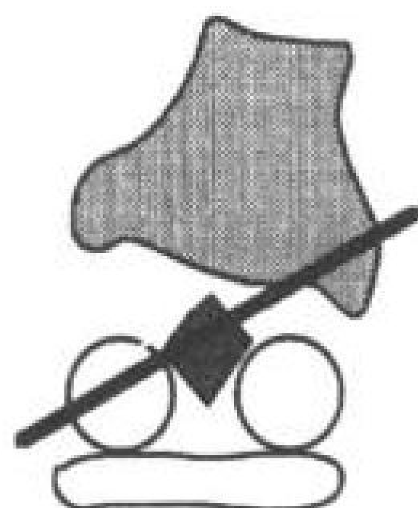
1. 结构稳定作用

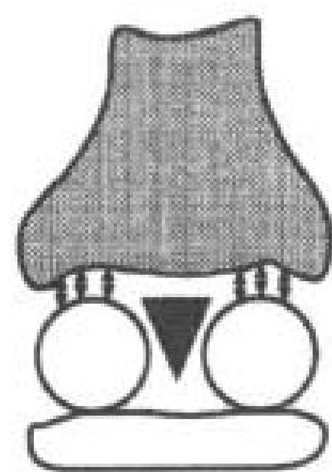




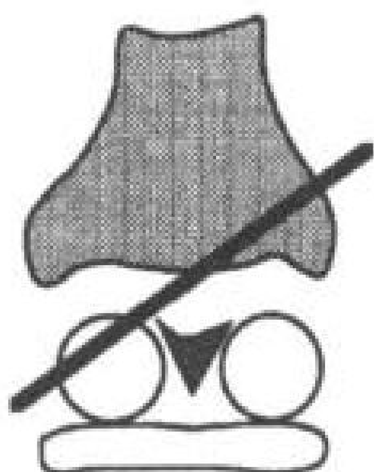
2. 不相适应

391





3. 直接识别



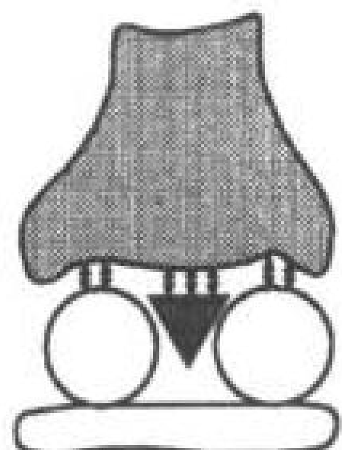


图 11.15 阳性选择中肽性配基的可能作用。这些图片描述了阳性选择中与 MHC 结合的肽所发挥作用的几种可能解释。在图片 1 中肽只起稳定 MHC 的结构性作用,该结论已经被许多观察否定,这些观察表明:肽的序列对选择效率具有特异性影响。图片 2 中,细胞的 TCR 搜寻没有 TCR-肽空间阻碍的 MHC 并与之作用,肽对选择效率没有贡献,只是 TCR/MHC 相互作用驱动着选择的进程。虽然 TCR 与肽的接触显著地提高了三方作用的能量平衡,而且选择的特异性也有利于第三种解释,但还是很难通过实验对地二、三种模型进行鉴定。

得出一个重要结论:多肽在阳性选择过程中确实具有特异性的作用,对成熟的促进作用不仅仅是因为可以稳定 MHC 分子[318,319]。随后,问题转为:如果转基因小鼠只表达单一的肽-MHC 复合体,或是转基因小鼠可以表达广谱的肽,但额外引入一种特殊的肽,那么什么样的受体可以被选中呢[320]?

总结有关配体的实验,可以得出这样的结论:肽对阳性选择的特异性做出一定的贡献,但它的作用具有很强的简并性和非选择性(degeneracy and promiscuity)。主要的观点概括如下:

① TCR 与肽之间没有明显的一一对应关系。从本质上讲,只载有一种肽的 MHC 分子可以筛选出一个非常广泛的 T 细胞谱系,大约为正常谱系的 20% ~ 50%[274,315,321~323]。反过来说,多种不同的肽可以促进一种特定 TCR 的选择。

② 如果一种肽与可以刺激成熟 T 细胞的抗原肽在结构和功能上相关,将这种肽加载到 MHC 分子上,同样可以促进阳性选择作用。最初,一种曾被看好的观点认为,这种相关肽是一种拮抗性的类似物,它不能刺激成熟 T 细胞,却可以阻断激动剂产生的刺激作用,这样就可以避免发育中的细胞从阳性/阴性选择中逃脱的可能[324]。但是这个观点已经被证明不具有广泛的适用性。事实上已经发现某些肽既可以刺激特定的 T 细胞,也可以促进这种细胞的选择[325~327]。后来清楚地认识到:虽然阳性选择所形成的谱系中明显地含有自身反应性成分,至少在阴性选择之前是如此,但是这些自身反应性造成的损害是可以容忍的。总之,从中性到完全刺激性(针对于成熟 T 细胞)的各种多肽都可以促进选择的进行,这不能与简单亲合选择模型直接相符。而且留有这样的可能:TCR 对肽-MHC 复合体中肽的识别比基本的热力学参数更具影响选择的能力[328]。

③ 另一方面,施选肽(selecting peptide)与抗原肽之间本质上不存在相似性。在结构和刺激功能上都与抗原肽无关的肽也可以促进该抗原反应性细胞的选择[327,329,330];反之,单一的肽可以筛选出一个广泛的谱系,而这些 T 细胞可以不具备对该施选肽的特异反应性[274,275]。

④ 这种选择的不加选择性可能反映出 TCR 结合的非严格模式:TCR 既可以结合到靶分子上,也可以结合到模拟分子上,这种现象已经在成熟 T 细胞的刺激试验中得到观察[331,332]。在 TCR-肽/MHC 复合体的晶体结构中,接触 MHC 可变区的 TCR CDR3 上存在许多氨基酸,它们同时也可以与肽结合[333]。阳性选择衡量 MHC-TCR 的整体相容性,不会因为这些氨基酸结合了自身肽而受到影响。

信号发生:阳性/阴性选择佯谬

TCR-MHC 相互作用不仅是阳性选择的基础,而且也指导着阴性选择。那么两者又是如何协调一致的呢?走出这个困境最简单的方法就是设想 MHC-TCR 的亲和力决定着选择的结果,高亲和力导致细胞凋亡,

低亲和力刺激细胞成熟[334]。亲和力水平的不同可以导致 TCR/CD3 簇集程度的不同，而 TCR/CD3 的高度交联可引起更多的 ZAP-70 自身磷酸化；不同水平的亲和力也可以引起时间元件作用持久性的不同，例如不同的亲和力可以引起 Ca^{2+} 流持续时间的不同。不同水平的亲和力可能通过上述两种方式产生不同的选择反应[335]。这个观点得到了一些试验的支持，例如在 FTOC 中，低剂量的激动性或拮抗性肽可以引起阳性选择，而高剂量则导致克隆清除[324~326]。但是 FTOC 试验的结果并不能作为直接证据[336,337]，因为引起阳性选择的肽随后还可以对成熟的 T 细胞产生广泛的影响。其中包括对 T 细胞功能的完全激动和完全拮抗，以及一些其他的未知作用。而且在单纯考虑亲和力的情况下，很难解决前述的困境①。目前有观点认为，与 MHC 结合在一起的肽，由于具有不同的化学性质，可以导致 TCR 构象的不同改变，从而引发不同的信号，产生阳性或阴性选择[317,328]。遗憾的是现在还没有直接的证据支持这个观点。

上述两个模型都提示在阳性和阴性选择过程中，必须通过 TCR 产生不同的信号。关于这一点，已经获得了一些证据(图 11.4)。处于信号级联顶点的 PTK 对于所有 TCR 介导的信号都是必须的，这已经从 ZAP-70 或 lak 基因的失活效应中得到充分地认识[28,188]。另一方面，利用转基因技术，对小鼠 ras 或其下游激酶的基因进行显-隐性突变，可以得到如下结论：ras 途径对于阳性选择是重要的；但对于阴性选择，则在很大程度上是可有可无的[338,339]。可以被环孢菌素 A(cyclosporine A)阻断的钙调磷酸酶信号途径(calcineurin pathway)对于阳性选择更为重要(较之阴性选择)[212,340]。最后需要提醒的是，上述的差别是定量而非定性的，阳性选择信号可能只比阴性选择具有更强的信号转导。而且只需 ras 和钙调磷酸酶途径中的任何一条就足以引发阴性选择。

阴性选择：自身耐受谱系的形成

阴性选择是为了建立自身耐受而在 T 细胞谱系中进行的第一轮，也是最重要一轮的筛选。大部分组织共同抗原、可溶性抗原和一些通常被错误地归属于特殊器官的蛋白质，如胰岛素和髓鞘质蛋白(myelin basic protein)，都包含在阴性选择的过程之中。在有机会对特殊器官施加破坏之前，早期的 T 细胞分化就已经形成了这些自身抗原的耐受，这是胸腺中谱系筛选的另一方面。但是胸腺中阴性选择的过程并非简单明了，特别是对那些严格的胸腺外抗原耐受的形成。而且阴性选择也不应该是绝对的，因为一个完全对自身失去反应的谱系可能对一切都会失去反应性。由于各种限制，使得肽性自我(peptidic self)只是基因自我(genomic self)的一小部分，这些限制包括加工途径的可进入性、蛋白分解酶的特异性、可结合于 MHC 分子上的肽在结构上的约束、引发有效应答的严格抗原剂量约束。

很显然，克隆清除是避免自身反应最有效的途径[341]。但是由于在很长一段时间内克隆清除难以显示，这就促成了其他假说的出现，如抑制理论。克隆清除的直接证据首先来自超抗原(SAg)耐受的研究和对自身反应性 TCR 转基因小鼠的分析。对表达 $V_\beta17$ 区的 T 细胞进行的频率分析是其中一个经典的例子。$V_\beta17$ 区对 MHCII E 分子呈递的内源性 mtv 超抗原具有反应性，而且可以通过特异性 mAb 对 $V_\beta17$ 进行检测。在外周血 T 细胞和成熟 TCR^{hi} 胸腺细胞中，E^+ 小鼠的 $V_\beta17^+$ 细胞明显少于 E^- 小鼠(图 11.16)[342]，而在 DP 中则并非如此。这表明 $V_\beta17^+$ 细胞的确出现在 E^+ 小鼠中，但在成熟之前以某种方式被清除了。这个基本的发现也存在于其他 V_β：SAg 组合中[343]。关于克隆清除的第二个明确证据来自转基因小鼠试验。这种转基因小鼠的 T 细胞表达雄性特异性 H-Y 抗原反应性 TCR。实验证明，如果转基因小鼠为雄小鼠，而且可以表达与转基因 TCR 相匹配的 MHC 分子，那么表达转基因 TCR 的细胞克隆将被清除[344]。在其他一些表达不同类型抗原反应性转基因 TCR，其对应的限制性 MHC 分子也不相同转基因小鼠中，同样存在类似的情况[263,345~348]。目前在体外细胞悬浮培养或 FTOC 系统中模拟胸腺细胞清除已经成为可能[349,350]。

392

克隆清除是一个极为敏感的过程，一些不足以刺激成熟 T 细胞的弱刺激性抗原或 MHC 异抗原性变异

① 亲和力模型具有内在的矛盾：有些 DP 以相当低的水平表达 TCR，这些细胞应该对这种阈下信号最乏敏感性，但却反而被阳性选择选中。

小鼠	H-2	IE α:β	KJ23a T细胞染色/%	KJ23a KJ23a⁺亲本/%	KJ16 T细胞染色/%	KJ16 KJ16⁺亲本/%
				20 40		20 40 60
BIO × SJA	b/s	None	2.5 ± 0.3(5)		9.2 ± 0.6(3)	
AKR × SWR	k/q	k:k	0.8 ± 0.1(9)		8.6 ± 0.1(5)	
BALB/c × SJA	d/s	d:d,d:s	0.25 ± 0.1(4)		14.0 ± 0.6(3)	
BIO.S(7R) × SWR	t2/q	None	4.5 ± 0.1(3)		7.7 ± 0.2(3)	
BIO.HTT × SWR	t3/q	k:s	1.2 ± 0.1(3)		8.0 ± 0.1(3)	
BIO.TL × SWR	t1/q	k:k	1.1 ± 0.2(3)		8.3 ± 0.1(3)	
BIO.Qx	q/q	None	5.5 ± 0.1(4)		8.6 ± 0.2(4)	
(AKRxSWR)F1	k/q	k:k	1.0 ± 0.1(14)		7.9 ± 0.1(4)	

图 11.16 通过 MHC 分子诱导的克隆清除产生耐受。关于胸腺中克隆清除的第一个表述中[342]，利用 KJ23a mAb 染色并进行流式细胞分析，测量几株 MHC-ⅡE 缺陷小鼠系 T 细胞表达 $V_\beta 17\alpha$ 的百分比，以表达 $V_\beta 8$(KJ16 染色)的细胞频率作为标准。E 分子介导清除的结论被相应的论文支持，该论文显示 $V_\beta 17a$ 可以产生针对 E 分子的特异反应性。E 分子的作用很快被随后的小鼠杂交实验进一步巩固，这些小鼠只表达由单一转基因编码的 E 分子。事后观之，这种解释并不完全正确，实际上 $V_\beta 17$ 是对内源性超抗原发生反应，其呈递需要 E 分子。经 Kappler 等授权引用[342]。

(alloantigenic MHC variant)都可以引发清除[351]。

通过讨论，目前已经很清楚地认识到，利用清除机制而进行的阴性选择可以在分化路径中的许多点上发生。超抗原的克隆清除发生在分化晚期，主要清除 TCR^{hi} 胸腺细胞而很少影响 DP[342]。据观察，大部分的源于自身蛋白质的肽类抗原，它们的克隆清除主要清除 DP 细胞，而一些肽特异性 TCR 转基因试验确实表明，这些肽特异性 T 细胞的清除在分化晚期发生，只作用于 SP 细胞池[348]。直到成熟过程的晚期，T 细胞才表现出对克隆清除的抗性[76]。抗原在胸腺表达部位的不同可能控制着清除的时间点。抗原与 TCR 的亲和力可能在清除中发挥一定的作用。DP 和 SP 细胞以不同水平表达受体，而表达较高亲和力受体的细胞则可能被首先清除。

许多类型的体细胞也可以诱导克隆清除，这并不奇怪。髓质中的血细胞，特别是 DC 由于表达共刺激分子，可能对克隆清除的诱导特别有效[352]。上皮成分，甚或加载在 T 细胞自身上的抗原也能诱导克隆清除[353~356]。综上所述，致清除抗原(deleting antigen)的性质以及这些抗原表达的解剖学定位都对克隆清除发生的时间产生重大影响[353]。

胸腺选择过程中，凋亡是主要的死亡机制[59]。超抗原介导的清除过程(如图 11.17 所示)可以利用 TUNEL 组织学技术进行清楚的观察[62]。十分有趣的是，这项研究同时明确地显示，胸腺中的凋亡细胞通过清除剂受体(scavenger receptor)与巨噬细胞相互作用，并被后者以极快的速度清除[357]。这就解释了从前一贯的迷惑：为什么在这样一个每天死亡五千万个细胞的胸腺中，利用标准的组织学染色技术却从未发现一个理应存在的细胞墓地。TCR 被自身抗原触发后，引起死亡的分子途径仍然未知。一个合理的假说认为，抗原与

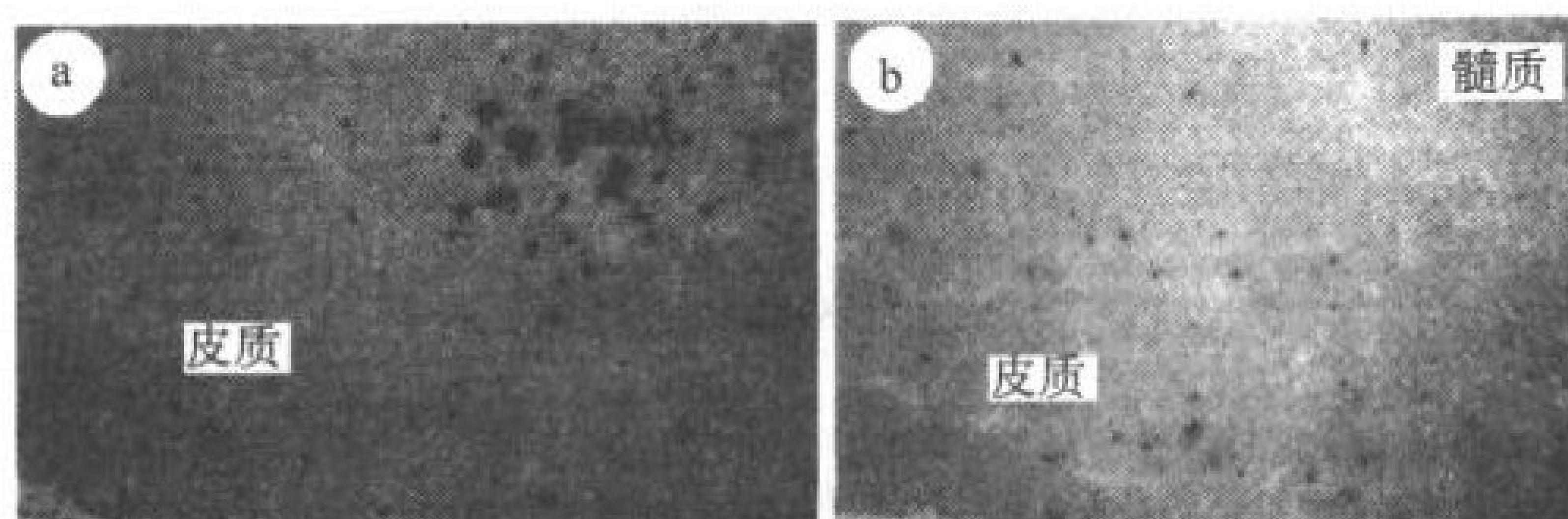


图 11.17 阴性选择或阳性选择失败而产生的凋亡。在表达有 $TCRV_\beta$ 的转基因小鼠胸腺切片上，通过 TUNEL 技术显示凋亡细胞，呈递于 MHC ⅡE 分子上的一种超抗原引起了这些细胞的清除[62]。E 阳性胸腺中(a)，凋亡细胞散布于皮质(由阳性选择失败致死)和髓质(由超抗原诱导的凋亡)。E 阴性胸腺中(b)，皮质中的凋亡依然存在，但髓质中超抗原诱导的凋亡历历可数。

TCR 结合导致 TNF 家族成员在细胞表面的表达增加，这种上调有可能以转录因子 nur77 作为中介[360,361]，然后 TNF 家族与相应的配体结合诱发细胞死亡[358,359]。然而目前还没有找到一个具有如此功能的 TNF 家族的成员。CD30/CD30L 的相互作用可能参与了清除过程，因为 CD30 缺陷动物的阴性选择似乎存在缺陷[362]。根据 fas 缺失/epr 突变的研究，最初就认识到 fas 在阴性选择中的作用无可置疑。但最近的数据提示，fas 的作用虽然是显著的，但并不是必需的[363]。最近一个新的 TNFR 家族成员的鉴定使情形变得更为复杂，这个分子的表达模式与阴性选择中的一个功能(DR3/WSL-1/TRAMP、DR4、CAR1)相一致[359]。

克隆清除对胸腺输出谱系的全局性影响具有重要意义。由于被胸腺呈递的自身肽具有多样性，因此就不难想象许多通过阳性选择的自身 MHC 限制性 T 细胞会遭到阴性选择的威胁。事实也是如此，利用不同的实验方法得到三个估计，它们之间具有惊人的一致性：皮质中通过阳性选择具有自身 MHC 限制性的细胞，其中三分之一在髓质中被阴性选择清除[274,275,364]。

克隆清除并不是免疫系统处理不想要的自身反应的惟一途径，一些对自身抗原功能性无反应的细胞也可以从胸腺输出。这种无反应性细胞既有可能是因为不表达反应所需的共同受体，也有可能是因为表达了第二条 TCR-α 链，从而降低了克隆性反应[348,365~367]。胸腺中无能诱导也已见报道，但还没有得到像外周无能诱导那样的很好证明[368~371]，胸腺中优势耐受(dominant tolerance)/ 抑制的机制也是如此[372]。

T 淋巴细胞的外周循环

环路

T 细胞从胸腺输出之后，以一种持续循环而并非静止的方式迁居于外周淋巴器官之间。这种在血流和淋巴管中进行的持续性循环可以使特异性淋巴细胞与淋巴器官捕获的抗原相互接触。这些抗原可以来自身体的各个部位：突破身体外屏障的抗原可被运送到淋巴结或派尔集合淋巴结(Peyer's patch，PP)；而血源性抗原则被脾捕获。图 11.18 所示的环路中可以看到，T 细胞是在所谓的高内皮微静脉(high endothelial venule，HEV)中穿过一层特殊的内皮细胞离开血流的。这些 T 细胞利用特殊的受体与黏附分子结合，然后利用渗出作用穿过表皮细胞间隙，进入淋巴结的主要集居区。在这个区域中，T 细胞可能会遇到由大量 DC 呈递的适当抗原。这些 DC 在外周组织收集抗原，然后通过淋巴管移入淋巴结。如果 T 细胞未发现异常情况，则迁入淋巴结髓质，并经由输出淋巴管移出淋巴结，而后进入同一路径上的另一个淋巴结，最终汇于胸导管。胸导管是终末淋巴管，并汇入左锁骨下静脉而进入静脉血流。经过血流，T 淋巴细胞可以重新回到其他淋巴结，其中也有许多滞留在脾中。

393

394

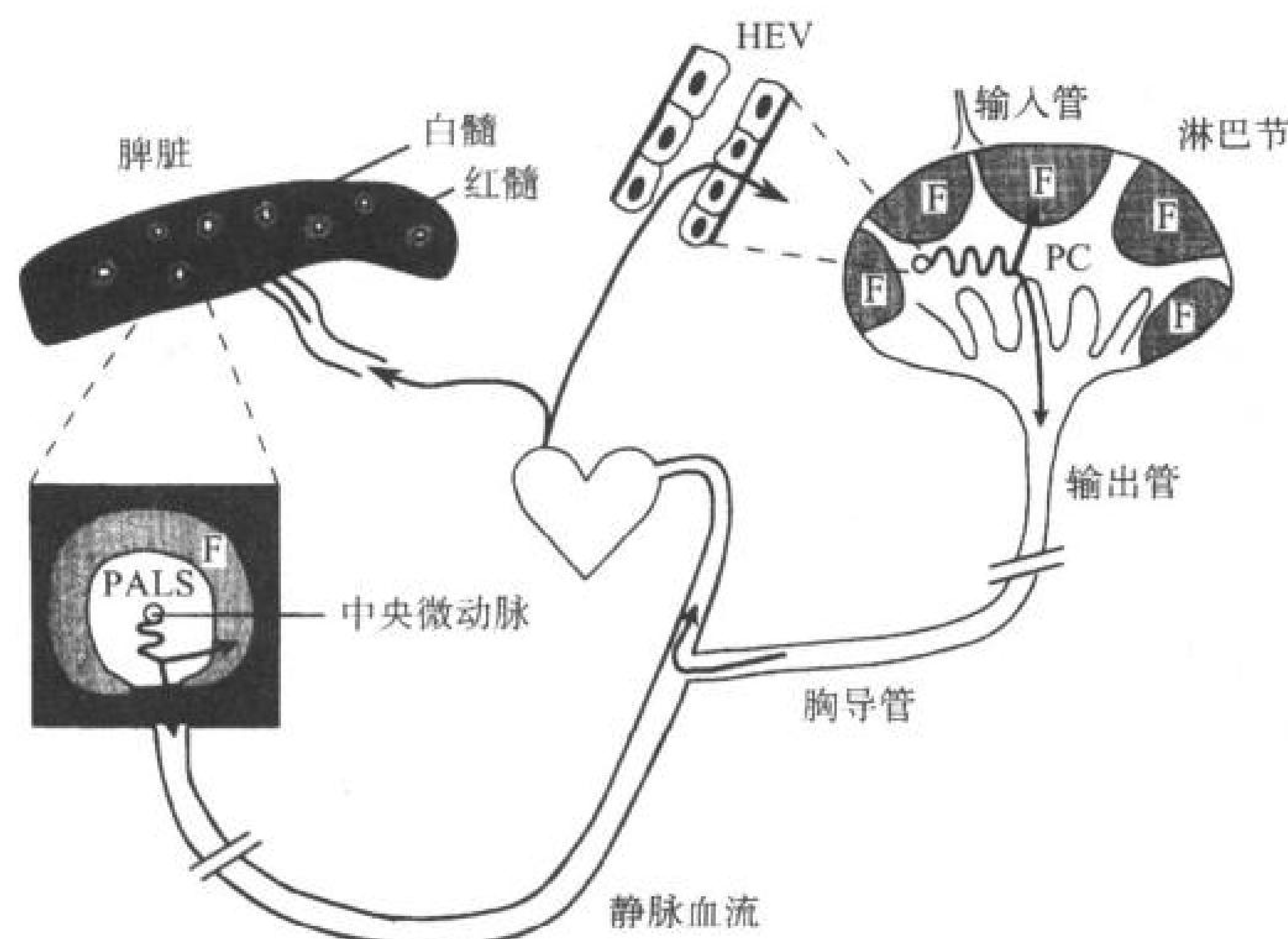


图 11.18　T 淋巴细胞循环图示。通过组织引流输入淋巴管或从血液中经由特殊的 HEV 内皮外渗，T 细胞进入淋巴结，并归巢于副皮质区(PC)。从那里它们可以迁移至 B 细胞滤泡和生发中心，或是通过输出淋巴管离开淋巴结。最终这些细胞汇集于胸导管并汇入静脉血流。T 细胞到达脾后，聚集于脾白髓岛的中心区域 PALS。在那里它们既可以被激活并转入 B 细胞滤泡，也可以离开脾，通过血流再循环。

与淋巴结不同,脾有丰富的直接血液供应。T细胞既可通过红髓进入脾,而后迅速迁入白髓;也可以通入中央微动脉直接进入白髓。但无论以何种方式进入白髓的T细胞都将再次迁入中央微动脉淋巴鞘(periarteriolar lymphoid sheath PALS),这是一个特殊的区域,相当于淋巴结的副皮质区,同样也是DC聚集的地方。如果T细胞没有与相应的抗原相遇,它将重新进入红髓,并从红髓离开脾进入静脉循环。综上,整个循环需要数小时,其中在脾内周转花费了相当长的时间(约6小时),同时这也表明初始T淋巴细胞每天可以完成一至两次循环。

有些因素可以干扰或改变这种规律性的循环方式。T细胞一旦在淋巴器官的T区内遇到由DC呈递的相应抗原,这种抗原反应性T细胞将在淋巴器官中短暂滞留。这一点最初为静脉内抗原引入实验阐明:在注入抗原的最初两天中,胸导管内检测不到这种抗原的反应性细胞[373]。这些细胞最终从T区移出,其中一些进入B细胞滤泡和生发中心,并在那里行使特殊的辅助功能;另一些则重返大循环,但是它们的归巢属性(homing property)已经发生了明显的变化。这些细胞不仅可以经HEV外渗,而且还获得了结合、穿透扁平内皮的能力,而这种上皮通常对于初始细胞是不可穿越的。随后,这些细胞进入淋巴外场所,如皮肤、肺组织间隙、肠固有层、关节等。值得指出的是,虽然所有的初始T细胞以极为相似的方式进行循环,但是各种活化细胞的循环方式却各不相同,活化细胞的循环方式以限定性和组织选择性归巢模式(restricted and tissue-selective homing pattern)为特征[374,375]。这种归巢的特异性倾向与T细胞最初活化的部位有关[376],这在生理上解释为:最初在PP中遇到的抗原,相对于皮肤来讲,更有可能在肠道中再次遇到。例如只有Th1才表达糖配基(the carbohydrate ligand),这使得它可以与炎症部位内皮细胞上的E选择素和P选择素(E- and P- selectin)相互作用[377]。

黏附作用

血管中T细胞特异性募集作用由淋巴细胞上的特异性归巢受体介导,这种受体可与内皮上的血管黏着素(addressin)相互作用。参与这些相互作用的分子十分复杂,包含来源于数个蛋白家族的多种受体、配体,它们既可以表达于淋巴细胞,也可表达于内皮细胞。根据血管外渗的多步模型(最初是针对中性粒细胞提出的),可以把这些相互作用分成几个不同的阶段[374,375,378]。最初是一个滚动阶段(rolling stage)。在这个阶段里淋巴细胞沿着内皮层滚动,通过多次瞬间开放和关闭分子间相互作用力,使淋巴细胞从正常无阻碍流动状态逐渐慢下来。这个阶段的许多作用都要归因于选择素分子对糖基的识别,例如L选择素/ CD62L是初始细胞向HEV归巢的主要实施分子。随后是T细胞的稳定捕获阶段,主要由整合素介导。这一过程包括整合素分子瞬间可逆性构象变化,这种变化对于牢固的细胞间结合是必需的。这种构象变化可能是一个化学因子受体引发的G蛋白信号转导事件的结果[375,379]。最后一个阶段是淋巴细胞在内皮细胞之间实际穿越的过程。

关于细胞归巢最初的设想认为,淋巴细胞-内皮细胞相互作用的不同阶段可能由不同的分子介导,这些分子也可能同时支配着组织特异性的归巢方式。但是现在了解到,有些特殊的黏附分子可以在不同的阶段发挥作用。例如在不同的生理流体力学切变的情况下进行分析,发现α4整合素既可以参与最早期的淋巴细胞捕获,也可以参与淋巴细胞在内皮细胞间的牢固接触[380,381]。另外,特定的黏附分子可以参与淋巴细胞对不同组织最初的识别过程,例如α4β7整合素可以参与淋巴细胞对多种黏膜层的识别。因此,归巢的组织特异性是由多种黏附分子联合作用产生的,而不归因于某一特殊分子的单独作用。通过表面表达/缺失的相互转换,可以对黏附分子进行调节,除此之外还有其他的两种调节方式。第一种方式是通过构象改变影响黏附分子的活性。例如LFA-1/αLβ2整合素在黏附作用的早期,通过整合素的信号转导引发构象变化,从而获得了对配基ICAM-1、-2高得多的亲和力[382]。第二种方式是对黏附分子进行清楚的表面区域分隔,这对整合素的作用方式产生了重大影响。例如L选择素和α4β7整合素密集分布于微绒毛的末端,在滚动过程中这个部位可以很快地与内皮细胞相互作用[383]。与此相反,β2整合素参与白细胞的固着,它只集中于细胞膜上平坦的区域而不表达于微绒毛[384]。

一些基质来源的化学因子,如 CC 和 CxC 家族,也对淋巴细胞归巢发挥促进作用[385]。这些分子与细胞外基质结合产生一个固相梯度,可以将细胞导向攻击位点。还有一些化学因子,如 IP10,具有优先于单核细胞的淋巴细胞趋化活性;相应地,这些因子的受体也更为特异地在 T 细胞上表达,其中有一些为 HIV 感染人 $CD4^+$ 细胞的共同受体[385]。这些受体的表达受 T 细胞活化状态的调控,IL-2 引起表达上调,TCR 和 CD28 与相应配体的结合则引起表达的下调。由于这些化学因子及其受体基因家族的复杂性,它们在引导细胞归巢时的相互作用以及它们在归巢的各个阶段所发挥的作用都还有待于进一步的阐明。

T 细胞应答

任何抗原的反应性 T 细胞出现的频率都很低,这使得长期以来无法在体内研究 T 淋巴细胞对抗原的反应。由于不能对抗原特异性 T 淋巴细胞进行跟踪,迫使 T 细胞活化的研究只能限于多克隆 T 细胞对植物血凝素有丝分裂原反应的体内分析和异体反应(alloreactive response)的频率分析。这些研究都以检测 T 淋巴细胞的功能表现作为实验手段。直到几年前,一些新发展起来的工具打破了这种限制,目前有三个实验系统可以在体内实现对 T 细胞反应的直接跟踪,它们分别是:病毒/细菌超抗原的引入,这种超抗原基本上可以刺激所有表达特殊 V_β 区的 T 细胞[386~388];反应性抗原肽的注入,这种抗原在很大程度上可以与 TCR V_α/V_β 不变性地结合[389,390];表达重排后 TCR 的转基因小鼠,可以利用相应的单克隆特异性试剂对这种小鼠本身或混合嵌 合体内的 T 细胞进行示踪[391,392]。

395

淋巴结副皮质区、脾的 PALS 是初始 T 细胞接触抗原主要部位。脾 PALS 中的初始 T 细胞既可以直接接触血液中的抗原,也可以与 DC 从全身外周组织捕获、转运来的抗原相接触。抗原反应性 T 细胞一旦与相应抗原相遇,最初的反应就是淋巴器官对该反应性 T 细胞的捕获与滞留(图 11.19),从而打断了这些细胞的淋巴/血循环。一系列的试验显示,在注射抗原后 24 小时内,无法在胸导管和其他次级淋巴组织的循环池中检测到这种抗原的特异性 T 细胞[373]。事实上在一些经典的实验中,这个性质已经用来排除异体反应性 T 细胞:用 B 型供体淋巴细胞重建 A 型宿主的淋巴系统,则 A 反应性 T 细胞被特异性地从宿主胸导管循环细胞群中清除[393]。

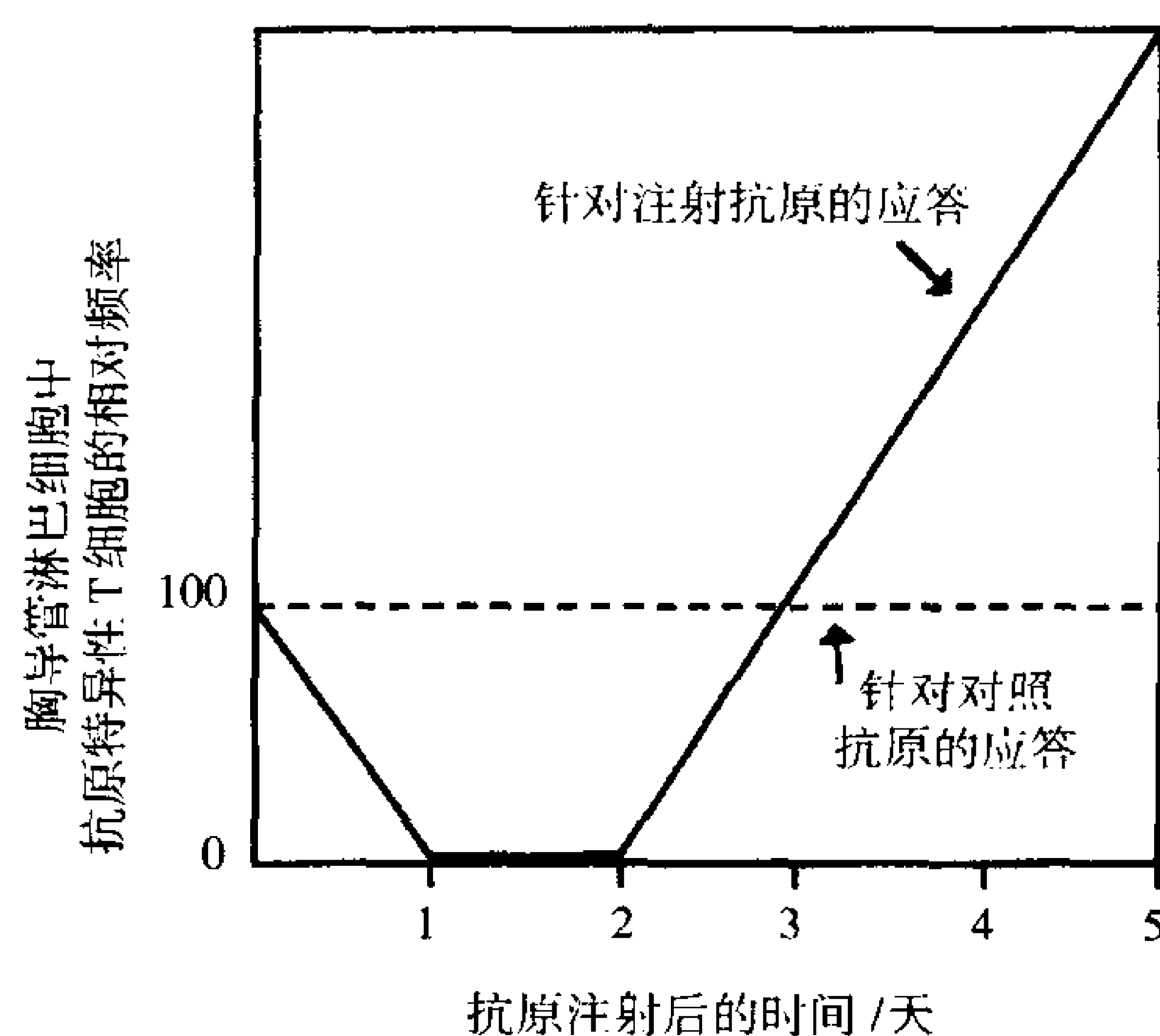


图 11.19 暴露于抗原后,T 细胞的选择性滞留。静脉内给予的抗原优先富集于脾,并被 APC 收集。散布于脾中的 T 细胞识别抗原后,暂时终止血液到淋巴再循环的正常模式(第 1、2 天)。在这个时期中,胸导管中的淋巴细胞对注射的抗原不显示反应性。滞留脾中的 T 细胞快速增殖,大量的子代细胞大约在 3 天后重返循环。经 Sprent 授权引用[535]。

接下来是反应的活化、增殖阶段,将持续约 1 周的时间。这个阶段以细胞表面活化和黏附分子表达的巨大变化为特征,如 CD25、CD69、CD40L、Fas 表达上调,CD62L、CD45R 表达下调。其中有些变化为细胞周期所必需,而有些变化解除 T 细胞的滞留状态,使其分布到其他淋巴器官和外周组织。活化的抗原特异反应性 T 细胞可以迁移并逐渐聚集于生发中心的边缘[394],向相应的 B 细胞提供辅助作用。活化过程还伴有 IL-2、IL-3、IL-4、IFN-γ 等细胞因子的分泌,这种分泌在活化阶段的最初几天里就已经具备了有利于 Th1 或 Th2 极化的倾向性[395,396]。这个过程的局部扩增程度是惊人的。在某些生物体内,可以翻 100~500 番[389,391,397]。某些,但并非所有的反应中扩增的同时伴有特殊受体介导的细胞克隆选择。例如在蛾细胞色素 c 免疫优势肽(moth cytochrome C immunodominant peptide)引发的免疫反应中,细胞表面 TCR 谱系倾向规范的 $V_\alpha11/V_\beta3$ 序列,这种规范的 $V_\alpha11/V_\beta3$ 最适于识别蛾细胞色素 c 的免疫优势肽,这种倾向性的发生与活化增殖过程在时间上相吻合[389]。但是在其他抗原反应中并未发现这种克隆选择作用[390]。在 T 细胞应答初始阶段的最后几天中产生了效应 T 细胞,包括全副武装并具有直接的靶细胞溶破能力的 $CD8^+$ 细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T

lympyocyt, CTL)和分泌大量细胞因子、并被极化的(polarized)$CD4^+$效应细胞。

活化增殖阶段之后很快出现一个萎缩期(contraction phase),与前述的活化增值阶段相比,具有戏剧性的变化,大量的活化$CD4^+$、$CD8^+$细胞发生凋亡。这个现象总体上属于活化诱导的细胞死亡(activation-induced cell death, AICD),其中包括几种不同的死亡过程。AICD最先是在T细胞体外增殖中被注意到的,在给予刺激的24小时内许多增殖的细胞发生死亡[398],在体内经细菌超抗原或肽抗原进行系统性刺激所产生的反应中也可以观察到这种现象[386~388,399]。短期内受到刺激的细胞对TCR交联引发的凋亡高度敏感,AICD就是对这种高度敏感性的反映,并且这种敏感性与细胞周期有关[400]。另一方面,AICD也可以在刺激的最初阶段将T细胞立即清除,尤其是在发生病毒性感染的个体中[401,402]。这种清除的极端形式就是克隆耗竭(clonal exhaustion),即AICD可以将所有具备某一抗原反应性的细胞完全清除,这可能是对很久以前就认识到的高带耐受现象最根本的解释[403,404]。

在AICD最直接的形式中,来自TCR的信号激活了一些早期应答转录因子,包括NF-ATP、TDAG51以及孤儿受体unr77家族的一些成员[358,359]。这一切好像都是通过诱导NGFR/TNFR家族的表达而发挥AICD作用的。在这些TNFR中,Fas已经得到了很明确的阐明[405],同时也提示,虽然在活化过程的早期阶段Fas和FasL就在细胞表面被诱导表达,但被激活的细胞只有在几天之后才对Fas触发的凋亡表现出敏感性[406],而且在某些情况下Fas触发反而对T细胞具有刺激作用[407]。Fas好象并不是引发AICD的惟一分子,本文中包含了一些转导死亡信号的其他TNFR家族成员,其中对TNFR的认识较为清楚[408]。生长因子/IL-2剥夺(growth factor deprivation)可能也是AICD的机制之一,尤其是在反应的疲倦期(waning phase),这时互分泌(intercrine)的辅助作用已经受到限制[409]。此外,已发现活化的T细胞表达可结合半乳糖凝集素(galectin-1)的*N*-聚糖配基。这种配基通常表达在胸腺和淋巴结基质细胞表面,并能引起T细胞凋亡[410]。最后,AICD的另外一个重要作用是引导活化的T细胞归巢于有细胞死亡倾向的部位,如生发中心[394]或肝脏中的淋巴细胞死亡场所[411]。

从目的论角度考虑,AICD的合理性存在若干理由。首先AICD清除了效应T细胞,这些细胞可以造成免疫病理损伤,AICD避免了保存这些细胞的危险性。AICD同时使免疫系统恢复了初始状态,为下一次抗原攻击作好准备。最后,在一个增殖反应性系统中,由于细胞具有增殖后继发萎缩的自发倾向,使得过度增殖问题获得很好的解决;同时也没有必要对一个具备内在控制回路的系统进行克隆型或抗原特异性的系统调节。

AICD并不是抑制应答的惟一办法,应答T细胞也可以受到其他的影响而导致无反应性。这种现象是在进行体外亚最佳条件刺激(suboptimal conditons of stimulation)实验中首先发现的[412~414],而且随后发现,利用拮抗性肽或在缺失适当的共刺激信号的条件下,肽与TCR的结合都可以更特异地诱导T细胞产生无反应性状态[415,416]。处于这种状态的细胞虽然的确可以对某些抗原表现出反应性,如可检测的Ca^{2+}浓度升高、细胞体积增大、分泌一些细胞因子(如IL-3或IL-4),但是不产生IL-2,也不使细胞进入周期[417],而且这些细胞对AICD也更为敏感[418]。几种信号转导途径的缺陷与这种无反应性状态有关[419],其中包括src家族激酶的缺失[420]、ras传导途径的阻断[421,422]。一个IL-2基因负性转录调控子也与无反应性有关[423]。但是现在还不知道这些体外的发现是否与体内的状态相对应、与哪一种体内的状态相对应。将MHC基因转入兼职APC并进行表达,由这种APC提供的不适当刺激更为经常地产生TCR或共同受体下调表达的T细胞群[424]。在体内经过大剂量超抗原刺激仍得以存活的反应性细胞对进一步的刺激失去反应性[399,425]。由外周给予抗原而诱导耐受的TCR转基因小鼠也显示其处于无反应性状态,这种无反应性状态可能是通过CTLA-4结合依赖性机制实现的[392,426]。

396

AICD和无反应性可以在更为广泛的话题中遇到,这些话题涉及到T细胞与抗原相遇后的选择,其中包括活化、增殖、无能、凋亡。有些参数参与了选择过程,如下所述。

① 抗原的量以及TCR对配基的亲和力。非最优刺激或拮抗性抗原刺激优先导致无能。

② 共刺激一致性的程度以及提供这种共刺激的APC的性质。APC共刺激分子的高表达有利于活化作用。

③ 局部环境中细胞因子的数量以及性质。这些细胞因子或是起共刺激作用,支持T细胞生长;或是促进

AICD。

以上这些因素共同作用的结果如下：在炎症或应激范围内遇到的抗原引发活跃T细胞应答；在兼职APC表面与抗原更为孤立的相遇，则优先导致T细胞的无反应性或死亡。这种二分法不仅是产生外周组织全部自身抗原耐受性的必需条件，同时在本文中也是识别自我/非我的根本。

效应T细胞的功能

充分刺激后的效应T细胞的功能在这里只作概述，更为详细的阐述见本书的其他章节。在T细胞反应的最初3、4天内，T细胞的扩增、分化导致了大量武装效应细胞的产生。虽然乍看上去这些细胞的功能是不同的，不相关的，如对病毒感染细胞的杀伤功能，辅助B细胞增殖、T细胞以不同的倾向性诱导B细胞的分化。然而这些分离的功能又有很大的一致性，因而执行这些功能的机制最终是相当相似的。

① 执行效应的细胞。效应细胞活性依赖于大颗粒淋巴细胞，这些细胞是在初次抗原攻击的几天内产生，并以寿命短暂为特征。

② 时间尺度。效应功能是一个即时过程。效应细胞表面的TCR必须识别靶细胞的肽-MHC复合体才能释放信号，这个过程的反应时间是以分秒而不是以小时、天计算的，这个反应时间用以诱发静息T细胞分泌IL-2。然后效应细胞从靶细胞释放，并转向其他靶细胞。

③ 敏感性。武装效应细胞的识别敏感性要比初始细胞高得多，前者可以对相当低浓度的肽-MHC复合体发生应答。虽然黏附分子对这个过应答过程具有必要的促进作用，但是效应细胞已经不依赖于这种作用了。

④ 靶细胞。正如T细胞只能识别由其他细胞呈递的抗原一样，它的效应也只能作用于细胞，如B细胞、巨噬细胞、病毒感染的细胞，而不能作用于游离抗原。但是值得注意的是效应T细胞可以直接杀伤一些真菌和寄生虫细胞[427]。

⑤ 介质。TCR触发(TCR triggering)之后，有两种类型的介质被效应T细胞利用：一种是膜结合分子，它们可以触发靶细胞上的特异性受体。值得注意的是，这些受体都与TNFR有关，而这些T细胞上的表面分子都属于TNF家族。另一种为释放性介质，作为接触依赖性介质的补充。在这两种介质的作用过程中都存在信号的发送。在T细胞表面组装的TCR与黏附分子、共同受体簇集在T细胞与靶细胞相互接触的很小的范围内[428]。这种簇集作用导致了细胞外颗粒(exocytic granule)的集中释放，使得活化的或溶细胞性的介质直接"喷射"向靶细胞。甚至还可以将细胞膜表面的受体-配体对约束在更小的范围内，这种喷射作用亦可聚焦于此区域。受控的介质活动将效应局限于靶细胞，而对旁观细胞(bystander cell)只有非常有限的作用。不过有趣的是，这些分子的效应具有多样性，有时甚至是相反的。例如TNF-α可以诱导靶细胞凋亡，但亦可使之活化，这取决于靶细胞信号转导的优势模式，即TNF-α引发的信号是通过FADD、caspase家族途径还是通过TRAF2、NF-κB途径进行转导[429]。

辅助B细胞

辅助B细胞增殖、产生特异性抗体的能力可能是效应T细胞的功能中最为精细的一种形式[430]。这种辅助作用主要是由$CD4^+$细胞，特别是其中的Th2亚群完成的。MHCⅡ类分子在这个过程中必不可少，这就是前述的T-B细胞相互作用MHC限制性[431,432]，这个概念最终由MHCⅡ类分子缺陷动物的抗体反应缺失试验正式确立[268]。T-B相互作用的特异性长久以来是个谜：T细胞是怎样知道要去辅助哪一个B细胞呢？直至开创性的半抗原-载体试验才认识到，这种辅助功能需要T、B淋巴细胞对物理连接在一起的表位进行识别[433]。在明了T细胞抗原识别的分子基础以及开创性的发现B细胞抗原呈递特点之前，无论多么富有创造力的解释都无法理解这种T细胞的特异性辅助现象[434~437]。以下的模式已经被普遍接受：最初，T细胞被专职APC，主要为DC呈递的抗原激活，分化成效应辅助T细胞，然后向呈递同一表位的B细胞提供辅助作用。

这种 B 细胞可以通过表面 Ig 受体内化抗原，其抗原摄取效率要比非特异性吞饮作用高得多。加之 B 细胞吞饮功能十分低下[434]，这使得 B 细胞只有表达可以结合同一抗原(通过另外一个表位)的 Ig 受体，才能加工这一抗原，并向活化的 T 细胞呈递相应的肽，由此获得 T 细胞的有效辅助。

397 在辅助过程中，CD40/ CD40L 分子对即使不是惟一的，也是其中优势的细胞间相互作用的分子通道[349]。由专职 APC 活化的 $CD4^+$ T 细胞诱导表达 CD40L，它与 B 细胞表面的 CD40 结合，引发 B 细胞的活化、增殖。这个分子对的独特作用，已经被高 IgM 综合征患者和 CD40 或 CD40L 敲除小鼠抗体反应缺失的事实证明[440~446]。在缺少 B 细胞抗原受体共同活化刺激的条件下，仅凭细胞间接触产生的辅助作用能否独立触发静息 B 细胞的增殖和分泌 Ig，这个问题争论已久[447]。现在已经阐明，虽然来自表面 Ig 受体的刺激确实可以提供协同活化信号，但是辅助 T 细胞与初始 B 细胞 CD40 的结合可以单独完成 B 细胞活化过程。有争论认为，sIg 与抗原结合的主要作用是动员 B 细胞与 PALS 或 LN 副皮质区的 T 细胞接触，在这些区域中 B 细胞被 T 细胞完全激活[448]。

T 细胞产生的许多细胞因子影响 B 细胞的分化。IL-2 促进 B 细胞成熟和分泌 Ig。IL-4 与 CD40 产生的信号协同促进 B 细胞增殖，但 IL-4 的特征性效应是产生 Ig 类型转换的倾向性，通过开放 IgC 区的转录，促进 Ig 向 IgG1 和 IgE 的同型转换[449,450]。与此相反，IFN-γ 则促进向 IgG2α、TGF-β 促进向 IgG2β 和 IgA 的同型转换。在黏膜组织中，IL-5 可以促进已经完成 IgA 转换的细胞分泌 IgA[451]。淋巴因子特别是 IL-4 高度集中地朝向 B 细胞分泌[452,453]。

简言之，抗体应答中的 T 细胞辅助作用是效应 T 细胞功能的一个范例，在发挥辅助功能的过程中，其触发具有抗原特异性(对两个细胞而言)和 MHC 限制性，但其效应功能是非特异性、非限制性的。

炎症刺激

炎症刺激作用由 Th1 行使[454]，在这种最具即时性的效应方式中，需要对承载抗原巨噬细胞进行刺激以增强它们的杀菌、杀细胞以及导致炎症的能力[455]。但是效应 T 细胞也可以对寄生虫、真菌生物细胞发挥直接细胞毒作用[427]，亦可以产生 DTH 的典型临床表现。经皮或皮下途径将个体暴露于抗原而引起的局部反应表现为炎症、细胞浸润，最终导致皮炎。当抗原持续存在且不能清除时，如某些细菌感染，DTH 反应将进一步发展、形成机化的肉芽肿。在蛋白质抗原引发的经典 DTH 中，这些现象主要是由 $CD4^+$ T 细胞引起的；而由病毒抗原或半抗原诱发的接触敏感性(contact sensitivity)则主要归因于 $CD8^+$ 细胞。

T 淋巴细胞炎症刺激作用中的主要可溶性介质是 IFN-γ、粒/巨噬集落刺激因子、淋巴毒素/TNF-β 和 TNF-α。后者可以阻断膜结合型 TNF 引发的接触依赖性信号。在诱导巨噬细胞活化、上调其 MHC 分子表达、通过吞噬体的融合产生杀菌活性、提高一氧化氮的基础性合成的过程中，TNF 和 INF-γ 发挥协同作用。在反应的早期，这些介质对血管内皮产生重要作用，上调黏附和归巢分子的表达，这是从血液中向炎症部位募集白细胞最根本的要求。

细胞溶破作用

T 细胞的一个主要功能是监视细胞内细菌或病毒对体细胞的感染，同时也监视致癌突变。然而在抗肿瘤的反应中这种监视与细胞内抑制肿瘤的作用相比，免疫反应可能只起次要作用。由于这些抗原位于细胞内，只能以病变细胞膜表面异常的间接形式，主要以肽-MHC 复合体的形式，而不能以直接的方式被感知。因此不能象细胞外抗原那样依赖于抗体对抗原进行特异性破坏和灭活，惟一的办法就是破坏整个受感染的细胞。这种破坏作用并非通过活化的杀伤机制完成，而是以一种靶细胞无法逃避的凋亡方式完成，这种方式让人联想到细胞的自杀。

$CD8^+$ 细胞是病毒感染或异基因靶细胞的主要识别者。效应 $CD8^+$ CTL 在给予刺激的 5 天之后产生，并以非常迅速而活跃的方式杀伤靶细胞，这种靶细胞携带有与 MHC Ⅰ类分子结合在一起的同一性质的肽[456]。T 细胞诱导靶细胞凋亡主要通过两种机制。首先可通过释放含有穿孔素(perforin)和颗粒酶(granzyme)的细

胞外细胞毒颗粒使靶细胞致死。前者是一种孔形成蛋白,通过多聚化在靶细胞膜上开放一个跨膜孔道[457];后者是一种 caspase 家族蛋白酶,可以参与凋亡途径中的蛋白酶级联反应,而这一凋亡途径普遍存在[458]。虽然颗粒酶和穿孔素之间的相互关系还未完全阐明,但是存在一个看似合理的概况:穿孔素激发靶细胞内强烈的 Ca^{2+} 流而产生细胞凋亡,而产生的 Ca^{2+} 可以促进颗粒酶进入细胞。其次,效应细胞表面的 FasL 与靶细胞的 Fas 结合,这种细胞间的直接通讯传递也可以引起靶细胞死亡。*lpr* 突变致 fas 缺陷鼠的穿孔素敲除试验显示了有说服力的结果:这两种途径对所有的 $CD8^+$ 细胞毒活性都是必需的[459],两者之间的相对重要性很大程度上取决于靶细胞 Fas 的表达水平。对成纤维母细胞的溶破完全依赖于穿孔素;对 Fas 阳性的血细胞的溶破则较少地依赖于穿孔素。

$CD4^+$ 效应细胞的 CTL 活性尚未得到充分研究[464],$CD4^+$ CTL 活性主要为 Th1 细胞所特有。已有报道,在溶细胞性 $CD4^+$ 克隆中发现穿孔素和颗粒酶[460],而且也表达 FasL[461]。还不清楚在这些细胞中何种机制占有优势,而且两者之间的相对重要性也可能随着 T 细胞发育环境和抗原特异性的不同而有所变化[462,463]。

γδ 细胞

γ:δT 细胞虽然在抗微生物感染中确实发挥重要作用[465~467],但是它们的功能目前依然不十分清楚[464]。逐渐增多的证据表明,作为一个群体,γ:δ 细胞与典型的 α:β 细胞之间存在显著的差异。首先,γ:δ 细胞不需要抗原加工和类 MHC 分子呈递就可以识别非肽类抗原[468~470],这根本不同于 α:β 细胞识别抗原的方式[471,472]。另外,上皮内存在着 γ:δ 上皮内细胞群,它们表达匀质性受体,如皮肤中的 $V^{\gamma}5^+$ DEC、$V^{\gamma}6^+$ 黏膜内细胞(intranucosal cell);而肠道或淋巴器官中的细胞群具有多样性受体。综上考虑 我们会发现,γ:δ 细胞的各种效应功能之间也许存在明显的差异。DEC 也许是准克隆 T 细胞群的一个例证[473],它们表达一个产生于胚胎发育期的根本不变的谱系,并规则地分布于上皮内,与角质细胞相互接触,其外观形态可以想像成树突状。这些细胞可以被"应激"状态角质细胞的产物选择性地活化。有些假说认为 DEC 是皮肤中防御病原的前线。当角质细胞受到攻击时,DEC 发生应答,通过分泌 Th1 类细胞因子启动炎症反应,并通过分泌淋巴趋化因子募集常规淋巴细胞。这种趋化因子是由 T 细胞产生的化学因子,具有很强的淋巴细胞吸引作用[474,475]。同时也有设想认为,上皮内的 γ:δ 细胞通过分泌上皮生长因子,特别是在损伤修复期,支持上皮组织的生长[476,477]。肠道和淋巴器官中的多样性 γ:δ 细胞与 α:β 细胞较为相似,具有较多的常规效应细胞的活性,如细胞毒性[478,479]、通过 IL-4 和 CD40L 辅助 B 细胞[480,481]、通过 IFN-γ 活化巨噬细胞[464]。这些细胞可以直接识别未经加工呈递的抗原,这与其前线抵抗病原的防御功能相一致。

398

非常规 T 细胞

甚至更难理解的是存在一个持久激活的 $CD4^+$ T 细胞小群体,它们不具备 MHCⅡ类分子限制性,却具有非经典Ⅰ类分子(如 CD1、LT)限制性[482,483]。这些细胞中的一部分表达恒定 $V_{\alpha}14J_{\alpha}28$ 受体和常规 NK 的细胞表面标志。这些细胞虽然激起了很大的研究兴趣[484],但它们的功能仍不清楚。它们的一些特异性属性,如多克隆刺激后快速释放细胞因子、表达 NK 细胞标志,也存在于活化的 T 细胞,况且这些属性也许只是它们活化状态的一个结果。在敲除小鼠中,CD1 分子的缺失使 NK-T 组分显著缩小,但是除非在人为控制条件下,否则不存在可检测的免疫功能受损[485,486]。

调节

是否存在这样的淋巴细胞,它们的主要功能是调节其他淋巴细胞的活性? 即使排除前述的 B 细胞辅助细胞和巨噬细胞刺激细胞,这个问题的备选答案依然十分众多。19 世纪 70 年代的免疫解释理论体系是从一种臆造性的解释发展起来的。这种解释缺乏可靠的生物化学和遗传学基础,因此当谈及抑制性细胞、辅助性细胞、抗独特型网络等复杂回路时,免疫的解释理论在很大程度上陷于无助的境地。作为事后的批判,这个调节性或抑制性 T 细胞的概念已经被否定[487,488],原来归因于抗原或独特型特异性调节细胞的现象现在可

以归结为非特异性细胞因子的非特异性效应活性在特殊场合的应用。例如 IL-4 辅助 Th2 应答，而在 DTH 分析中则表现为对 Th1 应答的抑制作用。从前认为，同型特异性辅助 T 细胞通过直接的同型识别而发挥同型转换的促进作用；现在认为是特殊的细胞因子优先地促进了特殊的同型转换。从前认为抗原特异性或独特型特异性辅助因子发挥 B 细胞辅助功能；现在认为是 T 细胞向呈递有特殊肽的 B 细胞提供靶向性辅助作用，其结果产生了 B 细胞表面 Ig 的特异性。目前已经逐渐清楚地认识到，免疫系统拥有细胞自发的控制系统，限制免疫反应的程度。这个控制系统包括两种机制：由负性信号转导，如 CTLA-4[489]，介导的 AICD 和通过细胞因子剥夺引发的细胞死亡。这个领域中一个新近而有趣的进展发现，活化的 T 细胞表达一种可结合 MHCI 分子的杀伤抑制性受体，这种受体不仅可以控制 NK 活性，还可以约束活化 T 细胞的活性[490,491]。这些自发的动态调节模式可以在很大程度上替代先前设想的基于细胞间相互作用反馈的独特型调节回路(circuits)。尽管如此，仍然有一些发现暗示着特异性调节细胞的存在，但是其特征还有待确切的描述[492~494]。在本书中，免疫的解释理论作为免疫学的一个领域，仍然遮盖着许多层神秘的面纱。

T 淋巴细胞记忆

T 细胞记忆的本质(实际上确实存在)一直都是一个谈论不休的话题[495~498]。T 细胞记忆的目的和机制一定在某些方面不同于 B 细胞记忆。首先是因为 TCR 对抗原的识别先天性地具有更大的交差反应性。其次是因为在 T 细胞中，通过体细胞突变而产生的亲和力成熟(affinity maturation)即使存在的话，也是十分有限的[499]。因此不能企图冒险通过连续的体细胞突变来维持 T 细胞表达特别有价值的受体。这样，T 细胞记忆就只能依赖于对表达高亲和受体的抗原特异性细胞池进行扩增、选择和表型改变，这使得记忆细胞对再次刺激具有更为迅速/更为有效的反应性。

很难将记忆 T 细胞划分为一个独立的类型。由于不加区分地将细胞表面标志作为记忆性 T 细胞的标志，记忆 T 细胞的特征经常被弄的混乱不堪，甚至同一蛋白质也可以表达在短寿的活化或效应 T 细胞表面。在某些经历免疫或感染的个体中，由于抗原具有持续出现的能力，引起了一个慢性低水平的刺激，这使真正记忆(true memery)的定义复杂化，而真正记忆原来是不依赖于抗原定义的。还有其他可能使定义复杂化的因素，包括研究记忆细胞的实验系统中引入的人为因素，例如在重建后的淋巴细胞缺陷小鼠中进行细胞扩增，其放射作用无疑会产生危害。这一切都说明，在 T 淋巴细胞组分中记忆现象确实存在，而且已经发现，在暴露于真正生命抗原很长一段时间之后才会出现前体细胞频率的提高[500]

尽管有些不足之处，但图 11.20 还是描绘了一个近乎合理的概况。初始 T 细胞被激活之后，效应和记忆细胞群中发生了一些表型的改变，虽然这种改变具有异质性，但仍在这些细胞群中持续存在。这些改变包括：开始或上调表达 CD44、Ly6C、α4β1 整合素、LFA1，下调 CD62L 和 CD45 的两种可选的拼接形式 CD45RA、CD45RB。这些表型的改变并不具有必然的普遍性，并且随着抗原刺激条件的不同而有所变化[496,498]。这些变化的结果包括：产生了一些修饰化的循环途径[374]、提高了对抗原的反应性、降低了对共刺激信号的依赖性[392,501~506]。在一个经历过抗原刺激的细胞群体中，可以通过细胞发挥作用的即时性对效应细胞、活化细胞和记忆细胞进行区分：$CD8^+$ CTL 效应细胞直接溶破靶细胞，$CD4^+$ 辅助细胞直接分泌细胞因子；与之相对，活化细胞或记忆细胞则更需要 TCR 介导的活化过程，这个过程虽然短暂，但只有启动这个过程才能产生上述的功能。

399

尽管图 11.20 所示记忆细胞的二分法过于简化，但长期记忆和短期记忆细胞群之间一些性状上的差异还是明显地得到了区分。短期记忆细胞是 T 细胞中一些大的组群，它们在抗原刺激几天或几周后增殖，从而达到一个很高的抗原特异性细胞频率，可达百分之一或更高，而且这些细胞分裂频繁。由于细胞表面归巢和黏附分子表达的变化，它们的循环路线与初始细胞明显不同，这些细胞不仅仅限于与 HEV 结合而产生从血液到淋巴结的循环，而且还可以巡视非淋巴组织[374,495]。这样它们就成为抵抗早期病原对非淋巴器官入侵的主要力量[495]。这个短期记忆细胞群的寿命很有限[507]，而且其存在对抗原具有依赖性[508,509]。长期记忆细胞

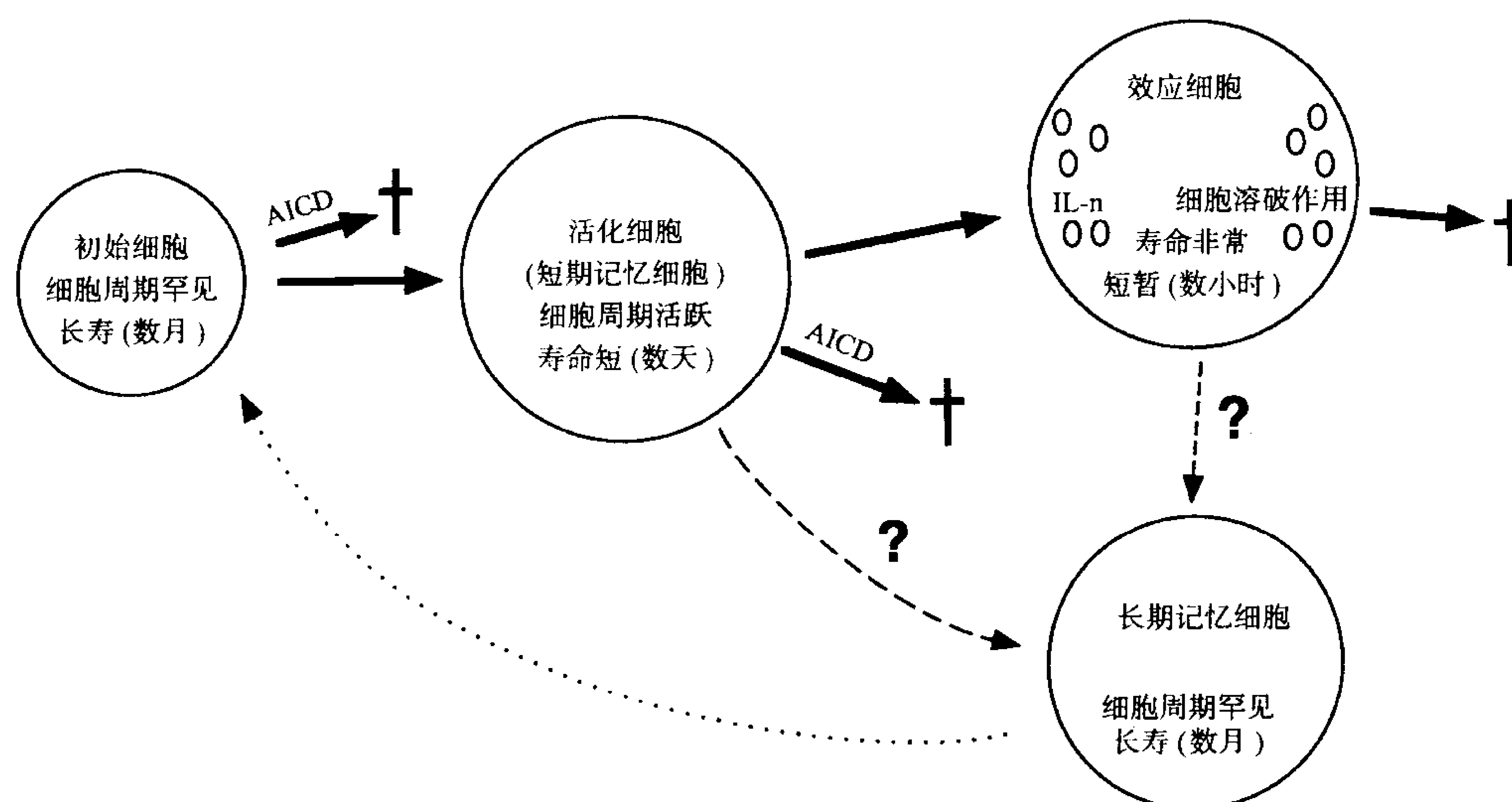


图 11.20　记忆形成的途径。T 细胞暴露于同种抗原后处于不同状态，这是一幅看似合理的图解。图左的完全初始 T 细胞在不发生 AICD 自杀的情况下，由抗原活化。活化细胞强烈增殖，但只有在持续刺激和暴露于细胞因子的情况下，它们才能存活。这些细胞最终分化成完全活性的效应细胞，并获得发挥效应的能力：分泌大量细胞因子（IL-n）或通过穿孔素/颗粒酶、Fas 介导的杀伤途径产生即时性靶细胞溶破作用。虽然经历过抗原刺激的个体的静息细胞比初始个体具有更高的前体细胞出现率，但目前尚不知道长期记忆细胞群产生于何时。

具有一些十分不同的特点。它们的寿命很长，从数月到数十年，但是出现频率低，只有 $10^{-5} \sim 10^{-4}$[500]。这些细胞分裂缓慢，与初始 T 细胞类似[510,511]。它们表面标志的变化至少在某种程度上与短期记忆细胞相反[397,506,512]，例如它们很大程度上丧失了组织归巢能力[495]。这使得抗原只能在淋巴组织中出现，机体才可以获得由这些细胞提供的保护作用，因此它们抵抗早期非淋巴组织抗原入侵的作用是很有限的。这些长寿细胞显示具有保存某些信息的能力，例如可以保存它们在开始产生时的 Th1/Th2 极化优势信息[513]，还可以记忆最初与抗原相遇的位置。这些细胞的循环路径具有优先倾向性，这对上述的特点作出了证明[514]。目前很有说服力地显示这些细胞的存在具有抗原依赖性，至少 $CD8^+$ 细胞如此[505,515~517]。这个问题的最初争论可能归因于实验系统中的差异，其中某差异是由于短期记忆/活化细胞高水平的存在对抗原的依赖性造成的[508,509]。是什么原因使长寿的记忆细胞生存而大多的抗原反应细胞消失呢？细胞内在地程序化高表达抗凋亡分子，如 Bcl 家族，可能是它们得以生存的原因，但是它们与初始细胞一样，也需要偶尔的 TCR 刺激（TCR “tickling”），交叉反应性刺激可能在其中发挥一定作用[518]。同时，记忆细胞对共刺激分子或细胞因子具有特殊的敏感性。

这些经历过抗原刺激的不同类型细胞系之间的关系还一无所知。长期记忆细胞与逃脱死亡的效应细胞是否存在差异？活化过程中，它们与短期活化细胞有无差别？还是这些细胞仅仅代表了幸存的细胞呢？长期记忆细胞最初可能是在免疫反应的后期产生，这时的抗原已经变得稀少，而且只能靶定在具有高亲和力受体的细胞上，这种情况不利于 AICD 的发生。在群体水平上，记忆 T 细胞亲和力成熟的程度可能是通过上述过程而并非通过受体突变产生的，但是其结果却仅仅保留了最为敏感的细胞。 *400*

T 细胞的动态平衡和寿命

白细胞，特别是 T 淋巴细胞，在保持数量动态平衡时面临着严峻的挑战。例如，作为细胞周期不固定的细胞，白细胞群体的大小无法像肝细胞那样通过器官的物理限制而得到简单的控制。但是对于通过增殖而

对识别的抗原发生应答的细胞来说，这种控制是必须的，否则这些增殖的细胞将充满血管内外所有的空间。而且与大多数哺乳动物细胞不同，白细胞具有寡亡（anoikis）敏感性，寡亡是一种由于接触缺失导致的死亡，信号传导途径的激活或抗凋亡因子的过表达可以阻断这个过程[519~521]。那么经常处于细胞周期中的T淋巴细胞是怎样运做这个最基本的生物学功能的呢？第二个不同点也许只是表面上的：从滤泡龛中移出的B细胞很快死亡[522]，因此可以想象T细胞也是竞争性地接收来自PAL和副皮质区基质细胞的生存信号。

另外，免疫系统必须能够保持一定数量的初始细胞，而不能被扩增的记忆细胞群完全占据，这样才能对生命个体以后遇到的新抗原具备潜在的反应性。因此有必要保持一种初始细胞和记忆细胞池之间的平衡[523]。

当然同其他细胞一样，处于稳定状态的T淋巴细胞群的大小受控于输入、输出细胞之间的平衡。输入细胞对应于由胸腺迁出的初始细胞流，当然也包括由于特异性抗原刺激和非特异性刺激应答而产生的增殖细胞。经典α:βT细胞群的胸腺源性初始细胞输入量在年轻个体达到最大，而后随着胸腺的萎缩而衰减。成年个体（8月龄小鼠或40岁人）的胸腺细胞构成和细胞输出能力只有最大时的10%[524]。但这个变化对于T细胞动态平衡的影响并不显著，成年生物T细胞群体的稳定状态主要受控于一种平衡，这种平衡的一方面是选择忽视和AICD导致的细胞死亡，另一方面是细胞分裂、增殖造成的细胞池扩增。T淋巴细胞缺失小鼠经成熟T细胞重建后，可以观察到强烈的增殖[525,526]，这种现象在正常的个体中较少出现，但是这种外周扩增在胸腺后谱系重塑过程中显示一定的作用。例如，在大多数TCR转基因小鼠中，由于逃脱等位排除作用而表达内源性基因编码TCR的T细胞，在外周细胞群中的构成比确实要高于在成熟胸腺细胞中的构成比。

生存竞争是理解T淋巴细胞动态平衡的最佳方式。竞争的对象可能是可溶性分子，如细胞因子；也可能是表达于细胞表面的配体；也有可能是两者的结合，因为只有与基质细胞紧密接触，T细胞才能最有效地获得细胞因子。这些因素定义了一个基本的场地，场地的可获得性控制着细胞的数量。T细胞总数随着个体和时间的不同而有所变化，这些外部因素的水平及T细胞群体对这些因素的反应性决定着T细胞总数的大小。这使得动态平衡的控制具有一定程度的适应性。在感染或突变干扰淋巴细胞对细胞外信号应答的时候，这种适应性可以表现出来。同时可以注意到，淋巴细胞群也可以塑造自己场地的规模。某些缺失成熟胸腺细胞的小鼠中（如SCID、RAG缺陷小鼠、MHC缺陷小鼠）可以发现具有说服力的证据，这些小鼠的髓质基质仅以小的原基形式存在[55]。这些环境规模的控制能够以非常不同的方式被运用，例如MHC-Ⅱ分子缺陷小鼠的$CD8^+$细胞数量增多以替代缺失的$CD4^+$细胞，而γδ和B细胞不发生代偿性增殖，甚至在MHC分子完全缺失而消除α:βT细胞成分的时候，情况也是如此。类似地，B细胞缺陷动物的T淋巴细胞也不增殖以填补B淋巴细胞的位置。

通常将增殖中的细胞以3H-TdR或BrdU标记，进行示踪研究，许多动物的初始和记忆T细胞群体的群体动力学已经得到考察，这些动物包括正常小鼠、经正常T细胞重建的淋巴细胞缺失动物、表达单一特异性TCR并用以进行命运追踪的TCR转基因动物。人体的群体动力学主要是利用染色体畸变进行跟踪研究的[510,526~528]。这些实验显示，大量的初始细胞长期（从数月到数年）以静息的状态存在，很少发生细胞周期事件。记忆细胞（注意前述关于它们鉴定的告诫）既包括短寿命、细胞周期较活跃的组分，也包括一些长寿的、非细胞周期循环的细胞。一些细胞因子，如IL-2、-4、-7可能为这些细胞提供生存信号，支持它们长期存活[529]。在缺失TCR刺激的情况下，可能是由Ⅰ型IFN驱动着这些细胞低水平的细胞周期循环[530]。

有趣的是，活化的T淋巴细胞可以像自我更新的生殖细胞和造血干细胞那样表达端粒酶[531]。这种核糖核蛋白酶（ribonucleoprotein enzyme）正常是在体细胞中缺失的，随着成功的分裂，这些细胞的染色体变短，并变得不稳定。那么，端粒酶是否对T细胞群的长期稳定具有促进作用呢？

新近的研究表明，外周T细胞需要某种形式TCR-MHC结合的刺激，在MHC分子缺失或等位基因不匹配的情况下，外周淋巴器官中初始T细胞的寿命缩短[85,532,533]。虽然记忆细胞对MHC-TCR作用的特异性没有那么苛刻的要求，但是在试验中依然取得了相同的结果[533]。现有假说认为，需要一种类似于阳性选择中的信号为T细胞“瘙痒”以使其免于最终的疲倦。

结论与展望

目前T淋巴细胞生物学遇到了一些严峻的挑战。我们现在知道T细胞怎样识别外来抗原、抗原受体多样性如何产生、细胞表面受体的直观形态、这些受体如何识别结合于APC表面MHC分子的肽、APC怎样加工并产生这些肽。T细胞表面的严格共同受体、共刺激分子、黏附分子以及越来越多的信号分子,它们的特性已经在分子水平得到描述。我们也基本了解了T细胞是怎样产生的(产生多少、什么时间、在哪里、通过什么路径产生),又是怎样对那些可以识别外来抗原(结合在自身MHC分子上)的T细胞进行富集,以及怎样对那些自身抗原(结合在自身MHC分子上)反应性T细胞进行清除。这几年我们最终建立了一幅关于T细胞行使不同功能的分子图景:通过分泌细胞因子和受体-配体对(如CD40-CD40L)介导的细胞间相互作用发挥辅助功能;通过穿孔素、颗粒酶和Fas-FasL作用发挥杀伤功能。

然而,一些重要的挑战仍有待解决。其中许多问题的解决需要从基本的描述向更为综合性的观察发展。例如,如果我们要了解来源于抗原受体和其他表面分子的不同信号是怎样在细胞内引导(channeled)、整合(collated)而最终产生不同的表型变化,我们就不能仅限于对复杂的T细胞分化路径的定义,而必须对决定细胞生存和谱系选择的机制进行仔细分析,这最终需要把细胞/细胞相互作用转化为蛋白质/蛋白质或蛋白质/DNA的相互作用。我们现在拥有一幅关于T细胞发挥功能更为细致的图像,下一步的工作是理解如何对各种效应能力进行调节,以解释一种反应的气质(timbre)是如何被决定的,以及理解如何才能对这种气质进行放大、多样化或衰减。

遗留的挑战更趋复杂,也更难以解决,但可能更富刺激性。

(刘宏利 译)

参考文献

1. Moller G(ed). Superantigens. Immunol Rev 1993; 131:
2. Fathman CG, Frelinger JG. T-lymphocyte clones. *Ann Rev Immunol* 1983;1:633–655.
3. Jenkinson EJ, Owen JJ. T-cell differentiation in thymus organ cultures. *Semin Immunol* 1990;2:51–58.
4. Jenkinson EJ, Anderson G. Fetal thymic organ cultures. *Curr Opin Immunol* 1994;6:293–297.
5. McCune JM. Development and applications of the SCID-hu mouse model. *Semin Immunol* 1996;8:187–196.
6. Jaenisch R. Transgenic animals. *Science* 1988;240:1468–1474.
7. von Boehmer H. Developmental biology of T cells in T-cell receptor transgenic mice. *Annu Rev Immunol* 1990;8:531–556.
8. Scott B, Bluthmann H, Teh HS, von Boehmer H. The generation of mature T cells requires interaction of the alpha beta T-cell receptor with major histocompatibility antigens. *Nature* 1989;338:591–593.
9. Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, et al. Doxycycline-mediated, quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10933–10938.
10. Shockett PE, Schatz DG. Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5173–5176.
11. Melton DW. Gene targeting in the mouse. *Bioessays* 1994;16:633–638.
12. Pfeffer K, Mak TW. Lymphocyte ontogeny and activation in gene targeted mutant mice. *Annu Rev Immunol* 1994;12:367–411.
13. Chen J, Shinkai Y, Young F, Alt FW. Probing immune functions in RAG-deficient mice. *Curr Opin Immunol* 1994;6:313–319.
14. Jiang R, Gridley T. Gene targeting: Things go better with Cre. *Curr Biol* 1997;7:R321–R323.
15. Gu H, Zou YR, Rajewsky K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 1993;73:1155–1164.
16. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 1994;265:103–106.
17. Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science* 1995;269:1427–1429.
18. Feil R, Brocard J, Mascrez B, Le Meur M, Metzger D, Chambon P. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10887–10890.
19. Monks CR, Kupfer H, Tamir I, Barlow A, Kupfer A. Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature* 1997;385:83–86.
20. Kersh GJ, Allen PM. Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. *Nature* 1996;380:495–498.
21. Alberola-Ila J, Takaki S, Kerner JD, Perlmutter RM. Differential signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol* 1997;15:125–154.
22. Lyons DS, Lieberman SA, Hampl J, et al. A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists. *Immunity* 1996;5:53–61.
23. Alam SM, Travers PJ, Wung JL, et al. T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 1996;381:616–620.
24. Ullman KS, Northrop JP, Verweij CL, Crabtree GR. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: The missing link. *Annu Rev Immunol* 1990;8:421–452.
25. Bolen JB, Brugge JS. Leukocyte protein tyrosine kinases: Potential targets for drug discovery. *Annu Rev Immunol* 1997;15:371–404.
26. Qian D, Weiss A. T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:205–212.
27. Arpaia E, Shahar M, Dadi H, Cohen A, Roifman CM. Defective T cell receptor signaling and CD8$^+$ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* 1994;76:947–958.
28. Chan AC, Kadlecek TA, Elder ME, et al. ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* 1994;264:1599–1601.
29. van Oers NS, Lowin-Kropf B, Finlay D, Connolly K, Weiss A. Alpha beta T cell development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases. *Immunity* 1996;5:429–436.
30. Negishi I, Motoyama N, Nakayama K-I, et al. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 1995;376:435–438.
31. Nada S, Yagi T, Takeda H, et al. Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. *Cell* 1993;73:1125–1135.
32. Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: An emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 1994;12:85–116.
33. Shultz LD, Schweitzer PA, Rajan TV, et al. Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell* 1993;73:1445–1454.
34. Plas DR, Johnson R, Pingel JT, et al. Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science* 1996;272:1173–1176.
35. Marengere LE, Waterhouse P, Duncan GS, Mittrucker HW, Feng GS, Mak TW. Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association

with CTLA-4. *Science* 1996;272:1170–1173.
36. Cantrell D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 1996;14:259–274.
37. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: Regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:707–747.
38. Genot EM, Parker PJ, Cantrell DA. Analysis of the role of protein kinase C-alpha, -epsilon, and -zeta in T cell activation. *J Biol Chem* 1995;270:9833–9839.
39. Ohoka Y, Kuwata T, Asada A, Zhao Y, Mukai M, Iwata M. Regulation of thymocyte lineage commitment by the level of classical protein kinase C activity. *J Immunol* 1997;158:5707–5716.
40. Leitges M, Schmedt C, Guinamard R, et al. Immunodeficiency in protein kinase c beta-deficient mice. *Science* 1996;273:788–791.
41. Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231–241.
42. Ward SG, June CH, Olive D. PI 3-kinase: A pivotal pathway in T-cell activation? *Immunol Today* 1996;17:187–197.
43. Leiden JM, Thompson CB. Transcriptional regulation of T-cell genes during T-cell development. *Curr Opin Immunol* 1994;6:231–237.
44. Fitzsimmons D, Hagman J. Regulation of gene expression at early stages of B-cell and T-cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 1996;8:166–174.
45. Verbeek S, Izon D, Hofhuis F, et al. An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* 1995;374:70–74.
46. Kuo CT, Veselits ML, Leiden JM. LKLF: A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival. *Science* 1997;277:1986–1989.
47. Matsuyama T, Kimura T, Kitagawa M, et al. Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development. *Cell* 1993;75:83–97.
48. Muthusamy N, Barton K, Leiden JM. Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor. *Nature* 1995;377:639–642.
49. Darnell JE. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277:1630–1635.
50. Fraser A, Evan G. A license to kill. *Cell* 1996;85:781–784.
51. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2239 2244.
52. Miller JFAP. Immunological function of the thymus. *Lancet* 1961;2:748–749.
53. DiGeorge AM. Congenital absence of the thymus and its immunological consequences: concurrence with congenital hypothyroidism. *Birth Defects* 1997;4: 116–120.
54. Warner NL, Szenberg A, Burnet FM. The immunological role of different lymphoid organs in the chicken. I. Dissociation of immunological responsiveness. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1962;40:373–388.
55. van Ewijk W. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu Rev Immunol* 1991;9:591–615.
56. Boyd RL, Tucek CL, Godfrey DI, et al. The thymic microenvironment. *Immunol Today* 1993;14:445–459.
57. Anderson G, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol* 1996;14:73–99.
58. Savino W, Villa-Verde DMS, Lannes-Vieira J. Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration and differentiation? *Immunol Today* 1993;14: 158–161.
59. Kisielow P, von Boehmer H. Development and selection of T cells: Facts and puzzles. *Adv Immunol* 1995;58:87–209.
60. Anderson G, Anderson KL, Tchilian EZ, Owen JJ, Jenkinson EJ. Fibroblast dependency during early thymocyte development maps to the $CD25^+$ $CD44^+$ stage and involves interactions with fibroblast matrix molecules. *Eur J Immunol* 1997;27:1200–1206.
61. Zuniga-Pflucker JC, Di J, Lenardo MJ. Requirement for TNF-alpha and IL-1 alpha in fetal thymocyte commitment and differentiation. *Science* 1995;268: 1906–1909.
62. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994;372:100–103.
63. Kraal G, Weissman IL, Butcher EC. Genetic control of T-cell subset representation in inbred mice. *Immunogenetics* 1983;18:585–592.
64. Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, et al. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nature Med* 1997;1:1279–1283.
65. Kraft DL, Weissman IL, Waller EK. Differentiation of $CD3^-4^-8^-$ human fetal thymocytes in vivo: characterization of a $CD3^-4^+8^-$ intermediate. *J Exp Med* 1993;178:265–277.
66. Hugo P, Waanders GA, Scollay R, Petrie HT, Boyd RL. Characterization of immature $CD4^+CD8^-CD3^-$ thymocytes. *Eur J Immunol* 1991;21:835–838.
67. Agus DB, Surh CD, Sprent J. Reentry of T cells to the adult thymus is restricted to activated T cells. *J Exp Med* 1991;173:1039–1046.
68. Ceredig R, Schreyer M. Immunohistochemical localization of host and donor-derived cells in the regenerating thymus of radiation bone marrow chimeras. *Thymus* 1984;6:15–26.
69. Wu L, Scollay R, Egerton M, Pearse M, Spangrude GJ, Shortman K. CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature* 1991;349:71–74.
70. Wu L, Antica M, Johnson GR, Scollay R, Shortman K. Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J Exp Med* 1991; 174:1617–1627.
71. Rodewald HR, Ogawa M, Haller C, Waskow C, Di Santo JP. Pro-thymocyte expansion by c-kit and the common cytokine receptor gamma chain is essential for repertoire formation. *Immunity* 1997;6:265–272.
72. Levelt CN, Ehrfeld A, Eichmann K. Regulation of thymocyte development through CD3. I. Timepoint of ligation of CD3 epsilon determines clonal deletion or induction of developmental program. *J Exp Med* 1993;177:707–716.
73. Shinkai Y, Alt FW. CD3e-mediated signals rescue the development of $CD4^+$ $CD8^+$ thymocytes in RAG-$2^{-/-}$ mice in the absence of TCR β chain expression. *Int Immunol* 1994;6:995–1001.
74. Jacobs H, Vandeputte D, Tolkamp L, de Vries E, Borst J, Berns A. CD3 components at the surface of pro-T cells can mediate pre-T cell development in vivo. *Eur J Immunol* 1994;24:934–939.
75. Miyazaki T. Two distinct steps during thymocyte maturation from $CD4^-CD8^-$ to $CD4^+CD8^+$ distinguished in the early growth response (Egr)-1 transgenic mice with a recombinase-activating gene-deficient (RAG)-$2^{-/-}$ background. *J Exp Med* 1997;186:877–885.
76. Kishimoto H, Sprent J. Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med* 1997;185:263–271.
77. Chaffin KE, Perlmutter RM. A pertussis toxin-sensitive process controls thymocyte emigration. *Eur J Immunol* 1991;21:2565–2573.
78. Stutman O. Intrathymic and extrathymic T cell maturation. *Immunol Rev* 1978; 42:138–184.
79. Kelly KA, Scollay R. Analysis of recent thymic emigrants with subset- and maturity-related markers. *Int Immunol* 1990;2:419–425.
80. Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ, Scollay R. The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol* 1990;2:3–12.
81. Egerton M, Scollay R, Shortman K. Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2579–2582.
82. Huesmann M, Scott B, Kisielow P, von Boehmer H. Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell* 1991;66:533–540.
83. Scollay R, Godfrey DI. Thymic emigration: Conveyor belts or lucky dips? *Immunol Today* 1995;16:268–264.
84. Tough DF, Sprent J. Thymic emigration—a reply. *Immunol Today* 1995;16:273.
85. Rooke R, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity* 1997;7:123–134.
86. Anderson G, Jenkinson EJ, Moore NC, Owen JJ. MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. *Nature* 1993;362:70–73.
87. Hollander GA, Wang B, Nichogiannopoulou A, et al. Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature* 1995;373:350–353.
88. Ritter MA, Boyd RL. Development in the thymus: It takes two to tango. *Immunol Today* 1993;14:462–469.
89. Arroyo AG, Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell* 1996;85:997–1008.
90. Crisa L, Cirulli V, Ellisman MH, Ishii JK, Elices MJ, Salomon DR. Cell adhesion and migration are regulated at distinct stages of thymic T cell development: The roles of fibronectin, VLA4, and VLA5. *J Exp Med* 1996;184:215–228.
91. Cordier AC, Haumont SM. Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *Am J Anat* 1980;157:227–263.
92. Le Douarin N, Bussonnet C, Chaumont F. Etude des capacités de differentiation et du rôle morphogène de l'endoderme pharyngier chez l'embryon d'oiseau. *Ann Embryol Morphog* 1968;1:29–37.
93. Nehls M, Pfeifer D, Schorpp M, Hedrich H, Boehm T. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* 1994;372:103–107.
94. Blackburn CC, Augustine CL, Li R, et al. The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5742–5746.
95. Nehls M, Kyewski B, Messerle M, et al. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* 1996;272:886–889.
96. Auerbach R. Mrophogenetic interactions in the development of the mouse thymus gland. *Dev Biol* 1997;2:271–285.
97. Le Lièvre CS, Le Douarin NM. Mesenchyme derivatives of the neural crest: Analysis of chimeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1975;34: 125–136.
98. Bockman DE, Kirby ML. Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. *Science* 1984;223:498–500.
99. Manley NR, Capecchi MR. The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development* 1995;121:1989–2003.
100. Greenberg F. DiGeorge syndrome: An historical review of clinical and cytogenetic features. *J Med Genet* 1993;30:803–806.
101. Surh CD, Sprent J, Webb SR. Exclusion of circulating T cells from the thymus does not apply in the neonatal period. *J Exp Med* 1993;177:379–385.
102. Shortman K, Wu L. Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:29–47.
103. Rodewald H-R, Fehling HJ. Molecular and cellular events in early thymocyte development. *Adv Immunol* 1997 (in press).
104. Ikuta K, Kina T, MacNeil I, et al. A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell*

1990;62:863–874.
105. Ceredig R. Intrathymic proliferation of perinatal mouse alpha beta and gamma delta T cell receptor-expressing mature T cells. *Int Immunol* 1990;2:859–867.
106. Adkins B. Developmental regulation of the intrathymic T cell precursor population. *J Immunol* 1991;146:1387–1393.
107. Schneider R, Lees RK, Pedrazzini T, Zinkernagel RM, Hengartner H, MacDonald HR. Postnatal disappearance of self-reactive (V beta 6+) cells from the thymus of Mlsa mice. Implications for T cell development and autoimmunity. *J Exp Med* 1989;169:2149–2158.
108. Benoist C, Mathis D. Generation of the alpha beta T-cell repertoire. *Curr Opin Immunol* 1992;4:156–161.
109. Wang JH, Nichogiannopoulou A, Wu L, et al. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* 1996;5:537–549.
110. Galandrini R, Henning SW, Cantrell DA. Different functions of the GTPase rho in prothymocytes and late pre-T cells. Immunity 1997;7:163–174.
111. Scollay RG, Butcher EC, Weissman IL. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur J Immunol* 1980;10:210–218.
112. Shivatcheva TM, Hadjioloff AI. Adaptive seasonal involution of the ground squirrel thymus. *Thymus* 1987;10:251–255.
113. Aurrand-Lions M, Galland F, Bazin H, Zakharyev VM, Imhof BA, Naquet P. Vanin-1, a novel GPI-linked perivascular molecule involved in thymus homing. *Immunity* 1996;5:391–405.
114. Dunon D, Courtois D, Vainio O, et al. Ontogeny of the immune system: γ/δ and α/β T cells migrate from thymus to the periphery in alternating waves. *J Exp Med* 1997;186:977–988.
115. Sagara S, Sugaya K, Tokoro Y, et al. B220 expression by T lymphoid progenitor cells in mouse fetal liver. *J Immunol* 1997;158:666–676.
116. Rodewald HR. Pathways from hematopoietic stem cells to thymocytes. *Curr Opin Immunol* 1995;7:176–187.
117. Antica M, Wu L, Shortman K, Scollay R. Thymic stem cells in mouse bone marrow. *Blood* 1994;84:111–117.
118. Wang TG, Lybarger L, Soloff R, Dempsey D, Chervenak R. Pre-thymic transcription of TCR genes by adult murine bone marrow cells. *Mol Immunol* 1996; 33:957–964.
119. Soloff RS, Wang TG, Lybarger L, Dempsey D, Chervenak R. Transcription of the TCR-beta locus initiates in adult murine bone marrow. *J Immunol* 1995;154: 3888–3901.
120. Peault B, Khazaal I, Weissman IL. In vitro development of B cells and macrophages from early mouse fetal thymocytes. *Eur J Immunol* 1994;24: 781–784.
121. Hattori N, Kawamoto H, Katsura Y. Isolation of the most immature population of murine fetal thymocytes that includes progenitors capable of generating T, B, and myeloid cells. *J Exp Med* 1996;184:1901–1908.
122. Papiernik M, Lepault F, Pontoux C. Synergistic effect of colony-stimulating factors and IL-2 on prothymocyte proliferation linked to the maturation of macrophage/dendritic cells within L3T4-Lyt-2-Ia-Mac- cells. *J Immunol* 1988; 140:1431–1434.
123. Matsuzaki Y, Gyotoku J, Ogawa M, et al. Characterization of c-kit positive intrathymic stem cells that are restricted to lymphoid differentiation. *J Exp Med* 1993;178:1283–1292.
124. Rodewald HR, Kretzschmar K, Takeda S, Hohl C, Dessing M. Identification of pro-thymocytes in murine fetal blood: T lineage commitment can precede thymus colonization. *EMBO J* 1994;13:4229–4240.
125. Rodewald HR, Dessing M, Dvorak AM, Galli SJ. Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science* 1996;271:818–822.
126. Marcos MA, Morales-Alcelay S, Godin IE, Dieterlen-Lievre F, Copin SG, Gaspar ML. Antigenic phenotype and gene expression pattern of lymphohemopoietic progenitors during early mouse ontogeny. *J Immunol* 1997;158:2627–2637.
127. Delassus S, Cumano A. Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo. *Immunity* 1996;4:97–106.
128. Lanier LL, Spits H, Phillips JH. The developmental relationship between NK cells and T cells. *Immunol Today* 1992;13:392–395.
129. Moore TA, Zlotnik A. T-cell lineage commitment and cytokine responses of thymic progenitors. *Blood* 1995;86:1850–1860.
130. Wu L, Li CL, Shortman K. Thymic dendritic cell precursors: Relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med* 1996;184:903–911.
131. Ardavin C, Wu L, Li CL, Shortman K. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 1993;362:761–763.
132. Sanchez MJ, Muench MO, Roncarolo MG, Lanier LL, Phillips JH. Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med* 1994;180:569–576.
133. Georgopoulos K. Transcription factors required for lymphoid lineage commitment. *Curr Opin Immunol* 1997;9:222–227.
134. Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 1994;265: 1573–1577.
135. Wu L, Nichogiannopoulou A, Shortman K, Georgopoulos K. Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity* 1997;7:483–492.
136. McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, et al. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* 1996;15: 5647–5658.
137. Schatz DG. V(D)J recombination moves in vitro. *Semin Immunol* 1997;9: 149–159.
138. Gilfillan S, Dierich A, Lemeur M, Benoist C, Mathis D. Mice lacking TdT: Mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 1993;261: 1175–1178.
139. Komori T, Okada A, Stewart V, Alt FW. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* 1993;261: 1171–1175.
140. Bogue M, Gilfillan S, Benoist C, Mathis D. Regulation of N-region diversity in antigen receptors through thymocyte differentiation and thymus ontogeny. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11011–11015.
141. George JF Jr, Schroeder HW Jr. Developmental regulation of D beta reading frame and junctional diversity in T cell receptor-beta transcripts from human thymus. *J Immunol* 1992;148:1230–1239.
142. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992;68: 869–877.
143. Shinkai Y, Rathbun G, Lam K-P, et al. RAG-2 deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992;68: 855–867.
144. Kirchgessner CU, Patil CK, Evans JW, et al. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science* 1995;267:1178–1183.
145. Miller RD, Hogg J, Ozaki JH, Gell D, Jackson SP, Riblet R. Gene for the catalytic subunit of mouse DNA-dependent protein kinase maps to the scid locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10792–10795.
146. Zhu C, Bogue MA, Lim DS, Hasty P, Roth DB. Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates. *Cell* 1996;86:379–389.
147. Nussenzweig A, Chen C, da Costa Soares V, et al. Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* 1996;382:551–555.
148. van Gent DC, McBlane JF, Ramsden DA, Sadofsky MJ, Hesse JE, Gellert M. Initiation of V(D)J recombination in a cell-free system. *Cell* 1995;81:925–934.
149. Allison JP, Havran WL. The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Annu Rev Immunol* 1991;9:679–705.
150. Goldman JP, Spencer DM, Raulet DH. Ordered rearrangement of variable region genes of the T cell receptor gamma locus correlates with transcription of the unrearranged genes. *J Exp Med* 1993;177:729–739.
151. Kaufmann SH. gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: What do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2272–2279.
152. Willerford DM, Swat W, Alt FW. Developmental regulation of V(D)J recombination and lymphocyte differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6:603–609.
153. Uematsu Y, Ryser S, Dembic Z, et al. In transgenic mice the introduced functional T cell receptor beta gene prevents expression of endogenous beta genes. *Cell* 1988;52:831–841.
154. Padovan E, Giachino C, Cella M, Valitutti S, Acuto O, Lanzavecchia A. Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor beta chains: Implications for the mechanism of allelic exclusion. *J Exp Med* 1995;181:1587–1591.
155. Davodeau F, Peyrat M-A, Romagné F, et al. Dual T cell receptor beta chain expression on human T lymphocytes. *J Exp Med* 1995;181:1391–1398.
156. Malissen M, Trucy J, Jouvin-Marche E, Cazenave P-A, Scollay R. Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol Today* 1992;13:315–322.
157. Borgulya P, Kishi H, Uematsu Y, von Boehmer H. Exclusion and inclusion of α and β T cell receptor alleles. *Cell* 1992;69:529–537.
158. Padovan E, Casorati G, Dellabona P, Meyer S, Brockhaus M, Lanzavecchia A. Expression of two T cell receptor alpha chain: Dual receptor T cells. *Science* 1993;262:422–424.
159. Heath WR, Miller JFA. Expression of two alpha chains on the surface of T cells in T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1993;178:1807–1811.
160. Heath WR, Carbone FR, Bertolino P, Kelly J, Cose S, Miller JFA. Expression of two T cell receptor alpha chains on the surface of normal murine T cells. *Eur J Immunol* 1995;25:1617–1623.
161. Alam SM, Crispe IN, Gascoigne NR. Allelic exclusion of mouse T cell receptor alpha chains occurs at the time of thymocyte TCR up-regulation. *Immunity* 1995; 3:449–458.
162. Hardardottir F, Baron JL, Janeway CA Jr. T cells with two functional antigen-specific receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:354–358.
163. Sleckman BP, Gorman JR, Alt FW. Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: Role of cis-acting elements. *Annu Rev Immunol* 1996;14:459–481.
164. Schlissel MS, Stanhope-Baker P. Accessibility and the developmental regulation of V(D)J recombination. *Semin Immunol* 1997;9:161–170.
165. Muegge K, Vila MP, Durum SK. Interleukin-7: A cofactor for V(D)J rearrangement of the T cell receptor beta gene. *Science* 1993;261:93–95.
166. Crompton T, Outram SV, Buckland J, Owen MJ. A transgenic T cell receptor restores thymocyte differentiation in interleukin-7 receptor alpha chain-deficient

mice. *Eur J Immunol* 1997;27:100–104.
167. Candeias S, Muegge K, Durum SK. IL-7 receptor and VDJ recombination: Trophic versus mechanistic actions. *Immunity* 1997;6:501–508.
168. Hoffman ES, Passoni L, Crompton T, et al. Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: Coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo. *Genes Dev* 1996;10:948–962.
169. Wilson A, Held W, MacDonald HR. Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes. *J Exp Med* 1994;179:1355–1360.
170. Brandle D, Muller C, Rulicke T, Hengartner H, Pircher H. Engagement of the T-cell receptor during positive selection in the thymus down-regulates RAG-1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:9529–9533.
171. Kouskoff V, Vonesch JL, Benoist C, Mathis D. The influence of positive selection on RAG expression in thymocytes. *Eur J Immunol* 1995;25:54–58.
172. Stanhope-Baker P, Hudson KM, Shaffer AL, Constantinescu A, Schlissel MS. Cell type-specific chromatin structure determines the targeting of V(D)J recombinase activity in vitro. *Cell* 1996;85:887–897.
173. Bories JC, Demengeot J, Davidson L, Alt FW. Gene-targeted deletion and replacement mutations of the T-cell receptor beta-chain enhancer: The role of enhancer elements in controlling V(D)J recombination accessibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7871–7876.
174. Bouvier G, Watrin F, Naspetti M, Verthuy C, Naquet P, Ferrier P. Deletion of the mouse T-cell receptor beta gene enhancer blocks alphabeta T-cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7877–7881.
175. Capone M, Watrin F, Fernex C, et al. TCR beta and TCR alpha gene enhancers confer tissue- and stage-specificity on V(D)J recombination events. *EMBO J* 1993;12:4335–4346.
176. Lauzurica P, Krangel MS. Enhancer-dependent and -independent steps in the rearrangement of a human T cell receptor delta transgene. *J Exp Med* 1994;179: 43–55.
177. Lauzurica P, Krangel MS. Temporal and lineage-specific control of T cell receptor alpha/delta gene rearrangement by T cell receptor alpha and delta enhancers. *J Exp Med* 1994;179:1913–1921.
178. Hernandez-Munain C, Lauzurica P, Krangel MS. Regulation of T cell receptor delta gene rearrangement by c-Myb. *J Exp Med* 1996;183:289–293.
179. Lauzurica P, Zhong XP, Krangel MS, Roberts JL. Regulation of T cell receptor delta gene rearrangement by CBF/PEBP2. *J Exp Med* 1997;185:1193–1201.
180. Borst J, Jacobs H, Brouns G. Composition and function of T-cell receptor and B-cell receptor complexes on precursor lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1996;8: 181–190.
181. Kishi H, Borgulya P, Scott B, et al. Surface expression of the beta T cell receptor (TCR) chain in the absence of other TCR or CD3 proteins on immature T cells. *EMBO J* 1991;10:93–100.
182. Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, et al. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* 1992;360:225–231.
183. Malissen M, Gillet A, Ardouin L, et al. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J* 1995;14:4641–4653.
184. Malissen M, Gillet A, Rocha B, et al. T cell development in mice lacking the CD3-zeta/eta gene. *EMBO J* 1993;12:4347–4355.
185. Liu CP, Ueda R, She J, et al. Abnormal T cell development in CD3-zeta$^{-/-}$ mutant mice and identification of a novel T cell population in the intestine. *EMBO J* 1993;12:4863–4875.
186. Love PE, Shores EW, Johnson MD, et al. T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex. *Science* 1993;261:918–921.
187. Ohno H, Aoe T, Taki S, et al. Developmental and functional impairment of T cells in mice lacking CD3 zeta chains. *EMBO J* 1993;12:4357–4366.
188. Molina TJ, Kishihara K, Siderovski DP, et al. Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature* 1992;357:161–164.
189. Levin SD, Anderson SJ, Forbush KA, Perlmutter RM. A dominant-negative transgene defines a role for p56lck in thymopoiesis. *EMBO J* 1993;12: 1671–1680.
190. Kishihara K, Penninger J, Wallace VA, et al. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon 6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* 1993;74:143–156.
191. Byth KF, Conroy LA, Howlett S, et al. CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4-CD8- thymocytes, and B cell maturation. *J Exp Med* 1996;183: 1707–1718.
192. Cheng AM, Negishi I, Anderson SJ, et al. The syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9797–9801.
193. Henning SW, Galandrini R, Hall A, Cantrell DA. The GTPase Rho has a critical regulatory role in thymus development. *EMBO J* 1997;16:2397–2407.
194. Crompton T, Gilmour KC, Owen MJ. The MAP kinase pathway controls differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Cell* 1996;86: 243–251.
195. Takahama Y, Hasegawa T, Itohara S, Ball EL, Sheard MA, Hashimoto Y. Entry of CD4$^-$CD8$^-$ immature thymocytes into the CD4/CD8 developmental pathway is controlled by tyrosine kinase signals that can be provided through TCR components. *Int Immunol* 1994;6:1505–1514.
196. Lalli E, Sassone-Corsi P, Ceredig R. Block of T lymphocyte differentiation by activation of the cAMP-dependent signal transduction pathway. *EMBO J* 1996; 15:528–537.
197. Wang B, Benoist C, Mathis D. The immunosuppressant 1,5-deoxyspergualin reveals commonality between preT and preB cell differentiation. *J Exp Med* 1996;183:2427–2436.
198. Shinkai Y, Koyasu S, Nakayama K, et al. Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* 1993;259: 822–825.
199. Mombaerts P, Anderson SJ, Perlmutter RM, Mak TW, Tonegawa S. An activated lck transgene promotes thymocyte development in RAG-1 mutant mice. *Immunity* 1994;1:261–267.
200. Fehling HJ, Iriatni BM, Krotkova A, et al. Restoration of thymopoiesis in pTa$^{-/-}$ mice by anti-CD3e antibody treatment or with transgenes encoding activated Lck or tailless pTa. *Immunity* 1997;6:703–714.
201. Swat W, Shinkai Y, Cheng HL, Davidson L, Alt FW. Activated Ras signals differentiation and expansion of CD4$^+$8$^+$ thymocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4683–4687.
202. Groettrup M, Baron A, Griffiths G, Palacios R, von Boehmer H. T cell receptor (TCR) β chain homodimers on the surface of immature but not mature α, γ, δ chain deficient T cell lines. *EMBO J* 1992;11:2735–2746.
203. Punt JA, Kubo RT, Saito T, et al. Surface expression of a T cell receptor beta (TCR-beta) chain in the absence of TCR-alpha, -delta, and -gamma proteins. *J Exp Med* 1991;174:775–783.
204. Dave VP, Cao Z, Browne C, et al. CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. *EMBO J* 1997;16: 1360–1370.
205. Groettrup M, Ungewiss K, Azogui O, et al. A novel disulfide-linked heterodimer on Pre-T cells consists of the T cell receptor β chain and a 33 kd glycoprotein. *Cell* 1993;75:283–294.
206. Saint-Ruf C, Ungewiss K, Groettrup M, Bruno L, Fehling HJ, von Boehmer H. Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 1994;266:1208–1212.
207. Fehling J, Krotkova A, Saint-Ruf C, von Boehmer H. Crucial role of the pre-T-cell receptor a gene in development of $\alpha\beta$ but not $\gamma\delta$ T cells. *Nature* 1995;375: 795–798.
208. Del Porto P, Bruno L, Mattei MG, von Boehmer H, Saint-Ruf C. Cloning and comparative analysis of the human pre-T-cell receptor alpha-chain gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:12105–12109.
209. Ramiro AR, Trigueros C, Marquez C, San Millan JL, Toribio ML. Regulation of pre-T cell receptor (pT alpha-TCR beta) gene expression during human thymic development. *J Exp Med* 1996;184:519–530.
210. Krimpenfort P, Ossendorp F, Borst J, Melief C, Berns A. T cell depletion in transgenic mice carrying a mutant gene for TCR-beta. *Nature* 1989;341:742–746.
211. Jacobs H, Iacomini J, van de Ven M, Tonegawa S, Berns A. Domains of the TCR beta-chain required for early thymocyte development. *J Exp Med* 1996;184: 1833–1843.
212. Gao EK, Lo D, Cheney R, Kanagawa O, Sprent J. Abnormal differentiation of thymocytes in mice treated with cyclosporin A. *Nature* 1988;336:176–179.
213. Jenkins MK, Schwartz RH, Pardoll DM. Effects of cyclosporine A on T cell development and clonal deletion. *Science* 1988;241:1655–1658.
214. Mallick CA, Dudley EC, Viney JL, Owen MJ, Hayday AC. Rearrangement and diversity of T cell receptor beta chain genes in thymocytes: A critical role for the beta chain in development. *Cell* 1993;73:513–519.
215. Dudley EC, Petrie HT, Shah LM, Owen MJ, Hayday AC. T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* 1994;1:83–93.
216. Xu Y, Davidson L, Alt FW, Baltimore D. Function of the pre-T-cell receptor alpha chain in T-cell development and allelic exclusion at the T-cell receptor beta locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2169–2173.
217. Krotkova A, von Boehmer H, Fehling HJ. Allelic exclusion in pTa$^{-/-}$ mice: No evidence for cell surface expression of two different TCRβ chains but less efficient inhibition of endogeneous β-rearrangements in the presence of a TCRβ transgene. *J Exp Med* 1997;186:767–775.
218. Aifantis I, Buer J, von Boehmer H, Azogui O. Essential role of the pre-T cell receptor in allelic exclusion of the T cell receptor β locus. *Immunity* 1997;7: 601–607.
219. Falk I, Biro J, Kohler H, Eichmann K. Proliferation kinetics associated with T cell receptor-beta chain selection of fetal murine thymocytes. *J Exp Med* 1996;184:2327–2339.
220. Bruno L, Fehling HJ, von Boehmer H. The alpha beta T cell receptor can replace the gamma delta receptor in the development of gamma delta lineage cells. *Immunity* 1996;5:343–352.
221. Kersh GJ, Hooshmand FF, Hedrick SM. Efficient maturation of alpha beta lineage thymocytes to the CD4$^+$CD8$^+$ stage in the absence of TCR-beta rearrangement. *J Immunol* 1995;154:5706–5714.
222. Buer J, Aifantis I, Di Santo JP, Fehling HJ, von Boehmer H. Role of different T cell receptors in the development of pre-T cells. *J Exp Med* 1997;185: 1541–1547.
223. Zuniga-Pflucker JC, Jiang D, Schwartzberg PL, Lenardo MJ. Sublethal gamma-radiation induces differentiation of CD4$^-$/CD8$^-$ into CD4$^+$/CD8$^+$ thymocytes without T cell receptor beta rearrangement in recombinase activation gene 2$^{-/-}$

mice. *J Exp Med* 1994;180:1517–1521.
224. Guidos CJ, Williams CJ, Wu GE, Paige CJ, Danska JS. Development of CD4⁻CD8⁺ thymocytes in RAG-deficient mice through a T cell receptor beta chain-independent pathway. *J Exp Med* 1995;181:1187–1195.
225. Mombaerts P, Terhorst C, Jacks T, Tonegawa S, Sancho J. Characterization of immature thymocyte lines derived from T-cell receptor or recombination activating gene 1 and p53 double mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7420–7424.
226. Jiang D, Lenardo MJ, Zuniga-Pflucker C. p53 prevents maturation to the CD4⁺CD8⁺ stage of thymocyte differentiation in the absence of T cell receptor rearrangement. *J Exp Med* 1996;183:1923–1928.
227. Pérrit C, Lucas B, Vasseur T. Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4⁻8⁻) to immature (CD4⁺8⁺) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J Immunol* 1995;154:5103–513.
228. Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* 1993;11: 637–685.
229. Okazaki K, Sakano H. Thymocyte circular DNA excised from T cell receptor alpha-delta gene complex. *EMBO J* 1988;7:1669–1674.
230. Winoto A, Baltimore D. Separate lineages of T cells expressing the alpha beta and gamma delta receptors. *Nature* 1989;338:430–432.
231. Takeshita S, Toda M, Yamagishi H. Excision products of the T cell receptor gene support a progressive rearrangement model of the alpha/delta locus. *EMBO J* 1989;8:3261–3270.
232. Nakajima PB, Menetski JP, Roth DB, Gellert M, Bosma MJ. V-D-J rearrangements at the T cell receptor delta locus in mouse thymocytes of the alpha beta lineage. *Immunity* 1995;3:609–621.
233. Ishida I, Verbeek S, Bonneville M, Itohara S, Berns A, Tonegawa S. T-cell receptor gamma delta and gamma transgenic mice suggest a role of a gamma gene silencer in the generation of alpha beta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:3067–3071.
234. Bonneville M, Ishida I, Mombaerts P, et al. Blockage of alpha beta T-cell development by TCR gamma delta transgenes. *Nature* 1989;342:931–934.
235. Sim GK, Olsson C, Augustin A. Commitment and maintenance of the alpha beta and gamma delta T cell lineages. *J Immunol* 1995;154:5821–5831.
236. Dent AL, Matis LA, Hooshmand F, Widacki SM, Bluestone JA, Hedrick SM. Self-reactive gamma delta T cells are eliminated in the thymus. *Nature* 1990; 343:714–719.
237. Livak F, Petrie HT, Crispe IN, Schatz DG. In-frame TCR delta gene rearrangements play a critical role in the alpha beta/gamma delta T cell lineage decision. *Immunity* 1995;2:617–627.
238. Dudley EC, Girardi M, Owen MJ, Hayday AC. Alpha beta and gamma delta T cells can share a late common precursor. *Curr Biol* 1995;5:659–669.
239. Kang J, Baker J, Raulet DH. Evidence that productive rearrangements of TCR gamma genes influence the commitment of progenitor cells to differentiate into alpha beta or gamma delta T cells. *Eur J Immunol* 1995;25:2706–2709.
240. Burtrum DB, Kim S, Dudley EC, Hayday AC, Petrie HT. TCR gene recombination and alpha beta-gamma delta lineage divergence: Productive TCR-beta rearrangement is neither exclusive nor preclusive of gamma delta cell development. *J Immunol* 1996;157:4293–4296.
241. Mertsching E, Wilson A, MacDonald HR, Ceredig R. T cell receptor alpha gene rearrangement and transcription in adult thymic gamma delta cells. *Eur J Immunol* 1997;27:389–396.
242. Petrie HT, Scollay R, Shortman K. Commitment to the T cell receptor-alpha beta or-gamma delta lineages can occur just prior to the onset of CD4 and CD8 expression among immature thymocytes. *Eur J Immunol* 1992;22:2185–2188.
243. Passoni L, Hoffman ES, Kim S, et al. Intrathymic δ selection events in γδ cell development. *Immunity* 1997;7:83–95.
244. Shutter J, Cain JA, Ledbetter S, Rogers MD, Hockett RD Jr. A delta T-cell receptor deleting element transgenic reporter construct is rearranged in alpha beta but not gamma delta T-cell lineages. *Mol Cell Biol* 1995;15:7022–7031.
245. Diaz P, Cado D, Winoto A. A locus control region in the T cell receptor alpha/delta locus. *Immunity* 1994;1:207–217.
246. Washburn T, Schweighoffer E, Gridley T, et al. Notch activity influences the ab versus δγ T cell lineage decision. *Cell* 1997;88:833–843.
247. Zinkernagel RM, Doherty PC. The discovery of MHC restriction. *Immunol Today* 1997;18.
248. Bechtol KB, Freed JH, Herzenberg LA, McDevitt HO. Genetic control of the antibody response to TGAL in C3H-CWB tetraparental mice. *J Exp Med* 1974; 140:1660–1675.
249. von Bohemer H, Hudson L, Sprent J. Collaboration of histoincompatible T- and B-lymphocytes using cells from tetraparental bone marrow chimeras. *J Exp Med* 1975;142:989–997.
250. Katz DH. The role of the histocompatibility gene complex in lymphocyte differentiation. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 1976;40: 611–624.
251. Bevan M. In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature* 1997;269:417–418.
252. Zinkernagel RM, Callahan GN, Klein J, Dennert G. Cytotoxic T cells learn specificity for self H-2 during diffentiation in the thymus. *Nature* 1978;271:251–253.
253. Fink PJ, Bevan MJ. H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity. *J Exp Med* 1978;148:766–774.
254. von Boehmer H, Haas W, Jerne NK. Major histocompatibility complex-linked immune-responsiveness is acquired by lymphocytes of low-responder mice differentiating in thymus of high-responder mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75: 2439–2442.
255. Kappler JW, Marrack P. The role of H-2 linked genes in helper T cell function IV. Importance of T-cell genotype and host environment in I region and Ir gene expression. *J Exp Med* 1978;148:1510–1516.
256. Singer A. Experimentation and thymic selection. *J Immunol* 1988;140: 2481–2483.
257. MacDonald HR, Lees RK, Schneider R, Zinkernagel RM, Hengartner H. Positive selection of CD4⁺ thymocytes controlled by MHC class II gene products. *Nature* 1988;336:471–473.
258. Blackman MA, Marrack P, Kappler J. Influence of the major histocompatibility complex on positive thymic selection of V beta 17a⁺ T cells. *Science* 1989;244: 214–217.
259. Marrack P, Kushnir E, Born W, McDuffie M, Kappler J. The development of helper T cell precursors in mouse thymus. *J Immunol* 1988;140:2508–2514.
260. Marusic-Galesic S, Longo DL, Kruisbeek AM. Preferential differentiation of T cell receptor specificities based on the MHC glycoproteins encountered during development. Evidence for positive selection. *J Exp Med* 1989;169:1619–1630.
261. Teh HS, Kisielow P, Scott B, et al. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 1988;335:229–233.
262. Kisielow P, Teh HS, Bluthmann H, von Boehmer H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 1988;335: 730–733.
263. Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, Loh DY. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 1988;336:73–76.
264. Berg LJ, Pullen AM, Fazekas de St. Groth B, Mathis D, Benoist C, Davis MM. Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand. *Cell* 1989;58:1035–1046.
265. Kaye J, Hsu ML, Sauron ME, Jameson SC, Gascoigne NR, Hedrick SM. Selective development of CD4⁺ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature* 1989;341:746–749.
266. Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R. β2-microglobulin deficient mice lack CD4⁻8⁺ cytolytic T cells. *Nature* 1990;344: 742–746.
267. Koller BH, Marrack P, Kappler JW, Smithies O. Normal development of mice deficient in β_2M, MHC class I proteins, and CD8⁺ T cells. *Science* 1990;248: 1227–1229.
268. Cosgrove D, Gray D, Dierich A, et al. Mice lacking MHC class II molecules. *Cell* 1991;66:1051–1066.
269. Grusby MJ, Johnson RS, Papaioannou VE, Glimcher LH. Depletion of CD4⁺ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Science* 1991;253:1417–1420.
270. Bix M, Raulet D. Inefficient positive selection of T cells directed by haematopoietic cells. *Nature* 1992;359:330–333.
271. Markowitz JS, Auchincloss H Jr, Grusby MJ, Glimcher LH. Class II-positive hematopoietic cells cannot mediate positive selection of CD4⁺ T lymphocytes in class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:2779–2783.
272. Cosgrove D, Chan SH, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. The thymic compartment responsible for positive selection of CD4⁺ T cells. *Int Immunol* 1992;4: 707–710.
273. von Boehmer H, Teh HS, Kisielow P. The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol Today* 1989;10:57–61.
274. Ignatowicz L, Kappler J, Marrack P. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* 1996;84:521–529.
275. Tourne S, Miyazaki T, Oxenius A, et al. Selection of a broad repertoire of CD4⁺ T cells in H-2Ma⁻/⁻ mice. *Immunity* 1997;7:187–195.
276. Surh CD, Lee D-S, Fung-Leung W-P, Karlsson L, Sprent J. Thymic selection by a single MHC/peptide ligand produces a semidiverse repertoire of CD4⁺ T cells. *Immunity* 1997;7:209–219.
277. Merkenschlager M, Benoist C, Mathis D. Evidence for a single-niche model of positive selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11694–11698.
278. Kaye J, Vasquez NJ, Hedrick SM. Involvement of the same region of the T cell antigen receptor in thymic selection and foreign peptide recognition. *J Immunol* 1992;148:3342–3353.
279. Bogen B, Gleditsch L, Weiss S, Dembic Z. Weak positive selection of transgenic T cell receptor-bearing thymocytes: Importance of major histocompatibility complex class II, T cell receptor and CD4 surface molecule densities. *Eur J Immunol* 1992;22:703–709.
280. Kirberg J, Baron A, Jakob S, Rolink A, Karjalainen K, von Boehmer H. Thymic selection of CD8⁺ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor. *J Exp Med* 1994;180:25–34.
281. Matechak EO, Killeen N, Hedrick SM, Fowlkes BJ. MHC class II-specific T cells can develop in the CD8 lineage when CD4 is absent. *Immunity* 1996;4:337–347.
282. Robey E, Ramsdell F, Elliott J, et al. Expression of CD4 in transgenic mice alters the specificity of CD8 cells for allogeneic major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:608–612.
283. Speiser DE, Stubi U, Zinkernagel RM. Extrathymic positive selection of alpha beta T-cell precursors in nude mice. *Nature* 1992;355:170–172.

284. Lundberg K, Shortman K. Small cortical thymocytes are subject to positive selection. *J Exp Med* 1994;179:1475–1483.
285. Swat W, von Boehmer H, Kisielow P. Small CD4⁺8⁻ TCRlow thymocytes contain precursors of mature T cells. *Eur J Immunol* 1994;24:1010–1012.
286. Akashi K, Weissman IL. The c-kit⁺ maturation pathway in mouse thymic T cell development: Lineages and selection. *Immunity* 1996;5:147–161.
287. Shortman K, Vremec D, Egerton M. The kinetics of T cell antigen receptor expression by subgroups of CD4⁺8⁺ thymocytes: delineation of CD4⁺8⁺3(2+) thymocytes as post-selection intermediates leading to mature T cells. *J Exp Med* 1991;173:323–332.
288. Kearse KP, Roberts JL, Munitz TI, Wiest DL, Nakayama T, Singer A. Developmental regulation of alpha beta T cell antigen receptor expression results from differential stability of nascent TCR alpha proteins within the endoplasmic reticulum of immature and mature T cells. *EMBO J* 1994;13:4504–4514.
289. Sawada S, Scarborough JD, Killeen N, Littman DR. A lineage-specific transcriptional silencer regulates CD4 gene expression during T lymphocyte development. *Cell* 1994;77:917–929.
290. Siu G, Wurster AL, Duncan DD, Soliman TM, Hedrick SM. A transcriptional silencer controls the developmental expression of the CD4 gene. *EMBO J* 1994; 13:3570–3579.
291. Turka LA, Schatz DG, Oettinger MA, et al. Thymocyte expression of RAG-1 and RAG-2: Termination by T cell receptor cross-linking. *Science* 1991;253: 778–781.
292. Swat W, Dessing M, von Boehmer H, Kisielow P. CD69 expression during selection and maturation of CD4⁺8⁻ thymocytes. *Eur J Immunol* 1993;23:739–746.
293. Linette GP, Grusby MJ, Hedrick SM, Hansen TH, Glimcher LH, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is upregulated at the CD4⁺ CD8⁺ stage during positive selection and promotes thymocyte differentiation at several control points. *Immunity* 1994;1: 197–205.
294. Tao W, Teh SJ, Melhado I, Jirik F, Korsmeyer SJ, Teh HS. The T cell receptor repertoire of CD4⁻8⁺ thymocytes is altered by overexpression of the BCL-2 protooncogene in the thymus. *J Exp Med* 1994;179:145–153.
295. Zacharchuk CM, Mercep M, Chakraborti PK, Simons SS Jr, Ashwell JD. Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J Immunol* 1990;145:4037–4045.
296. Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991;67:879–888.
297. Strasser A, Harris AW, Cory S. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 1991;67:889–899.
298. Strasser A, Harris AW, Huang DC, Krammer PH, Cory S. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J* 1995;14: 6136–6147.
299. Brandle D, Muller S, Muller C, Hengartner H, Pircher H. Regulation of RAG-1 and CD69 expression in the thymus during positive and negative selection. *Eur J Immunol* 1994;24:145–151.
300. Wilkinson RW, Anderson G, Owen JJ, Jenkinson EJ. Positive selection of thymocytes involves sustained interactions with the thymic microenvironment. *J Immunol* 1995;155:5234–5240.
301. Merkenschlager M. Tracing interactions of thymocytes with individual stromal cell partners. Eur J Immunol 1996;26:892–896.
302. Lucas B, Vasseur F, Penit C. Normal sequence of phenotypic transitions in one cohort of 5-bromo-2′-deoxyuridine-pulse-labeled thymocytes. *J Immunol* 1993; 151:4574–4582.
303. Lundberg K, Heath X, Kontgen F, Carbone FR, Shortman K. Intermediate steps in positive selection: Differentiation of CD4⁺8ⁱⁿᵗ TCRⁱⁿᵗ thymocytes into CD4⁻8⁻ TCRʰⁱ thymocytes. *J Exp Med* 1995;181:1643–1651.
304. Robey E, Chang D, Itano A, et al. An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell* 1996;87:483–492.
305. Lo D, Sprent J. Identity of cells that imprint H-2-restricted T-cell specificity in the thymus. *Nature* 1986;319:672–675.
306. Khazaal I, Salaun J, Coltey M, Calman F, Le Douarin N. Restoration of T-cell function in nude mice by grafting the epitheliomesenchymal thymic rudiment from 10-day-old euthymic embryos. *Cell Differ Dev* 1989;26:211–220.
307. Anderson G, Owen JJ, Moore NC, Jenkinson EJ. Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes in vitro. *J Exp Med* 1994;179:2027–2031.
308. Lorenz RG, Allen PM. Thymic cortical epithelial cells lack full capacity for antigen presentation. *Nature* 1989;340:557–559.
309. Kasai M, Hirokawa K, Kajino K, et al. Difference in antigen presentation pathways between cortical and medullary thymic epithelial cells. *Eur J Immunol* 1996;26:2101–2107.
310. Oukka M, Andre P, Turmel P, et al. Selectivity of the major histocompatibility complex class II presentation pathway of cortical thymic epithelial cell lines. *Eur J Immunol* 1997;27:855–859.
311. Bradley SM, Kruisbeek AM, Singer A. Cytotoxic T lymphocyte responses in allogeneic radiation bone marrow chimeras. The chimeric host strictly dictates the self-repertoire of Ia-restricted T cells but not H-2K/D-restricted T cells. *J Exp Med* 1982;156:1650–1664.
312. Kast WM, Voordouw AC, Leupers T, Visser JW, Melief CJ. Thymic immune response gene function in radiation chimeras reconstituted with purified hemopoietic stem cells. *Eur J Immunol* 1987;17:471–475.
313. Vukmanovic S, Grandea AG, Faas SJ, Knowles BB, Bevan MJ. Positive selection of T-lymphocytes induced by intrathymic injection of a thymic epithelial cell line. *Nature* 1992;359:729–732.
314. Pawlowski T, Elliott JD, Loh DY, Staerz UD. Positive selection of T lymphocytes on fibroblasts. *Nature* 1993;364:642–645.
315. Hugo P, Kappler JW, McCormack JE, Marrack P. Fibroblasts can induce thymocyte positive selection in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10335–10339.
316. Zinkernagel RM, Callahan GN, Althage A, Cooper S, Klein PA, Klein J. On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: Evidence for dual recognition? *J Exp Med* 1978;147:882–896.
317. Jameson SC, Hogquist KA, Bevan MJ. Positive selection of thymocytes. *Annu Rev Immunol* 1995;13:93–126.
318. Hogquist KA, Gavin MA, Bevan MJ. Positive selection of CD8⁺ T cells induced by major histocompatibility complex binding peptides in fetal thymic organ culture. *J Exp Med* 1993;177:1469–1473.
319. Ashton-Rickardt PG, van Kaer L, Schumacher TNM, Ploegh HL, Tonegawa S. Peptide contributes to the specificity of positive selection of CD8⁺ T cells in the thymus. *Cell* 1993;73:1041–1049.
320. Benoist C, Mathis D. Positive selection of T cells: Fastidious or promiscuous? *Curr Opin Immunol* 1997;9:245–249.
321. Miyazaki T, Wolf P, Tourne S, et al. Mice lacking H-2M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* 1996;84:531–541.
322. Martin WD, Hicks GG, Mendiratta SK, Leva HI, Ruley HE, van Kaer L. H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection. *Cell* 1996;84:543–550.
323. Fung-Leung WP, Surh CD, Liljedahl M, et al. Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice. *Science* 1996;271:1278–1281.
324. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 1994;76:17–27.
325. Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR, et al. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 1994;76:651–663.
326. Sebzda E, Wallace VA, Mayer J, Yeung RSM, Mak TW, Ohashi PS. Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science* 1994;263:1615–1618.
327. Nakano N, Rooke R, Benoist C, Mathis D. Positive selection of T cells induced by viral delivery of neopeptides to the thymus. *Science* 1997;275:678–683.
328. Janeway CA Jr, Dianzani U, Portoles P, et al. Cross-linking and conformational change in T-cell receptors: Role in activation and in repertoire selection. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54(Pt 2):657–666.
329. Pawlowski TJ, Singleton MD, Loh DY, Berg R, Staerz UD. Permissive recognition during positive selection. *Eur J Immunol* 1996;26:851–857.
330. Hogquist KA, Tomlinson AJ, Kieper WC, et al. Identification of a naturally occurring ligand for thymic positive selection. *Immunity* 1997;6:389–399.
331. Evavold BD, Sloan-Lancaster J, Wilson KJ, Rothbard JB, Allen PM. Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: Evidence for multiple endogenous ligands. *Immunity* 1995;2:655–663.
332. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80:695–705.
333. Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 1996;384:134–141.
334. Sprent J, Lo D, Gao EK, Ron Y. T cell selection in the thymus. *Immunol Rev* 1988;101:173–190.
335. Valitutti S, Müller S, Dessing M, Lanzavecchia A. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J Exp Med* 1996;183:1917–1921.
336. Hogquist KA, Jameson SC, Bevan MJ. Strong agonist ligands for the T cell receptor do not mediate positive selection of functional CD8⁺ T cells. *Immunity* 1995;3:79–86.
337. Sebzda E, Kundig TM, Thomson CT, et al. Mature T cell reactivity altered by peptide agonist that induces positive selection. *J Exp Med* 1996;183:1093–1104.
338. Swan KA, Alberola-Ila J, Gross JA, et al. Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes. *EMBO J* 1995;14:276–285.
339. Alberola-Ila J, Hogquist KA, Swan KA, Bevan MJ, Perlmutter RM. Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med* 1996;184: 9–18.
340. Anderson G, Anderson KL, Conroy LA, et al. Intracellular signaling events during positive and negative selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes in vitro. *J Immunol* 1995;154:3636–3643.
341. Lederberg J. Genes and antibodies. *Science* 1959;129:1649–1652.
342. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987;49:273–280.
343. Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM. Superantigens: Mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol* 1991;9: 745–772.
344. Kisielow P, Bluthmann H, Staerz UD, Steinmetz M, von Boehmer H. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4⁺8⁺ thymocytes. *Nature* 1988;333:742–746.
345. Pircher H, Burki K, Lang R, Hengartner H, Zinkernagel RM. Tolerance induc-

tion in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 1989;342:559–561.
346. Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science* 1990;250: 1720–1723.
347. Berg LJ, de St. Groth BF, Pullen AM, Davis MM. Phenotypic differences between alpha beta versus beta T-cell receptor transgenic mice undergoing negative selection. *Nature* 1989;340:559–562.
348. Zal T, Volkmann A, Stockinger B. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* 1994;180:2089–2099.
349. Swat W, Ignatowicz L, von Boehmer H, Kisielow P. Clonal deletion of immature CD4+8+ thymocytes in suspension culture by extrathymic antigen-presenting cells. *Nature* 1991;351:150–153.
350. Spain LM, Berg LJ. Developmental regulation of thymocyte susceptibility to deletion by "self"-peptide. *J Exp Med* 1992;176:213–223.
351. Pircher H, Rohrer UH, Moskophidis D, Zinkernagel RM, Hengartner H. Lower receptor avidity required for thymic clonal deletion than for effector T-cell function. *Nature* 1991;351:482–485.
352. Kishimoto H, Cai Z, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Sprent J. Differing roles for B7 and intercellular adhesion molecule-1 in negative selection of thymocytes. *J Exp Med* 1996;184:531–537.
353. Speiser DE, Pircher H, Ohashi PS, Kyburz D, Hengartner H, Zinkernagel RM. Clonal deletion induced by either radioresistant thymic host cells or lymphohemopoietic donor cells at different stages of class I-restricted T cell ontogeny. *J Exp Med* 1992;175:1277–1283.
354. Oukka M, Colucci-Guyon E, Tran PL, et al. CD4 T cell tolerance to nuclear proteins induced by medullary thymic epithelium. *Immunity* 1996;4:545–553.
355. Hoffmann MW, Allison J, Miller JF. Tolerance induction by thymic medullary epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2526–2530.
356. Schonrich G, Strauss G, Muller KP, et al. Distinct requirements of positive and negative selection for selecting cell type and CD8 interaction. *J Immunol* 1993;151:4098–4105.
357. Platt N, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S. Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12456–12460.
358. Wong B, Choi Y. Pathways leading to cell death in T cells. *Curr Opin Immunol* 1997;9:358–364.
359. Winoto A. Cell death in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol* 1997;9:365–370.
360. Zhou T, Cheng J, Yang P, et al. Inhibition of Nur77/Nurr1 leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells. *J Exp Med* 1996;183:1879–1892.
361. Cheng LE, Chan FK, Cado D, Winoto A. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J* 1997;16: 1865–1875.
362. Amakawa R, Hakem A, Kundig TM, et al. Impaired negative selection of T cells in Hodgkin's disease antigen CD30-deficient mice. *Cell* 1996;84:551–562.
363. Castro JE, Listman JA, Jacobson BA, et al. Fas modulation of apoptosis during negative selection of thymocytes. *Immunity* 1996;5:617–627.
364. van Meerwijk JPM, Marguerat S, Lees RK, Germain RN, Fowlkes BJ, MacDonald HR. Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J Exp Med* 1997;185:377–383.
365. Hammerling GJ, Schonrich G, Momburg F, et al. Non-deletional mechanisms of peripheral and central tolerance: Studies with transgenic mice with tissue-specific expression of a foreign MHC class I antigen. *Immunol Rev* 1991;122: 47–67.
366. Husbands SD, Schonrich G, Arnold B, et al. Expression of major histocompatibility complex class I antigens at low levels in the thymus induces T cell tolerance via a non-deletional mechanism. *Eur J Immunol* 1992;22:2655–2661.
367. Blichfeldt E, Munthe LA, Rotnes JS, Bogen B. Dual T cell receptor T cells have a decreased sensitivity to physiological ligands due to reduced density of each T cell receptor. *Eur J Immunol* 1996;26:2876–2884.
368. Blackman MA, Gerhard-Burgert H, Woodland DL, Palmer E, Kappler JW, Marrack P. A role for clonal inactivation in T cell tolerance to Mls-1a. *Nature* 1990;345:540–542.
369. Ramsdell F, Fowlkes BJ. Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science* 1990;248:1342–1348.
370. Schonrich G, Momburg F, Hammerling GJ, Arnold B. Anergy induced by thymic medullary epithelium. *Eur J Immunol* 1992;22:1687–1691.
371. Antonia SJ, Geiger T, Miller J, Flavell RA. Mechanisms of immune tolerance induction through the thymic expression of a peripheral tissue-specific protein. *Int Immunol* 1995;7:715–725.
372. Le Douarin N, Corbel C, Bandeira A, et al. Evidence for a thymus-dependent form of tolerance that is not based on elimination or anergy of reactive T cells. *Immunol Rev* 1996;149:35–53.
373. Sprent J, Miller JFAP, Mitchell GF. Antigen-induced selective recruitment of circulating lymphocytes. *Cell Immunol* 1971;2:171–181.
374. Mackay CR. Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1993;5:423–427.
375. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272: 60–66.
376. Gowans JL, Knight EJ. The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc R Soc Lond [Biol]* 1964;159:257–282.
377. Austrup F, Vestweber D, Borges E, et al. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflammed tissues. *Nature* 1997;385: 81–83.
378. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67:1033–1036.
379. Mackay C. Lymphocyte migration. A new spin on lymphocyte homing. *Curr Biol* 1995;5:733–736.
380. Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, et al. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 1995;80:413–422.
381. Bargatze RF, Jutila MA, Butcher EC. Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: The multistep model confirmed and refined. *Immunity* 1995;3:99–108.
382. Lub M, van Kooyk Y, Figdor CG. Ins and outs of LFA-1. *Immunol Today* 1995; 16:479–483.
383. von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* 1995;82:989–999.
384. Erlandsen SL, Hasslen SR, Nelson RD. Detection and spatial distribution of the beta 2 integrin (Mac-1) and L-selectin (LECAM-1) adherence receptors on human neutrophils by high-resolution field emission SEM. *J Histochem Cytochem* 1993;41:327–333.
385. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: An update. *Annu Rev Immunol* 1997;15:675–705.
386. Webb S, Morris C, Sprent J. Extrathymic tolerance of mature T cells: Clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 1990;63:1249–1256.
387. Kawabe Y, Ochi A. Programmed cell death and extrathymic reduction of Vbeta8+ CD4+ T cells in mice tolerant to Staphylococcus aureus enterotoxin B. *Nature* 1991;349:245–248.
388. Choi Y, Lafferty JA, Clements JR, et al. Selective expansion of T cells expressing V beta 2 in toxic shock syndrome. *J Exp Med* 1990;172:981–984.
389. McHeyzer-Williams M, Davis MM. Antigen-specific development of primary and memory T-cells in vivo. *Science* 1995;268:106–111.
390. Maryanski JL, Jongeneel CV, Bucher P, Casanova JL, Walker PR. Single-cell PCR analysis of TCR repertoires selected by antigen in vivo: a high magnitude CD8 response is comprised of very few clones. *Immunity* 1996;4:47–55.
391. Rocha B, von Boehmer H. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 1991;251:1225–1228.
392. Kearney ER, Pape KA, Loh DY, Jenkins MK. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1994;1: 327–339.
393. Sprent J, von Boehmer H. Helper function of T cells depleted of alloantigen-reactive lymphocytes by filtration through irradiated F1 hybrid recipients. I. Failure to collaborate with allogeneic B cells in a secondary response to sheep erythrocytes measured in vivo. *J Exp Med* 1976;144:617–621.
394. Kelsoe G. The germinal center: A crucible for lymphocyte selection. *Semin Immunol* 1996;8:179–184.
395. Nakamura T, Kamogawa Y, Bottomly K, Flavell RA. Polarization of IL-4- and IFN-gamma-producing CD4+ T cells following activation of naive CD4+ T cells. J Immunol 1997;158:1085–1094.
396. Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 6065–6069.
397. Zimmermann C, Brduscha-Reim K, Blaser C, Zinkernagel RM, Pircher H. Visualization, characterization, and turover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts. *J Exp Med* 1996;183:1367–1375.
398. Ucker DS, Ashwell JD, Nickas G. Activation-driven T cell death. I. Requirements for de novo transcription and translation and association with genome fragmentation. *J Immunol* 1989;143:3461–3469.
399. MacDonald HR, Baschieri S, Lees RK. Clonal expansion precedes anergy and death of V beta 8+ peripheral T cells responding to staphylococcal enterotoxin B in vivo. *Eur J Immunol* 1991;21:1963–1966.
400. Lenardo MJ. Introduction: The molecular regulation of lymphocyte apoptosis. *Semin Immunol* 1997;9:1–5.
401. Green DR, Scott DW. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1994;6:476–487.
402. Marrack P, Hugo P, McCormack J, Kappler J. Death and T cells. *Immunol Rev* 1993;133:119–129.
403. Dixon FJ, Maurer PH. Immunologic unresponsiveness induced by protein antigens. *J Exp Med* 1955;101:245–250.
404. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 1993;362:758–761.
405. Russell JH, Rush B, Weaver C, Wang R. Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4409–4413.
406. Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 1993;5:625–630.
407. Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, et al. Fas transduces activation sig-

nals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med* 1993;178:2231–2235.
408. Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 1995;377: 348–351.
409. Kirberg J, Bruno L, von Boehmer H. CD4⁺8⁻ helps prevent rapid deletion of CD8⁻ cells after a transient response to antigen. *Eur J Immunol* 1993;23: 1963–1967.
410. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 1995;378:736–739.
411. Huang L, Soldevila G, Leeker M, Flavell R, Crispe IN. The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity* 1994;1:741–749.
412. Lamb JR, Skidmore BJ, Green N, Chiller JM, Feldmann M. Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. *J Exp Med* 1983;157:1434–1447.
413. Jenkins MK, Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1987;165:302–319.
414. Quill H, Schwartz RH. Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J Immunol* 1987;138: 3704–3712.
415. Sloan-Lancaster J, Evavold BD, Allen PM. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* 1993;363: 156–159.
416. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990;248:1349–1356.
417. Kang SM, Beverly B, Tran AC, Brorson K, Schwartz RH, Lenardo MJ. Transactivation by AP-1 is a molecular target of T cell clonal anergy. *Science* 1992;257: 1134–1138.
418. Miethke T, Vabulas R, Bittlingmaier R, Heeg K, Wagner H. Mechanisms of peripheral T cell deletion: Anergized T cells are Fas resistant but undergo proliferation-associated apoptosis. *Eur J Immunol* 1996;26:1459–1467.
419. Schwartz RH. T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol* 1997;9:351–357.
420. Bhandoola A, Cho EA, Yui K, Saragovi HU, Greene MI, Quill H. Reduced CD3-mediated protein tyrosine phosphorylation in anergic CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol* 1993;151:2355–2367.
421. Fields PE, Gajewski TF, Fitch FW. Blocked Ras activation in anergic CD4⁺ T cells. *Science* 1996;271:1276–1278.
422. Li W, Whaley CD, Mondino A, Mueller DL. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4⁺ T cells. *Science* 1996;271: 1272–1276.
423. Becker JC, Brabletz T, Kirchner T, Conrad CT, Brocker EB, Reisfeld RA. Negative transcriptional regulation in anergic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:2375–2378.
424. Arnold B, Schonrich G, Hammerling GI. Multiple levels of peripheral tolerance. *Immunol Today* 1992;14:12–14.
425. Rammensee HG, Kroschewski R, Frangoulis B. Clonal anergy induced in mature V beta 6⁺ T lymphocytes on immunizing Mls-1b mice with Mls-1a expressing cells. *Nature* 1989;339:541–544.
426. Perez VL, Parijs LV, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 1997;6:411–417.
427. Levitz SM, Mathews HL, Murphy JW. Direct antimicrobial activity of T cells. *Immunol Today* 1995;16:387–391.
428. Shaw AS, Dustin ML. Making the T cell receptor go the distance: Review a topological view of T cell activation. *Immunity* 1997;6:361–369.
429. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355–365.
430. Parker DC. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 1993;11: 331–360.
431. Kindred B, Shreffler DC. H-2 dependence of co-operation between T and B cells in vivo. *J Immunol* 1972;109:940–943.
432. Katz DH, Chiorazzi N, McDonald J, Katz LR. Cell interactions between histoincompatible T and B lymphocytes. Cooperative response between lymphocytes are controlled by genes in the I region of H-2 complex. *J Exp Med* 1975;141: 263–266.
433. Mitchison NA. The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. *Eur J Immunol* 1971;1:18–21.
434. Chesnut RW, Grey HM. Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. *J Immunol* 1981;126:1075–1079.
435. Rock KL, Benacerraf B, Abbas AK. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors. *J Exp Med* 1984;160: 1102–1113.
436. Tony HP, Phillips NE, Parker DC. Role of membrane immunoglobulin (Ig) crosslinking in membrane Ig-mediated, major histocompatibility-restricted T cell-B cell cooperation. *J Exp Med* 1985;162:1695–1708.
437. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 1985;314:537–539.
438. Simitsek PD, Campbell DG, Lanzavecchia A, Fairweather N, Watts C. Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J Exp Med* 1995;181:1957–1963.
439. Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhlmann JE, Noelle RJ. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* 1996;14:591–617.
440. Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 1993;259:990–993.
441. Korthauer U, Graf D, Mages HW, et al. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993;361: 539–541.
442. Di Santo JP, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Fischer A, de Saint Basile G. CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993;361: 541–543.
443. Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, et al. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 1993;72:291–300.
444. Renshaw BR, Fanslow WC, Armitage RJ, et al. Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J Exp Med* 1994;180:1889–1900.
445. Xu J, Foy TM, Laman JD, et al. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* 1994;1:423–431.
446. Kawabe T, Naka T, Yoshida K, et al. The immune responses in CD40-deficient mice: Impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1994;1:167–178.
447. Coutinho A. The theory of the "One nonspecific signal" model for B cell activation. *Transplant Rev* 1975;23:49–65.
448. Fulcher DA, Lyons AB, Korn SL, et al. The fate of self-reactive B cells depends primarily on the degree of antigen receptor engagement and availability of T cell help. *J Exp Med* 1996;183:2313–2328.
449. Kepron MR, Chen YW, Uhr JW, Vitetta ES. IL-4 induces the specific rearrangement of gamma 1 genes on the expressed and unexpressed chromosomes of lipopolysaccharide-activated normal murine B cells. *J Immunol* 1989;143: 334–339.
450. Rothman P, Li SC, Gorham B, Glimcher L, Alt F, Boothby M. Identification of a conserved lipopolysaccharide-plus-interleukin-4-responsive element located at the promoter of germ line epsilon transcripts. *Mol Cell Biol* 1991;11:5551–5561.
451. Takatsu K. Interleukin-5. *Curr Opin Immunol* 1992;4:299–306.
452. Poo WJ, Conrad L, Janeway CA Jr. Receptor-directed focusing of lymphokine release by helper T cells. *Nature* 1988;332:378–380.
453. Kupfer A, Mosmann TR, Kupfer H. Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:775–779.
454. Cher DJ, Mosmann TR. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol* 1987;138:3688–3694.
455. Kaufmann SH. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* 1993;11: 129–163.
456. Poenie M, Tsien RY, Schmitt-Verhulst AM. Sequential activation and lethal hit measured by $[Ca^{2+}]i$ in individual cytolytic T cells and targets. *EMBO J* 1987;6: 2223–2232.
457. Liu CC, Walsh CM, Young JD. Perforin: Structure and function. *Immunol Today* 1995;16:194–201.
458. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 1995;377:446–448.
459. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* 1996;14:207–232.
460. Yasukawa M, Utsunomiya Y, Inoue Y, Kimura N, Fujita S. Monoclonal proliferation of CD4⁻ large granular lymphocytes with cytolytic activity. *Br J Haematol* 1995;91:419–420.
461. Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Picha KS, Kennedy MK, Lynch DH. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand an to undergo activation-induced cell death. *Int Immunol* 1994;6:1545–1553.
462. Stalder T, Hahn S, Erb P. Fas antigen is the major target molecule for CD4⁺ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1994;152:1127–1133.
463. Williams NS, Engelhard VH. Identification of a population of CD4⁺ CTL that utilizes a perforin- rather than a Fas ligand-dependent cytotoxic mechanism. *J Immunol* 1996;156:153–159.
464. Bluestone JA, Khattri R, Sciammas R, Sperling AI. TCR gamma delta cells: A specialized T-cell subset in the immune system. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1995;11: 307–353.
465. Mombaerts P, Arnoldi J, Russ F, Tonegawa S, Kaufmann SH. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature* 1993;365:53–56.
466. Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kaufmann SH. Protective role of gamma/delta T cells and alpha/beta T cells in tuberculosis. *Eur J Immunol* 1995; 25:2877–2881.
467. Hiromatsu K, Yoshikai Y, Matsuzaki G, et al. A protective role of gamma/delta T cells in primary infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *J Exp Med* 1992;175:49–56.
468. Pfeffer K, Schoel B, Gulle H, Kaufmann SH, Wagner H. Primary responses of human T cells to mycobacteria: A frequent set of gamma/delta T cells are stimulated by protease-resistant ligands. *Eur J Immunol* 1990;20:1175–1179.
469. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, et al. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8175–8179.
470. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, et al. *Stimulation of human gamma delta T*

cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 1994;264:267–270.
471. Schild H, Mavaddat N, Litzenberger C, et al. The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell* 1994;76:29–37.
472. Weintraub BC, Jackson MR, Hedrick SM. Gamma delta T cells can recognize nonclassical MHC in the absence of conventional antigenic peptides. *J Immunol* 1994;153:3051–3058.
473. Boismenu R, Hobbs MV, Boullier S, Havran WL. Molecular and cellular biology of dendritic epidermal T cells. *Immunology* 1996;8:323–331.
474. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, et al. Lymphotactin: A cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994;266:1395–1399.
475. Boismenu R, Feng L, Xia YY, Chang JC, Havran WL. Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J Immunol* 1996;157:985–992.
476. Boismenu R, Havran WL. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science* 1994;266:1253–1255.
477. Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, et al. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:6147–6151.
478. Moingeon P, Jitsukawa S, Faure F, et al. A gamma-chain complex forms a functional receptor on cloned human lymphocytes with natural killer-like activity. *Nature* 1987;325:723–726.
479. Cron RQ, Gajewski TF, Sharrow SO, Fitch FW, Matis LA, Bluestone JA. Phenotypic and functional analysis of murine CD3$^+$, CD4$^-$, CD8$^-$ TCR-gamma delta-expressing peripheral T cells. *J Immunol* 1989;142:3754–3762.
480. Horner AA, Jabara H, Ramesh N, Geha RS. Gamma/delta T lymphocytes express CD40 ligand and induce isotype switching in B lymphocytes. *J Exp Med* 1995;181:1239–1244.
481. Wen L, Pao W, Wong FS, et al. Germinal center formation, immunoglobulin class switching, and autoantibody production driven by "non alpha/beta" T cells. *J Exp Med* 1996;183:2271–2282.
482. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1$^+$ T lymphocytes. *Science* 1995;268:863–865.
483. Cardell S, Tangri S, Chan S, Kronenberg M, Benoist C, Mathis D. CD1-restricted CD4$^+$ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J Exp Med* 1995;182:993–1004.
484. Bendelac A, Rivera MN, Park S-H, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: Development, specificity, and function. *Ann Rev Immunol* 1997;15:535–562.
485. Chen Y-H, Chiu NM, Mandal M, Wang N, Wang C-R. Impaired NK1- T cell development and early Il-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity* 1997;6: 459–467.
486. Mendiratta SK, Martin WD, Hong S, Boesteanu A, Joyce S, van Kaer L. CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 1997;6:469–477.
487. Green DR, Webb DR. Saying the "S" word in public. *Immunol Today* 1993;14: 523–525.
488. Bloom BR, Salgame P, Diamond B. Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol Today* 1992;13:131–136.
489. Allison JP, Krummel MF. The yin and yang of T cell costimulation. *Science* 1995;270:932–933.
490. Ferrini S, Cambiaggi A, Meazza R, et al. T cell clones expressing the natural killer cell-related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotypic properties and p58 function. *Eur J Immunol* 1994;24:2294–2298.
491. Phillips JH, Gumperz JE, Parham P, Lanier LL. Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes. *Science* 1995;268:403–405.
492. Powrie F. T cells in inflammatory bowel disease: Protective and pathogenic roles. *Immunity* 1995;3:171–174.
493. Offner H, Hashim GA, Vandenbark AA. T cell receptor peptide therapy triggers autoregulation of experimental encephalomyelitis. *Science* 1991;251:430–432.
494. Qin S, Cobbold SP, Pope H, et al. "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 1993;259:974–977.
495. Zinkernagel RM, Bachmann MF, Kundig TM, Oehen S, Pirchet H, Hengartner H. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 1996;14:333–367.
496. Gray D. Immunological memory. *Annu Rev Immunol* 1993;11:49–77.
497. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: Understanding their relation. *Science* 1996;272:54–60.
498. Sprent J. Immunological memory. *Curr Opin Immunol* 1997;9:371–379.
499. Zheng B, Xue W, Kelsoe G. Locus-specific somatic hypermutation in germinal centre T cells. *Nature* 1994;372:556–559.
500. Demkowicz WE Jr, Littaua RA, Wang J, Ennis FA. Human cytotoxic T-cell memory: Long-lived responses to vaccinia virus. *J Virol* 1996;70:2627–2631.
501. Sanders ME, Makgoba MW, June CH, Young HA, Shaw S. Enhanced responsiveness of human memory T cells to CD2 and CD3 receptor-mediated activation. *Eur J Immunol* 1989;19:803–808.
502. Byrne JA, Butler JL, Cooper MD. Differential activation requirements for virgin and memory T cells. *J Immunol* 1988;141:3249–3257.
503. Croft M, Bradley LM, Swain SL. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* 1994;152:2675–2685.
504. Farber DL, Luqman M, Acuto O, Bottomly K. Control of memory CD4 T cell activation: MHC class II molecules on APCs and CD4 ligation inhibit memory but not naive CD4 T cells. *Immunity* 1995;2:249–259.
505. Bruno L, Kirberg J, von Boehmer H. On the cellular basis of immunological T cell memory. *Immunity* 1995;2:37–43.
506. Pihlgren M, Dubois PM, Tomkowiak M, Sjögren T, Marvel J. Resting memory CD8$^+$ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *J Exp Med* 1996;184:2141–2151.
507. Roost HP, Charan S, Zinkernagel RM. Analysis of the kinetics of antiviral memory T help in vivo: Characterization of short lived cross-reactive T help. *Eur J Immunol* 1990;20:2547–2554.
508. Gray D, Matzinger P. T cell memory is short-lived in the absence of antigen. *J Exp Med* 1991;174:969–974.
509. Oehen S, Waldner H, Kundig TM, Hengartner H, Zinkernagel RM. Antivirally protective cytotoxic T cell memory to lymphocytic choriomeningitis virus is governed by persisting antigen. *J Exp Med* 1992;176:1273–1281.
510. Tough DF, Sprent J. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med* 1994;179:1127–1135.
511. Bruno L, von Boehmer H, Kirberg J. Cell division in the compartment of naive and memory T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1996;26:3179–3184.
512. Bunce C, Bell EB. CD45RC isoforms define two types of CD4 memory T cells, one of which depends on persisting antigen. *J Exp Med* 1997;185:767–776.
513. Swain SL. Generation and in vivo persistence of polarized Th1 and Th2 memory cells. *Immunity* 1994;1:543–552.
514. Gallichan WS, Rosenthal KL. Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization. *J Exp Med* 1996; 184:1879–1890.
515. Hou S, Hyland L, Ryan KW, Portner A, Doherty PC. Virus-specific CD8$^+$ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature* 1994;369:652–654.
516. Lau LL, Jamieson BD, Somasundaram T, Ahmed R. Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* 1994;369:648–652.
517. Mullbacher A. The long-term maintenance of cytotoxic T cell memory does not require persistence of antigen. *J Exp Med* 1994;179:317–321.
518. Selin LK, Nahill SR, Welsh RM. Cross-reactivities in memory cytotoxic T lymphocyte recognition of heterologous viruses. *J Exp Med* 1994;179:1933–1943.
519. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124:619–626.
520. Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994;77:477–478.
521. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356: 397–400.
522. Cyster JG, Hartley SB, Goodnow CC. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature* 1994;371: 389–395.
523. Tanchot C, Rocha B. The peripheral T cell repertoire: Independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8$^+$ T cell pools. *Eur J Immunol* 1995;25: 2127–2136.
524. George AJ, Ritter MA. Thymic involution with ageing: Obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today* 1996;17:267–272.
525. Rocha B, Dautigny N, Pereira P. Peripheral T lymphocytes: Expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *Eur J Immunol* 1989;19:905–911.
526. Sprent J, Schaefer M, Hurd M, Surh CD, Ron Y. Mature murine B and T cells transferred to SCID mice can survive indefinitely and many maintain a virgin phenotype. *J Exp Med* 1991;174:717–728.
527. von Boehmer H, Hafen K. The life span of naive alpha/beta T cells in secondary lymphoid organs. *J Exp Med* 1993;177:891–896.
528. Mclean AR, Michie CA. In vivo estimates of division and death rates of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3707–3711.
529. Boise LH, Minn AJ, June CH, Lindsten T, Thompson CB. Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5491–5495.
530. Tough DF, Borrow P, Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* 1996;272:1947–1950.
531. Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1995;155:3711–3715.
532. Takeda S, Rodewald HR, Arakawa H, Bluethmann H, Shimizu T. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4$^+$ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 1996;5:217–228.
533. Tanchot C, Lemonnier FA, Pérarnau B, Freitas AA, Rocha B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science* 1997;276:2057–2058.
534. Heilig JS, Tonegawa S. Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature* 1986;322:836–839.
535. Sprent J. Role of H-2 gene products in the function of T helper cells from normal and chimeric mice in vivo. *Immunol Rev* 1978;42:108–137.
536. Yasutomo K, Maeda K, Hisaeda H, Good RA, Kuroda Y, Himeno K. The Fas-deficient SCID mouse exhibits the development of T cells in the thymus. *J Immunol* 1997;158:4729–4733.

第 12 章　T 淋巴细胞活化

Arthur Weiss[①]

411　免疫系统发展出了一套弹性的动态机制,以便对范围很广的各种抗原做出特异性的应答。为了对抗原的挑战做出反应,抗原特异性淋巴细胞不仅要识别抗原,并且这种识别必需被转换成信号转导事件以触发细胞反应。T 淋巴细胞与 B 淋巴细胞代表了机体抗原特异性免疫系统的两大细胞组成。静止 T 细胞的活化是大多数免疫应答的关键,并且活化的细胞将发挥它们的调节或效应功能。在活化过程中,这些处于 G_0 期、相对静止的 T 细胞发生了复杂的变化并最终导致细胞的分化和增殖。

由于每个 T 细胞表达单一抗原特异性的 T 细胞抗原受体(TCR),特定的抗原只活化一小部分 T 细胞亚群(克隆选择)。这就要求抗原反应性 T 细胞有一个克隆扩增过程,并在扩增中获得分化的能力。但是,T 淋巴细胞活化实际上是 T 细胞与抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)表面多种配基-受体相互作用的结果。总之,这些相互作用触发了细胞内生物化学事件并以产生细胞应答而达到反应的顶点。

这一点是十分清楚的,即 T 淋巴细胞和 APC 表面多种不同的分子均可参与抗原呈递过程中复杂的细胞与细胞相互作用。图 12.1 中描述了部分这些细胞表面分子。对于特异性 T 细胞应答而言,抗原诱导的 T 淋巴细胞活化必须由 TCR 介导。TCR 的配基是一个与同源的主要组织相容性复合体(MHC)分子相结合的、短的抗原肽片段,它由大分子蛋白质水解而来(参见第 8、9 章)。抗原受体由多条肽链组成,它们至少由 6 个基因编码产生(图 12.2)。大多数 T 细胞的 TCR 含有一个二硫键连接的 Tiα/β 异二聚体,该分子负责抗原识别

① A. Weiss: Department of Medicine, Howard Hughes Medical Institute, University of California, San Francisco, San Francisco, CA 94143.

(参见第10章)。有一小部分T细胞亚群以Tiγ/δ异二聚体识别抗原,它们主要在上皮组织中专职行使免疫应答。Tiαβ或Tiγδ异二聚体与ζ以及CD3γ、δ以及ε基因编码的多肽链非共价结合,后者负责偶联受体与胞内信号转导分子[1~3](见后文)。

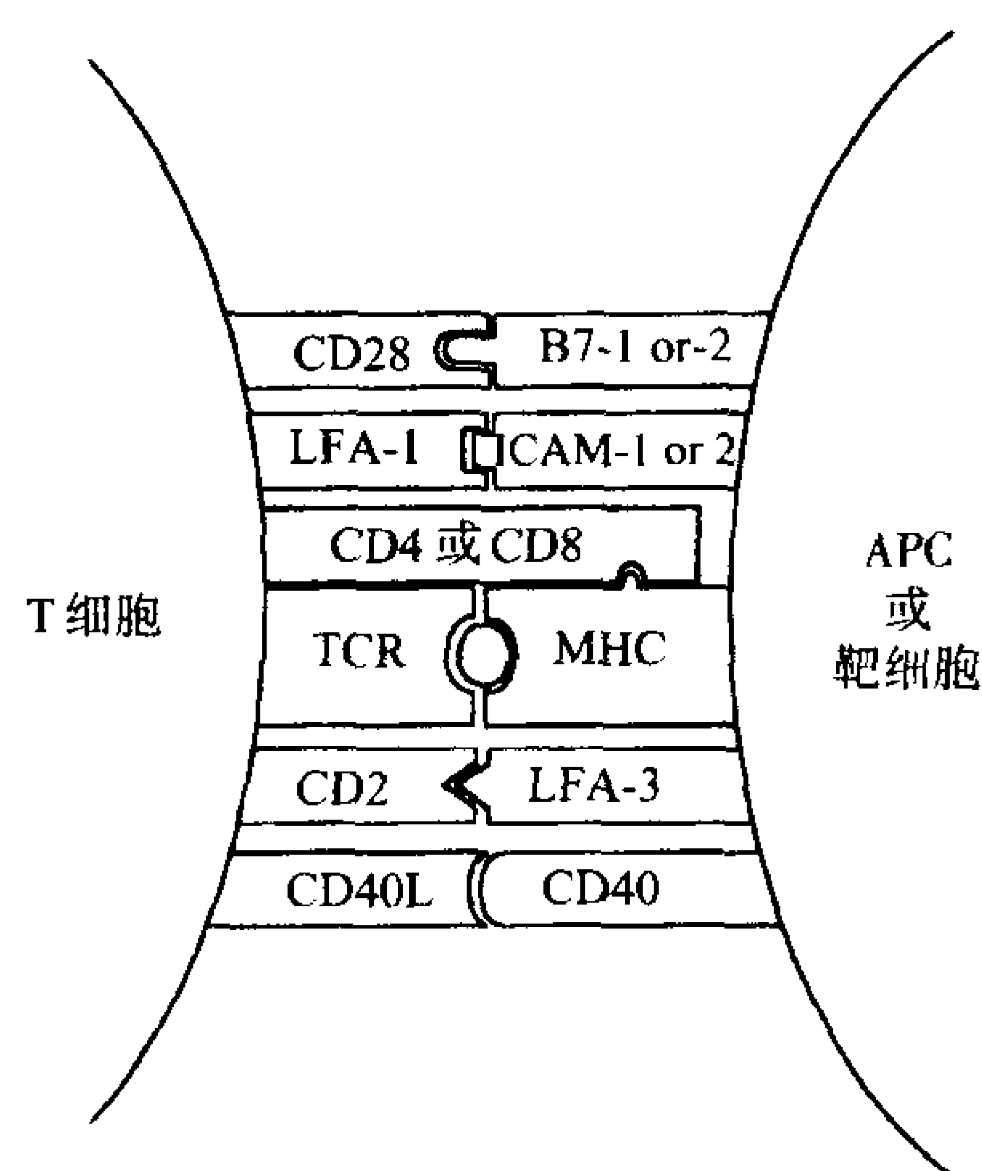


图12.1 图中显示在T细胞与抗原呈递细胞或靶细胞相互作用时,细胞表面一些配体-受体的相互作用。

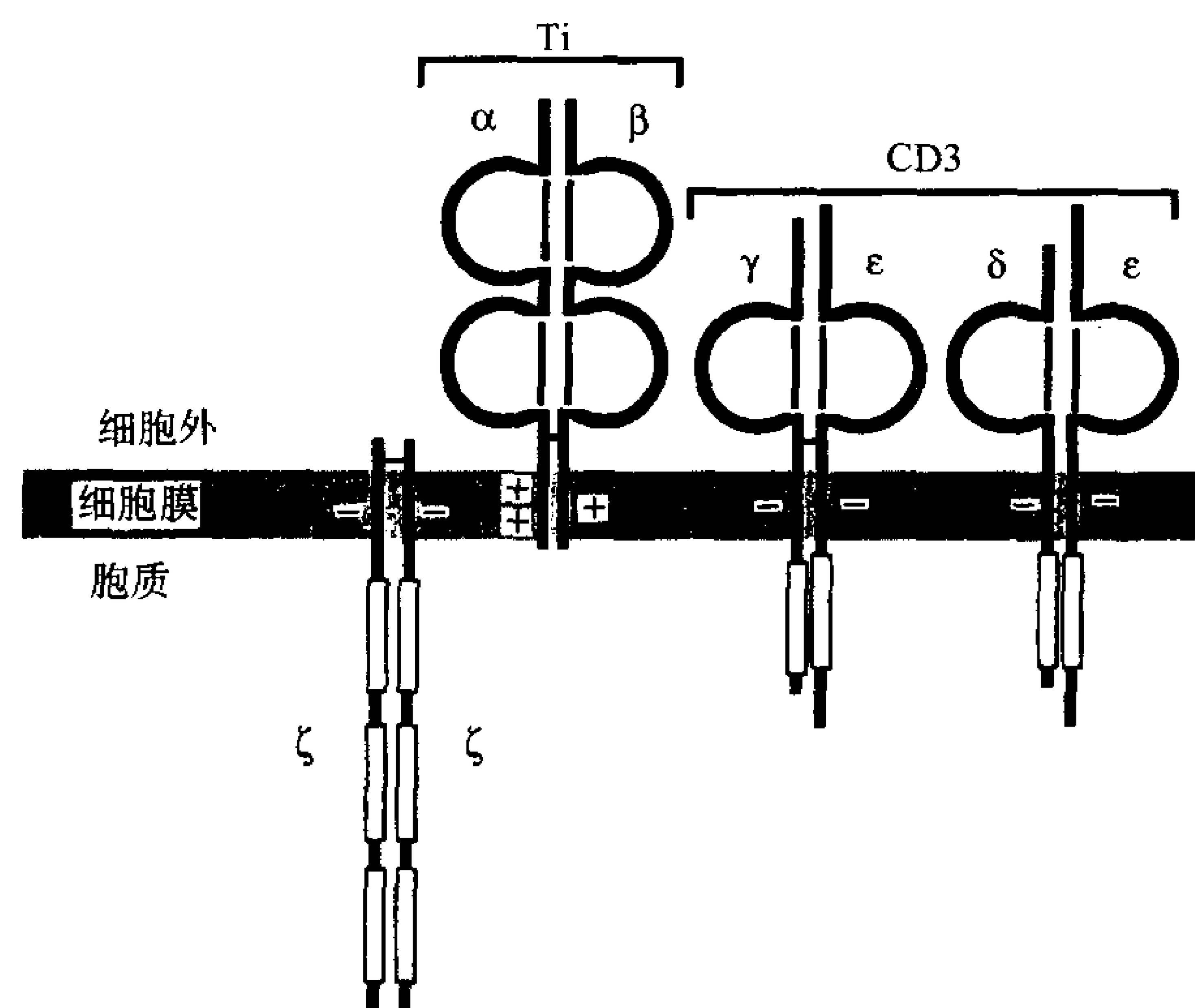


图12.2 T细胞抗原受体。图中所示的抗原结合亚基由α/β异二聚体Ti组成,并且它与恒定的CD3和ζ链相结合。质膜内的酸性和碱性氨基酸残基在图中标出。矩形框代表胞质区与胞质酪氨酸蛋白激酶相互作用的基序(见图12.3)。

抗原介导的TCR刺激提供首要的活化触发信号。单独刺激纯化的静止G_0期T细胞的TCR并不能诱导天然静止T细胞发生增殖反应,但是可以诱导分化程度较高的T细胞亚群活化或诱导无反应状态的产生,后者称为T细胞"无反应性"[4]。在APC与T细胞最初相互作用的抗原特异性事件中,表达于T细胞表面的其他表面分子与它们相应的配基结合,在抗原特异性活化中发挥辅助分子的作用。这些辅助分子在触发细胞活化方面有以下几方面的贡献,包括:①发挥黏附分子功能,增强T细胞和APC的相互作用(如LFA-1和CD2);②修饰抗原受体的跨膜信号(如CD4和CD8);③触发其自身的跨膜信号事件,这些信号与TCR转导的信号明显不同,但也是细胞应答所必需的(如CD28和白细胞介素-1受体)。这些后续的信号转导事件是第二信号,或称为共刺激信号,是静止T细胞活化所必需的。在第13章中将对这些辅助分子的结构和功能进行详细的讨论。

412

TCR与其配体或共刺激受体与其配体相互作用,通过诱导信号产生并形成称为第二信使的细胞内生物介质而活化细胞。这些第二信使可以作为生物化学信号,触发或影响细胞反应。在静止T细胞中,这些信号影响特异反应基因的表达调控,使其转变为转录活化或非活化状态。在分化的效应性T细胞中,这些信号可以触发细胞溶破机制活化,引起一个刺激偶联的分泌反应,导致与细胞溶破相关的蛋白分泌出胞,这些蛋白已预先合成并贮存于胞质中。

在T细胞活化过程中,触发信号转导的几分钟到几小时内早期反应即可发生,而其他的反应则要在刺激后几天才出现。早期细胞反应可能是TCR或其他受体介导信号转导的直接或间接的结果。在T细胞活化早期阶段,T细胞发生巨大的改变,以蛋白质磷酸化,膜脂质改变,离子流动,核酸变化,组成性表达的基因和新活化的基因RNA合成增加或减少,细胞体积增大(母细胞化)为特征。晚期细胞反应包括增殖,通常是一系列复杂的基因活化事件和这些基因产物相互影响的结果。例如,刺激TCR可以诱导静止的G_0期T细胞进入G_1期,后者表达淋巴因子受体,但进一步的细胞周期进程需要生长因子如IL-2和IL-4作用于相应的受体[5,6]。T细胞活化的过程代表了一个级联事件,其下游事件的发生依赖于上游分子的表达。静止T淋巴细

413

胞活化可有多种表现，主要有表达新的细胞表面分子，分泌一系列淋巴因子，细胞增殖、分化，甚至是程序性细胞死亡（凋亡）。所有或部分这些事件在活化的T细胞上出现，并且活化的T细胞可表现为以某一特定的反应为主。

研究T细胞活化的实验模型

主要兴趣集中在对诱导T细胞活化所需条件的研究上。最初人们关注的是在抗原刺激静止的，未被刺激过（初始）的T细胞活化过程中首要的细胞和分子相互作用。但是，抗原诱导的T细胞活化的许多特征阻碍了这一分析。首先，研究T细胞与呈递于APC表面的抗原的相互作用中包含了细胞与细胞的相互作用。由于刺激配基和TCR的复杂性，使得这一相互作用非常难于研究。另外在细胞-细胞相互作用中，其他胞膜蛋白的多种分子间配-受体结合事件中也存在着不确定性（图12.1）。第二，对于一个给定抗原，抗原特异性反应性T细胞的丰度是非常低的，大约占天然T细胞的几千到上万分之一。第三，不同的反应性T细胞亚群对于活化可有不同的要求，或者以不同的形式发生反应，而且这些T细胞亚群从组织或血中分离而来，与难于完全去除的非T细胞混杂在一起，这些非T细胞可能对触发活化发挥很明显的作用。第四，反应性T细胞的来源影响着它们对活化的要求——新鲜分离的初始G_0期T细胞对活化的要求比T细胞株、克隆或杂交瘤要高得多。第五，反应的结果可能并不反映最初的刺激，而可能是对其他反应细胞亚群的产物发生反应的结果（如淋巴因子）。最后，这些固有的不确定性被实验中多种用于辅助T细胞活化的实验条件进一步复杂化。T细胞活化的检测参数包括：①早期信号转导事件，如蛋白酪氨酸磷酸化或细胞内游离Ca^{2+}浓度（$[Ca^{2+}]_i$）增高，虽然它们并不是介导细胞反应所必需的；②T细胞表达新的细胞表面活化抗原，包括IL-2受体的一条多肽链（CD25），转铁蛋白受体，MHCⅡ类分子和CD69，后者是一个目前尚不知其功能的分子；③产生淋巴因子如IL-2或IL-4；④细胞增殖；⑤细胞毒性功能活化。

反应性T细胞和抗原呈递细胞

为了避开在研究抗原诱导T细胞活化过程中复杂的相互作用所面临的固有的困难，人们发展了模式系统以将细胞相互作用和刺激配基的作用简单化。包括T细胞克隆，杂交瘤，白血病细胞株在内的T细胞群被应用于研究中。使用这些模型的好处在于它们代表了均一的，克隆化的细胞群体，可以大量获得，并且具有鉴定清楚的抗原受体和抗原应答。但准确地说，这些特性以及永生性、其他不同的特性，决定了我们不能将全部的结果外推至静止的初始T细胞上。为了避免这些问题，研究者转而依赖从复杂的混合细胞中制备纯化的T细胞。如前面讨论中提到的，这些研究的主要缺点是分离过程所面临的困难和纯化细胞群体中决定细胞纯度的细胞组成。含有表达单特异性TCR T细胞的转基因小鼠的发展极大地促进了这方面的研究。

最常用的APC模型是B细胞株或由外周血中分离的单核细胞或脾细胞。目前强调得更多是对树突细胞的研究，因为这些细胞似乎是最强效的APC（见第9、16章）。这些细胞群在呈递和（或）处理抗原上的差异已知道得很清楚[8]。进一步要考虑的问题是APC如何参与T细胞活化这一过程。APC功能的另一个不同点是仅有部分而不是全部细胞有提供共刺激信号的能力[9,10]。另外，许多肿瘤细胞株和淋巴瘤可作为靶细胞呈递抗原给活化的细胞毒性T细胞。人们应用单层脂质膜或包被脂质的珠与有限数量的纯化蛋白组装在一起刺激T细胞克隆和杂交瘤、而避免应用完整的细胞进行研究，以进一步简化APC上的配基[11,12]。为了获得足够高的亲合力，可能需要固相化结合高浓度的配体分子，因为在液相中TCR与MHC结合肽或辅助分子与它们的配基的亲和力极低，通常在微摩尔水平[13]。

通过运用基因转染获得转染的细胞株、转基因小鼠以及同源重组的缺陷小鼠，人们探索了膜表面分子在T细胞活化中的作用。人们在多种功能性T细胞或APC表面表达这些分子，而它们在天然状态下是不表达的。通过这样的方法建立的新细胞模型被用于检测分子的功能。对特定基因缺失小鼠体内T细胞和APC的发育过程的研究为分析分子在T细胞活化中的作用提供了重要的资料。检测转染的突变或嵌合分子的功

能是这一方法的进一步复杂应用,它们显示了遗传学分析的强大能力。

刺激物:复杂的抗原和肽

在对T细胞活化的早期研究中人们检测了不均一细胞群体对复杂的细胞或可溶性抗原的应答。人们努力将应答细胞的特性以及刺激抗原简单化。表达在细胞上的同种抗原受到极大的关注,因为它们代表了这样一类抗原,即其抗原反应性T细胞前体丰度足够多,以致在初次抗原刺激后即出现可以检测得到的反应。过去人们经常应用具抗原性差异的同种细胞,目前更新的研究主要应用转染表达同种克隆分子的细胞或培育的转基因小鼠,后者的T细胞表达同种特异性TCR,更进一步的复杂应用还包括使用转染的同种嵌合分子[14]。

414

研究同种抗原的应答必然涉及到使用将抗原作为一个整合膜分子表达的细胞。在这样的研究中,其他细胞膜蛋白的贡献或同种抗原参与活化事件的程度远未明确。由于强调这样的不确定性,有人用结合了纯化的MHC分子的单层脂质膜或脂质包被珠进行研究[11,15]。来源于原蛋白序列的可溶性合成肽能够作为致敏细胞或纯化MHC分子的激动剂或拮抗剂[16]。通过将均一的多肽与MHC分子相结合再与细胞相互作用,这种方法使得同种抗原的操作与可溶性抗原一样简便。

另一广泛应用的刺激抗原是已查明的、APC呈递的可溶性蛋白。应用这类可溶性抗原的一个主要限制在于脾脏、淋巴结或血液中抗原反应性T细胞的低频度,并进而导致研究初始应答困难。但通过同源的抗原反应性T细胞克隆、杂交瘤以及来源于TCR转基因小鼠的T细胞的应用,可溶性抗原应答的研究得到极大促进。由复杂抗原序列预测并制备的合成肽现在已得到广泛应用。通过应用肽转运缺陷细胞,现在获得接近100%纯的MHCⅠ类分子-肽复合物已成为可能[17]。在这些条件下,合成肽弥补了MHC分子的不稳定性表达。另外,在APC的MHC分子上装载制备的纯化抗原肽为研究T细胞活化中的生物化学事件提供了极大的便利。

刺激物:超抗原

细菌和病毒的产物包括细菌外毒素的独特群体,能够活化大量T细胞,被称为超抗原(见第9、41章)。这些超抗原由于能与肽-MHC结合位点之外的TCR V_β 区域结合而刺激T细胞活化[18,19]。产生的后果是5%~20%的T细胞被这些超抗原刺激活化。如此大量的T细胞活化在体内常常导致疾病(如中毒性休克综合征和食物中毒)[18]。传统的抗原肽与MHC分子的抗原结合沟槽相结合,而超抗原则与MHC肽结合位点以外的部位结合,且不需要抗原加工。虽然作为大量T细胞的活化物,超抗原在体内可能产生严重的后果,但它们在体外研究中非常有用。因为它们与传统抗原活化T细胞的模式相近,虽然可能并不完全相同[20~23]。

刺激物:凝集素

多种不同的试剂被用于替代抗原-MHC分子。许多如此的刺激物能以多克隆的方式活化T细胞,从而解决了研究复杂的多克隆T细胞群体时只有少量抗原特异性反应细胞这一困难。在这些试剂中,几种凝集素可与多种糖链群相结合[24]。这些凝集素是植物来源的蛋白质,其中植物血凝素(PHA),刀豆蛋白A(Con A)和美洲商陆(PWM)是首先被鉴别出的T细胞多克隆活化剂[25]。由于能诱导增殖反应,它们属于被称为"丝裂原"的一类试剂。除T细胞以外,它们还可与众多细胞质膜上的众多糖蛋白相结合。与它们在B细胞上的效应相比,Con A和PHA是选择性的T细胞丝裂原,而PWM是T细胞和B细胞两者的丝裂原[24]。凝集素的相对选择性丝裂原作用不依赖于它们对特定细胞群的特异性结合,而是反映了各种细胞表达的多种糖蛋白的糖基异质性。这些丝裂原对T细胞的活化效应依赖于它们结合并交联T细胞表面分子,而这些分子正是生理条件下介导T细胞活化的相关受体。对PHA和ConA的研究提示它们能与组成TCR的多肽链相结合[26],并且它们的活化效应依赖于TCR的表达和功能[27]。但应该强调的是,它们的效应是这些凝集素与细胞表面包括TCR在内的大量不同的分子结合所产生效应的总和。尽管其作用是这样一种异质性的相互作用,Con A刺激初始T细胞和静止T细胞克隆仍需共刺激信号[28]。

刺激物：单克隆抗体

以单克隆抗体(monocolonal antibody,mAb)作为特异性探针研究特定的T细胞膜表面分子功能为研究T细胞活化带来极大的便利。这些mAb被用作激动剂或拮抗剂以模拟或阻断T细胞与APC或靶细胞之间的相互作用。在这些mAb中,有的与TCR的Ti或CD3亚基反应,它们被用于模拟抗原肽-MHC的刺激效应或阻断抗原肽-MHC与TCR的结合。可与T细胞表面其他分子反应的mAb也被用于多种实验模型中,以探讨T细胞或APC表面的其他分子是否参与T细胞活化。在这一方案上稍加变化,用连接T细胞或APC表面分子胞外区的免疫球蛋白融合蛋白,这就可以获得比用mAb更接近生理状态的分子间相互作用。通过这些方法,人们鉴定出一大批T细胞和APC表面分子,它们直接参与触发T细胞活化或在活化过程中起调节作用。

在解释这些仅仅依赖于mAb或融合蛋白的研究时必须谨慎,因为这些试剂的结合在表位特异性、亲合力或效价上可能并不能真正模拟生理性配基的结合事件。mAb的非抗原结合部分也可能影响mAb的作用,研究得较清楚的是抗CD3 mAb通过其Fc受体固化至培养的黏附细胞是其对T细胞发挥丝裂原效应的关键[29]。mAb的激动或拮抗效应可能并不完全模拟或阻断生理配基的作用,还可能发挥它们自身独有的作用,415 因此对受体生理作用的困惑就进一步增加了。例如,对CD2而言,与这一受体结合的mAb可表现为激动或拮抗效应,取决于不同的实验模型和特异性单抗株的使用[30~32]。另外,特定的mAb可以广泛地交联细胞表面能与该mAb反应的分子,这是这些分子的生理性配基不可能模拟的。除了这些值得注意的问题以外,已证明在研究T细胞活化过程中T细胞和APC可能发生的复杂的分子间相互作用时,应用mAb不能解决这方面面临的问题。

药理试剂

药理试剂能模拟或抑制与T细胞活化相关联的一些细胞内事件,从而可被用作探针以研究这些事件在触发细胞活化中的重要性。值得注意的是可以增加胞质游离钙浓度的钙通道载体A23187和可以活化蛋白激酶C(PKC)的佛波酯,两者可以协同地诱导在T细胞活化过程中发生的多种基因表达活化和细胞增殖反应[33,34]。应用这些试剂模拟配基结合TCR后相关联的事件,对理解TCR的信号转导功能有帮助(见下文)。

表 12.1 应用于T细胞活化研究的抑制剂

抑制剂	靶分子
新霉素	磷脂酰肌醇代谢
锂	磷酸肌醇磷酸酶
H7	蛋白激酶C
神经鞘氨醇	蛋白激酶C
Staurosporin	蛋白激酶C
Genestein	酪氨酸激酶
除莠霉素A	酪氨酸激酶
Tyrphostin	酪氨酸激酶
钒酸盐	酪氨酸磷酸酶
Phenylarsine 氧化物	酪氨酸磷酸酶(?)
EDTA	Ca^{2+}和Mg^{2+}
EGTA	Ca^{2+}
Dimethylamiloride	Na^{+}/H^{+}反向转运
糖皮质素	糖皮质激素受体;多种效应
环孢菌素A	钙调磷酸酶
FK506	钙调磷酸酶
雷帕霉素	mTor
渥曼青霉素	PI-3激酶
LY294002	PI-3激酶

许多药理试剂被用于抑制特定的细胞内事件或阻止特定的细胞反应。一些常用的抑制剂列于表12.1中。这些抑制剂的靶目标是多种多样的,并且常常不清楚。但是在一些条件下,这些抑制剂在评估一个特定的靶分子在细胞反应中的作用中十分有用,突出的例子是蛋白酪氨酸激酶抑制剂genestein和除莠霉素A(herbimycin A)提供了PTK调节T细胞中的磷酸肌醇途径最初的线索。

一些T细胞活化抑制剂可作为临床药物,有很大用途。如环孢霉素A(CsA)、(FK506)、雷帕霉素(rapmycin)和糖皮质素(glucocoritcoid)。CsA和FK506作用机制的体外研究鉴定出TCR调节信号转导途径中的以前未认识到的分子成分(见后文和第36章)。

应用抑制剂研究T细胞活化要求抑制剂具有特异性和低毒性。不幸的是,实践当中它们很少有理想的高度特异性和低毒性。但是,通过使用几种不同的药理抑制剂和激动剂,可以了解到许多有关T细胞活化的过程和事件。

虽然每种实验模型都有它的不确定性和限制,但通过这些实验方法我们仍了解到许多知识。这些实验系统提供了本章要讨论的及随后关于T细胞活化和细胞表面分子章节的许多基础内容。

T细胞活化所需的条件

抗原特异性T细胞活化是在非常复杂的细胞-细胞相互作用过程中触发的。APC上与MHC分子结合的抗原肽被T细胞表面抗原特异性TCR识别。此外,还有许多分子要参与反应,它们中的部分描述于图1中。TCR和其他细胞表面分子通过介导信号转导事件和提高T细胞-APC相互作用的总体亲合力而触发T细胞活化。已经积累的许多证据提示在初始T细胞当中为了诱导IL-2分泌和细胞增殖反应,除TCR以外至少还需一个分子作为共刺激受体来触发不同的信号转导事件。

T细胞活化的初始信号:需要或依赖TCR介导

很清楚,T细胞活化的中心是TCR,刺激TCR产生第一信号是活化静止T细胞所必需的。但是在合适的条件下,刺激细胞表面其他分子也可模拟TCR这一功能。其中研究最多的是CD2、CD28和小鼠系统中的Thy-1和Ly-6,这些分子可以介导与刺激TCR相同的信号转导事件[37,38]。除了CD2[39]和CD28[9]以外,其他膜表面分子的生理配基尚不清楚。因此,通过这些分子介导信号转导进而活化T细胞的生理重要性并不清楚。通常,对于非TCR分子介导这样一个第一活化信号而言,它们广泛的交联(通常用mAb)是必需的。生理性配基似乎难以达到这样的条件。另外,当配基表达相当广泛时,如CD2配基,如何调控这些分子介导的活化以使之处于对宿主有利的状态这一点仍不清楚。部分分子还可能具有更重要的功能,包括提高T细胞-APC相互作用的亲合力或介导其他不同的信号转导事件,例如在CD28分子中所阐明的[10]。更重要的是,这些非TCR分子触发第一活化信号依赖TCR分子的表达和功能,提示这些分子介导的信号与TCR调节的信号途径相汇聚[40~43]。这样在一些情况下,例如通过广泛交联介导的直接或间接物理性相互作用,TCR似乎负责介导来自这群分子信号转导事件,这与CD2介导的信号转导需要TCRζ链参与的研究结果相一致[44]。

416

在抗原诱导的T细胞活化中TCR有两种功能。首先,它必须结合APC表面特异性的肽-MHC分子复合物。第二,这一结合事件必须转化成一个跨膜信号转导事件,后者导致胞质信号机制活化,进而调节后续的细胞反应(TCR信号转导将在后面详细讨论)。以基因转染进行的研究清楚地显示,TCRα/β异二聚体包含了识别抗原肽-MHC分子所必需的信息。但是,肽-MHC结合α/β异二聚体后如何通过TCR结合的CD3和ζ链介导信号转导仍不完全清楚。对这一领域的兴趣正在不断增加,因为不同的或有微小改变的肽(altered peptide ligand, APL)与相同的MHC分子结合可以诱导TCR不同的信号转导事件[45~47]。分析研究APL对TCR信号转导的影响受到配基(如肽-MHC分子)的复杂性和在细胞-细胞相互作用中多种分子相互作用等因素的阻碍。不同的信号转导被归因于在肽-MHC识别中TCR形成不同的变构,TCR与辅助分子不同的相互作用以及这些分子间相互作用的结合-解离率不同[48,49]。

利用针对TCR不同链的mAb可以比较方便地研究TCR单独参与的信号转导。抗CD3或α/β异二聚体可变决定簇、恒定决定簇的不同单抗可作为激动剂用于触发T细胞活化[37]。在适当条件下,mAb通常需要固定于固相载体或结合至黏附细胞上的Fc受体。这些mAb可以诱导静止T细胞分泌淋巴因子(如IL-2、IFN-γ),表达多种新的膜表面分子(包括高亲和力IL-2R和CD69)和增殖。这些mAb也被用于活化T细胞克隆和肿瘤细胞株以产生淋巴因子,或诱导已分化的细胞毒性T淋巴细胞(cytolytic T-lymphocyte, CTL)细胞毒机制活化。有趣的是,与TCRαβ异二聚体的反应中,不同克隆的mAb作为激动剂活化T细胞的能力不同[50,51]。另外,以mAb选择性刺激Ti或CD3成分可产生不同的功能效应[52]。这些观察与使用嵌合TCR分子进行的研究一起,提示TCR不同的结构域和成分具有不同的信号转导功能。

T细胞活化所需的肽-MHC复合物或mAb的浓度很低,提示占用相对较少的受体——可能少于几百个就足已触发T细胞活化[53~57]。这与APC表面只有相对较少的抗原肽-MHC分子呈递相吻合。另一个可能就

是最近的研究显示，TCR-肽-MHC 相互作用具有相对较低的亲和力和较短的半衰期。一些实验结果提示，数量相对巨大的 TCR 可以被 APC 表面较少的肽/MHC 复合物连续占用，导致多量的 TCR 在它们内在化前很短的时间中结合配体并转导信号[58]。但是，当所用的是 mAb 时，只需较少部分的 TCR 被作用即可产生 T 细胞活化所需的足够信号。

与 CD3 或 α/βTi 相结合的单抗也可作为拮抗剂抑制 T 细胞和 APC 或靶细胞之间的抗原特异性相互作用。这些 mAb 在特定的实验模型中是作为激动剂还是作为拮抗剂取决于它们被应用的条件。固相化的抗 TCR mAb 通常产生一个激动剂效应，但它并非只能作为激动剂。这样的固相化可以阻止受体内在化并增强受体的交联。可溶性抗 TCR mAb 在实验中通常产生拮抗效应。

纯化的 MHC 分子与肽结合后用于刺激 T 细胞具有与单抗相同的作用特点，虽然以这种方式进行的实验不多。通常，产生任何诱导活化的反应需要将这些分子固化于塑料表面，或包被于脂质或其他的基质上[11,12]。这些纯化分子通常只能成功诱导杂交瘤或一些 T 细胞克隆的活化。静止的初始 T 细胞，即使来源于 TCR 转基因小鼠，也需要额外的条件方能活化[59]。由纯化的肽-MHC 复合物诱导的信号转导事件与抗 TCR mAb 相近但并不相同。

超抗原如链球菌外毒素或内源性小鼠乳腺肿瘤病毒染色体编码的 Mls 抗原，也被用于诱导 TCR 的第一信号产生[18]。细胞对这些超抗原发生反应依赖于超抗原与 MHCⅡ类分子和 TCR 上合适的 V_β 片段相作用。有趣的是，用这样的抗原刺激细胞可以产生多种不同的结果。在一些情况下，可以观察到 T 细胞出现多克隆增殖和产生淋巴因子的反应，但随后开始出现克隆排除和失能[60]。这种反应多样性产生的原因似乎取决于在形成炎症反应过程中，超抗原是否被呈递给了 T 细胞。但这种反应多样性并不是超抗原引起的特征性反应，因为传统抗原反应性 T 细胞在缺乏相应的炎症反应条件下也发生相同的细胞清除反应[62]　。对于超抗原引起的信号转导事件是否与由抗原或 mAb 介导的相同存在着一些争议[20,21,23,63,64]。但是这些细菌或病毒产物被证实是 TCR 的强有力刺激剂，并且也是超抗原研究的有用探针。

TCR 与配体结合并不足以完全活化 T 细胞。但是，在讨论 T 细胞活化所需的其他信号之前，必须首先对经 TCR 活化所检测的参数和被刺激的细胞群体作一个定义。例如，在单独刺激静止初始 T 细胞的 TCR 时，可以诱导 CD25(IL-2R 的 α 链)的表达，但此时检测不到细胞增殖反应[65,66]。这是因为，这些细胞产生淋巴因子 IL-2 受到更严密的调控并需要共刺激受体提供额外的刺激。因此，T 细胞增殖反应更多地受到 IL-2 产生的控制而不是 IL-2R 的表达。

417

抗原或 mAb 诱导静止 G_0 期 T 细胞产生 IL-2 和增殖依赖 APC 的几种功能，后者可影响第一信号的转导。在使用抗 TCR mAb 进行的研究中 APC 的部分功能被描述，其中之一似乎与通过 Fc 段与 Fc 受体的结合将 mAb 固化至 APC 表面有关[29,67]。APC 的这一功能可用结合至纤维素珠或塑料培养皿上的抗 TCR mAb 刺激 T 细胞代替。固化的 mAb 呈递给 T 细胞时可能与结合在细胞上的肽-MHC 作用相类似，这提示通过抗原肽-MHC 分子或 mAb 交联 TCR 或在局部形成高浓度对于触发活化很重要。这样的多聚化配基可以提高它们作用的效价和亲合力。另外，以固相化而非可溶性配基刺激可以防止 TCR 内在化，从而增加了刺激持续的时间和强度。

CD4 和 CD8 共同受体在第一活化信号中的作用

CD4 和 CD8 分子表达于 T 细胞表面，代表了含有 TCRαβ 的成熟 T 细胞的两个主要亚群(见第 11 章)。它们分别与 MHCⅠ类和Ⅱ类分子的非多态性位点相结合。通常 $CD4^+$ 细胞发挥辅助性 T 细胞功能并主要参与经内吞途径处理的抗原的免疫应答。与之相反，$CD8^+$ T 细胞主要是细胞毒性效应细胞，并且识别来源于内源性生物合成途径的肽[68]。共同受体的功能在于增加抗原识别时 TCR 对抗原反应的敏感性并且帮助来自 TCR 的第一活化信号产生。

CD4 和 CD8 是整合型膜糖蛋白，其结构方面的研究进行得非常充分[69]。CD4 的胞外区由 4 个串联的 Ig 结构域组成。两个远离膜的或更靠近 N 端的结构域与 MHCⅡ类分子的 β2 区域相作用，而靠近膜的两个 Ig

区域在同源寡聚化中发挥作用[70]。N端的两个Ig结构域还与人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的衣壳糖蛋白gp120相互作用。CD8在表达TCRαβ的T细胞上是一个由α和β链组成的异二聚体,但在TCRγδT细胞上也可以αα同二聚体形式表达。α链N端的Ig结构域与MHCⅠ类分子α结构域相结合[71,72]。目前仍不清楚CD8β链是否结合MHCⅠ类分子,前者的表达依赖CD8α链[73]。CD4和CD8与MHC分子的结合是毫摩尔水平、相对低亲和力的结合。但是,这些受体与MHC分子相识别的位置不涉及肽的识别,这就使得TCR和共同受体可以同时识别一个肽-MHC分子,这样可以增强四聚体复合物的稳定性[74,75]。因此,许多TCR,虽然不是全部,与抗原的功能性相互作用都依赖合适的CD4和CD8共同受体参与。不依赖共同受体的抗原反应通常是回忆反应和具有高亲和力TCR的T细胞。

CD4和CD8共同受体不但能帮助TCR与肽-MHC复合物形成更稳定的相互作用,它们还通过它们的胞内区与胞质PTK Lck相互作用而与胞内信号转导事件相联系。后面将对Lck在TCR信号途径中的功能进行详细的讨论。这里我们只关注其共同受体功能。

两种共同受体均可与Lck N端的一个区域通过配对的半胱氨酸残基以非共价结合形式相互作用[76,77],其中Lck与CD4的相互作用的亲和力高于CD8[78]。一些证据显示共同受体与Lck不同的相互作用可导致不同的信号转导事件[79,80]。这一模型可以解释在胸腺内发生的阳性选择导致不同的发育后果以及成熟T细胞的CD4和CD8亚群在功能上的差异。

TCR与两种共同受体共同结合同一配体,显著地增强了TCR的信号转导[81,82]。Lck对CD4和CD8功能的贡献是重要的,但在发育或高浓度抗原条件下Lck功能并不是有效的TCR信号转导所必需的。胸腺发育中Lck功能可以被略过,可能与高水平的共同受体占用有关[83]。Lck的作用可能是两方面的:一个是不依赖激酶活性的Lck分子功能,它可能在传导或增强共同受体与TCR-肽-MHC复合物相互作用中发挥作用[84]。事实上,CD4或CD8与MHC分子结合的强度受到TCR信号转导事件的调控,后者可以影响Lck的定位或与细胞骨架成分[85]、活化的TCR的相互作用[86,87]。这可导致四聚体复合物的形成和稳定。第二个功能是由激酶结构域介导的,共同受体通过该结构域向活化的TCR复合物传递信号[82,88]。这时,Lck的激酶结构域行使磷酸化关键底物的功能(见后文)。这两个功能可能是协调一致地,而不是独立地增加TCR识别抗原的整体敏感性。

无共同受体参与可以导致T细胞产生一个活化抑制信号,而CD4和CD8与MHC分子的结合已在大量过表达这些分子的细胞中得到了证实[89,90]。这种相互作用可能在TCR识别肽-MHC分子时自然地同时发生。但是,以抗CD4 mAb作为CD4的实验性配基预先作用于T细胞,当随后再刺激TCR时可导致T细胞凋亡发生[91]。在体内,这可能与HIV衣壳糖蛋白gp120与CD4的相互作用有关,当TCR随后被占用时细胞凋亡即可发生[92]。这一机制提示那些尚未得到证明的抑制事件。

在大多数初次免疫应答当中,CD4或CD8的参与是必需的。因此,通常用与CD4或CD8反应的mAb能够阻断T细胞亚群对相应抗原的初次应答,对再次应答则否。但是,是否依赖CD4或CD8分子的参与对于每一个T细胞个体而言是随不同克隆而不同的。对于CD4而言,它参与对抗原的应答不仅仅在于它的胞外区与MHCⅡ类分子相互作用,还在于它的胞质区域与Lck的相互作用[93],提示CD4结合MHC结构域和结合Lck PTK结构域的关键性作用。在这些研究中,这一点也表现得很清楚,即在CD4或CD8与MHC分子在抗原识别的相互作用中,必须是这些分子与将肽呈递给TCR的同一个MHC分子相结合。这至少包含了两种功能:首先,它帮助提高抗原识别复合物的整体亲合力。第二,它将Lck募集至受抗原刺激的TCR的邻近部位,使Lck可以调节这一相互作用。

418

辅助分子增加T细胞-APC相互作用的亲合力

已鉴定出几种非抗原依赖分子的相互作用可以提高T细胞与APC相互作用的整体亲合力,并参与组织复杂的细胞间相互作用。它们包括LFA-1(CD11a/CD18)与ICAM-1(CD54)或ICAM-2(CD102)[13,94];CD2与LFA-3(CD58)或CD59[95];CD4与MHCⅡ类分子或CD8与MHCⅠ类分子[96]。与TCR介导特异性的识别事件相反,这些抗原非依赖分子的相互作用以非特异的方式增加T细胞与APC的相互作用。

一般认为 TCR 与特异性肽-MHC 复合物的亲和力相对较低，大约在 10^{-5}mol/L 水平[97]。由于这一原因，并且由于在 T 细胞和潜在 APC 中可观察到非特异性细胞连接，人们设想 T 细胞首次与 APC 的相遇可能不是由抗原特异性识别介导的[13,98]。上面提及的部分分子的相互作用可能参与介导 T 细胞-APC 最初的非特异性连接形成。这种 T 细胞和 APC 之间非抗原特异性黏附可允许 TCR 寻找肽-MHC 分子，一旦形成足够数量的复合物，即可激发信号转导事件。这些信号转导事件不仅导致可引起 T 细胞活化的生化途径活化，并且增加其他几个辅助分子对的亲合力。这样一个由 TCR 介导的亲合力增加已在 LFA-1 和 ICAM-1[99]、CD2 和 LFA-3[100]、CD8 和 MHC Ⅰ类分子[12,85]的相互作用中观察到。这种亲合力增加可以帮助进一步稳定 T 细胞和 APC 间的相互作用并通过延长信号转导而促进 T 细胞活化。如果 TCR 在初次接触中未能遇到它特异性的抗原肽，就没有促进辅助分子亲合力增加的信号转导事件发生，这就使 T 细胞和 APC 在低亲合力相互作用的条件下解离，并使 T 细胞可以转而与其他的 APC 相互作用。关于这些辅助分子功能的更详尽讨论见第 13 章。

T 细胞活化需要共刺激信号

已经清楚，APC 表达的分子在触发 T 细胞活化中发挥多种作用。除了呈递抗原肽和黏附分子功能，由 APC 表达于细胞表面或分泌的分子所介导的额外的信号转导事件对于 T 细胞活化是必需的。后一种功能被称为共刺激功能[101]或共刺激信号。共刺激功能可确保识别的抗原肽是非己肽。这一点是通过静止 T 细胞的活化只能由专职 APC 如树突细胞，巨噬细胞或活化的 B 细胞呈递的抗原肽介导来完成的。这些专职 APC 组成型表达或由炎症刺激诱导表达 T 细胞表面共刺激受体的配基。

在去除了 APC 的黏附细胞群对静止 G_0 期 T 细胞或静止 Th1 型 T 细胞克隆应答的影响的研究中，共刺激功能首先被揭示。纯化的静止 T 细胞对丝裂原性凝集素、固相化的抗 TCR mAb 或装载抗原的固定的 APC（固定的 APC 不能提供共刺激信号）的刺激不能产生 IL-2 或发生增殖反应，但它们可以被诱导表达 IL-2R 或在提供外源性 IL-2 条件下发生增殖[65,66,101,102]。与之相反，在固相化的抗 TCR mAb、固定的抗原负载 APC 甚至是含有肽-MHC 分子的脂膜的单独作用下，常可使 T 细胞杂交瘤和细胞毒性 T 细胞克隆产生 IL-2 和/或增殖[11,15,103]，但这些刺激对辅助性 T 细胞克隆则将诱导一个不反应状态[4]。这种不反应状态将在本章后面部分以及第 13、20 章进行讨论。避免无反应性状态的关键事件是对 IL-2 的应答[104]。在大多数情况下，这可反映同一 T 细胞产生 IL-2 的情况。一些 T 细胞克隆和杂交瘤对共刺激信号不一致的依赖性可能反映了这些细胞分化状态上的差异。T 细胞克隆已经表达高亲合力的 IL-2R，转铁蛋白受体，人 T 细胞克隆中还表达 MHC Ⅱ类分子，这是静止的初始 T 细胞所没有的特征。因此，这些观察提示活化静止的初始 T 细胞和部分情况下辅助性 T 细胞克隆需要两种独立的信号诱导 IL-2 产生，细胞增殖和分化。一个信号由 TCR 提供，另一个则由 APC 的可溶性因子或细胞表面分子与 T 细胞表面分子相互作用后提供。

T 细胞表面的 CD28 在功能上是作为一个共刺激受体[10]。CD28 功能在第 13 章中详细讨论。简单地说，CD28 是一个由二硫键连接的 44kDa 同二聚体糖蛋白，它表达于绝大多数 T 细胞上，但在人类中大约 50% 的 CD8T 细胞不表达 CD28。CD28 有 2 个鉴定清楚的配体，B7-1(CD80)和 B7-2(CD86)，它们表达于强效的 APC 上，主要包括活化的 B 细胞、活化的巨噬细胞和树突细胞。抗 CD28 mAb、可溶性 B7-Ig 融合蛋白，或表达 B7 分子的细胞可以提供共刺激功能[105~108]。干扰 CD28-B7 相互作用可以在体内和体外阻断共刺激功能和 T 细胞活化[107,108~111]，强调出这种相互作用的重要性。此外，CD28 或 B7-1 和 B7-2 缺陷小鼠有明显的免疫应答缺陷[112,113]。

共刺激功能所必需的关键事件是诱导或上调 APC 表面 B7 分子的表达。研究显示这包括顺次刺 激参与相互作用的 T 细胞上的 TCR 和抗原呈递性 B 细胞上的 CD40[114,115]（图 12.3）。在这一相互作用中，刺激静止 T 细胞上的 TCR 导致 gp39，CD40 配基（CD40L）的诱导表达。该分子是一个膜结合形式的肿瘤坏死因子家族成员[116]。CD40L 的表达反过来刺激 B 细胞上的 CD40，进而上调 B7-1 和 B7-2 的表达，后者可以再刺激

419 CD28。炎症介质如脂多糖（LPS）也能上调 B7-1 和 B7-2 的表达[117]，确保了炎症部位能提供共刺激功能。这也

使得最初的天然免疫反应可以招募获得性免疫反应。这样一个复杂的过程也可以确保T细胞只在合适的环境中活化。

CD28分子本身无内在的酶活性，其介导共刺激信号的机制仍然难以捉摸。虽然CD28可以调节另外几种T细胞来源的淋巴因子产生，但介导IL-2产生的信号机制研究最为深入[118,119]。CD28信号调节IL-2基因的转录活性和它的转录后调控[120,121]。CD28的胞质尾足以介导IL-2转录所需的共刺激信号并产生淋巴因子[122]。这一功能的关键性氨基酸残基已被鉴定出来[123~126]。CD28刺激后通过什么样的生化信号介导其刺激功能仍不清楚。现已鉴定出几种不同的事件。它们将在本文后面和第13章进行讨论。

尽管CD28与B7分子相互作用十分重要，阻断这种相互作用或以CD28或B7分子缺陷的小鼠进行的实验并不总是产生无反应性。CD28缺陷小鼠对一些病原菌的确能产生一个明显的免疫反应[112,127]。这些结果提示其他的分子可以提供相近的但可能不是相同的共刺激功能。在APC表达或分泌的其他分子中，热稳定性抗原[128]和IL-1获得最多的关注。虽然已非常清楚重组的IL-1在某些细胞体系中可以模拟APC提供的第二刺激[66,129,130]，许多实验仍不能检测到IL-1的辅助功能[28,131]。IL-1不能提供辅助功能可能与T细胞上IL-1R的分布有关。已有报道IL-1R在某些T细胞亚群中高密度表达[132,133]。另外，IL-1的效应可能非常间接，例如IL-1能上调B7的表达[134]。IL-1与其受体结合后触发或介导的细胞内事件尚未明确，但是IL-1受体的胞质段与果蝇Toll的胞质段同源。近来，哺乳类Toll类似物得到了鉴定并发现它表达于淋巴细胞上[135]。有趣的是，刺激所有这三种分子均活化核转录因子NF-κB[136]，有可能刺激这些受体可以活化IκB激酶[137]。活化NF-κB可能在介导B7基因转录活化中发挥作用。

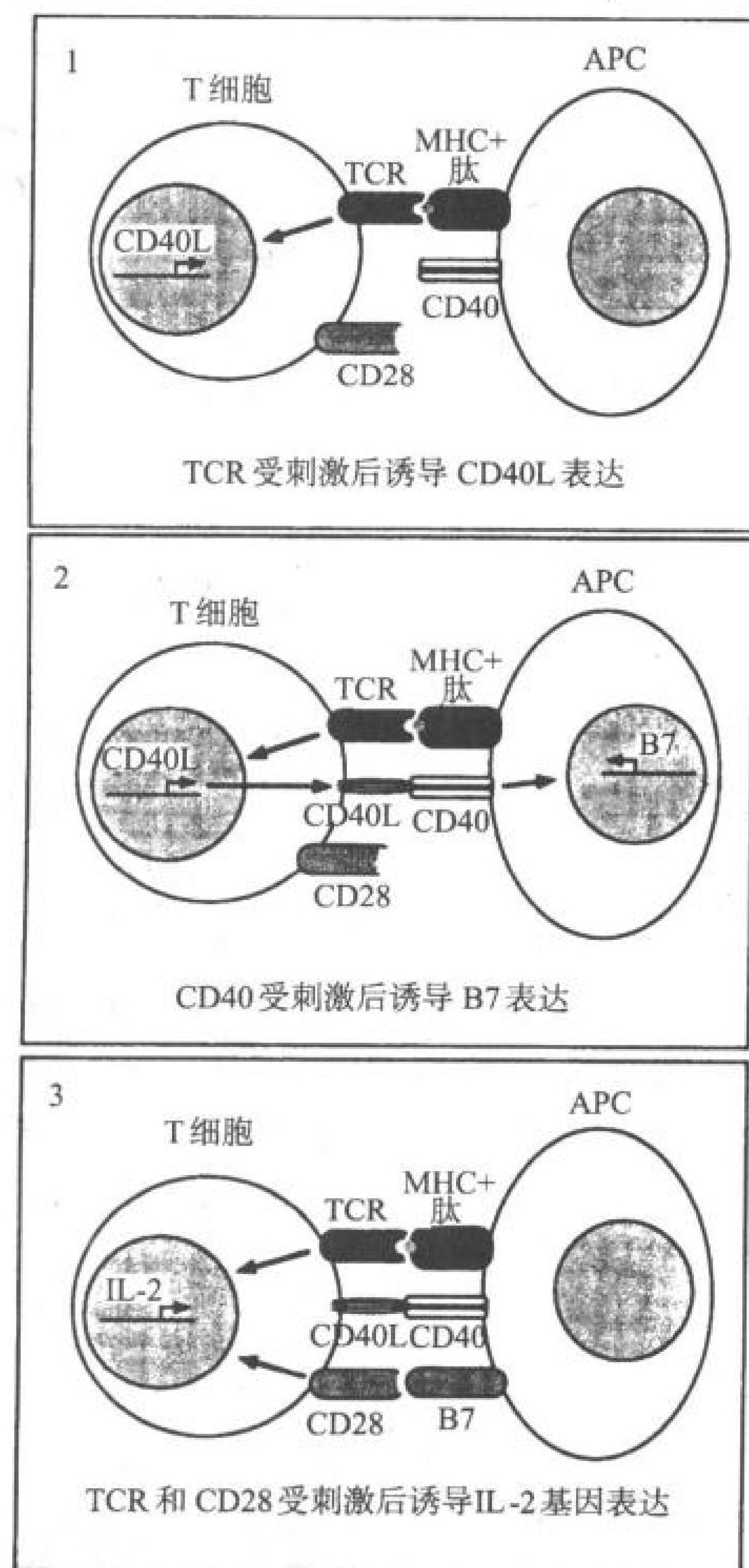


图12.3 T细胞与APC相互作用导致IL-2的产生。TCR与肽-MHC复合物的连续相互作用导致T细胞表达CD40L，后者可与APC表面的CD40相互作用；这一相互作用可诱导APC表达B7；B7进一步刺激T细胞表面的共刺激受体CD28；由TCR和CD28介导的细胞信号诱导IL-2基因表达。

420

针对其他细胞表面分子的试剂和mAb也提供T细胞产生淋巴因子和增殖所需的第二信号。在一些系统中，IL-6单独或与IL-1一起可以提供共刺激信号[138]。最后，药理试剂可提供第二信号，如佛波酯可以活化PKC同工酶[65,139]。佛波酯提供第二信号的机制仍不清楚，因为TCR刺激能够活化PKC(见后文)。似乎许多途径可以提供第二信号，导致T细胞活化。这些信号在性质上可能并不相同，它们对同一T细胞群体也可产生不同的功能活性。

T细胞抗原受体的信号转导

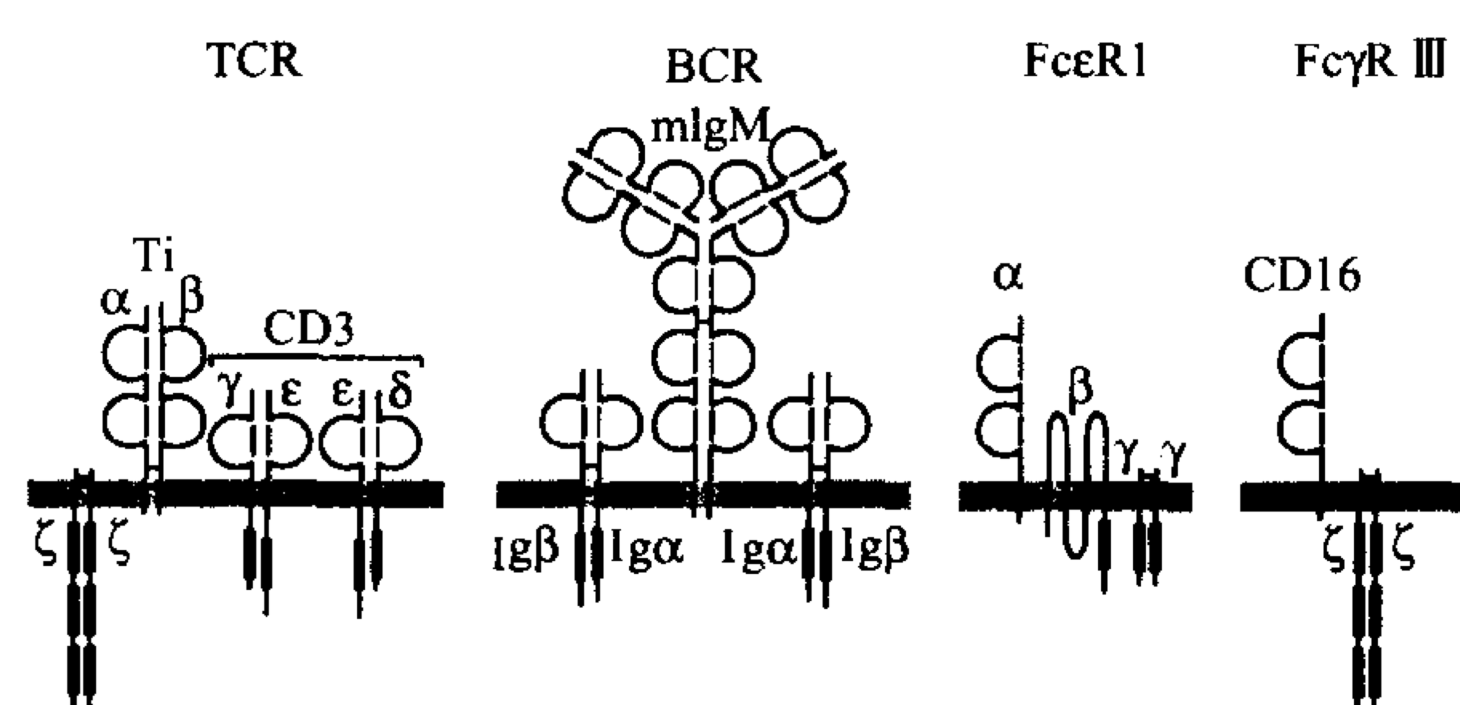
TCR的复杂结构及其信号转导功能

TCR包括两种异二聚体Tiαβ或Tiγδ，负责肽抗原-MHC分子的识别。这些Ti亚基与六种恒定的蛋白以强制结合的方式转运至细胞膜上，但TCR复合物内多肽链的精确化学结构尚不确定[1,3,140]。六种结合蛋白来源于4个基因，其中包括CD3复合物。CD3包含了3种同源的非共价结合的跨膜蛋白γ、δ和ε。CD3基因紧密连锁可能是由基因扩增而来[1]。在每一个TCR复合物内部似乎包含2个拷贝的CD3ε，它们分别与δ或

γ结合形成二聚体,但 γ 和 δ 本身不能相互结合[141~143]。另外,TCR 包含了一个由二硫链连接的、同源或异源的 ζ 链二聚体,它与 CD3 分子在整体结构上不具有同源性。ζ 链在 TCR 中主要的存在形式是 ζζ 同二聚体。在某些 CTL 中,ζ 与高亲和力的 IgE Fc 受体 α 链以二硫链连接形成二聚体[144]。γ 链基因与 ζ 紧密连接,并且两种分子显示出结构上的同源性,特别是在跨膜段部分。TCR 的复杂结构与其功能的关系尚不清楚,但它可能与受体信号转导的多样化有关。

Ti 异二聚体在配基(肽-MHC 分子)识别中发挥作用,但是 α 和 β 链只具有有限的 5 个胞质段氨基酸残基,不包含与胞内的信号转导机制结合所需的足够信息。因此 TCR 复合物的信号转导功能转交给与之相联系的 CD3 和 ζ 链。认识这一功能最早的线索来自于与 CD3 复合物胞外段反应的 mAb 方面的研究,它可以模拟抗原诱导的 T 细胞活化的许多表现[56,57]。当将 CD3 和 ζ 链的结构特征与 Ti 链相比较时,结果很清楚地显示虽然 CD3 和 ζ 链胞质段无内在的酶活性,但它们足够长(40~113 个氨基酸残基),更可能与胞质信号分子相互作用。

用包含 ζ、CD3ε 或相关分子的胞质段构建嵌合分子的研究结果提示其具有信号转导功能。更早的研究提示 TCR 组分的跨膜段的外周及内部含有 TCR 亚基组装所必需的信息[142,145],因此对 TCR 各链胞质段功能进行研究的策略是可行的。CD4、CD8、CD16 或 IL-2Rα 链(能不依赖 TCR 而表达)的膜外区,更重要的是它们的跨膜区,分别与 TCRζ,CD3ε 或 IgE Fc 受体 α 链的胞质区融合构建成了嵌合分子。[146-148]。这些嵌合分子能够不依赖内源性 TCR 链而表达在 T 细胞株、T 细胞克隆或嗜碱性细胞株中。刺激这些嵌合分子可诱导与刺激完整的寡聚 TCR 相同的早期信号转导事件和晚期 T 细胞活化表现,如淋巴因子分泌,细胞毒活性。这样,TCRζ 和 CD3 链均能完成介导 TCR 配体结合亚基后的胞内信号转导机制。这与在 T 细胞杂交瘤中进行的 TCR 构建研究相一致,其结果提示 CD3 和 ζ 链可以作为独立的信号转导分子行使功能[149]。



ITAM
(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)

hζ1	N Q L Y N E L N L G R R E E - Y D V L
hζ2	E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I
hζ3	D G L Y Q G L S T A T K D T - Y D A L
hCD3γ	D Q L Y Q P L K D R E D D Q - Y S H L
hCD3ε	N P D Y E P I R K G Q R D L - Y S G L
hCD3δ	D Q V Y Q P L R D R D D A Q - Y S H L
rIgE FcR γ	D A V Y T G L N T R N Q E T - Y E T L
rIgE FcR β	D R L Y E E L - H V Y S P I - Y S A L
mIg α	E N L Y E G L N L D D C S M - Y E D I
mIg β	D H T Y E G L N I D Q T A T - Y E D I
BLV gp30	D S D Y Q A L L P S A P E I - Y S H L
EBV LMP-2	H S D Y Q P L G T Q D Q S L - Y L G L
SIV Nef	G D L Y E R L L R A R G E T - Y G R L

图 12.4 抗原识别受体中的 ITAM。

CD3 和 ζ 链的功能重复表面上自相矛盾,但通过对许多造血细胞抗原识别相关受体胞质段相同基序的认识可以得到解释[150]。这一基序称为"免疫受体酪氨酸活化基序"(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM),基于保守性的相同序列(**D/E**) **XXYXXLX$_{(6-8)}$ YXXL**。该基序在 ζ 链胞质段重复三次,而 CD3 胞质段只包含一个拷贝(图 12.4)。IgE Fc 受体的 β 和 γ 链、与 B 细胞表面膜免疫球蛋白抗原受体结合的 Igα 和 Igβ 链(见第 7、35 章和图 12.4)均含有此基序。用 TCR 嵌合受体进行的观察也已扩展至表达于 B 细胞(B 细胞抗原受体)和肥大细胞(高亲和力 IgEFc 受体)上与寡聚受体结合的受体恒定链。通常只含有一个 ITAM 拷贝的嵌合受体足以诱导与刺激完整寡聚 TCR 相同的早期和晚期事件[148,151,152]。IgE Fc 受体 β 链是惟一的多有 6 个氨基酸残基长度 ITAM,功能上似乎更像一个增强器而非独立的功能单位[153]。突变 ITAM 序列证实了酪氨酸和亮氨酸残基在 ITAM 信号功能中的重要性。并不令人感到意外的是,人们发现 ITAM 在不同的受体中具有相同的功能。由于各种 ITAM 的外显子-内含子组织方式是保守的,提示它们拥有一个共同的进化祖先[149]。

TCR 中具有多个 ITAM 是该受体令人关注的特

征，它可能对受体功能产生影响。虽然精确的TCR组成链化学结构仍不清楚，如果我们假设受体具有最常见的结构模式（图12.2和图12.4），那么单一TCR复合物包含10个拷贝的ITAM。受体中这一基序的重复出现使得一分子TCR可与多拷贝相同的信号转导成分相互作用并活化之。这可使单一配基结合事件的信号转导得到增强[152]，因此增加TCR的敏感性[154]。另外，TCR中含有足量不同序列的基序允许它们与不同的胞内信号转导分子相互作用，从而允许多样化的信号转导事件发生[155,156]。这样，TCR刺激后选择性地活化不同的ITAM可以介导不同的细胞应答[46,157,158]。 421

并不令人吃惊的是病毒攻击淋巴细胞时，在它们的致病机理中需要ITAM序列的帮助。至少有三种病毒具有ITAM序列并能与淋巴细胞内胞内信号机制相作用，并在其致病机制中扮演重要角色。牛白血病病毒衣壳糖蛋白gp130含有一个ITAM序列，该病毒能转化反刍动物B细胞。它依赖ITAM序列进行感染和获得高病毒滴度[159]。EB病毒隐性膜蛋白2(latent membrare protein 2, LMP2)在维持病毒潜伏于转化B细胞中发挥重要作用。LMP2中的ITAM认为是作为一种细胞内的诱饵，阻止胞质信号蛋白与受刺激后活化的B细胞抗原受体的ITAM相互作用[160]。一种特殊的猿免疫缺陷病毒(SIV)株不寻常的分离可导致爆发性的静止T细胞感染，与常见的大多数SIV病毒株引起的慢性和潜伏性感染不同。已鉴定出该病毒不同寻常的表现是由病毒Nef蛋白的两个突变造成的，该突变导致序列中产生一个ITAM[161]。总之，这些病毒似乎利用了存在于TCR或其他的抗原受体中的ITAM，并通过病毒自身ITAM与淋巴细胞活化的胞内信号分子相互作用。

TCR中的CD3链还有其他的调控功能。在PKC活化事件中人CD3γ和δ链的丝氨酸残基被磷酸化[162,163]，这与TCR信号转导功能消失相联系，它可能代表了一个可使受体脱敏的负反馈调节机制。

Ti链如何将配体结合的信息传递给CD3和ζ链的机制仍知道不多。mAb刺激包含ζ或CD3ε胞质段的单链或双链嵌合受体的能力与交联或二聚化模型相吻合。但是，受体的复杂结构和Ti、CD3对单抗刺激敏感性不一致，提示构象改变在受体活化中的作用[52,164]。具有相同亲和力的肽配基可诱导不同信号事件也支持变构模型，虽然动力学特性上的差异也可以解释这种不同[49]。最后，CD3和ζ链也可提供"船坞"功能以允许其他分子如CD2、CD4或CD8与TCR相互作用形成一个组装好的受体复合物。后一种功能与观察到的TCR与CD4稳定的或可诱导性结合相吻合[49,165]。这一船坞功能也与CD2介导的信号转导中需要功能性的TCR或ζ链-嵌合体这一实验结果相吻合[44]。

TCR ITAM与胞质酪氨酸蛋白激酶相互作用

以抗原肽-MHC分子或刺激性抗TCR mAb刺激TCR触发细胞应答必须以诱导胞内生化事件产生为前提。多种胞内生化改变在TCR受刺激后的最初几秒到几分钟内即可发生。TCR组成链并不含有内在的酶活性，而是TCR ITAM将TCR与胞内酶相偶联。

TCR刺激后最早发生的事件是诱导几种蛋白质的酪氨酸残基发生磷酸化[166,167]。值得注意的是，在这些磷酸化底物中有TCRζ和CD3链的ITAM[168~170]。这些酪氨酸磷酸化在TCR刺激后数秒内即可观察到并能持续数小时[146,166,167]。抑制PTK能抑制大多数，如果不是全部TCR刺激介导的晚期事件[35,36]。由于ITAM包含TCR信号转导功能全部所需的信息，因此似乎由ITAM调节PTK功能。胞质PTK的两个家族，Src和Syk家族成员被证实在TCR信号转导功能中发挥重要作用。

Src PTK与TCR信号转导

Lck和Fyn是在T细胞中表达的主要Src家族PTK，两者都被揭示可与ITAM结合并参与TCR信号转导。在综述两种激酶的特异性功能以前，我们将先讨论两种PTK共同的整体结构特征（图12.5）和功能结构域。

Src激酶分子质量从50~60kDa不等[172]。在这些激酶的N端第2位甘氨酸残基上是肉豆蔻酯酰化位点，介导分子的膜结合。一些Src激酶，包括Lck在头10个氨基酸残基中的1个或2个半胱氨酸残基上还有软脂酰化，这一修饰是动态调节的[173,174]。这将进一步增强膜定位，特别是质膜定位。在N端40~70位氨基酸残基是家族中差异最大的序列，可能在行使不同分子各自的功能和与该分子的特异性结合上发挥重要作 422

用。紧随独特区的是 Src 同源序列 3(Src homology 3,SH3)结构域,它包含大约 60 个氨基酸残基。SH3 结构域可以与一个富含脯氨酸残基的特异性区域相结合,在介导蛋白质-蛋白质直接相互作用中发挥作用。SH3 后面是一个由 100 个氨基酸组成的结构域——SH2 结构域。SH2 通过与特定序列中的磷酸化酪氨酸特异性结合而参与蛋白质-蛋白质相互作用。

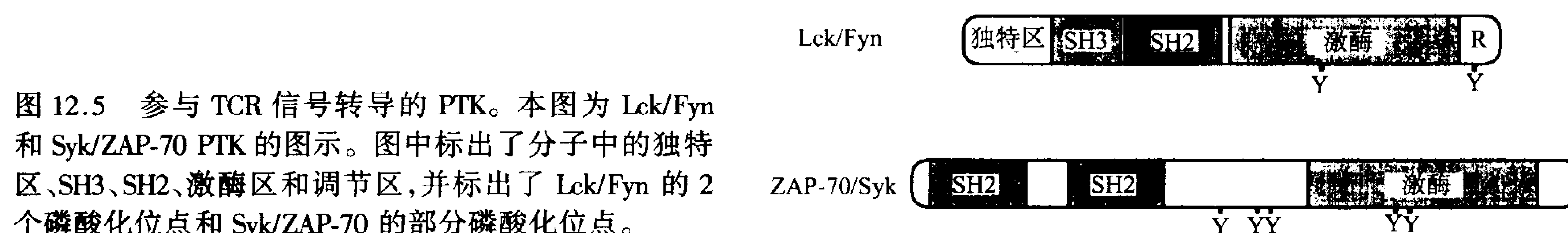


图 12.5 参与 TCR 信号转导的 PTK。本图为 Lck/Fyn 和 Syk/ZAP-70 PTK 的图示。图中标出了分子中的独特区、SH3、SH2、激酶区和调节区,并标出了 Lck/Fyn 的 2 个磷酸化位点和 Syk/ZAP-70 的部分磷酸化位点。

SH2 区后面是催化区,即激酸活性区。活化的 Lck 激酶结构域的晶体结构已被解析。与其他激酶结构域相似,它是一个包含大约 250 个残基的双叶状结构[175]。像大多数激酶一样,激酶的催化活性由一个活性环调节。在 Src 家族中活性环由一个酪氨酸残基负责调节激酶活性。这一酪氨酸残基磷酸化后,通过改变活性环的位置而活化催化功能,允许底物接近催化位点。

在 Src 激酶的 C 端一个调节区。这一短区含有两个鉴定清楚的酪氨酸磷酸化位点。该位点的磷酸化将导致激酶的失活。两种 Src 家族激酶 Hck 和 Src 的晶体结构解析发现两者在此位置均是磷酸化的,并且它们非常相似[176,177]。结构显示在未活化的磷酸化状态时,激酶呈一个紧密的关闭性结构,其中 C 端负性调节的磷酸化酪氨酸与同一分子中的 SH2 结构域相结合,而 SH3 结构域出乎人们意料地与 SH2 和激酶区之间的脯氨酸富含区相结合。这些相互作用使激酶结构域不能形成活化构象。因此,活化激酶需要 C 端酪氨酸残基去磷酸化和活化环中的酪氨酸磷酸化。

Fyn 蛋白酪氨酸激酶

有几条证据均提示 Fyn PTK 参与 TCR 信号转导。Fyn 是一 59kDa 蛋白,表达广泛,但在脑和造血系统中表达尤其高。造血细胞和脑细胞分别表达两种不同形式的 Fyn[178],这两种形式 Fyn 产生的基础是对两个同源的但并不完全相同的外显子 7 的组织特异性剪接,该外显子编码激酶结构域的一部分。在抗原特异性 T 细胞杂交瘤中过表达两种形式的 Fyn 可产生不同的功能后果[179]。两种形式的 Fyn 均可增强抗 TCR mAb 诱导的胞内蛋白磷酸化,但只有造血细胞表型的 Fyn 能增强抗原诱导的 IL-2 产生。因此两种形式 Fyn 介导不同的功能,可能它们与不同的胞内信号转导分子相作用。

Fyn 与 TCR 的相互作用难以研究。如果用温和的去污剂溶解复合物,Fyn 能够与 TCR 复合物共沉淀,虽然它只具有较低的化学能[180]。有报道称当抗 TCR mAb 诱导 TCR 膜上重排时可以观察到 Fyn 蛋白与 TCR 共同存在,提示两者存在直接或间接的联系[181]。在敏感的异源性表达系统中,可以检测到 Fyn 与 ζ、CD3γ 或 CD3ε 融合蛋白之间特异性的联系[182]。虽然未找到在其中起关键作用的某一单一残基,Fyn N 端 10 个氨基酸残基(它们也是负责膜定位的氨基酸残基)及 ITAM 中的序列被确定为与这一相互作用有关。这些观察必须与定位研究结合起来看,Fyn 蛋白主要位于微管组织复合物周围,当其过表达时在质膜上能检测到它[183]。综上所述,这些生化和细胞的研究结果提示了 Fyn 与 TCR 直接和间接结合的可能性。

多项生物化学和遗传学的研究均强调 Fyn 与 TCR 结合的功能重要性。刺激 TCR 可诱导 Fyn PTK 活性增加,后者与 Fyn 结合蛋白酪氨酸磷酸化水平增高相联系[184,185]。在 T 细胞杂交瘤细胞中表达 Fyn 两种表型的活化形式均导致 TCR 信号转导增高[179],这里活化形式的 Fyn 指的是 C 端负性调节酪氨酸被突变的蛋白。其他的 Src 家族 PTK 成员也观察到相似的效应[186,187],因此这一功能可能不是 Fyn 所特有的。另一替代的方法是在 T 细胞系中转基因高表达正常的 Fyn,这可导致 TCR 反应增高。与之相反,当小鼠表达一个激酶缺陷型的突变 Fyn 时,TCR 信号转导能力被破坏[188]。令人吃惊的是用同源重组的方法破坏 Fyn 基因只产生相对有限的信号转导功能缺陷。成熟的单阳性胸腺细胞($CD4^+$ 或 $CD8^+$)TCR 信号转导能力明显减弱,而双阳性

($CD4^+$或$CD8^+$)和成熟的外周血T细胞TCR信号转导能力下降较少[189,190]。以破坏Fyn基因的小鼠进行的实验提示Fyn在TCR信号转导中的重要作用,并且Fyn功能缺失使T细胞随发育阶段的不同而被限制在特定的状态。但是Fyn的缺失并不影响胸腺发育,提示可能存在其他具有冗余功能的PTK介导互补机制。下面讨论中提及的研究结果提示了Lck激酶的重要作用。

在对选择压力下发育的细胞群体进行的研究中,可以观察到Src家族成员之间存在冗余,但每种Src激酶仍可能还有其特异的功能,特别是在PTK独特的N端。Pyk2激酶是与斑点黏附激酶同源的蛋白激酶,对该分子的研究提示了Fyn的独特功能[191]。虽然Pyk2的功能目前仍不清楚,它的磷酸化和催化活性均受TCR信号转导的调节[192]。但是,Fyn缺陷小鼠中Pyk2既不能活化也不发生磷酸化。这些结果提示TCR与Pyk2的结合需要Fyn。因此,Pyk2活化障碍可归因于的Fyn缺陷小鼠的某些功能缺陷。

Lck蛋白酪氨酸激酶

Lck是一种56kDa的Src家族PTK,在信号转导中发挥关键作用。它主要表达于T细胞中。CD4和CD8通过胞质段的半胱氨酸残基与Lck独特的N端区域相结合[76,77,193,194]。虽然不是所有的Lck均能与CD4或CD8相结合,但它们结合的化学能是相对较高的。Lck与共同受体CD4和CD8的直接作用使它在TCR的抗原识别信号转导中扮演重要的功能角色。

在TCR与肽-MHC相互作用中,证明CD4和CD8是作为TCR的共同受体的研究显示,Lck在TCR信号转导中扮演重要功能角色[68]。以mAb同时交联TCR和CD4,可以显著增强TCR介导的信号转导[81],分别交联则无此效应,这提示了共同受体CD4和CD8不但增强TCR与抗原肽-MHC复合物的亲合力,也将Lck与TCR胞质段信号装置置于一处。有关CD4依赖的抗原特异性T细胞杂交瘤的研究工作也支持这一模式。抗原可诱导含野生型CD4的杂交瘤产生IL-2,但突变型CD4细胞则不能,这是由于突变型CD4不能结合Lck[93]。综上,Lck似乎在CD4和CD8依赖的TCR信号转导中发挥关键性的作用。

在多次不同的研究中均观察到一些T细胞克隆或杂交瘤能在无CD4和CD8表达的情况下对抗原产生应答,提示Lck在介导TCR信号转导中可不依赖与CD4或CD8的结合。CD4和CD8参与的抗原识别通常在再次免疫应答当中不那么重要。在一个MHCⅡ类分子限制的IL-2分泌型T细胞杂交瘤中,表达活化的Lck而不表达CD4仍能显著地增加该细胞对抗原的敏感性[187]。在$CD4^-$T细胞克隆中表达CD4似乎能够通过使Lck与TCR相分离而抑制抗TCR mAb通过TCR活化细胞,这一实验至少提示Lck与TCR间接的相互作用[195]。更重要的是,Lck能在TCR成分的免疫共沉淀中检测到,虽然并不清楚这种相互作用是否是直接的[86,196~198]。虽然Lck定位于质膜上从而可与TCR成分相互作用,它与TCR成分直接相互作用的机制尚未明确[183]。这样,Lck能通过CD4/CD8依赖和不依赖的机制参与TCR的信号转导。

在对Lck缺陷的小鼠或细胞株的研究中发现,Lck在TCR信号转导中的关键性作用十分明显。当Lck缺陷时,TCR介导的蛋白酪氨酸磷酸化和下游事件明显受阻[199~202]。通过同源重组破坏*lck*基因,小鼠胸腺发育异常但不完全受阻。这一研究很好地提示Lck在胸腺发育中的关键作用,特别是其在前TCR和成熟TCR信号途径中的可能功能[200]。*lck*基因缺陷的小鼠主要的异常似乎发生在早期发育调控点,由$CD4^-$/$CD8^-$向$CD4^+$/$CD8^+$的转变这一阶段。这一过程中前TCR介导一个细胞信号,诱导TCRβ链功能性重排并表达于细胞表面(见第11章)。在Lck和Fyn两者同时缺乏的小鼠中可以观察到这一发育调控点完全被阻断[203,204]。由于在Fyn缺陷小鼠中无明显发育缺陷,提示在前TCR信号转导功能中Lck发挥主要作用,但Fyn能部分地补偿其功能丢失。

TCR受刺激后可以检测到Lck催化活性活化[205]。另外交联CD4分子后可以检测到Lck激酶活性升高2~4倍[206]。PTK活性的活化与激酶区活化环中的一个酪氨酸残基(Y394)磷酸化相联系,该位点是活化的Src家族成员的特征性自身磷酸化位点[82]。活化环的作用被推断为可使底物接近催化位点。值得注意的是虽然交联CD4增加Lck催化活性,但并不能观察到与TCR刺激相联系的特征性酪氨酸磷酸化细胞蛋白增加[81]。因此,Lck代表了TCR信号转导中一个关键性的重要PTK,但似乎它并不是惟一的PTK。

与刺激的 TCR 相联系的 Syk 家族 PTK

由 Syk 和 ZAP-70 两种分子组成的 Syk 家族 PTK 在 TCR 信号转导中发挥重要作用[207]。ZAP-70 在 T 细胞和天然杀伤细胞(NK)中广泛表达[208]。它首先在 TCR 刺激细胞的免疫共沉淀物中被分离,并被鉴定为与 TCRζ 相联系的 70kDa 的酪氨酸磷酸化蛋白[209]。Syk 表观分子质量 72kDa,在造血细胞系中有更广泛的表达[210]。但在 T 细胞系中,它在胸腺发育过程中表达较早,并在成熟 T 细胞中表达下调。但在 γδ 系中,Syk 表达似乎更加丰富[211,212]。两种激酶在造血细胞系受体介导的信号途径中具有相近的功能。它们与双磷酸化的 ITAM 相联系并在 TCR 受刺激后出现可诱导的磷酸化。

ZAP-70 和 Syk 的整体结构相似。它们均有 2 个位于 N 端的 SH2 结构域和更靠近 C 端的一个催化域(图 12.5)。现在已经认识得很清楚,ZAP-70 的 SH2 结构域以相对较高的亲和力(10～30nmol/L)与一个双磷酸化的 ITAM 顺序结合[64,213,214]。这一亲和力明显高于纯化的 SH2 结构域,后者只以毫摩尔级结合[215]。X 射线解析已获得 2 个 ZAP-70 SH2 与一个双磷酸化 TCRζITAM 结合的晶体结构[216]。磷酸化的 ITAM 具有一个伸展的结构,而更靠近 C 端的 SH2(SH2C)具有一个典型的结构域并与 ITAM 中更靠近 N 端的 PYXXL 序列相结合。与之相反,N 端的 SH2(SH2N)是不典型的。它是一个不完整的 SH2 结构域,只有当其靠近 SH2C 时,其磷酸化酪氨酸结合口袋才完整。这种当 SH2N 和 SH2C 与双磷酸化的 ITAM 结合时两者相距很近的关系强调了 ITAM YXXL 群之间空间距离的重要性。大于或小于 7 或 8 个残基很可能导致不能适当地结合。这一结构提示的另一有趣的特征是内在结构域 A 形成一个螺旋环可分隔 SH2 结构域。内在结构域 A 可以帮助稳定结构,但它的其他的功能仍不清楚。基于 Syk 的研究,磷酸化这个环能调控 SH2 与磷酸化 ITAM 的结合[217]。Syk SH2 结构域的结构与 ZAP-70 相似。

ZAP-70 SH2 结构域和激酶区被大约 65 个残基分离,形成内在结构域 B。人们相信这一区域发挥调控功能。内在结构域 B 中的 Y292 是 ZAP-70 分子内的一个自身磷酸化位点[218],其磷酸化可抑制 ZAP-70 功能[219-221]。在 ZAP-70 内在结构域 B 中还有其他潜在的磷酸化位点,Y315 和 Y319。Syk 的同源位点被证明是体外的自身磷酸化位点[222]。这些位点通过募集底物至 ZAP-70 而发挥正性调节作用。Y315 对 ZAP-70 功能很重要并可磷酸化原癌基因 Vav(见下文)。但缺失内在结构域 B 对 ZAP-70 功能有正性效应,提示这一区域在整体上表现为负性调节功能[220]。

424

ZAP-70 和 Syk 的催化结构域是典型的 PTK 结构域。TCR 受刺激后两种激酶的催化活性增加。它们的催化活性由推断的活化环中的磷酸化残基调节。ZAP-70 活化环中 Y493 和 Syk 的同源残基 Y519 的磷酸化可增加激酶活性[223～225]。与之相反,ZAP-70 中的 Y492 具有负性调节功能[219,221,223]。这两个位于相同活化环中的残基可以在一个动态的反馈调节环路中被顺次磷酸化[223]。有趣的是,Syk 内在催化活性远大于 ZAP-70[226]。在表达突变型的 ZAP-70 和 Syk 细胞株中以及在 ZAP-70 天然突变的小鼠中的研究证实,催化活性是两个分子功能的关键。

对 T 细胞中 ZAP-70 和 Syk 功能重要性的认识是在天然和实验性遗传模型研究中建立起来。人类重症联合免疫缺陷(SCID)综合征的患者以 TCR 信号转导障碍和 T 细胞系发育异常为其特征,这些均是 ZAP-70 突变的结果[229～231]。在这些 SCID 患者中,只能检测到成熟的 $CD4^+$ T 细胞,但这些 T 细胞 TCR 信号转导缺陷。在 ZAP-70 蛋白缺陷或 ZAP-70 分子激酶活性缺失的小鼠中[228,232],胸腺发育在 $CD4^+/CD8^+$ 阶段受阻,而此时成熟的 TCR 信号转导为阳性选择所必需。前 TCR 介导的发育调控点可以被越过,可能反映了 Syk 激酶的替代作用,后者在胸腺发育的早期阶段高表达[211]。目前尚不能解释人和小鼠 ZAP-70 缺陷后表现不同的原因,但可以反映 Syk 表达上的不同[233]。通过基因打靶建立小鼠 Syk 表达缺陷模型很好地揭示了 T 细胞系中 Syk 的正常功能。在这些小鼠中,T 细胞缺陷主要表现在表达 γδTCR 的上皮 T 细胞发育失败。总之,这些结果提示这一激酶家族在 TCR 信号转导中发挥重要作用,并且这此激酶可以发挥部分相同的功能,同时还有部分功能不同。

Src 与 Syk PTK 的相互作用

Src 和 Syk 激酶以高度协调和顺次的模式与 TCR 相互作用。在细胞株或体外培养的 T 细胞中，TCR ITAM 在受体刺激后出现可诱导的磷酸化。在原位胸腺细胞或 T 细胞中，TCRζ ITAM 为组成型磷酸化，CD3 ITAM 则是诱导型磷酸化[234]。无论是 ITAM 组成型还是诱导型的磷酸化均主要由 Lck 介导[64,202]。ZAP-70 或 Syk 可与双磷酸化的 ITAM 结合，一旦结合，它们就能通过磷酸化其活化环而活化。ZAP-70 活化环中的关键性残基 Y493 的磷酸化被认为是由 Lck 介导的[64,218,223]。与这相反，Syk 能够自身磷酸化并在结合 ITAM 后活化其酶活性[235]。的确 Syk 的活化似乎更少地依赖 T 细胞中 Src 激酶[236,237]。但是在离体胸腺细胞和 T 细胞，刺激受体是 ZAP-70 或 Syk 可诱导性磷酸化所必需的，两者均组成型地与 TCRζ 链相结合[202]。在刺激后的 TCR 复合物中，ITAM 结合 Syk 或 ZAP-70 并与 Lck 通过 Lck SH2 域形成一个稳定的复合物[86,87]。这可能导致 PTK 活性的进一步增高和底物磷酸化。

这些研究提示在 T 细胞与抗原反应时 Lck 和 Syk 家族 PTK 将发生重要的相互作用。图 12.6 中描述了 Lck 与 ZAP-70 相互作用的一种模式。在识别与 MHCⅡ类分子结合的抗原肽过程中，TCR 和 CD4 相互靠近的情况出现了，这可将 Lck 募集至与 TCR 链 ITAM 非常邻近的位置。这将导致 ITAM 中的酪氨酸残基发生磷酸化。在体内，这种情况可能只发生在 CD3 的磷酸化中。这样的 ITAM 酪氨酸磷酸化可以募集 ZAP-70 或 Syk。这种 ZAP-70 和(或)Syk 与 Lck 共处增强了这些激酶的相互作用和转移磷酸基活性。相同的机制可以应用于 CD8⁺ 细胞识别并结合 MHCⅠ类分子结合的肽。但是，这一模式并未包含 TCR 可以不依赖 CD4 和 CD8 的方式诱导信号转导的机制。在这些情况下，胞质 Lck 未与 CD4 或 CD8 结合，可以通过寡聚的 ITAM 被募集至 TCR 复合物。这些相互作用的最终结果是这些激酶的协同活化并进一步导致作为信号途径关键调控者的下游效应分子和底物的酪氨酸磷酸化。

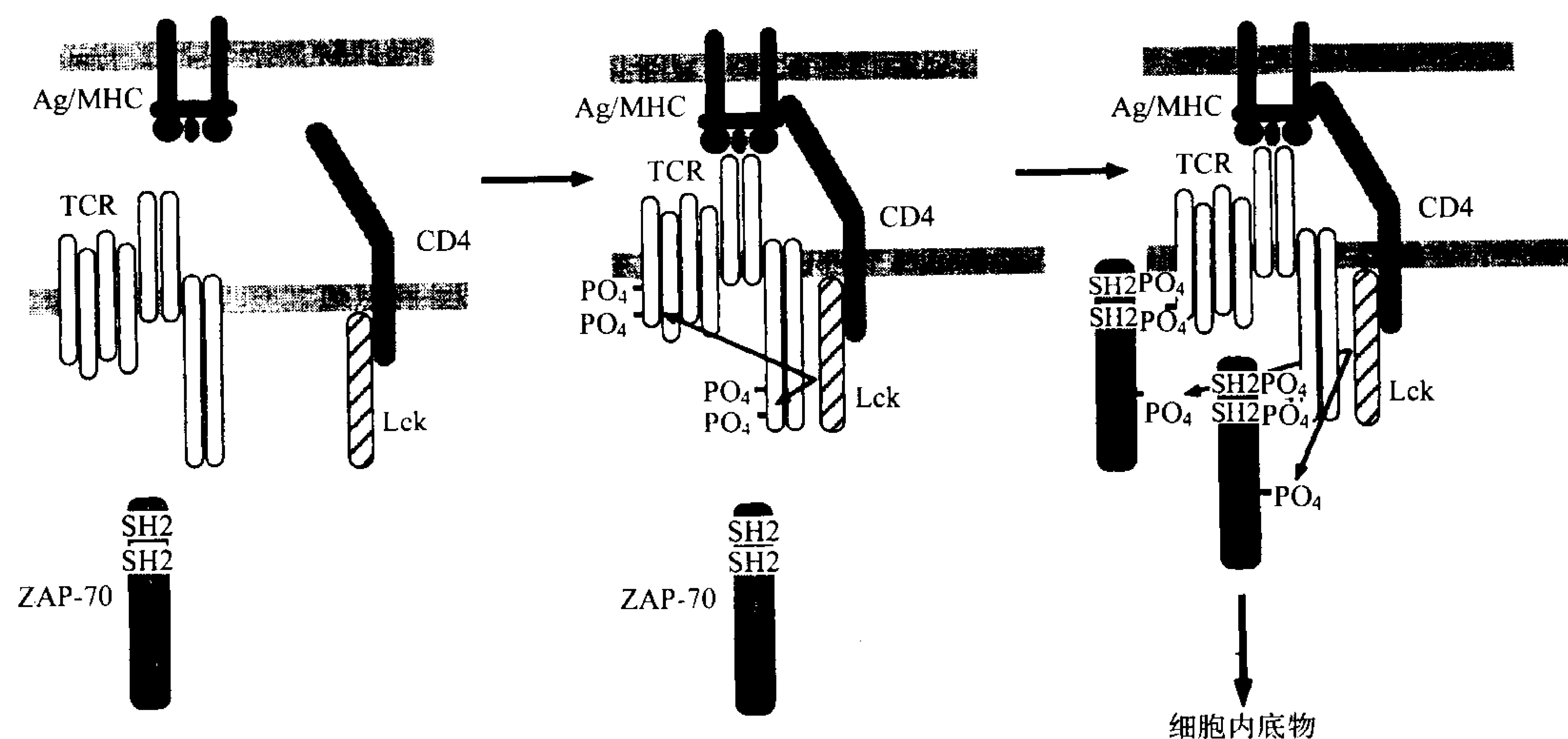


图 12.6　CD4⁺ T 细胞抗原识别过程中 Lck 和 ZAP-70 的相互作用模式。当 TCR 和 CD4 与 MHCⅡ类分子相互作用时，Lck 被带到靠近 TCR 胞质区的位置，并对 CD3 和 ζ 链进行磷酸化。ZAP-70 随后通过其 SH2 结构域被募集至磷酸化的 CD3 和 ζ 链，这使得 ZAP-70 可被 Lck 磷酸化、活化。

信号转导途径中 SH2 结构域的功能

TCR 活化胞质 PTK 的催化功能带来几个后果，而不仅仅是利用酪氨酸磷酸化增强蛋白质-蛋白质相互作用。目前人们已经对在 PTK 或蛋白酪氨酸磷酸酶(PTPase)信号转导途径中，蛋白质分子如何通过 SH2 识别含有磷酸化酪氨酸的序列并相互作用的理解已获得显著的进步[215]。SH2 结构域是含有大约 100 个氨基酸

残基的同源序列,涉及蛋白酪氨酸磷酸化的信号转导途径中的多种分子中均有此同源序列。表 12.2 中列出了在 TCR 信号转导途径中含有 SH2 的部分蛋白质。

单独的 SH2 能在毫摩尔亲和力水平与磷酸化蛋白或磷酸化肽独立地结合。由于这种结合依赖于磷酸化酪氨酸残基的周围序列,提示结合可能是特异性的[215,238,239]。在 SH2 的三维结构中可以清楚地看到其与磷酸化酪氨酸特异性相互作用的结构基础[240,241]。每个 SH2 含有一个磷酸化酪氨酸结合口袋,但是口袋周边的序列也可以影响结合。这样,SH2 结构域识别磷酸化酪氨酸周围序列的能力决定了信号转导途径中蛋白质相互作用的特异性。

表 12.2　与 T 细胞活化相关、含有 SH_2 结构域的蛋白质 SH_2

蛋白酪氨酸激酶
Fyn
Lck
Syk
ZAP-70
Csk
Itk
蛋白酪氨酸磷酸酶
SHP-1
SHP-2
具有酶功能的蛋白质
PLCγ1
PI-3 激酶,p85 亚基
接头蛋白和调节蛋白
GTPase 活化蛋白(GAP)
SOS
Vav
Slp-76
Shc
Nck
Grb2
Crk

SH2 结构域可以发挥多种功能。首先,它们可以将信号转导分子募集至活化的 PTK。活化的 PTK 通常含有自身或转移磷酸化位点,这将成为下游信号转导分子经 SH2 结合的位点。例如,Vav 的 SH2 与 ZAP-70 中的磷酸化 Y315 结合,这种结合是 Vav 酪氨酸磷酸化和功能活化所必需的[242]。第二,它们可以保护酪氨酸磷酸化位点免遭 PTPase 活性降解,从而延长酪氨酸磷酸化的效应[243]。第三,它们将激酶或磷酸酶募集至底物或活化位点处,Src 和 Syk PTK 家族均含有 SH2[82,207],另外至少两种胞质酪氨酸磷酸酶也含有[244]。第四,SH2 在增强或抑制酶活性方面发挥重要的调控功能。例如,Src 家族 PTK 的酪氨酸化负性调节位点与分子内的 SH2 相互作用可抑制激酶活性[82,176,177]。综上所述,SH2 与蛋白质分子中的磷酸化酪氨酸残基的相互作用在信号转导途径中发挥多种作用。

SH2 不是惟一的与磷酸化酪氨酸相结合的结构域,还有其他的结构域在信号转导中的蛋白质-蛋白质相互作用中发挥作用,认识到这一点很重要。例如,PTB 区与酪氨酸磷酸化残基相结合[245,246]。PTB 区的特异性可能更有限。其他可与磷酸化酪氨酸以外的残基结合、参与信号途径中的相互作用的结构域还包括 SH3、PH、WW、WD40 和 PDZ 区。SH2 经常与一个或更多的 SH3 串联在一起。就像已讨论过的,SH3 与脯氨酸富集序列相结合,因此 SH3 与它们的靶分子的相互作用不需要翻译后的共价修饰。但是,靶序列的构象改变可能是关键,不同分子的 SH2 和 SH3 序列存在差异,这可使它们在结合事件上表现出不同的特异性。SH2 和 SH3 与它们的肽配基的亲和力较低(毫摩尔范围),对 SH2 而言这一亲和力只比其对纯化的磷酸化酪氨酸的亲和力高 20~50 倍。但是,通过配对或联合这些蛋白功能模块,可以获得特异性和亲和力更高的蛋白质-蛋白质相互作用。

蛋白酪氨酸磷酸酶 CD45 在 TCR 信号转导中的关键作用

刺激 PTK 可以调节蛋白质磷酸化,抑制 PTPase 也可以产生这一效应。许多 PTPase 表达于 T 细胞中,CD45(白细胞共同抗原或 T200)和 PTPase α(或 LRP)是跨膜的酪氨酸磷酸酶[247~249]。许多胞质 PTPase(包括 T 细胞磷酸酶、PEP、SHP-1 和 SHP-2、低分子质量磷酸酶)均表达于 T 细胞中[249,250]。虽然所有这些 PTPase 可能都在 TCR 信号转导中发挥作用,但人们对 CD45 理解最多。

CD45 代表了一个跨膜的 PTPase 家族,并由于外显子 4 到 6 不同的剪接方式而产生多种亚型[247]。所有的亚型包含两个串联的、由 300 个氨基酸组成的结构域,该结构域与其他的 PTPase 同源[249]。只有第一个结构域具有催化活性[251,252],但其活性依赖于第二个结构域的存在。

CD45 在除成熟红细胞以外的造血细胞系中高水平表达。不同的 CD45 亚型分子质量为 180~220kDa 不等,以组织和活化特异性形式表达。在 T 细胞,这些亚型被用于区别辅助性 T 细胞亚群[253]和静止的或活化的 T 细胞[254,255]。例如,活化的 T 细胞只表达 180kDa 的亚型(CD45RD),其外显子 4、5 和 6 的产物被剪切。各

种亚型的高度调节性表达提示分子的胞外区具有特异性功能。在抗原特异性杂交瘤中不同的亚型表现出不同的功能证实了这一点[256]。各种亚型的配基(如果存在)仍未鉴定出。与不同 CD45 亚型反应的 mAb 可以观察到刺激或抑制效应。一些研究者认为不同的 CD45 亚型可与同一细胞上的不同分子相互作用如 CD4[257]。除了结合配基以外,人们推断 CD45 亚型还具有其他不同的功能。基于不同亚型在分子大小和电荷上的差异,人们推断 CD45 具有影响 T 细胞与 APC 相互作用的能力[13]。但是,以上皮生长因子的胞外段和跨膜段替代 CD45 分子相应区段构建的嵌合分子进行研究,结果提示,配基诱导的二聚化可以抑制 CD45 功能[258]。

利用 CD45 表达缺陷的 T 细胞株或小鼠进行的遗传学研究中确定了 CD45 的一项功能。CD45 表达缺如的大多数 T 细胞系克隆表现出选择性的 TCR 信号转导功能缺失,包括 TCR 诱导的蛋白酪氨酸磷酸化[259~262]。类似的,通过基因打靶造成小鼠 CD45 缺陷导致 TCR 功能受阻和发育停滞[263,264]。缺失这一主要的膜 PTPase 并不造成酪氨酸磷酸化蛋白增加。由于 TCR 受刺激后最早的信号转导事件是活化 PTK,CD45 似乎在调控 TCR 活化 PTK 途径上发挥一个选择性的作用。

以 CD45 缺陷细胞进行的研究提示这一 PTPase 的靶点是 Lck 的负性调节位点,这就形成了图 12.7 中显示的 Lck 调节模式。CD45 在体外可以对该位点去磷酸化,导致 Lck 活化[265]。Lck 的 Y505 位点在 CD45 缺陷细胞中是高度磷酸化的[266~268]。Fyn 中的同源位点也要受到影响,但程度较小。非活化状态激酶的 X 射线晶体衍射图像揭示了这一磷酸化位点抑制激酶功能的机制[176,177]。当在 C 端发生磷酸化,SH2 域以分子内相互作用的方式结合至这一位点,SH3 域通过与 SH2 和激酶区之间的脯氨酸环序列相结合而帮助形成非活化构象。这一相互作用的后果是激酶区保持在非活化状态。与激酶功能负性调节相联系的酪氨酸由一个广泛表达的 PTK 磷酸化,该分子称为 Csk,与 Src PTK 具有部分同源性[82]。这样,CD45 可能参与 Lck (或其他 Src 成员)负性调节位点在体内的去磷酸化并使激酶转变为活化形式而参与 TCR 信号转导。CD45 缺陷细胞中超磷酸化形式的 Lck 将被阻止参与 TCR 的信号转导事件。这样,Src PTK 和 PTPase 之间存在着一个复杂的,可能非常动态的关系,这一关系可以影响 TCR 诱导信号转导事件的能力。

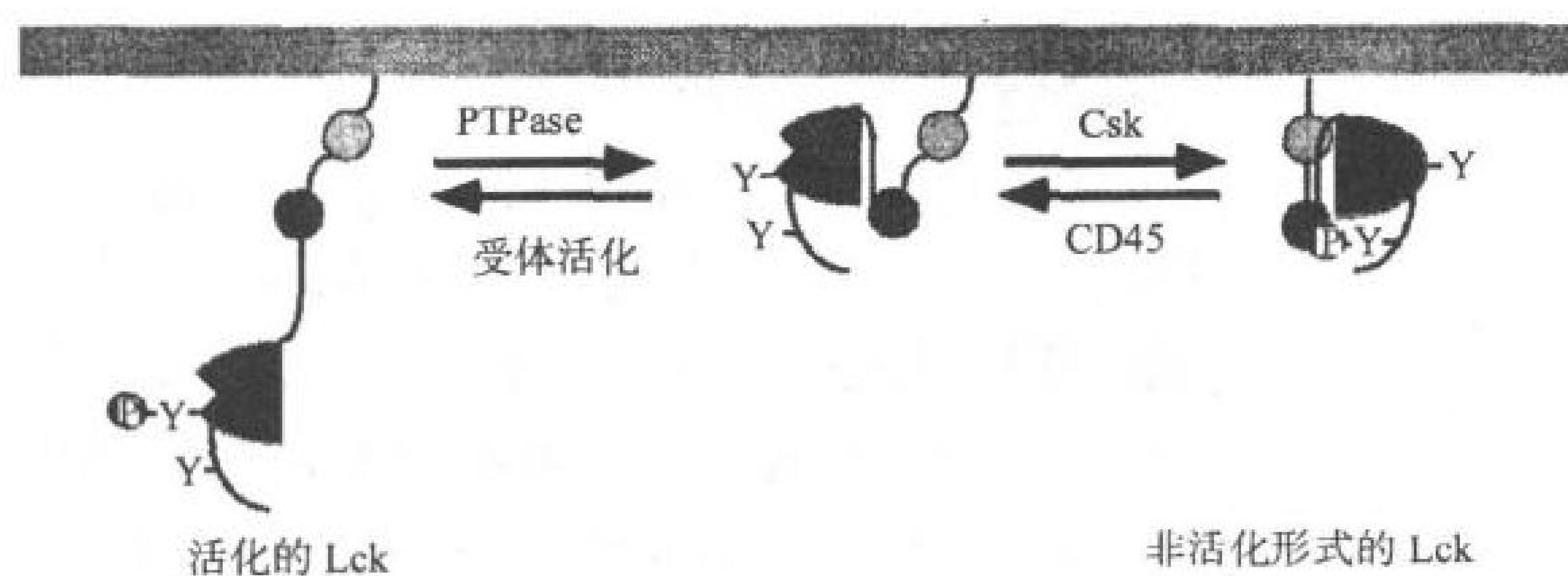


图 12.7 Lck 的动态调节。Lck 2 个磷酸化位点的调节示意图。Lck C 端负性调节区的磷酸化导致 Lck 激酶呈"闭合的"非活化状态。受体刺激后,CD45 可使该位点去磷酸化而打开激酶,分子呈现活化状态。受体刺激还导致活化环发生磷酸化,进一步增加激酶活性。一种目前尚未鉴定清楚的 PTPase 可使活化环去磷酸化,从而降低激酶活性。

TCR 介导 PTK 活化的后果

除 TCR 成分以及 Src、Syk 家族激酶以外,TCR 介导的 PTK 活化还导致多种胞内蛋白酪氨酸磷酸化。表 12.3 中列出部分由 TCR 刺激诱导磷酸化的蛋白。这些蛋白 磷酸化的功能在很大程度上并不清楚。一些蛋白(如 Grb2、Shc 和 Slp-76)没有内在酶活性但可以通过 SH2 和(或)SH3 结构域作为接头,将 TCR 与重要的胞内途径相联系。另一些具有明确的酶活性,如磷脂酶 Cγ1(PLCγ1)、Itk 和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)都受酪氨酸磷酸化的影响。还有许多其他蛋白质在 TCR 信号转导途径中的功能仍不清楚。

427

磷酯酰肌醇第二信使途径活化

TCR 诱导发生酪氨酸磷酸化的蛋白质中，PLCγ1 是了解得最清楚的分子之一。TCR 刺激导致 PLCγ1 酪氨酸磷酸化并活化的确切机制仍不完全清楚。PLCγ1 本身是一种胞质酶[269]，当分子内 SH2 与 Syk、ZAP-70 或某个接头蛋白的酪氨酸磷酸化残基相互作用时，一部分 PLCγ1 就可能转位至膜上。在 B 细胞中 PLCγ1 通过 SH2 与 Syk 的内在结构域 B 中的 Y348 和 Y352 相互作用[270]，但在 T 细胞中未观察到相似的结合。将 PLCγ1 连接至 TCR 信号途径最可能的接头蛋白是最近鉴定出的、TCR 诱导的一种 36kDa 的酪氨酸磷酸蛋白 LAT。后者可与 PLCγ1 和 Grbz(217a)相互作用，是 Ras 途径中的一个接头蛋白(见后文)。由于 LAT 只在特定的细胞区段中特异性表达，它能帮助 PLCγ1 定位于质膜。一旦定位于质膜，PLCγ1 就处于可被磷酸化的位置，导致其活化。PLCγ1 在 Lck 缺陷或 ZAP-70 缺陷的 T 细胞中不能磷酸化活化[228,230,272]。有趣的是，Btk，B 细胞中的 Itk 的同源物缺陷也导致 PLC 不能活化[273]。以此类推，Itk 可能在 T 细胞中发挥重要作用。由于 T 细胞中 PLCγ1 磷酸化发生在几个酪氨酸残基上并与它的催化功能活化相联系[274]，多种 PTK 能够通过募集或磷酸化该酶直接或间接地参与分子活化。

表 12.3 TCR 刺激后发生酪氨酸磷酸化的部分蛋白质

TCR 亚基
CD3δ，ε，γ
ζ
蛋白酪氨酸激酶
Itk
Lyn
Lck
MAPK
Pyk2
Syk
ZAP-70
具有酶功能的蛋白质
磷脂酶 Cγ1(PLCγ1)
其他
Cbl
CD5
CD6
Ezrin
LAT
Shc
Slap-130
Slp-76
Shc
α 微管蛋白
valosin containing protein
Vav

PLCγ1 是几种酶中的惟一具有 PLC 活性的。活化 PLC 导致 PI 途径第二信使的产生。PI 途径参与 T 细胞活化已研究得较充分。早期以钙离子载体和特定的佛波酯进行的研究显示，这些试剂能够协同诱导淋巴因子分泌、IL-2R 表达、T 细胞增殖以及 CTL 细胞毒机制活化[37]。而且，这些试剂能够在 TCR 表达缺失的突变细胞株中诱导淋巴因子分泌[33,40]，提示这些药理试剂可以模拟 TCR 重要的下游信号。由于钙离子载体可以诱导胞质游离钙浓度增加并拮抗佛波酯活化的丝/苏氨酸激酶——PKC[275]，这使得人们推断 TCR 可通过相同的信号转导事件触发 T 细胞活化。

钙敏感荧光染料的发展(如 quin 2、indo 1 和 fura 2)可以显示像 T 细胞这样的小细胞$[Ca^{2+}]_i$ 的变化，从而验证上面的假设[276]。用荧光分光光度计可显示群体细胞$[Ca^{2+}]_i$ 的改变，流式细胞仪可对一个细胞亚群进行检测，而敏感的显微技术则可对单细胞的$[Ca^{2+}]_i$ 变化进行观测。的确，在刺激 TCR 后数秒到数分钟内即可观察到$[Ca^{2+}]_i$从大约 100nmol/L 的基线水平升高至大于 1.0μmol/L，并维持数小时[33,277,278]。TCR 刺激后可观察到 PKC 出现相似的快速、持续活化[279,280]。钙离子载体和佛波酯的激动效应提示刺激 TCR 后观察到 $[Ca^{2+}]_i$ 增高和 PKC 活化是生理状态下重要的细胞内事件。

$[Ca^{2+}]_i$增高和 PKC 活化通常是受体介导信号转导途径——PI 途径的特征性事件。在 PI 途径中关键性的调控事件之一是对相对较少的膜磷脂，称为磷脂酰肌醇-4，5-二磷酸 (PIP_2)的水解[281]。TCR 通过磷酸化 PLCγ1 活化 PI 途径[272,274]。活化该酶是通过裂解 PIP_2 的磷酸酯键实现的，裂解导致 1，4，5-三磷酸肌醇(1，4，5-IP_3)和二酰基甘油(DG)产生(图 12.8)。这些分子反过来作为细胞内“第二信使”分别诱导$[Ca^{2+}]_i$增加和 PKC 活化。在抗原或抗 TCR mAb 刺激 TCR 的数秒内，即可观察到 1，4，5-IP_3 明显增加以及 DG、磷脂酸代谢增强[282]。只要受体处于被占用状态，第二信使就会持续产生[27]。

PI 途径的第二信使功能

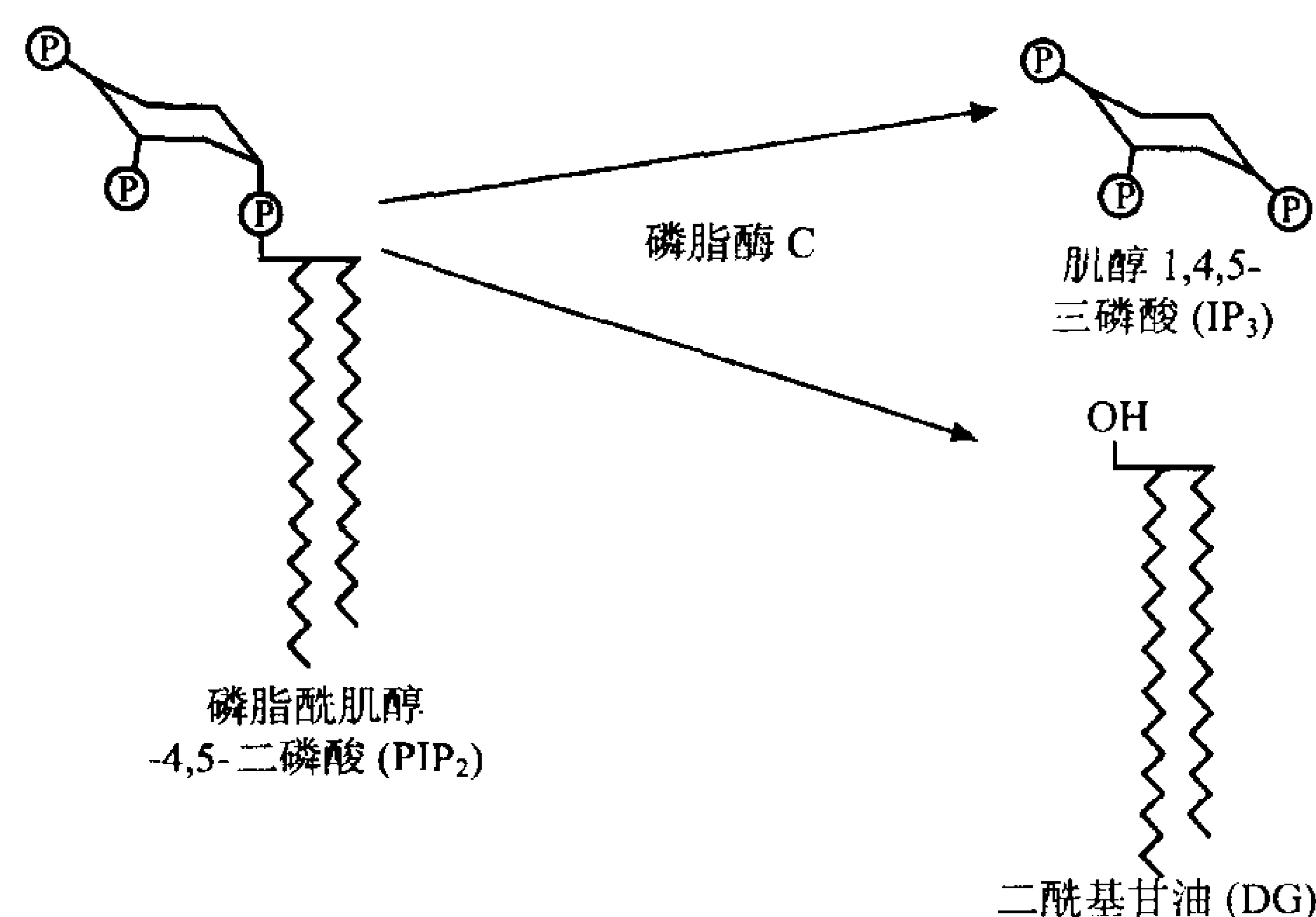


图 12.8 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸及其磷脂酶 C 水解产物结构示意图。

1，4，5-IP_3提高胞质钙离子的作用得到广泛研究。这一水溶性的糖具有一个特异性的细胞内受体,可以调节胞内 Ca^{2+} 从贮存的内质网中流出[283,284]。1,4,5-IP_3 释放细胞内 Ca^{2+} 贮存是 TCR 刺激后 1～2 分钟内[Ca^{2+}]$_i$ 首次升高的主要原因[282]。但在细胞群体水平,刺激 TCR 诱导的[Ca^{2+}]$_i$ 增高持续数小时[27,285]。膜片钳和图像分析技术在单细胞水平进行的观测提示,以多种不同配基进行 TCR 刺激后在细胞群体水平观察到的[Ca^{2+}]$_i$ 持续增高反映的是单个细胞不同时相性的[Ca^{2+}]$_i$ 振荡升高的总和[47,285]。持续性的[Ca^{2+}]$_i$ 增高和振荡的存在均需要钙从胞外向胞内的跨膜流动。持续的[Ca^{2+}]$_i$ 增高也是某些细胞反应所必需的,特别是触发 IL-2 基因转录[27,285,287]。在胞内钙贮存耗尽时,T 细胞通过一个非电压依赖性 Ca^{2+} 通道介导 Ca^{2+} 跨膜流动,该通道受一个尚未得到鉴定的调节分子的调控[288,289]。一旦跨膜钙流动使胞内 Ca^{2+} 贮存恢复,质膜钙通道即关闭。这种钙流的调节称为“可占有性钙内流”。高水平的[Ca^{2+}]$_i$ 似乎对跨膜钙离子有负性影响[288,290]。这种负反馈可能是观察到的钙振荡的产生原因,并和保持相对狭窄的生理性范围有关。

多种形式的肌醇磷酸酯、大量不同的磷酸肌醇单体以及调节这些成分的多种酶的存在使磷酸肌醇对细胞活化可能产生更大的影响[291]。这些磷脂或磷酸肌醇单体以及其他未被提及的形式可能参与调节一些胞内事件,这种可能性显示了受体如何与 PI 途径相结合从而对多种胞内事件发生影响。

一种磷酸肌醇的代谢值得特别关注,它们由 PI-3 激酶活化产生。该酶包含了两个组分,即作为接头蛋白和调节亚基的 p85 亚基和一个催化亚基 p110[292]。刺激一系列受体包括 TCR、CD28、IL-2R[122,293～296] 均可活化该酶。PI-3 激酶活化导致几种磷脂酰肌醇的产生,包括 PI_3-P、PI_3,4-P_2 和 PI_3,4,5-P_3。PI-3 激酶活性可被两种抑制剂渥曼青霉素(wortmannin)和 LY294002 阻断。这些抑制剂可以帮助判断 PI-3 激酶的重要性以及在受体介导的信号事件中它的代谢情况。这些磷脂和 PI-3 激酶活化后产生的磷酸肌醇可能具有多种重要功能,包括受体内在化、细胞骨架重排、细胞增殖和凋亡[292]。

PIP_2 的另一种水解产物是 DG。DG 也是调节丝/苏氨酸激酶家族强有力的“第二信使”,包括 PKC 同工酶[297]。DG 活化 PKC 是通过增加其与磷脂的亲和力实现。许多酶也是 Ca^{2+} 依赖性的,在生理水平的[Ca^{2+}]$_i$ 下,它们通过 DG 和 Ca^{2+} 的协调作用而活化。TCR 刺激后的细胞中可观察到 PKC 同工酶的活化[279,280,298,299]。同样,佛波酯是 PKC 的有效活化者。这也解释了为何这些试剂与 Ca^{2+} 载体协调作用可以模拟抗 TCR mAb 效应。

PKC 代表了一个密切相关的酶家族,它们具有共同的结构特征,并且其活化需要 Ca^{2+}、磷脂和 DG[297]。已鉴定的形式能够被激动剂佛波酯活化,但是它们的钙敏感性不同。许多但不是所有同工酶在 T 细胞中均有表达。在这些表达当中,有证据强烈地提示 PKCα、β 和 θ 同工酶的重要性[298,299]。至少部分 T 细胞应答,包括 IL-2 产生能在无 PKCβ 的情况下发生[300]。一些酶可能具有相同的功能,因为在钙离子载体刺激条件下,表达一组成型活化形式的 PKCβ 能够诱导 IL-2 转录活性[301]。但也存在这样的可能,即在 T 细胞中不同的同工酶既有相互重叠的功能也有不同的功能。PKCθ 的特异性功能可能表现在 T 细胞和 APC 相互作用的界面上有该分子的特异性分布[302]。这是惟一的一个在抗原特异性相互作用时发生转位 的 PKC 同工酶。

几条途径均可能影响 PKC 活性。首先,DG 由 DG 激酶代谢成磷脂酸将帮助限制 DG 的量。第二,一种钙活化蛋白酶,需钙蛋白酶(calpain),在体外能将 PKC 裂解为 50kDa 的胞质组成型活化酶,其活性不依赖于

Ca^{2+}和磷脂[303]。(需)钙蛋白酶活性是否在T细胞中帮助活化或调节PKC尚不清楚。第三,刺激配基的特性将影响PKC的活化。以固相化的抗CD3 mAb刺激T细胞诱导长时间的PKC活性转位至膜,但同样的mAb在可溶性形式下则不出现这一效应,可能是前者更多地保持PIP_2的转换[279,304]。这些持续的PKC活化对随后T细胞增殖反应很重要[280]。这样,PKC的活化和调节可能比先前预料的要复杂。可以预期这些胞内事件不同的调控对最终的细胞反应有影响。

$[Ca^{2+}]_i$增高和PKC活化的后果

$[Ca^{2+}]_i$增高和PKC活化的协调效应必须从这些胞内事件对随后的信号途径的影响说起。虽然$[Ca^{2+}]_i$增高和PKC活化对细胞反应影响的细节仍不清楚,但这方面的认识已获得了很大的进展。图12.9中描述了TCR至IL-2基因转录活化过程中包含这些事件的大致信号通路的模式。$[Ca^{2+}]_i$增高影响钙调蛋白依赖事件,包括活化钙调磷酸酶(PP2B)和Ca^{2+}/钙调蛋白依赖激酶(CaM激酶)。

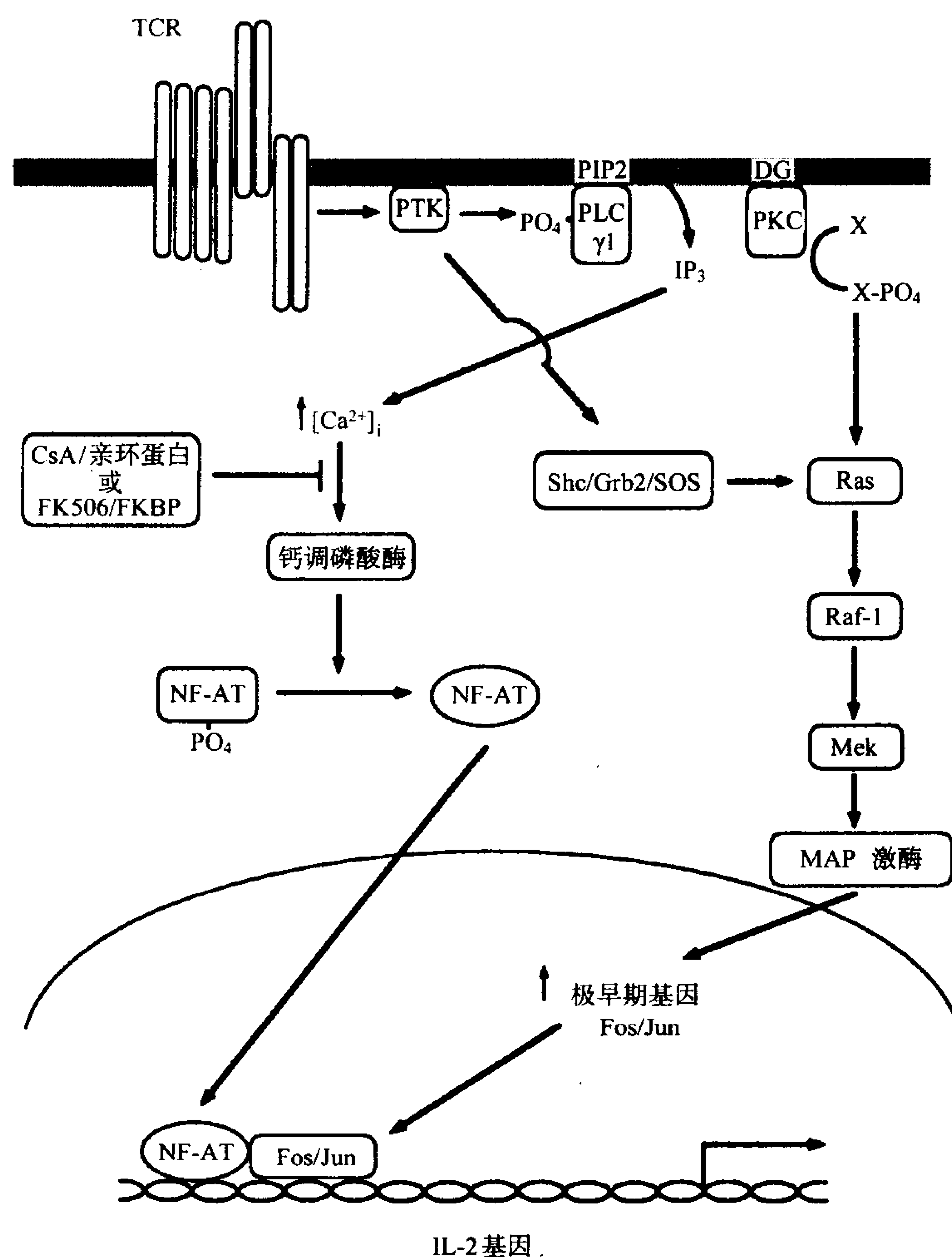


图12.9 TCR活化诱导IL-2表达的信号转导模式。注意蛋白质分子间的箭头并不代表两者间的直接相互作用。

430

Ca^{2+}/钙调蛋白依赖的丝-苏氨酸磷酸酶的关键性作用现在已经明确,它们是临床器官移植革命性药物、免疫抑制剂CsA和FK506的分子靶点[305]。CsA和FK506分别与它们的细胞受体亲环蛋白(cyclophilin)和FKBP形成分子复合物,再由这些复合物发挥抑制功能[306]。钙调磷酸酶表达广泛但在T淋巴细胞中只有低

水平的表达,这可能与免疫抑制药物相对特异定位于T细胞功能有关。

钙调磷酸酶在调节IL-2表达中的关键性作用已得到明确[7]。一个被称为“活化T细胞的核因子”(NF-AT)是钙调磷酸酶的靶蛋白,该核因子可以调节多种淋巴因子基因转录,包括IL-2[307]。NF-AT组成一个胞质磷酸蛋白家族,当钙离子增高时转位至核[287,308]。这种转位是关键性的调节事件,因为NF-AT的核定位活化了它的转录功能[287]。钙磷酸酶活性是NF-AT转录报告复合物活性的关键[309,310]。而且,它能将NF-AT脱磷酸化[311]。这种去磷酸化可能显露NF-AT核定位位点,导致分子的转位发生。这样,$[Ca^{2+}]_i$增高导致钙调磷酸酶(calcineurin)活化,后者进一步使淋巴因子基因表达(见下文)有关的重要转录因子去磷酸化活化。

其他的对$[Ca^{2+}]_i$增高有反应的酶是多种Ca^{2+}/钙调蛋白-依赖性激酶(CaM激酶)。激酶在TCR刺激后活化。单独活化CaM激酶似乎对IL-2基因表达具有负性调节作用[312]。这与单独应用钙离子载体可诱导T细胞无反应性相吻合[28]。

PKC的相关底物十分令人感兴趣。T细胞经佛波酯处理或经TCR刺激后,PTK活化导致多种蛋白质在丝氨酸或苏氨酸残基上发生磷酸化,这当中包括人的CD3γ和δ链[162],小鼠CD3δ和CD3ε链[313],CD4[314],转铁蛋白,IL-2R,和HLAⅠ类分子重链[315]。其中一些蛋白质并不是PKC的直接底物,并且这些蛋白磷酸化后其功能重要性也不清楚。但是正如下面讨论的,T细胞中PKC活化是令人感兴趣的和重要的细胞反应。

活化Ras途径

以佛波酯或以TCR配基刺激T细胞可诱导原癌基因Ras的快速活化[316]。Ras是一个21kDa的外周膜蛋白,并是许多结合和分解鸟苷酸三磷酸(GTP)蛋白中的一个。在结合GTP时Ras呈活化状态,而在结合GDP时呈非活化态。它的鸟苷酸三磷酸酶活性(GTPase)通过与鸟苷酸交换蛋白的相互作用而受到调节,如Sos、GTPase-活化蛋白(GAPs)(图12.10)[317,318]。

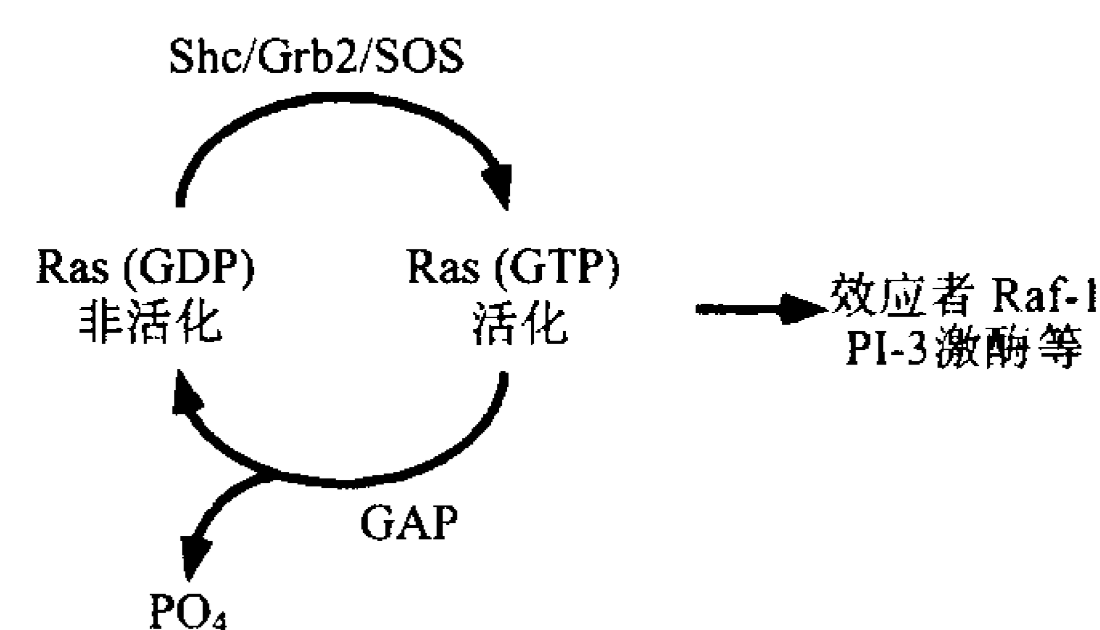


图12.10 Ras GTPase的调节。

通过TCR活化Ras是PKC依赖和PKC不依赖机制共同作用的结果[319]。PKC活化怎样导致Ras活化仍不清楚。最初的研究提示:T细胞中加入佛波酯或TCR刺激中Ras的活化是由于GAP活性受抑制[320]。TCR刺激后GAP有微弱的磷酸化,并同时出现一个62kDa的酪氨酸磷酸化蛋白.该分子最近已被克隆[299]。这一复合物在T细胞Ras活化中的作用仍需进一步确立。但是,近来更多的研究显示鸟苷酸交换蛋白Sos参与反应,Ras的功能主要受它调节。许多遗传和生物化学方面的研究提示结合蛋白Grb2与鸟苷酸交换蛋白Sos结合共同参与Ras活化的调节[318]。Grb2是一个接头蛋白,在SH3结构域两侧各含有一个SH2结构域。在TCR刺激的细胞中,Grb2的SH2与LAT相结合[321],LAT是一个与PLCγ1结合的磷酸化蛋白。另一个接头蛋白Shc[322]也有类似的作用。Grb2的SH3与Sos脯氨酸富含区相结合。这样,TCR刺激后可以通过募集Grb2/Sos复合物至与TCR结合的、酪氨酸磷酸化的Shc或膜结合的LAT而活化Ras。随后膜结合Sos分子可以通过诱导核苷酸交换活化Ras。

Ras具有多个下游效应分子,包括Raf、PI_{-3}激酶以及其他的GTP结合蛋白如Rac和Cdc42[324,325]。Ras-Raf相互结合介导的功能最为明确,并且已经证实其在TCR信号转导活化IL-2基因表达中发挥重要作用[299,326]。Ras直接与丝-苏氨酸激酶Raf-1结合。Raf-1在TCR刺激或佛波酯活化PKC的T细胞中呈活化状态[327]。Raf-1能调节双特异性酪氨酸-丝苏氨酸激酶MEK活化,从而活化MAPK[328,329]。在T细胞中,MAPK活化也与PKC活化相联系[330]。这一复杂的激酶级联在多种细胞的生长和分化中参与调控核事件。

Ras的活化参与活化IL-2基因转录[299]。一种因水解GTP能力下降而呈活化形式的Ras能够部分地替代佛波酯,协同钙载体诱导IL-2上游调控区或多个NF-AT位点的转录启动[326,331]。更重要的是缺失突变Ras或Raf可抑制TCR诱导的IL-2转录[326,332]。活化的Ras参与介导茴香霉素敏感的和钙离子非依赖的NF-AT,AP-1核因子活化,两者形成的异二聚体组成Fos和Jun相关蛋白[333-335]。Fos的表达高度依赖于MAPK活化。

这样，TCR 诱导的不同信号通路分支就整合起来了。介导[Ca^{2+}]$_i$ 增高和介导 Ras 活化，导致不同的转录因子活化，共同调节 IL-2 基因表达(图 12.9)。

其他的 PTK 调控事件

正如在表 12.3 中所提及的，TCR 刺激可引起许多蛋白诱导性磷酸化。目前的讨论只集中在这些蛋白中有限的几种，其他通过 TCR 活化 PTK 而发生磷酸化的蛋白质的功能尚远未清楚，但它们可能在 T 细胞活化中发挥重要功能。在这一认识下，两种可诱导的磷酸化蛋白 Vav 和 Slp-76 值得进一步的讨论。

Vav 是一个 95kDa 蛋白，具有多个有信号转导功能的结构域，在造血细胞系和滋养层细胞中广泛表达[336]。TCR 刺激可诱导该分子磷酸化[337,338]。Vav 表达缺陷时 T 细胞发育受阻，而部分发育的 T 细胞具有一个异常的 TCR 信号转导，并导致 IL-2 基因表达。这一观察强调出 Vav 在 TCR 功能中的重要性[339,340]。而且 Vav 的过度表达导致组成型和 TCR 诱导的 IL-2 基因表达增强[341]。这些研究提示 Vav 在 TCR 信号转导中发挥重要作用。

Vav 参与 TCR 信号转导的机制目前尚不清楚。在成纤维细胞中缺失其 N 端的 65 个氨基酸残基导致产生一个原癌基因蛋白[342]，但是过度表达原癌基因 Vav 不能重获野生型蛋白在 T 细胞中的活化效应[341]，提示该区域有重要功能。它的鸟苷酸交换结构域特异性地针对 Rac、Rho 和 Cdc42[343]。这些 GTP 结合蛋白参与肌动蛋白细胞骨架重排。Lck 体外酪氨酸磷酸化该分子能够活化鸟苷酸交换活性。肌动蛋白细胞骨架在 TCR 信号转导功能中的作用尚不清楚。但正如下边要讨论的，T 细胞-APC 相互作用的位点附近有肌动蛋白聚合发生[344]。肌动蛋白细胞骨架成分可能帮助将 TCR 信号转导途径中的成分组织在一起。

Vav SH2 区在与至少两种蛋白的结合中有重要作用。SH2 直接与酪氨酸磷酸化的 ZAP-70 相结合，且 SH2 的结合功能依赖 Vav 酪氨酸磷酸化[242,345]。推测 SH2 序列对 ZAP-70 的 Y351 具有特异性结合作用，而这一位点已经证明是结合 Vav 和 ZAP-70 信号转导功能所必需的[242]。Vav 的 SH2 也与酪氨酸磷酸化的 Slp-76 相结合，后者是在造血细胞系中广泛表达的接头蛋白。像 Vav 一样，过量表达 Slp-76 增强 TCR 信号、导致 NF-AT 活化[346]。而且，在过表达研究中，两种蛋白能够协同活化 NF-AT，提示 Vav 和 Slp-76 相互作用的重要性[347]。这些研究提示 Vav 和 Slp-76 复合物在 TCR 信号转导途径和参与肌动蛋白细胞骨架调节的重要作用。

早期信号转导事件的后果

早期生化事件

TCR 和(或)其他辅助受体触发的信号转导事件可以介导胞内生化改变的级联发生并参与介导细胞应答。这些早期生化事件包括蛋白质磷酸化、多种激酶活化(如前所述)、胞质碱性化、离子流动、环核苷酸水平改变。这些事件不仅局限于 T 细胞，而具可广泛地在受体介导多种类型细胞的活化中观察到。它们可能十分重要，通过尚需明确的机制来调节晚期细胞应答。

pH 改变

改变胞质离子环境，特别是胞质 pH 是影响细胞功能并继而触发细胞应答的机制之一。改变 pH 对酶活性有复杂的影响。在多种细胞类型中，当受体触发 PIP_2 水解时细胞发生碱性化改变[348]。凝集素或 mAb 刺激 TCR 均可导致 T 细胞株和胸腺细胞 pH 值增高[349,350]。这似乎是质膜 Na^+/H^+ 反向转运活性增高的结果。这种效应可为 PIP_2 水解所调节，因为有报道认为模拟凝集素和 TCR mAb 的效应依赖细胞外钙和佛波酯活化 PKC[349,350]。

环核苷酸流动

在多种细胞类型中环核苷酸，环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cAMP)的改变可以调节细胞功能。T 细

胞丝裂原反应中环核苷酸的变化在早期T淋巴细胞活化中受到相当的重视。T细胞受丝裂原凝集素刺激后,cAMP先升高后降低的变化被认为是T细胞增殖反应的重要调节因素[351]。用抗CD3 mAb刺激一种T细胞株后可以观察到细胞cAMP水平升高[352]。高水平的cAMP对T细胞增殖的抑制效应已经明确[353,354]。高水平cAMP抑制T细胞增殖是通过阻止IL-2产生实现的,但它不能抑制IL-2对受体的刺激作用[355]。cAMP对cAMP抑制T细胞应答的机制始终有争议,可能与cAMP依赖的激酶活性有关。一些研究者观察到cAMP抑制T细胞PIP_2水解[356],但不是所有的人均观察到了此现象[357]。另一个cAMP依赖性激酶是Raf-1激酶,后者可因丝氨酸磷酸化而被失活[358]。抑制这两个事件之一均可能造成负性调节效应。由于T细胞表达的多种受体包括β-肾上腺素受体均可诱导cAMP增高,因此T细胞功能可能被免疫的或非免疫的介质所影响。

丝裂原凝集素刺激T细胞后可以观测到cGMP增高[359]。这种cGMP增高的生理功能尚不明确。

432

改变膜通透性

与其他细胞一样,T细胞质膜内外具有离子电化学梯度。这一梯度的形成是由于质膜两侧离子分布不均一造成的,并导致大约-70mV的静息负电位。静息负电位导致带电离子具有顺浓度梯度跨越质膜的趋势。但是Na^+、K^+、Cl^-和Ca^{2+}离子跨膜的能力受到质膜对该种离子梯透性的限制。而受体可以介导膜对特定离子的通透性改变,从而改变了膜的通透性。另外通道开放可以引起膜通透性的快速变化。只要通道保持开放和离子梯度存在,扩散就可以建立。这样,受体信号转导能影响质膜对特定离子的通透性发生改变,这些通透性改变可以表现为膜电位的改变。

凝集素刺激后,T细胞在发生超极化反应之后(如更加负的电位)有瞬时的去极化(如更加正的电位),这一现象已得到公认多年了[360]。敏感的膜片钳技术显示,T细胞中电压依赖的钾通道是主要的离子通道[361]。在小鼠T细胞和胸腺细胞的多种表型中均可观察到这些钾通道的异质性[362]。已检测到3种类型的钾通道,它们是n、n′和l。人T细胞中只存在n通道。这种异质性的功能重要性仍不清楚。这些通道的功能特性在加入T细胞丝裂原后发生改变。但T细胞表面分子在配受体相互作用后是否可以直接调节这些通道,目前仍不清楚。胞外Ca^{2+}不能通过此通道进入细胞。已观察到升高的$[Ca^{2+}]_i$可以调节瞬时的超极化反应[363],随后去极化的机制仍不清楚。在T细胞丝裂原反应中观察到相对滞后的膜电位去极化改变提示,这些通道不受膜受体相关信号转导的直接调节[364,365]。K^+通道阻断剂可以抑制T细胞增殖反应,提示这些通道的功能重要性。以霍乱毒素阻断K^+通道似乎可以影响TCR刺激后Ca^{2+}增高的程度,这不像是经典的电压依赖式Ca^{2+}通道介导的效应。需要更进一步的工作以理解K^+通道的功能。

细胞反应

细胞骨架改变

人们研究了辅助性T细胞克隆与APC以及细胞毒性T淋巴细胞(CTL)与它们的靶细胞相互作用时,T细胞中细胞骨架成分的重新分布和重新定位的情况[344]。辅助性T细胞和CTL中特异性的抗原依赖性微管组织中心(MTOC)可重新定位至细胞发生相互作用的部位。这种MTOC的重新定位在APC或靶细胞中不发生。另外,在细胞发生抗原特异性相互作用时一些肌动蛋白细胞骨架(如Talin和F-肌动蛋白)移位至T细胞与APC或靶细胞相结合处,但不是所有的细胞骨架均会发生移位(如α-肌动蛋白)。

由于细胞骨架的极化需要抗原特异性相互作用存在,提示TCR介导的信号转导在这一过程中可能发挥重要作用。研究提示TCR ITAM是TCR调节PTK[366a]所必需的。ITAM能够作为细胞骨架重新定向的焦点。虽然Ras的活化似乎并不为这些事件所需,另一个GTP结合蛋白,Cdc42[366b]被认为在T细胞极化中发挥作用。由于具有鸟苷酸交换功能的Vav能够调节Cdc2活化[343],这使人易于设想Vav与ZAP-70的相互作用以及Vav酪氨酸磷酸化,导致其对rho-家族GTPaseGEF功能的活化,并参与介导T细胞骨架重新定位。同样有趣的是,α-微管蛋白在TCR刺激后也发生酪氨酸磷酸化并且磷酸化的微管蛋白分布于细胞去极化区段[367]。

这提示微管蛋白酪氨酸磷酸化在MTOC极化中发挥作用[368]。肌球蛋白轻链激酶能调节细胞骨架结构,它可以被升高的$[Ca^{2+}]_i$活化[369]。这些观察提示T细胞发生细胞骨架重排以获得恰当的定位和局限化的T细胞反应,这一过程涉及复杂的机制。

重新定位的功能性后果中格外引人注意的是定向分泌预先包装好的或新合成的分泌性产物。对CTL而言,这可能意味着只定向针对特定的抗原携带靶细胞分泌细胞毒性成分(见下文和第13章)。对辅助性T细胞而言,在巨噬细胞活化或B细胞分化增殖中发挥重要作用的新合成的淋巴因子能够定向地针对相应的APC。对呈递抗原给T细胞的B细胞而言,这可能有助于限制这些淋巴因子对抗原特异性B细胞发挥效应。

细胞毒机制的活化

溶破过程的触发发生在CTL受体与靶细胞上相应配基复杂的细胞-细胞相互作用过程中。TCR触发的信号转导事件有助于细胞溶破机制的启动。与这一实验结果相吻合,大多数情况下细胞外钙是靶细胞溶破所必需的,但CTL与靶细胞的结合则不依赖Ca^{2+}的存在[370]。而且,钙载体和佛波酯协同诱导CTL以抗原非依赖特征溶破旁观细胞[371]。在单细胞水平可以观察到与特异性靶细胞相互作用的CTL的$[Ca^{2+}]_i$水平增加[372]。总之,这些观察强烈地提示靶细胞抗原刺激CTL的TCR触发跨膜信号转导机制,包括PIP_2水解、$[Ca^{2+}]$增加和/或PKC活化,并导致细胞溶破机制活化。

433 TCR信号转导事件活化两种细胞溶破机制。这两种机制在第31章中详细讨论。简单地说,一种机制包括预先包装好的细胞毒性颗粒的分泌,该颗粒内含穿孔素和称为"颗粒酶"的丝氨酸酯酶[370]。穿孔素是一种钙依赖的孔道形成蛋白,参与介导靶细胞的渗透性破坏。颗粒酶辅助启动靶细胞的凋亡途径。佛波酯和钙载体试剂可以通过模拟TCR触发PIP_2水解而诱导这些颗粒分泌。通过TCR诱导的信号转导事件,包括PIP_2水解,活化这一细胞毒机制与在血小板、中性粒细胞和肥大细胞中观察到的刺激-分泌偶联机制相一致,均通过相似的受体介导信号转导机制。事实上,将穿孔素转染至肥大细胞颗粒中去,可以诱导这些细胞杀伤致敏的靶细胞[373]。就CTL而言,分泌颗粒与重新定向的细胞骨架成分,特别是MTOC相联系可能有助于将受刺激而分泌的溶细胞颗粒定位至相关的靶细胞而防止非抗原特异性的旁观细胞溶破[368]。与之相反,钙载体和佛波酯诱导的旁观细胞溶破可能代表了细胞表面受体未发挥作用这样一个状态,导致细胞以不定向形式分泌溶破性颗粒[371]。

CTL还使用第二种机制诱导靶细胞死亡——Fas系统(见第22、30章)。Fas是肿瘤坏死因子受体家族的一员,其胞质区序列负责与触发凋亡途径的蛋白相互作用并破坏靶细胞。只有表达Fas的靶细胞才对这一机制敏感。对于T细胞通过Fas系统介导靶细胞破坏而言,它们必须被诱导表达另一肿瘤坏死因子家庭成员——Fas配体(Apo-1)[374]。Fas配体表达是TCR信号转导事件转录水平诱导的结果,NF-AT转录因子的活化参与此过程。这样,TCR信号转导事件调节两种迥然不同的机制共同参与介导CTL杀伤靶细胞。

基因活化事件

T细胞受体介导的信号转导事件的结果包括质膜上的刺激诱导一系列特异性反应基因转录活化。这些转录事件诱导T细胞分化和增殖。我们在对胞质信号转导途径如何介导关键性转录因子活化的理解已获得长足的进步。

越来越清楚,受体介导的信号转导事件导致T细胞增殖并获得分化能力不是单一 一系列基因活化事件的结果,而很可能是受到级联调控的一系列基因顺次活化事件的结果。这样,在最初的信号转导事件导致特定的一系列基因转录活化之后,第一波活化基因产物可以参与活化第二波目的基因转录,以此类推。当基因产物累积到一定程度,细胞达到反应终点(以分化或增殖来衡量),并且有明确的证据显示T细胞应答并不是无限制的。

IL-2基因和它的受体IL-2R的活化是这种级联一个极好的例子。这些基因的转录在T细胞刺激后的最初几个小时即可开始[7,307]。IL-2基因自身的转录活化依赖蛋白质合成,这就反映了IL-2基因转录的触发需

要一种或多种基因的翻译产物[308]。一旦产生，IL-2 与其受体结合触发不同的信号转导事件，导致包括调节细胞生长在内的一系列事件。增殖反应发生在数小时或几天之后。在这种以一个基因活化级联来行使功能的情况下，最初活化的一系列反应基因必须受到严密调控，否则必然会发生增殖或分化的失控。

早期基因活化事件

在特定的活化刺激出现的数分钟内，T 细胞中的一些基因即已出现转录活化[7,307]。这些"极早期活化基因"代表了大部分的新表达基因，它们的表达不依赖蛋白合成。这样，极早期基因代表了 T 细胞活化中最初的诱导基因表达级联。抑制蛋白合成能阻止随后的 IL-2 基因转录活化提示至少这些早期活化基因产物中的一个影响 IL-2 基因调控[27,375]。因此，这些基因产物中的一个或多个可能参与形成核蛋白，后者结合或影响 IL-2 基因的重要调节序列（见后文）。这一领域的进展使人们对这些极早期活化基因的表达调控以及它们在 T 细胞应答中确保后续的基因活化有更完全的理解。

两种编码核蛋白的原癌基因，*c-myc* 和 *c-fos*，是参与转录调节的极早期基因[376,377]。它们可作为研究极早期活化基因系列的有用模型。*c-myc* 的细胞生长调节功能经过长期研究仍不清楚，但它能结合 DNA，与其他核蛋白包括 Max 形成复合物，并能调节转录[378,379]。c-fos 与另一种称为 c-Jun 的蛋白结合形成二聚体，进而成为转录复合物 AP-1[377]。然而 c-myc 和 c-fos mRNA 的表达不仅限于 T 细胞，在静止 T 细胞中 TCR 受刺激后这些基因出现在首先转录活化的基因行列中。以 PHA 刺激，或以与 TCR 或 CD2 反应的 mAb 刺激后 5～10 分钟，即可检测到 c-myc 和 c-fos 的转录活化，单独升高[Ca^{2+}]或活化 PKC 也可诱导它们的表达[382]。当钙通道与佛波酯同时作用时两种事件的协同效应非常明显。在 T 细胞中 c-myc 和 c-fos 转录活化均不需要蛋白合成，提示这些基因的转录由受体介导信号转导的系列生化事件直接调节。MAPK 家族成员，包括 Jun N 端激酶（Jnk）和 Erk 激酶，在 T 细胞受到抗原受体信号和佛波酯或共刺激信号刺激时活化，并磷酸化转录因子如三重反应因子、血浆反应因子，后者可与 c-fos 启动子结合，从而直接影响 c-fos 的转录调节[377]。

434

早期活化基因的产物与正在进行的信号转导事件产生的效应一起，触发第二波的基因活化。的确，几种早期基因活化产物可能参与调控 IL-2 基因表达，包括形成的 AP-1 复合物[333,383]。有趣的是，即使在早期活化基因转录以后，IL-2 基因转录仍需要持续的信号转导。对此有几种可能的解释，早期活化基因的翻译后修饰可能是它们功能所必需的。的确，c-fos 和 c-jun 翻译后需要 Jnk 和未知的 c-fos 激酶将之磷酸化，以获得 AP-1 转录活性[377,384,385]。总之，一系列非常协调的事件级联，包括信号转导事件和基因活化，参与调节随后发生的基因活化并最终诱导 T 细胞增殖反应。

活化淋巴因子基因

T 细胞活化的许多重要表现是由众多 T 细胞来源的，称为淋巴因子的分泌型可溶性蛋白介导的。这些淋巴因子在多种细胞类型和组织中发挥多种功能。在静止 T 细胞中，淋巴因子的产生是编码它们的基因转录活化的结果。不同的 T 细胞对相同的刺激应答可产生不同系列的淋巴因子，而不同的淋巴因子谱可以反映辅助性 T 细胞两种主要亚类分泌淋巴因子的轮廓（Th1 和 Th2，见第 26 章）。在不同的亚群中这些可诱导性基因表达的分子机制只得到部分的理解。调节因子组织特异性表达是表达不同的部分原因。例如，转录因子 GATA-3 只存在于 Th2 表型中[386]。C-Maf 转录因子在 NIP45 存在时特异性表达，它是一个新近鉴定出的 NF-AT 结合蛋白。与 NF-AT 一样，C-Maf 参与 IL-4 基因的组织特异性转录活化[387,388]。GATA3 和 C-Maf 组织特异性表达的决定因素仍不清楚。IL-4 是 Th2 亚型的主要决定者。这样，IL-4 受体信号转导途径可影响 C-Maf 和（或）GATA-3 的特异性表达。另外，INF-γ 和 IL-12 是驱动 T 细胞向 Th1 表型转化的主要淋巴因子。它们可能对另一系列的转录因子发生正性影响，也可能对 GATA-3 和（或）C-Maf 的表达向下调节。此外，在不同的 T 细胞亚群，细胞表面受体产生不同的跨膜信号，或胞质蛋白表达不同，或者 T 细胞与不同亚群的 APC 上的不同受体相作用。这些事件均可能参与转录活化不同的淋巴因子基因系列。T 细胞活化不同的表现可能是转录活化的淋巴因子基因产物作用的总和。对于 T 细胞活化过程中多种淋巴因子的效应将在随后的章

节(第 26 章)中详细讨论。

由于 IL-2 基因的转录调节机制已获得实质性进展,下面将集中讨论它的表达调控。可能调节 IL-2 基因的基本规律也适用于其他淋巴因子基因的转录调节。正如已述及的,蛋白质磷酸化调节的 TCR 信号途径是 IL-2 基因转录活化所必需的。

人们首先通过它们对 DNAase Ⅰ 消化的敏感性实验鉴定出参与 IL-2 基因调节的染色体 DNA 序列[389]。对 IL-2 基因转录调控更详细的分析证明,转录起始位点的上游 - 275bp 片段含有调节基因转录活性的大部分序列[7]。这一序列是增加$[Ca^{2+}]_i$和诱导 PKC 或 Ras 活化的协同作用区域[326,390]。从动力学分析和抑制蛋白合成阻断 IL-2 转录活性的效应可以清楚地看到,早期活化基因产物是这一转录活化所必需的[3],其中许多 AP-1 位点涉及 c-fos 可以至少部分地解释这一点。

DNAse"足迹"分析,转录受体构建、电泳迁移分析等实验证明这一区域中含有几种不同的核蛋白结合位点,并可对 TCR 来源和 CD28 来源的信号转导事件起反应[7,391](图 12.11)。与这一区域结合的蛋白参与转录活化或抑制 IL-2 基因转录。TCR 信号转导事件至少影响 6 个核复合物的结合和(或)活性(图 12.11)。所有这些位点均需要与 TCR 来源的信号转导事件相协同。

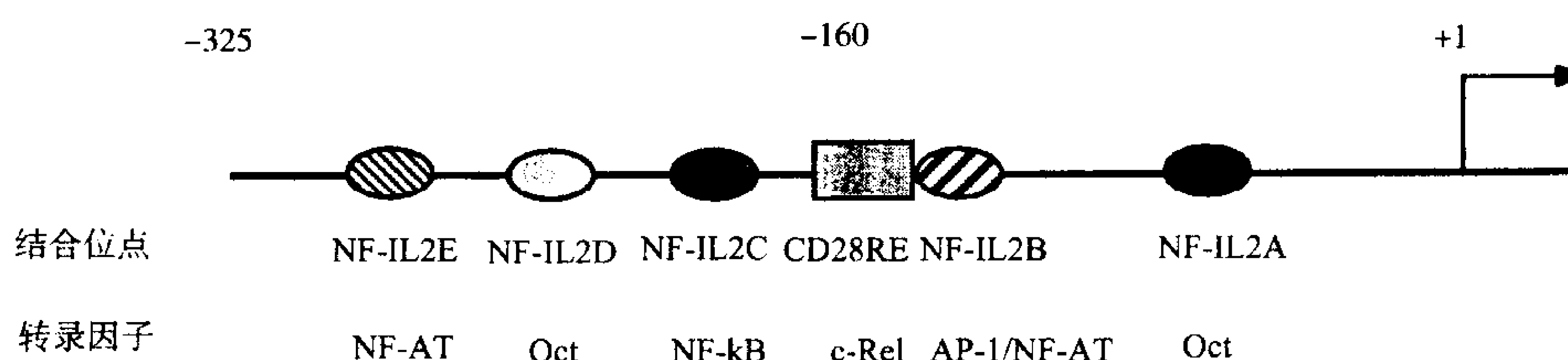


图 12.11 IL-2 基因上游调节区,其中标出了 TCR(卵圆形)和 CD28(矩形)反应元件。

435 NF-IL2A 位点结合转录因子 Oct-1,这一因子的活性受到一个称为 OAP 蛋白复合物的调控。该复合物含有一个 jun 家族成员,它只在刺激后与 Oct-1 相结合[383,392]。NF-IL2B 位点与 AP-1 或其相关蛋白以及,NF-AT 转录因子相结合,似乎是 PKC 应答的主要位点[393,394]。在无反应性的 T 细胞中活化的 AP-1 蛋白不能与该位点结合[395]。这与无反应性 T 细胞中 MAPK、Jnk 蛋白活化受阻[396,397]以及 MAPK 和 Jnk 在调节 AP-1 功能中的作用相吻合。NF-IL2C 可与几种不同的转录因子相结合,包括 NF-κB 和 AP-3。但这一位点在诱导 IL-2 基因中的作用受到质疑[393,398]。NF-IL-2D 位点是另一 Oct 结合位点,它尚未得到详细的研究。

在 IL-2 调控区中至少有 2 个位点结合 NF-AT 转录因子:邻近 NF-IL-2B 的 NF-AT 位点和 NF-IL-2E 位点[7,307,391]。NF-AT 家族蛋白的 DNA 结合区和活化区与 Rel 家族转录因子同源。NF-AT 的最易结合位点也是 Rel 结合位点。IL-2 基因中的 NF-AT 结合位点实际上是可结合连接在 AP-1 复合物中的 4 种 NF-AT 蛋白之一的转录元件。结合形成完整的蛋白复合物是功能所必需的。这些位点能够多聚化以产生转录受体结构,后者在 T 细胞活化的研究中非常有用。正如上面所讨论的,NF-AT 转位至核并与核复合物 AP-1 相互作用所需的信号由 MAPK、Jnk 和 Frk 活化产生。

如果同时提供 TCR 来源的信号,刺激 CD28 也能调节淋巴因子基因转录[119,121]。正如上面述及,CD28 调节的信号转导事件如何影响淋巴因子基因表达仍不清楚,虽然它们是 CsA 和 FK506 不敏感的。在 TCR 信号或钙通道加佛波酯存在的条件下,刺激 CD28 可诱导一种能结合同源序列元件——CD28RE 的核因子产生,多种淋巴因子基因中均含有此因子的结合位点,包括 IL-2、IFN-γ、GM-CSF 和 IL-3[119]。这些位点负责 CD28 信号活化基因转录效应,并可能部分地参与 CD28 的共刺激效应。CD28RE 与许多 rel 家族转录因子以及 NF-AT 相结合[399~401]。IL-2 基因中的 CD28RE 位点与结合 AP-1 的 NF-IL2B 相邻。研究显示这一位点可作为集成元件与 c-Rel 和 AP-1 相结合[402,403]。值得注意的是来自 c-Rel 缺陷小鼠的 T 细胞不能产生 IL-2,除非它们被钙载体和佛波酯刺激[404]。这一位点似乎是信号整合点,c-Rel 和 AP-1 活化均需要 TCR 和 CD28 的信号。

虽然转录调节代表了控制淋巴因子产生的主要机制，转录后调节也同样重要。大多数淋巴因子转录产物，包括 IL-2，含有一个富含 AU 的非翻译序列，导致这些 mRNA 序列的不稳性[405]。有报道称以佛波酯或 CD28 配基刺激 T 细胞可以稳定淋巴因子 mRNA[120,405,406]。这些在转录和转录后水平调节淋巴因子基因表达提示这些重要调节分子的表达受到复杂的调控机制调控。

表达新的细胞表面分子

在 T 细胞活化、分化和增殖过程中多种细胞表面分子出现在细胞表面，它们包括淋巴因子受体（如 CD25，IL-2R 的 α 链）[6,407]；营养受体（如转铁蛋白受体和胰岛素受体）[380]；人 T 细胞上的 MHC Ⅱ 类分子，但在小鼠 T 细胞上则无[408]；以及其他的细胞表面分子，其功能尚远不清楚（如 CD69 和 4F2）[409,410]。这些蛋白质可能在生长、分化和活化的 T 细胞功能中扮演不同的角色。这些蛋白质的表达动力学是不同的，一些在刺激 T 细胞活化后数分钟至数小时出现（如 CD25 和 CD69），其他的只在几天后才出现（如 VLA-2）。由于大多数这些蛋白质的调节方式为转录调节，那么一定存在不同的转录调节机制。除了表达新的细胞表面分子，在已存在的细胞表面蛋白上还出现新的抗原表位，提示存在不同的功能调节机制。例如，T 细胞活化后可相应地检测到 CD2 分子出现一种新的抗原表位（$T11_3$ 表位），这很可能是等位基因交换的结果[31,38]。与表达新表位相关的另一个机制是外显子剪切改变的调控，CD45 的情况正是如此。活化的 T 细胞和一些辅助性亚群表达一种不同形式的 CD45——180kDa 的 CD45RO，后者是缺乏外显子 4、5 和 6 的产物。而 200～210kDa 的 CD45RA 或 CD45RB 形式则相反，它们表达在静止 T 细胞上，含有这些外显子。这是通过调节编码胞外区的外显子拼接而产生的转变[247,411]。这使人易于设想这样的拼接调节可以影响 CD45 的配基结合功能。

在本章内详细地分析在 T 细胞活化中所有细胞表面蛋白的调控是不可能的。但是简单地讨论 CD25，人 IL-2Rα 链，一个可通过抗 Tac mAb 识别的、55kDa 的糖蛋白是有益的[6]。IL-2Rα 链的表达受到转录水平调节，在静止 G_0 细胞中不表达。在不同的条件下，人们发现至少三种不同的转录位点可以触发表达，提示 T 细胞活化的不同模式可以影响基因序列两侧不同的调控序列[412]。在 T 细胞活化过程中，IL-2Rα 链基因的上游侧翼序列中对特定刺激发生反应的调控序列已被鉴定出来[413]。NF-κB 似乎在调节此基因中发挥关键性作用。NF-κB 的功能通过转录后调节，IκB 磷酸化和降解是 NF-κB 的主要调节方式[136]。最近鉴定的 IκB 激酶负责磷酸化事件导致 IκB 泛素化和降解可能为研究 IL-Rα 链的表达提供了新的途径[137]。

调节 IL-2Rα 链的表达与调节其配基 IL-2 不同，表现在以下几个方面：①在诱导 IL-2Rα 链基因表达中，只需要 PKC 活化试剂即已足够，并且比升高 $[Ca^{2+}]_i$ 更有效[414]；②IL-2 自身可以通过转录机制调节 IL-2Rα 链的表达。它能部分地与升高 $[Ca^{2+}]_i$ 和活化 PKC 协同，导致 IL-2 上调 IL-2Rα 链的表达；③PMA 诱导的 IL-2Rα 链表达不能被 CsA 所抑制[410]，而后者是一个强有力的 IL-2 表达抑制剂[417]；④最后，在 HTLV-1 转染的人 T 细胞株中，IL-2Rα 链在无 IL-2 产生的条件下超高水平表达，提示存在其他不同的 IL-2Rα 链表达调控机制[412,413]。因此，对这一淋巴因子受体链调控并不像对淋巴因子自身的调控那么严密，这就使得 IL-2R 表达细胞可以被募集至免疫应答产生的位置，那里有其他的细胞正在产生 IL-2。这是一种旁分泌效应。由于活化后的细胞持续低水平地表达 IL-2Rα 链，这就使得记忆 T 细胞能够更容易地被募集到免疫应答部位。这种旁分泌效应被广泛用来解释 $CD4^+$ IL-2 产生细胞与 $CD8^+$ CTL 前体细胞之间的协同性作用的一个被广泛接受的解释，因为 CTL 通常不能产生大量的 IL-2。很清楚，在 T 细胞活化中 IL-2α 链的调节是复杂的。很可能在 T 细胞活化过程中表达于细胞表面的其他众多受体的调节也具有相同的复杂性和各自不同的调控机制。

436

T 细胞增殖调控

在初次免疫应答当中最重要的事件之一是抗原特异性 T 细胞克隆的增殖。在未免疫动物的任何一个特定的外周淋巴组织中，抗原特异性 T 细胞前体的丰度很低，抗原反应性效应 T 细胞和记忆细胞的扩增是形成持久特异性免疫力的关键。为了实现克隆扩增，增殖反应必须是高度调节的，并主要局限于那些与刺激抗原

相反应的细胞中。这是通过严密调控作为生长因子的特定淋巴因子的产生，以及调节这些淋巴因子受体的表达来实现的。

IL-2 的作用

IL-2 与其受体的相互作用在抗原诱导的 T 细胞增殖调控中发挥重要作用[418~420]。一旦 T 细胞受刺激分泌 IL-2，可溶性的淋巴因子能够与产生这一生长因子的同一个细胞相互作用（一种自分泌效应），或者与其他表达 IL-2R 的细胞相互作用（旁分泌效应）（图 12.12）。这样产生 IL-2 的抗原活化 T 细胞能够：①促进它们自身的克隆扩增；②促进被同样或相关的抗原活化但不能产生 IL-2 的其他 T 细胞增殖（如 $CD8^+$ 细胞）；③促进以前受到过刺激，表达低水平高亲和力 IL-2R 的淋巴细胞扩增（如记忆细胞）；④促进表达 IL-2R 的非 T 细胞增殖（如 B 细胞或 NK 细胞）。除了在多种细胞上发挥促增殖活性外，IL-2 还能影响多种细胞功能活性分化形成（在第 21 章中讨论）。

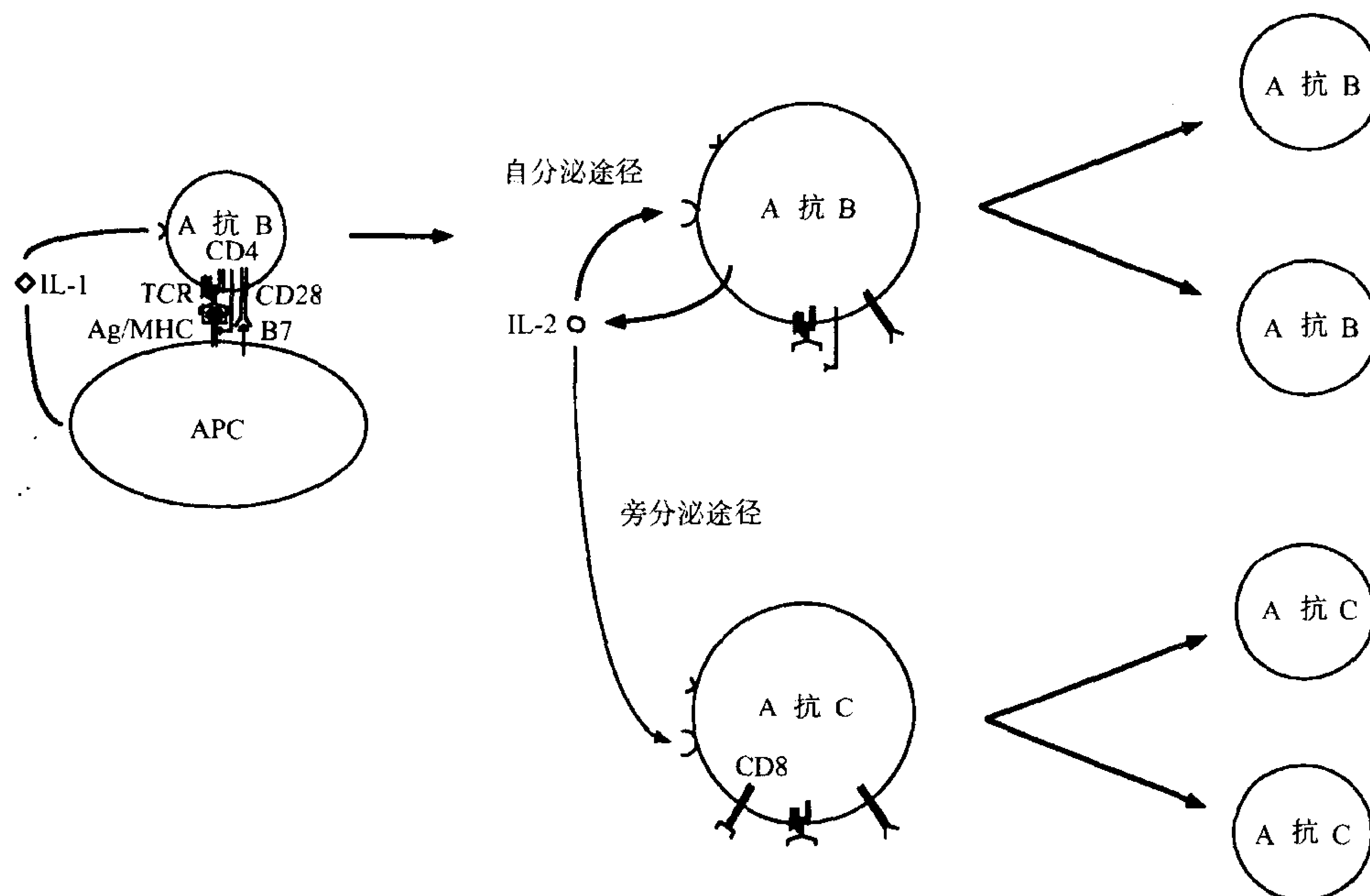


图 12.12　T 细胞增殖的自分泌和旁分泌途径。

437

刺激 TCR 可诱导初始 T 细胞的细胞周期由 G_0 期进入 G1 期，并表达高水平的 IL-2R[5,419]。IL-2 的功能是启动细胞周期的进一步进展。IL-2 通过与其高亲和力受体的结合诱导细胞周期进展，从 G_1 通过 S，G_2 和 M 期依赖于 IL-2。虽然 IL-2 可能不是惟一的诱导 T 细胞增殖的淋巴因子，但经同源重组破坏 IL-2 产生的小鼠，其 T 细胞经丝裂原或抗原刺激后反应减弱，强调出该分子在促进外周 T 细胞细胞周期进展中的重要性[421,422]。因此，IL-2 与其受体结合并导致信号转导事件在大多数免疫应答中起关键作用。

在 T 细胞上检测到至少三种不同亲和力的 IL-2R（图 12.13）。这种结合的异质性的分子基础反映了三种蛋白均通过高亲和力受体参与 IL-2 结合[407,419]。CD25，IL-Rα 链，一种 55kDa 的整合膜糖蛋白其亲和力常数约为 10^{-8}mol/L[423]。这种低亲和力形式的 IL-2R 是活化后 T 细胞和人 T 细胞白血病病毒转化细胞株上表达最广泛的形式。该种类型受体在一些早期的 $CD4^-$/$CD8^-$ 胸腺细胞上也有表达。IL-2β 链是一种 70kDa 的糖蛋白。当它表达在 T 细胞上时可与 IL-2 以中等亲和力结合（K_D 大约为 10^{-9}mol/L）[424]，但是表达在成纤维细胞上时则不能结合 IL-2[425]。后一结果导致第三种 IL-2R 成员的鉴定[426]。IL-2Rγ 链是一个 64kDa 的整合型膜蛋白。它自身不与 IL-2 结合，但在成纤维细胞上与 β 链共表达时可以构成一个中等亲和力的结合位点。

IL-2Rβ 和 γ 链是细胞因子受体家族成员[427]。β 和 γ 链单独均不与 IL-2 结合，但是它们一起可组成中等亲和力的 IL-2R。在天然 T 细胞，NK 细胞和 B 细胞上可以检测到该分子低水平的存在。高亲和力形式的 IL-2R 依赖所有的三条链，虽然以生化的方法难于检测到三条链形成的分子复合物。这可能是由于这些链的结合是由 IL-2 诱导的并且三分子复合物的形成很短暂。不同 IL-2R 的特征反映在其明显不同的 IL-2 结合和解离率上[428,429]。快速的结合/解离率是 α 链的特征，与 β 链(也可能是 γ 链)结合 IL-2 的慢速结合/解离率特征相反。高亲和力受体能快速结合 IL-2，但它与 IL-2 的解离非常慢。因此，高亲和力 IL-2 结合位点似乎是由 α、β 和 γ 链共同形成的。

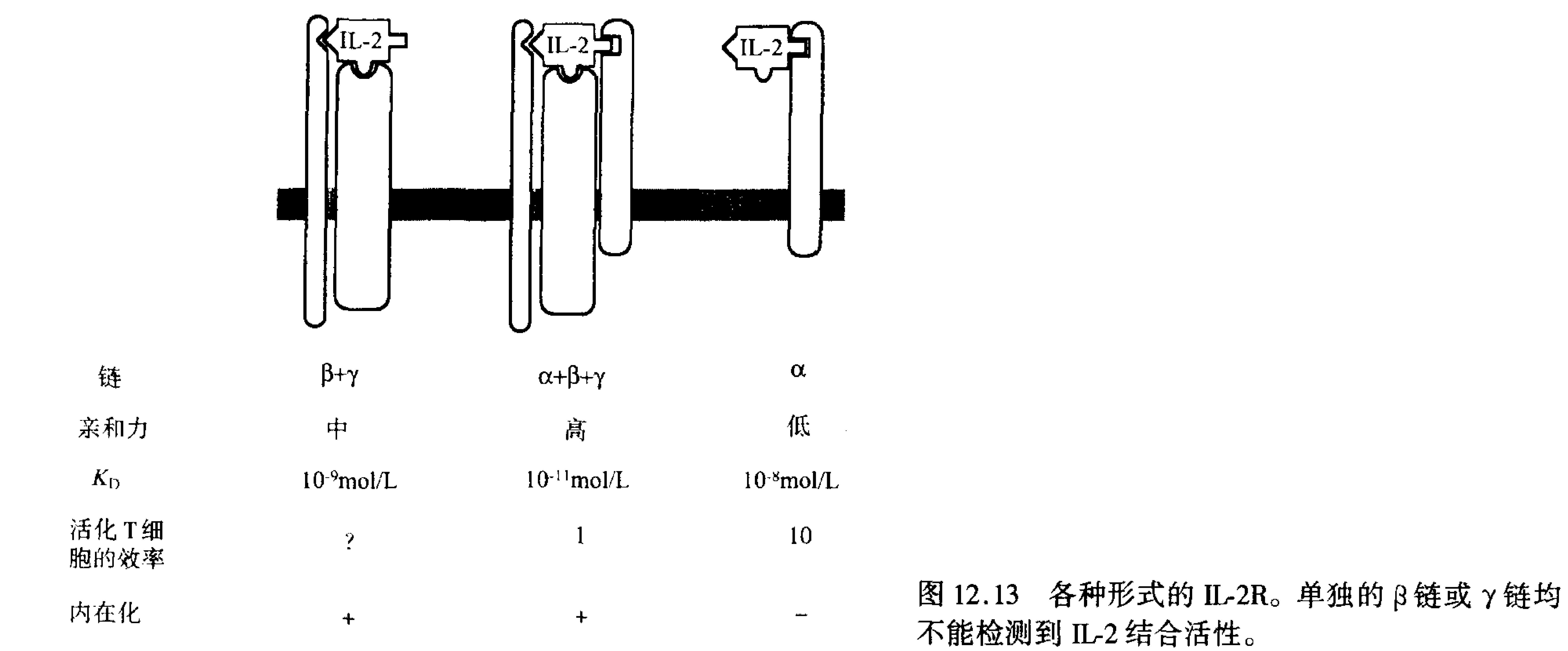


图 12.13　各种形式的 IL-2R。单独的 β 链或 γ 链均不能检测到 IL-2 结合活性。

以凝集素或抗 TCR mAb 刺激 T 细胞后，高亲和力和低亲和力受体在细胞表面表达的比率是 1:10。β 链(也许是 γ 链)的数量似乎在高亲和力受体表达时受到限制。人们认为高亲和力 IL-2R 能在生理浓度下结合 IL-2，但在高浓度 IL-2 存在时，中亲和力受体似乎也可以诱导 T 细胞增殖，而低亲和力受体则不能。

通过对人类疾病和同源重组基因受损小鼠的研究，IL-2R 系统各种链的重要性被清楚地认识。IL-Rγ 链突变是大多数 X 染色体连锁的重症联合免疫缺陷综合征的(XSCID)的原因[430]。相同的表型在小鼠 γ 链缺陷中也可观察到[431]。但是，病人和小鼠 γ 链缺陷的表现比从 IL-2 缺陷小鼠的表现上预料的要严重。这可以通过 γ 链实际上是几种其他的淋巴因子包括 IL-4、IL-7、IL-9 和 IL-15 的受体成分来解释[407]。这些淋巴因子在 T、B 细胞发育中发挥关键作用。IL-2Rα 或 β 链缺陷小鼠不能存活[432,433]。在这两种情况下，令人惊讶的是由于免疫系统严重失控，出现多种自身免疫的表现。这些结果不能被简单地解释，但它们的确强调了 IL-2、IL-2R 系统在保持正常的自身稳定和免疫系统调控中的重要作用。

IL-2 与高等或中等亲和力形式的受体结合后触发跨膜信号转导，诱导促 T 细胞进入细胞周期的事件发生。这样的跨膜信号转导事件必然也是 IL-2 其他效应的原因，如上调 IL-2Rα 链转录。IL-2Rα 链只有一个相对较短的胞质段，它的主要功能是通过增加与 IL-2 的结合的亲和力而增加受体的敏感性。

β 和 γ 链负责受体的信号转导功能。在嵌合分子的研究中包含 β 和 γ 胞质区的异二聚体可以触发受体的信号功能[434,435]。这些链的胞质区并无酶活性，它们与胞质蛋白结合触发增殖和分化反应所需的信号。IL-2R 的 β 和 γ 链具有相同的信号转导机制，涉及胞质 Jak 家族 PTK 和信号转导和转录活化因子(signal transducer and activator of transcription，STAT)家族的转录因子以及其他细胞因子家族成员，后者在第 21 章中详细讨论[436,437]。简单地讲，β 和 γ 链通过质膜邻近的保守区域特异性地分别与 Jak1 和 Jak3 PTK 相结合[438]。具有 Jak3 突变的病人和 Jak3 被破坏的小鼠表现为 SCID 综合征，显示了 Jak3 在这种相互作用中的重要性[439,440]。β 和 γ 链的二聚化导致与之相结合的 Jak1 和 Jak3 二聚化活化，这导致与之相联系的 STAT5 蛋白磷

438

酸化。现在仍不清楚 STAT 蛋白怎样与 Jak 或受体蛋白相联系，虽然已知 IL-2Rβ 链中特异的酪氨酸磷酸化位点对 STAT5 磷酸化很重要[441]。这样，Jak 可以通过磷酸化细胞因子受体募集 STAT5 至受体 Jak 复合物上，在这里 STAT5 被 PTK 磷酸化。随后，酪氨酸磷酸化的 STAT 蛋白通过其 SH2 与它们的 STAT 分子伴侣的磷酸化酪氨酸残基结合，形成同源或异源二聚体。STAT 二聚体核转位并与特异的 DNA 靶序列相结合，参与靶基因的转录活化。虽然特异性的 STAT 调控细胞增殖靶基因仍未鉴定清楚，现已知 IL-2R 刺激可诱导几种与生长控制相关的基因表达活化，它们包括 c-myc、c-fos、c-jun 和 bcl-2[419,436]。这些基因和其他基因的整合反应可能参与细胞整体反应的调控。

还有几种其他的事件与 IL-2R 信号转导相联系。除了活化 Jak-STAT 系统，刺激 IL-2R 可以活化其他的 PTK，它们是 Lck、Lyn 和 Syk[442~444]。Src 激酶被认为直接与 IL-2Rβ 链的酸性区域相结合，Syk 则通过它的丝氨酸富含区与之结合。这些相互作用分别与 Fos/Jun 和 Myc 途径的活化同时发生[419,444]。但是，Lck 和(或)Fyn，或是 Syk PTK 缺陷小鼠仍然具有功能性 IL-2R[200,203,445,446]。这就提示其他途径可以替代与这种结合相联系的功能。

除了与 PTK 相结合，酪氨酸磷酸化 IL-2Rβ 链还与其他两个有趣的分子结合，Shc 和 PI3 激酶[296,407,447]。正如已提及的，Shc 在功能上作为连接 Ras 途径和活化受体系统的接头。IL-2R 刺激后，Ras 快速地被活化[316]。Shc 与 IL-2Rβ 链 Y338 的相互作用以及该残基磷酸化是 C-fos 转录活化所必需的，提示 Shc 与 IL-2Rβ 链的相互作用具有功能上的重要性[441]。PI-3 激酶的 P85 亚基的 SH2 结构域也可与 β 链酪氨酸磷酸化残基相结合。这一结合与 PI-3 激酶功能活化相联系。PI-3 激酶在控制细胞生长中的作用方面的认识正在快速进展，并可能有多种下游途径参与[292]。但是，PI-3 激酶的一个下游效应分子似乎是 Akt(也称为 PKB)，一种丝-苏氨酸激酶。Akt 阻止凋亡的功能已经得到描述[448]，使人易于设想 IL-2R 介导的 PI-3 激酶活化的功能之一是在 T 细胞对特异性抗原的增殖性应答中阻止 T 细胞的凋亡。

雷帕霉素是一个免疫抑制剂，被用于 IL-2/IL-2R 途径的研究[449]。它与 FK506，FKBP 一样结合于相同的细胞受体，该受体是介导 T 细胞功能抑制的药物-受体复合物。但是与 FK506 不同的是，雷帕霉素不抑制 IL-2 介导的效应，也不影响它的靶分子 calcineurin。相反，它通过阻断称为 mTOR(是雷帕霉素哺乳动物的体内靶点，也称为 PRAP，即 FKBP12-雷帕霉素相关蛋白)的酶功能而抑制 IL-2 介导的 T 细胞增殖反应。mTOR 是具有 PI-3 激酶结构域的一个大的蛋白家族的成员。通过使用雷帕霉素鉴定出 mTOR 的靶分子，它们是三种参与 G_1 到 S 期转化、可被雷帕霉素阻断的靶分子。核糖体 P70 S6 激酶活性可被雷帕霉素阻断，并且 mTOR 被认为是 P70 S6 激酶的上游调节者[450]。虽然在丝裂原反应中可以观察到 P70 S6 激酶广泛地活化，但未能确定细胞进入 S 期特异性地需要该分子。mTOR 通过它将 PHAS-1，真核起始因子(eIF)-4E 结合蛋白磷酸化而使蛋白翻译受到调控[451]。雷帕霉素阻断 mTOR 介导的 PHAS-1 磷酸化，这导致 elF-4E 蛋白翻译触发受阻，而后者是 G_1 期进展的关键性步骤。最后，雷帕霉素的效应可能经过调节 Kip-1 活性，一种 G_1 细胞周期蛋白 cdks 抑制剂与细胞周期控制相联系[452]。雷帕霉素可以阻断 IL-2 诱导的 Kip-1 下调[453]。mTOR 怎样阻止 Kip-1 下调仍不清楚。综上所述，虽然许多问题仍需明确，雷帕霉素对 mTOR 的作用可能可以揭示 T 细胞增殖反应中重要的调节事件。

T 细胞增殖的其他调控机制

虽然 IL-2 驱动的 T 细胞增殖被广泛地认为是 T 细胞增殖的主要机制，在某些条件下，T 细胞增殖可以不依赖 IL-2 发生。例如，小鼠 T 细胞增殖可以不依赖于 IL-2，在没有可检测得到的 IL-2 存在条件下对抗 TCR mAb 发生反应[454]，静止的人 T 细胞也可以[455]。最重要的是，在 IL-2 缺陷的小鼠中仍然存在一些增殖反应，提示存在不依赖 IL-2 驱动 T 细胞增殖的其他机制。在这些条件下，有限的 T 细胞增殖可能是 TCR 刺激的结果，但是持续的增殖似乎依赖于生长因子。

IL-2 非依赖性 T 细胞增殖最有可能是其他可以诱导 T 细胞增殖反应的淋巴因子作用的结果。IL-4 和 IL-15 最有可能在无 IL-2 作用时作为 T 细胞生长因子。关于这些淋巴因子在第 21 和 26 章中详细的讨论。

因为不同的T细胞亚群均要进行扩增,其他淋巴因子在T细胞生长中的贡献也应被考虑。这样,如果在特定的T细胞应答中以IL-4产生为主,如在对寄生虫和变态原的应答中即是,人们可以观测到T细胞增殖,但这种增殖可能只限于特定的T细胞亚群(如Th2 T细胞克隆)。也有相反的意见认为主要由IL-2介导产生。是否一个生长因子在所有的T细胞增殖中必需仍是一个不能回答的问题。有可能在IL-2,IL-4或IL-15存在时,可产生更持久的T细胞增殖和募集T细胞的反应。

T细胞应答的终止

439

一个未被控制或未终止的T细胞应答将对宿主造成毁灭性打击。对于T细胞应答水平怎样调控或应答是如何终止的人们所知相对较少。抗原的耗竭或清除可以导致输入信号终止,但是是什么决定应答何时必须终止?已经知道存在一些调控机制。这是一个正在被涉及的领域,提及几种已鉴定的、可能发挥重要作用的机制是有益的。

抗原识别介导的信号转导机制,多数包括了酪氨酸或丝-苏氨酸磷酸化事件。PTK和丝-苏氨酸激酶的存在是与PTPase和丝-苏氨酸磷酸酶相平衡的。磷酸酶可以通过磷酸化和亚基重新定位至底物而调节自身活性。含有SH2结构域的PTPase如SHP-1和SHP-2能通过自身酪氨酸磷酸化而活化,并能通过它们的SH2定位于相应的底物[244]。SHP-1缺陷小鼠患有以炎症系统全面活化和胸腺细胞中Src激酶超高活性为特征的致死性疾病[456,457]。

CTLA-4是一个值得注意的例子,有报道发现它可与SHP-2 PTPase相互作用[458]。CTLA-4是与CD28同源的跨膜分子[117],它在T细胞活化中表达上调。CTLA-4缺陷小鼠在生命早期即发生严重的淋巴细胞增殖综合征,这似乎是T细胞多克隆未控制的活化的结果[459]。因此,CTLA-4可能参与T细胞应答的自身负反馈调节,一旦触发,通过招募PTPase至胞膜,从而使之对与TCR复合物相结合的相应底物发挥作用。

Csk,正像前面提及的,是一个PTK,可以磷酸化Src激酶的负调节位点,如Lck。虽然Csk活性不通过磷酸化调节,但它的调节功能依赖SH2和SH3结构域,它们在免疫应答触发后将Csk定位于其底物上[82]。研究提示酪氨酸磷酸酶PEP参与将Csk定位于活化的TCR复合物,以抑制活化的Lck和(或)Fyn功能[460]。

淋巴因子是非常强有力的生物介质。在由葡萄球菌外毒素引起的食物中毒或中毒性休克综合征中,淋巴因子的过量产生可以导致对宿主的毁灭性后果。因此,大多数淋巴因子在免疫应答当中更趋向于一过性产生。确保它们一过性产生的机制之一是存在于大多数淋巴因子中的富含AU的3′非翻译区[405]。这一AU富含区导致编码淋巴因子的mRNA不稳定,确保这些有力的介质的产生只是短暂瞬时的。

最后的一种在免疫应答中终止T细胞活化的机制与凋亡有关。在抗原反应性淋巴细胞活化中,反应性T细胞中的Fas配基表达上调[62]。事实上,Fas配基基因表达受到TCR信号的调控[461]。无适当的炎症信号时,伴随抗原反应性T细胞的扩增之后发生的是活化T细胞通过Fas和Fas配体表达细胞介导的凋亡而被清除[61]。现在仍不清楚炎症性细胞因子或其他炎症信号是如何阻止抗原反应性T细胞的凋亡,从而使炎症发生部位的免疫应答得以持续。这一系统的失效可导致可怕的后果。淋巴细胞增殖综合征患者的Fas发生了突变,以及缺乏功能性Fas(*lpr*小鼠)或Fas配基(*gld*小鼠)的小鼠证明了这一点[374,462]。

免疫应答的终止和调控与它的触发同样重要,一个合适的免疫应答水平对宿主至关重要。参与终止应答的调控系统可能与触发它的系统至少同样重要。

T细胞失活

以正常情况下起激动剂作用的试剂在特定的体内条件和特定的体外培养条件下刺激T细胞,能够导致细胞出现长时间的存活状态并对随后的TCR刺激无反应[101],这种不反应状态称为失能。用丝裂原、抗原、改变的肽配基、抗TCR mAb和淋巴因子刺激T细胞克隆均可诱导无反应状态产生。这些实验模型可能与理

解特定形式的耐受,特别是外周(胸腺外)抗原和不同类型的抗原刺激为何产生不同的免疫应答相关。

几种因子似乎可以影响刺激物诱导T细胞克隆无反应性而不是活化。诱导无反应性状态的关键因素是应答细胞的特性。无反应性可在辅助性T细胞的Th1亚型中诱导出来[463,464]。但是在相同条件下,却不能在细胞毒性T细胞克隆中获得[465]。在T细胞杂交瘤和白血病细胞株中也不能诱导出相同的无反应性。但是,在天然小鼠中通过抗原注射可以诱导出无反应性[466]。

刺激的性质和间隔时间是诱导无反应性的关键因素。在抗原特异性小鼠辅助性T细胞克隆中,用固定的APC表面或脂质膜呈递抗原,在只有MHCⅡ类分子存在条件下可诱导一个对随后的抗原刺激的长时间无反应状态(以检测增殖反应或IL-2产生为指标),但杂交瘤中则不能[466,467]。这种不活化并不是完全的,主要针对增殖反应而言。因为在随后的抗原刺激中能够产生亚适量的IFN-γ和IL-3,而且增殖反应可为外源性IL-2所恢复[28]。在已诱导的失能状态中与活化细胞主要的差异似乎主要在TCR来源的信号的接受上,与$[Ca^{2+}]_i$增高而无随后的IL-2刺激有关[101,104]。

这些模型不能产生IL-2大多数是因为T细胞未能接收到一个共刺激信号。众多证据显示CD28与B7-1或B7-2相互作用是共刺激信号产生的主要原因,正如早先所讨论的[117]。但是,阻断CD28-B7相互作用只是偶而诱导出无反应性状态[107,112,127,468]。这提示可能还存在其他的共刺激途径介导IL-2产生。这与CD28缺陷小鼠仍能产生一些免疫应答的观察相吻合[112,127]。

440

改变的肽配基在存在合适的共刺激信号时也能诱导出一个无反应性状态[45]。这可能来自一个不充分的TCR信号,也许由于TCRζ链不能有效地磷酸化或ZAP-70不能活化[46]。但是很清楚,决定是否能诱导无反应性的最重要的决定性因素是产生IL-2的应答失败[104]。

建立并鉴别无反应性状态已经获得很大的关注。无反应性状态的诱导需要蛋白合成,提示新合成的蛋白是保持无反应性状态所必需的。研究提示,在抗原刺激的无反应性T细胞中,Ras活化障碍,导致MAPK和Jnk活化失败[396,397]。Ras和这些激酶的活化障碍将帮助解释以前的结果,即无反应性的T细胞克隆失去了AP-1活性[395]。Ras活化障碍的原因仍需进一步明确。

结论

T细胞活化是一个复杂的过程,它导致T细胞增殖和分化,涉及的主要事件归纳于表12.4中。T细胞活化是通过T细胞与APC或靶细胞表面的配基-受体相互作用而触发的。TCR在这一相互作用中起主要作用,但T细胞和APC上的其他分子在T细胞最终活化中也有作用。刺激TCR诱导一个高度有序的酪氨酸磷酸化级联,它由PTK介导,受其他PTK和PTPase的调控。这些磷酸化事件导致信号转导事件发生,包括活化多种酶,诱导多种蛋白相互作用,第二信使产生,离子流动。这些信号级联事件决定T细胞反应。在一些情况下,效应功能被活化,另一些情况下多种基因诱导表达,后者参与适当的抗原特异性T细胞克隆扩增和分化。还有一些情况下,当信号事件不充分时,不反应状态发生了。未来的研究将进一步揭示从膜到核的信号转导事件的复杂性。T细胞活化被证实是研究细胞增殖和分化这一复杂调节机制独一无二的系统。

(周镜然 译　许雪青 校)

参 考 文 献

1. Clevers H, Alarcon B, Willeman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 1988;6:629–662.
2. Ashwell JD, Klausner RD. Genetic and mutational analysis of the T cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 1990;8:139–168.
3. Weiss A. Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function. *Annu Rev Genet* 1991;25:487–510.
4. Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 1992;71:1065–1068.
5. Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 1986;240:1169–1176.
6. Waldmann TA. The IL-2/IL-2 receptor system: A target for rational immune intervention. *Immunol Today* 1993;14:264–270.
7. Crabtree GR, Clipstone NA. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* 1994;63:1045–1083.
8. Marrack P, Kappler J. T cells can distinguish between allogeneic major histocompatibility complex products on different cell types. *Nature* 1988;332:840–843.
9. Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses

to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993;11:191–212.
10. June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994;15:321–331.
11. Watts TH, Brian AA, Kappler JW, Marrack P, McConnell H. Antigen presentation by supported planar membranes containing affinity-purified I-Ad *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:7564–7568.
12. O'Rourke AM, Rogers J, Mescher MF. Activated CD8 binding to class I protein mediated by the T-cell receptor results in signalling. *Nature* 1990;346:187–189.
13. Shaw AS, Dustin ML. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 1997;6:361–369.
14. Ronchese F, Schwartz RH, Germain RN. Functionally distinct subsites on a class II major histocompatibility complex molecule. *Nature* 1987;329:254–256.
15. Goldstein SAN, Mescher MF. Cytotoxic T cell activation by class I protein on cell size artificial membranes: antigen density and Lyt-2/3 function. *J Immunol* 1987;138:2034–2043.
16. Clayberger C, Parham P, Rothbard J, Ludwig DS, Schoolnik GK, Krensky AM. HLA-A2 peptides can regulate cytolysis by human allogeneic T lymphocytes. *Nature* 1987;330:763–765.
17. York I, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996;14:369–396.
18. Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM. Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol* 1991;9: 745–772.
19. Fields BA, Malchiodi EL, Li H, et al. Crystal structure of a T-cell receptor β-chain complexed with a superantigen. *Nature* 1996;384:188–192.
20. Fraser JD, Newton ME, Weiss A. CD28 and T cell antigen receptor signal transduction coordinately regulate interleukin 2 gene expression in response to superantigen stimulation. *J Exp Med* 1992;175:1131–1134.
21. O'Rourke AM, Mescher MF, Webb SR. Activation of polyphosphoinositide hydrolysis in T cells by H-2 alloantigen but not MLS determinants. *Science* 1990;249:171–174.
22. Yamasaki S, Tachibana M, Shinohara N, Iwashima M. Lck-independent triggering of T-cell antigen receptor signal transduction by staphylococcal enterotoxin. *J Biol Chem* 1997;272:14787–14791.
23. Liu H, Lampe MA, Iregui MV, Cantor H. Conventional antigen and superantigen may be coupled to distinct and cooperative T-cell activation pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8705–8709.
24. Sharon N. Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Adv Immunol* 1983; 34:213–298.
25. Nowell PC. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* 1960;20:462–466.
26. Kanellopoulos JM, De Petris S, Leca G, Crumpton MJ. The mitogenic lectin from Phaseolus vulgaris does not recognize the T3 antigen of human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1985;15:478–486.
27. Weiss A, Shields R, Newton M, Manger B, Imboden J. Ligand-receptor interactions required for commitment to the activation of the interleukin 2 gene. *J Immunol* 1987;138:2169–2176.
28. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal expansion vs functional inactivation. *Annu Rev Immunol* 1989;7:445–480.
29. Tax WJM, Hermes FFM, Willems RW, Capel PJA, Koene RAP. Fc receptors for mouse IgG1 on human monocytes: Polymorphism and its role in antibody-induced T cell proliferation. *J Immunol* 1984;133:1185–1189.
30. Palacios R, Martinez-Maza O. Is the E receptor on human T lymphocytes a "negative signal receptor"? *J Immunol* 1982;129:2479–2485.
31. Meuer SC, Hussey RE, Fabbi M, et al. An alternative pathway of T-cell activation: a functional role of the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* 1984;36:897–906.
32. Yang SY, Chouaib S, Dupont B. A common pathway for T lymphocyte activation involving both the CD3-Ti complex and CD2 erythrocyte receptor determinants. *J Immunol* 1986;137:1097–1100.
33. Weiss A, Imboden J, Shoback D, Stobo J. Role of T3 surface molecules in human T-cell activation: T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:4169–4173.
34. Truneh A, Albert F, Golstein P, Schmitt-Verhulst AM. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature* 1985;313:318–320.
35. Mustelin T, Coggeshall KM, Isakov N, Altman A. T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation. *Science* 1990;247:1584–1587.
36. June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, et al. Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T cell receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7722–7726.
37. Weiss A, Imboden JB. Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. *Adv Immunol* 1987;41:1–38.
38. Bierer BE, Sleckman BP, Ratnofsky SE, Burakoff SJ. The biological roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Immuno Rev* 1989;7:579–599.
39. Dustin ML, Sanders ME, Shaw S, Springer TA. Purified lymphocyte function-associated antigen 3 binds to CD2 and mediates T lymphocyte adhesion. *J Exp Med* 1987;165:677–692.
40. Schmitt-Verhulst AM, Guimezanes A, Boyer C, et al. Pleiotropic loss of activation pathways in a T-cell receptor a-chain deletion variant of a cytolytic T-cell clone. *Nature* 1987;325:628–631.
41. Gunter KC, Germain RN, Kroczek R, A., et al. Thy-1-mediated T-cell activation requires co-expression of CD3/Ti complex. *Nature* 1987;326:505–507.
42. Breitmeyer JB, Daley JF, Levine HF, Schlossman SF. The T11 (CD2) molecule functionally linked to the T3/Ti T cell receptor in the majority of T cells. *J Immunol* 1987;139:2899–2905.
43. Bockenstedt LK, Goldsmith MA, Dustin M, Olive D, Springer TA, Weiss A. The CD2 ligand LFA-3 activates T cells but depends on the expression and function of the antigen receptor. *J Immunol* 1988;141:1904–1911.
44. Howard FD, Moingeon P, Moebius U, et al. The CD3ζ cytoplasmic domain mediates CD2-induced T cell activation. *J Exp Med* 1992;176:139–145.
45. Sloan-Lancaster J, Evavold BE, Allen P. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* 1993;363:156–159.
46. Sloan-Lancaster J, Shaw AS, Rothbard JB, Allen PM. Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* 1994;79:913–922.
47. Rabinowitz JD, Beeson C, Wulfing C, et al. Altered T cell receptor ligands trigger a subset of early T cell signals. *Immunity* 1996;5:125–135.
48. Lyons DS, Lieberman SA, Hampl J, et al. A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists. *Immunity* 1996;5:53–61.
49. Madrenas J, Germain R. Variant TCR ligands: new insights into the molecular basis of antigen-dependent signal transduction and T cell activation. *Semin Immunol* 1996;8:83–101.
50. Lanier LL, Ruitenberg JJ, Allison JP, Weiss A. Distinct epitopes on the T cell antigen receptor of HPB-ALL tumor cells identified by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1986;137:2286–2292.
51. Rojo JM, Janeway J, CA. The biological activity of anti-T cell receptor antibodies is determined by the epitope recognized. *J Immunol* 1988;140:1081–1088.
52. Finkel TH, Cambier JC, Kubo RT, Born WK, Marrack P, Kappler JW. The thymus has two functionally distinct populations of immature ab+ T cells: one population is deleted by ligation of abTCR. *Cell* 1989;58:1047–1054.
53. Demotz S, Grey HM, Sette A. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 1990;249:1028–1030.
54. Harding CV, Unanue E. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 1990;346:574–576.
55. Christinick ER, Luscher MA, Barber BH, Williams DB. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* 1991;352:67–70.
56. Chang TW, Kung PC, Gingras SP, Goldstein G. Does OKT3 monoclonal antibody react with an antigen-recognition structure on human T cells? *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:1805–1809.
57. Van Wauwe JP, De Mey JR, Goosens JG. OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J Immunol* 1980;124:2708–2713.
58. Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 1995;375: 148–151.
59. Sagerstrom CG, Kerr EM, Allison JP, Davis MM. Activation and differentiation requirements of primary T cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 8987–8991.
60. Webb S, Morris C, Sprent J. Extrathymic tolerance of mature T cells: Clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 1990;63:1249–1256.
61. Vella AT, McCormack JE, Linsley PS, Kappler JW, Marrack P. Lipopolysaccharide interferes with the induction of peripheral T cell death. *Immunity* 1995;2:261–270.
62. van Parijs L, Abbas A. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol* 1996;8:355–361.
63. Chatila T, Wood N, Parsonnet J, Geha RS. Toxic shock syndrome toxin-1 induces inositol phospholipid turnover, protein kinase C translocation, and calcium mobilization in human T cells. *J Immunol* 1988;140:1250–1256.
64. Iwashima M, Irving BA, van Oers NSC, Chan AC, Weiss A. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 1994; 263:1136–1139.
65. Hara T, Fu SM. Human cell activation: I. Monocyte-independent activation and proliferation induced by anti-T3 monoclonal antibodies in the presence of tumor promoter 12-o-Tetradecanoyl Phorbol-13-acetate. *J Exp Med* 1985;161:641–656.
66. Williams JM, Deloria D, Hansen JA, et al. The events of primary T cell activation can be staged by use of sepharose-bound anti-T3 (64.1) monoclonal antibody and purified interleukin 1. *J Immunol* 1985;135:2249–2255.
67. Ceuppens JL, Bloemmen FJ, Van Wauwe JP. T cell unresponsiveness to the mitogenic activity of OKT3 antibody results from a deficiency of monocyte Fcg receptors for murine IgG2α and inability to cross-link the T3-Ti complex. *J Immunol* 1985;135:3882–3886.
68. Janeway CA Jr. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:645–674.
69. Leahy DJ. A structural view of CD4 and CD8. *FASEB J* 1995;9:17–25.
70. Sakihama T, Smolyar A, Reinherz EL. Oligomerization of CD4 is required for stable binding to class II major histocompatibility complex proteins but not for interaction with human immunodeficiency virus gp120. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6444–6448.

71. Salter RD, Norment AM, Chen BJ, et al. Polymorphism in the a2 domain of HLA-A molecules affects binding to CD8. *Nature* 1989;338:345–347.
72. Gao GF, Tormo J, Gerth UC, et al. Crystal structure of the complex between human CD8αα and HLA-A2. *Nature* 1997;387:630–634.
73. Zamoyska R. The CD8 coreceptor revisted: one chain good, two chains better. *Immunity* 1994;1:243–246.
74. Luescher IF, Vivier E, Layer A, et al. CD8 modulation of T-cell antigen receptor-ligand interactions on living cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1995;373:353–356.
75. Garcia KC, Scott CA, Brunmark A, et al. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes [see comments]. *Nature* 1996; 384:577–581.
76. Shaw AS, Amrein KE, Hammond C, Stern DF, Sefton BM, Rose JK. The lck protein tyrosine kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell* 1989;59:627–636.
77. Turner JM, Brodsky MH, Irving BA, Levin SD, Perlmutter RM, Littman DR. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56^{lck} with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediated by cysteine motifs. *Cell* 1990; 60:755–765.
78. Wiest DL, Yuan L, Jefferson J, et al. Regulation of T cell receptor expression in immature CD4+CD8+ thymocytes by p56^{lck} tyrosine kinase: basis for differential signaling by CD4 and CD8 in immature thymocytes expressing both coreceptor molecules. *J Exp Med* 1993;178:1701–1712.
79. Itano A, Salmon P, Kioussis D, Tolaini M, Corbella P, Robey E. The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells. *J Exp Med* 1996;183:731.
80. Robey E, Fowlkes BJ. Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol* 1994;12:675–705.
81. Ledbetter JA, Gilliland LK, Schieven GA. The interaction of CD4 with CD3/Ti regulates tyrosine phosphorylation of substrates during T cell activation. *Semin Immunology* 1990;2:99–106.
82. Chow LML, Veillette A. The Src and Csk families of tyrosine protein kinases in hemopoietic cells. *Semin Immunol* 1995;7:207–226.
83. Killeen N, Littman DR. Helper T-cell development in the absence of CD4-p56^{lck} association. *Nature* 1993;364:729–732.
84. Xu H, Littman DR. A kinase-independent function of lck in potentiating antigen-specific T cell activation. *Cell* 1993;74:633–644.
85. O'Rourke AM, Mescher MF. Cytotoxic T-lymphocyte activation involves a cascade of signaling and adhesion events. *Nature* 1992;358:253–255.
86. Thome M, Duplay P, Guttinger M, Acuto O. Syk and ZAP-70 mediate recruitment of p56lck/CD4 to the activated T cell receptor/CD3/ζ complex. *J Exp Med* 1995;181:1997–2006.
87. Straus DB, Chan AC, Patai B, Weiss A. SH2 domain function is essential for the role of the Lck tyrosine kinase in T cell receptor signal transduction. *J Biol Chem* 1996;271:9976–9981.
88. Lee-Fruman KK, Collins TL, Burakoff SJ. Role of the Lck Src homology 2 and 3 domains in protein tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1996;271:25003–25010.
89. Doyle C, Strominger JL. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 1988;330:256–258.
90. Norment AM, Salter RD, Parham P, Engelhard VH, Littman DR. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature* 1988;336:79–81.
91. Newell MK, Haughn LJ, Maroun CR, Julius MH. Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature* 1990;347:286–289.
92. Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, et al. Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med* 1992;176:1099–1106.
93. Glaichenhaus N, Shastri N, Littman DR, Turner JM. Requirement for association of p56^{lck} with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells. *Cell* 1991; 64:511–520.
94. Dustin ML, Springer TA. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu Rev Immunol* 1991;9:27–68.
95. Davis SJ, van der Merwe PA. The structure and ligand interactions of CD2: Implications for T cell function. *Immunol Today* 1996;17:177–187.
96. Janeway CA. The co-receptor function of CD4. *Semin Immunol* 1991;3:153–160.
97. Matsui K, Boniface JJ, Reay PA, Schild H, Fazekas De St. Groth B, Davis MM. Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* 1991;254:1788–1791.
98. Shimizu Y, van Seventer G, Horgan KJ, Shaw S. Roles of adhesion molecules in T-cell recognition: fundamental similarities between four integrins on resting human T cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in expression, binding, and costimulation. *Immunol Rev* 1990;114:109–143.
99. Dustin ML, Springer TA. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 1989;341:619–624.
100. Hahn WC, Burakoff SJ, Bierer BE. Signal transduction pathways involved in T cell receptor-induced regulation of CD2 avidity for CD58. *J Immunol* 1993;150: 2607–2619.
101. Schwartz RH. T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol* 1997;9:351–357.
102. Jenkins MK, Pardoll DM, Mizuguchi J, Chused TM, Schwartz RH. Molecular events in the induction of a nonresponsive state in interleukin 2-producing helper T-lymphocyte clones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5409–5413.
103. Shimonkevitz R, Kappler J, Marrack P, Grey H. Antigen recognition by H-2-restricted T cells. *J Exp Med* 1983;158:303–316.
104. Madrenas J, Schwartz RH, Germain RN. Interleukin 2 production, not the pattern of early T-cell antigen receptor-dependent tyrosine phosphorylation, controls anergy induction by both agonists and partial agonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9736–9741.
105. Ledbetter JA, Martin PJ, Spooner CE, et al. Antibodies to Tp67 and Tp44 augment and sustain proliferative responses of activated T cells. *J Immunol* 1985;135: 2331–2336.
106. Weiss A, Manger B, Imboden J. Synergy between the T3/antigen receptor complex and Tp44 in the activation of human T cells. *J Immunol* 1986;137:819–825.
107. Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy of T-cell clones. *Nature* 1992;356:607–609.
108. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 1991;173:721–730.
109. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 1991;174: 561–569.
110. Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, et al. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation moleucle. *Science* 1992;257:792–795.
111. Lenschow DJ, Zeng Y, Thisthwaite JR, et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science* 1992;257:789–792.
112. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 1993;261:609–612.
113. Borriello F, Sethna MP, Boyd SD, et al. B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1997;6:303–313.
114. Grewal IS, Foellmer HG, Grewal KD, et al. Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 1996;273:1864–1867.
115. Yang Y, Wilson JM. CD40 Ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 1996;273:1862–1864.
116. Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhlmann JE, Noelle RJ. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* 1996;14:591–617.
117. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233–258.
118. Thompson CG, Lindstein T, Ledbetter JA, et al. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:1333–1337.
119. Fraser JD, Weiss A. Regulation of T cell lymphokine transcription by the accessory molecule CD28. *Mol Cell Biol* 1992;12:4357–4363.
120. Lindsten T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 1989;244:339–342.
121. Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 1991;251: 313–316.
122. Stein PH, Fraser JD, Weiss A. The cytoplasmic domain of CD28 is both necessary and sufficient for costimulation of interleukin-2 secretion and association with phosphatidylinositol 3'-kinase. *Mol Cell Biol* 1994;14:3392–3402.
123. Crooks MEC, Littman DR, Carter RH, Fearon DT, Weiss A, Stein PH. CD28-mediated costimulation in the absence of phosphatidylinositol 3-kinase association and activation. *Mol Cell Biol* 1995;15:6820–6828.
124. Truitt KE, Shi J, Gibson S, Segal LG, Mills GB, Imboden JB. CD28 delivers costimulatory signals independently of its association with phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 1995;155:4702–4710.
125. Cai Y-C, Cefai D, Schneider H, Raab M, Nabavi N, Rudd CE. Selective CD28pYMNM mutations implicate phosphatidylinositol 3-kinase in CD86-CD28-mediated costimulation. *Immunity* 1995;3:417–426.
126. Pages F, Ragueneau M, Rottapel R, et al. Binding of phosphatidyl-inositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature* 1994;369:327–329.
127. Kundig TM, Shahinian A, Kawai K, et al. Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* 1996;5:41–52.
128. Liu Y, Jones B, Aruffo A, Sullivan KM, Linsley PS, Janeway CA. Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth. *J Exp Med* 1992;175: 437–445.
129. Kaye J, Janeway CA Jr. The Fab fragment of a directly activating monoclonal antibody that precipitates a disulfide-linked heterodimer from a helper T cell clone blocks activation by either allogeneic Ia or antigen and self-Ia. *J Exp Med* 1984;159:1397–1412.
130. Abraham RT, Ho SN, Barna TJ, McKean DJ. Transmembrane signaling during interleukin 1-dependent T cell activation: interactions of signal 1- and signal 2-type mediators with the phosphoinositide-dependent signal transduction mechanism. *J Biol Chem* 1987;262:2719–2728.
131. Bekoff M, Kubo R, Grey HM. Activation requirements for normal T cells: accessory cell-dependent and-independent stimulation by anti-receptor antibodies. *J Immunol* 1986;137:1411–1419.
132. Dower SK, Kronheim SR, March CJ, et al. Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *J Exp Med* 1985;162:501–515.
133. Lowenthal JW, MacDonald HR. Binding and internalization of interleukin 1 by T cells. *J Exp Med* 1986;164:1060–1074.

134. Furue M, Chang CH, Tamaki K. Interleukin-1 but not tumour necrosis factor alpha synergistically upregulates the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced B7-1 expression of murine Langerhans cells. *Br J Dermatol* 1996;135:194–198.
135. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity [see comments]. *Nature* 1997;388:394–397.
136. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kB in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141–179.
137. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB [see comments]. *Nature* 1997;388:548–554.
138. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990;8:253–278.
139. Weiss A, Wiskocil R, Stobo JD. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two stimulus requirement for IL-2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol* 1984;133:123–128.
140. Frank SJ, Samelson LE, Klausner RD. The structure and signalling functions of the invariant T cell receptor components. *Semin Immunol* 1990;2:89–97.
141. Blumberg R, Ley S, Sancho J, et al. Structure of the T-cell antigen receptor: evidence for two CD3 ε subunits in the T-cell receptor-CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7220–7224.
142. Manolios N, Letourneur F, Bonifacino JS, Klausner RD. Pairwise, cooperative and inhibitory interactions describe the assembly and probable structure of the T-cell antigen receptor. *EMBO J* 1991;10:1643–1651.
143. Kearse KP, Roberts JL, Singer A. TCRa-CD3de association is the initial step in αβ dimer formation in murine T cells and is limiting in immature CD4+CD8+ thymocytes. *Immunity* 1995;2:391–399.
144. Orloff DG, Ra C, Frank SJ, Klausner RD, Kinet J-P. Family of disulphide-linked dimers containing ζ and η chains of the T-cell receptor and the γ chain of Fc receptors. *Nature* 1990;347:189–191.
145. Tan L, Turner J, Weiss A. Regions of the T cell antigen receptor α and β chains that are responsible for interactions with CD3. *J Exp Med* 1991;173:1247–1256.
146. Irving B, Weiss A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor ζ chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 1991; 64:891–901.
147. Romeo C, Seed B. Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell* 1991;64:1037–1046.
148. Letourneur F, Klausner RD. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3ε. *Science* 1992;255:79–82.
149. Wegener A-MK, Letourneur F, Hoeveler A, Brocker T, Luton F, Malissen B. The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* 1992;68:83–95.
150. Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature* 1989;338:383–384.
151. Romeo C, Amiot M, Seed B. Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor ζ chain. *Cell* 1992;68:889–897.
152. Irving BA, Chan AC, Weiss A. Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell receptor ζ chain. *J Exp Med* 1993;177:1093–1103.
153. Lin S, Cicala C, Scharenberg AM, Kinet J-P. The FceR1b subunit functions as an amplifier of FceR1γ-mediated cell activation signals. *Cell* 1996;85:985–995.
154. Shores EW, Tran T, Grinberg A, Sommers CL, Shen H, Love PE. Role of the multiple T cell receptor (TCR)-ζ chain signaling motifs in selection of the T cell repertoire. *J Exp Med* 1997;185:893–900.
155. Letourneur F, Klausner RD. T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell-receptor ζ family proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:8905–8909.
156. Osman N, Turner H, Lucas S, Reif K, Cantrell DA. The protein interactions of the immunoglobulin receptor family tyrosine-based activation motifs present in the T cell receptor ζ subunits and the CD3γ,δ and ε chains. *Eur J Immunol* 1996;26:1063–1068.
157. Rozdzial MM, Malissen B, Finkel TH. Tyrosine-phosphorylated T cell receptor ζ chain associates with the actin cytoskeleton upon activation of mature T lymphocytes. *Immunity* 1995;3:623–633.
158. Combadière B, Freedman M, Chen L, Shores EW, Love P, Lenardo MJ. Qualitative and quantitative contributions of the T cell receptor zeta chain to mature T cell apoptosis. *J Exp Med* 1996;183:2109–2117.
159. Willems L, Gatot JS, Mammerickx M, et al. The YXXL signalling motifs of the bovine leukemia virus transmembrane protein are required for in vivo infection and maintenance of high viral loads. *J Virol* 1995;69:4137–4141.
160. Miller CL, Burkhardt AL, Lee JH, et al. Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* 1995;2.
161. Du Z, Lang SM, Sasseville VG, et al. Identification of a nef allele that causes lymphocyte activations and acute disease in macaque monkeys. *Cell* 1995;82: 665–674.
162. Cantrell DA, Davies AA, Crumpton MJ. Activators of protein kinase C down-regulate and phosphorylate the T3/T-cell antigen receptor complex of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:8158–8162.
163. Dietrich J, Hou X, Wegener AM, Pedersen LO, Odum N, Geisler C. Molecular characterization of the di-leucine-based internalization motif of the T cell receptor. *J Biol Chem* 1996;271:11441–11448.
164. Goldsmith MA, Weiss A. Isolation and characterization of a T-lymphocyte somatic mutant with altered signal transduction by the antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6879–6883.
165. Dianzani U, Shaw A, Al-Ramadi BK, Kubo RT, Janeway CA Jr. Physical association of CD4 with the T cell receptor. *J Immunol* 1992;148:678–688.
166. Hsi ED, Siegel JN, Minami Y, Luong ET, Klausner RD, Samelson LE. T cell activation induces rapid tyrosine phosphorylation of a limited number of cellular substrates. *J Biol Chem* 1989;264:10836–10842.
167. June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, Samelson LE. Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J Immunol* 1990;144:1591–1599.
168. Samelson LE, Patel MD, Weissman AM, Harford JB, Klausner RD. Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* 1986;46:1083–1090.
169. Baniyash M, Garcia-Morales P, Luong E, Samelson LE, Klausner RD. The T cell antigen receptor ζ chain is tyrosine phosphorylated upon activation. *J Biol Chem* 1988;263:18225–18230.
170. Qian D, Griswold-Prenner I, Rosner MR, Fitch FW. Multiple components of the T cell antigen receptor complex become tyrosine-phosphorylated upon activation. *J Biol Chem* 1993;268:4488–4493.
171. Weiss A. T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell* 1993;73:209–212.
172. Brown MT, Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1996;1287:121–149.
173. Yurchak LK, Sefton BM. Palmitoylation of either Cys-3 or Cys-5 is required for the biological activity of the Lck tyrosine protein kinase. *Mol Cell Biol* 1995;15: 6914–6922.
174. Shenoy-Scaria AM, Gauen LKT, Kwong J, Shaw AS, Lublin DM. Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases $p56^{lck}$ and $p59^{fyn}$ mediates interactions with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein. *Mol Cell Biol* 1993;13:6385–6392.
175. Yamaguchi H, Hendrickson WA. Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature* 1996;384: 484–489.
176. Sicheri F, Moarefi I, Kuriyan J. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 1997;385:602–609.
177. Xu W, Harrison SG, Eck MJ. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 1997;385:595–602.
178. Cooke MP, Perlmutter RM. Expression of a novel form of the fyn proto-oncogene in hematopoietic cells. *New Biologist* 1989;1:66–74.
179. Davidson D, Chow LML, Fournel M, Veillette A. Differential regulation of T cell antigen responsiveness by isoforms of the src-related tyrosine protein kinase $p59^{fyn}$. *J Exp Med* 1992;175:1483–1492.
180. Samelson LE, Phillips AF, Luong ET, Klausner RD. Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4358–4362.
181. Gassmann M, Amrein KE, Flint NA, Schraven B, Burn P. Identification of a signaling complex involving CD2, ζ chain and $p59^{fyn}$ in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1994;24:139–144.
182. Gauen LKT, Kong A-NT, Samelson LE, Shaw AS. $p59^{fyn}$ tyrosine kinase associates with multiple T-cell receptor subunits through its unique amino-terminal domain. *Mol Cell Biol* 1992;12:5438–5446.
183. Ley SC, Marsh M, Bebbington CR, Proudfoot K, Jordan P. Distinct intracellular localization of Lck and Fyn protein tyrosine kinases in human T lymphocytes. *J Cell Biol* 1994;125:639–649.
184. Tsygankov AY, Broker BM, Fargnoli J, Ledbetter JA, Bolen JB. Activation of tyrosine kinase $p60^{fyn}$ following T cell antigen receptor cross-linking. *J Biol Chem* 1992;267:18259–18262.
185. Tsygankov AY, Spana C, Rowley RB, Penhallow RC, Burkardt AL, Bolen JS. Activation-dependent tyrosine phosphorylation of Fyn-associated proteins in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1994;269:7792–7800.
186. O'Shea JJ, Ashwell JD, Bailey TL, Cross SL, Samelson LE, Klausner RD. Expression of v-src in a murine T-cell hybridoma results in constitutive T-cell receptor phosphorylation and interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1741–1745.
187. Abraham N, Miceli MC, Parnes JR, Veillette A. Enhancement of T-cell responsiveness by the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase $p56^{lck}$. *Nature* 1991;350:62–66.
188. Cooke MP, Abraham KM, Forbush KA, Perlmutter RM. Regulation of T cell receptor signaling by a src family protein-tyrosine kinase ($p59^{fyn}$). *Cell* 1991; 65:281–292.
189. Appleby MW, Gross JA, Cooke MP, Levin SD, Qian X, Perlmutter RM. Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of $p59^{fyn}$. *Cell* 1992;70:751–763.
190. Stein PL, Lee H-M, Rich S, Soriano P. pp59fyn mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells. *Cell* 1992;70:741–750.
191. Lev S, Moreno H, Martinez R, et al. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca^{2+}-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 1995;376:737–745.
192. Qian D, Lev S, van Oers NSC, Dikic I, Schlessinger J, Weiss A. Tyrosine phosphorylation of Pyk2 is selectively regulated by Fyn during TCR signaling. *J Exp Med* 1997;185:1253–1259.

193. Rudd CE, Trevillyan JM, Dasgupta JD, Wong LL, Schlossman SF. The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5190–5194.
194. Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Cell* 1988;55:301–308.
195. Haughn L, Gratton S, Caron L, Sekaly R-P, Veillette A, Julius M. Association of tyrosine kinase p56lck with CD4 inhibits the induction of growth through the T-cell receptor. *Nature* 1992;358:328–331.
196. Beyers AD, Spruyt LL, Williams AF. Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8 and CD5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2945–2949.
197. Burgess KE, Odysseos AD, Zalvan C, et al. Biochemical identification of a direct physical interaction between the CD4:p56^{lck} and Ti(TCR)/CD3 complexes. *Eur J Immunol* 1991;21:1663–1668.
198. Straus DB, Weiss A. The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation. *J Exp Med* 1993;178:1523–1530.
199. Straus D, Weiss A. Genetic evidence for the involvement of the Lck tyrosine kinase in signal transduction throught the T cell antigen receptor. *Cell* 1992;70:585–593.
200. Molina TJ, Kishihara K, Siderovski DP, et al. Profound block in thymocyte development in mice lacking p56^{lck}. Nature 1992;357:161–164.
201. Karnitz L, Sutor SL, Torigoe T, et al. Effects of p56lck on the growth and cytolytic effector function of an interleukin-2-dependent cytotoxic T-cell line. *Mol Cell Biol* 1992;12:4521–4530.
202. van Oers NSC, Killeen N, Weiss A. Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J Exp Med* 1996;183:1053–1062.
203. van Oers NSC, Lowin-Kropf B, Finlay D, Connolly K, Weiss A. ab T cell development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases. *Immunity* 1996;5:429–436.
204. Groves T, Smiley P, Cooke MP, Forbush K, Perlmutter RM, Guidos CJ. Fyn can partially substitute for Lck in T lymphocyte development. *Immunity* 1996;5:417–428.
205. Danielian S, Alcover A, Polissard L, et al. Both T cell receptor (TcR)-CD3 complex and CD2 increase the tyrosine kinase activity of p56^{lck}. CD2 can mediate TcR-independent and CD45-dependent activation of p56^{lck}. *Eur J Immunol* 1992;22:2915–2921.
206. Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Samelson LE, Bolen JB. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Nature* 1989;338:257–259.
207. van Oers NSC, Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Semin Immunol* 1995;7:227–236.
208. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: A 70kD protein tyrosine kinase that associates with the TCR ζ chain. *Cell* 1992;71:649–662.
209. Chan AC, Irving BA, Fraser JD, Weiss A. The ζ-chain is associated with a tyrosine kinase and upon T cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70 kilodalton tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9166–9170.
210. Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, et al. Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem* 1991;266:15790–15796.
211. Chan AC, van Oers NSC, Tran A, et al. Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in T cell antigen receptor signaling. *J Immunol* 1994;152:4758–4766.
212. Mallick-Wood CA, Pao W, Cheng AM, et al. Disruption of epithelial gd T cell repertoires by mutation of the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9704–9709.
213. Wange RL, Malek SN, Desiderio S, Samelson LE. Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor z and CD3e from activated Jurkat T cells. *J Biol Chem* 1993;268:19797–19801.
214. Bu J-Y, Shaw AS, Chan AC. Analysis of the interaction of ZAP-70 and syk protein-tyrosine kinases with the T-cell antigen receptor by plasmon resonance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5106–5110.
215. Pawson T, Schlessinger J SH2 and SH3 domains. *Curr Biol* 1993;3:434–442.
216. Hatada MH, Lu X, Laird ER, et al. Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* 1995;377:32–38.
217. Keshvara LM, Isaacson C, Harrison ML, Geahlen RL. Syk activation and dissociation from the B-cell antigen receptor is mediated by phosphorylation of tyrosine 130. *J Biol Chem* 1997;272:10377–10381.
218. Watts JD, Affolter M, Krebs DL, Wange RL, Samelson LE, Aebersold R. Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J Biol Chem* 1994;269:29520–29529.
219. Kong G, Dalton M, Wardenburg JB, Straus D, Kurosaki T, Chan AC. Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function. *Mol Cell Biol* 1996;16:5026–5035.
220. Zhao Q, Weiss A. Enhancement of lymphocyte responsiveness by a gain-of-function mutation of ZAP-70. *Mol Cell Biol* 1996;16:6765–6774.
221. Wange RL, Guitian R, Isakov N, Watts JD, Aebersold R, Samelson LE. Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70. *J Biol Chem* 1995;270:18730–18733.
222. Furlong MT, Mahrenholz AM, Kim KH, Ashendel CL, Harrison ML, Geahlen RL. Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochim Biophys Acta* 1997;1355:177–190.
223. Chan AC, Dalton M, Johnson R, et al. Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J* 1995;14:2499–2508.
224. Kurosaki T, Johnson SA, Pao L, Sada K, Yamamura H, Cambier JC. Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. *J Exp Med* 1995;182:1815–1823.
225. Chan AC, Shaw AS. Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr Opin Immunol* 1996;8:394–401.
226. Latour S, Chow LML, Veillette A. Differential intrinisic enzymatic activity of Syk and Zap-70 protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996;271:22782–22790.
227. Kong G-H, Bu J-Y, Kurosaki T, Shaw AS, Chan AC. Reconstitution of Syk function by the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *Immunity* 1995;2:485–492.
228. Wiest DL, Ashe JM, Howcroft TK, et al. A spontaneously arising mutation in the DLAARN motif of murine ZAP-70 abrogates kinase activity and arrests thymocyte development. *Immunity* 1997;6:663–671.
229. Arpaia E, Shahar M, Dadi H, Cohen A, Roifman CM. Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking ZAP-70 kinase. *Cell* 1994;76:947–958.
230. Chan AC, Kadlecek TA, Elder ME, et al. ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* 1994;264:1599–1601.
231. Elder ME, Lin D, Clever J, et al. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T-cell tyrosine kinase. *Science* 1994;264:1596–1599.
232. Negishi I, Motoyama N, Nakayama K-I, et al. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 1995;376:435–438.
233. Gelfand EW, Weinberg K, Mazer BD, Kadlecek TA, Weiss A. Absence of ZAP-70 prevents signaling through the antigen receptor on peripheral blood T cells but not thymocytes. *J Exp Med* 1995;182:1057–1066.
234. van Oers NSC, Tao W, Watts JD, Johnson P, Aebersold R, Teh H-S. Constitutive tyrosine phosphorylation of the T cell receptor (TCR) ζ subunit: regulation of TCR-associated protein kinase activity by TCR ζ. *Mol Cell Bio* 1993;13:5771–5780.
235. Shiue L, Zoller MJ, Brugge JS. Syk is activated by phosphotyrosine-containing peptides representing the tyrosine-based activation motifs of the high affinity receptor for IgE. *J Biol Chem* 1995;270:10498–10502.
236. Kolanus W, Romeo C, Seed B. T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* 1993;74:171–183.
237. Chu DH, Spits H, Peyron J-F, Rowley RB, Bolen JB, Weiss A. The Syk protein tyrosine kinase can function independently of CD45 and Lck in T cell antigen receptor signaling. *EMBO J* 1996;15:6251–6261.
238. Fantl WJ, Escobedo JA, Martin GA, et al. Distinct phosphotyrosines on a growth factor receptor bind to specific molecules that mediate different signaling pathways. *Cell* 1992;69:413–423.
239. Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993;72:767–778.
240. Overduin M, Rios CB, Mayer BJ, Baltimore D, Cowburn D. Three-dimensional solution structure of the src homology 2 domain of c-abl. *Cell* 1992;70:697–704.
241. Eck MJ, Shoelson SE, Harrison SC. Recognition of a high-affinity phosphotyrosyl peptide by the Src homology-2 domain of p56^{lck}. *Nature* 1993;362:87–91.
242. Wu J, Zhao Q, Kurosaki T, Weiss A. The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J Exp Med* 1997;185:1877–1882.
243. Rotin D, Margolis B, Mohammadi M, et al. SH2 domains prevent tyrosine dephosphorylation of the EGF receptor, identification of Tyr992 as the high affinity binding site for SH2 domains of phospholipase Cg. *EMBO J* 1992;11:559–567.
244. Charbonneau H, Tonks NK. 1002 protein phosphates. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8:463–493.
245. Kavanaugh WM, Turck CW, Williams LT. PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine. *Science* 1995;268:1177–1179.
246. van der Geer P, Pawson T. The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci* 1995;20:277–280.
247. Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 1994;12:85–116.
248. Sap J, D'Eustachio P, Givol D, Schlessinger J. Cloning and expression of a widely expressed receptor tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6112–6116.
249. Fischer EH, Charbonneau H, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* 1991;253:401–406.
250. Thomas ML. Positive and negative regulation of leukocyte activation by protein tyrosine phosphatases. *Semin Immunol* 1995;7:279–288.
251. Johnson P, Ostergaard HL, Wasden C, Trowbridge IS. Mutational analysis of CD45: a leukocyte-specific protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 1992;12:8035–8041.
252. Desai DM, Sap J, Silvennoinen O, Schlessinger J, Weiss A. The catalytic activity of the CD45 membrane proximal phosphatase domain is required for TCR sig-

naling and regulation. *EMBO J* 1994;13:4002–4010.
253. Bottomly K, Luqman M, Greenbaum L, et al. A monoclonal antibody to murine CD45R distinguishes CD4 T cell populations that produce different cytokines. *Eur J Immunol* 1989;19:617–623.
254. Byrne JA, Butler JL, Cooper MD. Differential activation requirements for virgin and memory T cells. *J Immunol* 1988;141:3249–3257.
255. Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PCL, Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* 1988;140: 2171–2178.
256. Novak TJ, Farber D, Leitenberg D, Hong SC, Johnson P, Bottomly K. Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition. *Immunity* 1994;1:109–119.
257. Leitenberg D, Novak TJ, Farber D, Smith BR, Bottomly K. The extracellular domain of CD45 controls association with the CD4-T cell receptor complex and the response to antigen-specific stimulation. *J Exp Med* 1996;183:249–259.
258. Desai DM, Sap J, Schlessinger J, Weiss A. Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase. *Cell* 1993;73:541–554.
259. Pingel JT, Thomas ML. Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. *Cell* 1989;58:1055–1065.
260. Koretzky GA, Picus J, Thomas ML, Weiss A. Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T cell antigen receptor to the phosphatidylinositol pathway. *Nature* 1990;346:66–68.
261. Koretzky G, Picus J, Schultz T, Weiss A. Tyrosine phosphatase CD45 is required for both T cell antigen receptor and CD2 mediated activation of a protein tyrosine kinase and interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2037–2041.
262. Weaver CT, Pingel JT, Nelson JO, Thomas ML. CD8+ T-cell clones deficient in the expression of the CD45 protein tyrosine phosphatase have impaired responses to T-cell receptor stimuli. *Mol Cell Biol* 1991;11:4415–4422.
263. Byth KF, Conroy LA, Howlett S, et al. CD45-Null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of $CD4^+CD8^-$ thymocytes, and in B cell maturation. *J Exp Med* 1996;183:1707–1718.
264. Kishihara K, Penninger J, Wallace VA, et al. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-Exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* 1993;74:143–156.
265. Mustelin T, Coggeshall KM, Altman A. Rapid activation of the T-cell tyrosine protein kinase $pp56^{lck}$ by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6302–6306.
266. McFarland EDC, Hurley TR, Pingel JT, Sefton BM, Shaw A, Thomas ML. Correlation between Src family member regulation by the protein-tyrosine-phosphatase CD45 and transmembrane signaling through the T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1402–1406.
267. Ostergaard HL, Shackelford DA, Hurley TR, et al. Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck—encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8959–8963.
268. Sieh M, Bolen JB, Weiss A. CD45 specifically modulates binding of Lck to a phosphopeptide encompassing the negative regulatory tyrosine of Lck. *EMBO J* 1993;12:315–322.
269. Todderud G, Wahl MJ, Rhee SG, Carpenter G. Stimulation of phospholipase C-g1 membrane association by epidermal growth factor. *Science* 1990;249:296–298.
270. Law CL, Chandran KA, Sidorenko SP, Clark EA. Phospholipase C-gamma 1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol Cell Biol* 1996;16:1305–1315.
271. Sieh M, Batzer A, Schlessinger J, Weiss A. GRB2 and phospholipase C-γ1 associate with a 36- to 38-kilodalton phosphotyrosine protein after T-cell receptor stimulation. *Mol Cell Biol* 1994;14:4435–4442.
271a. Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, et al. LAT: The ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 1998;92:83–92.
272. Weiss A, Koretzky G, Schatzman R, Kadlecek T. Stimulation of the T cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C γ1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5484–5488.
273. Takata M, Kurosaki T. A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-γ2. *J Exp Med* 1996;184:31–40.
274. Park DJ, Rho HW, Rhee SG. CD3 stimulation causes phosphorylation of phospholipase C-γ1 on serine and tyrosine residues in a human T cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5453–5456.
275. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988;334:661–665.
276. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{++} indicators with greatly improved fluorescent properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440–3448.
277. Oettgen HC, Terhorst C, Cantley LC, Rosoff PM. Stimulation of the T3-T cell receptor complex induces a membrane-potential-sensitive calcium influx. *Cell* 1985;40:583–590.
278. Rabinovitch PS, June CH, Grossman A, Ledbetter JA. Heterogeneity among T cells in intracellular free calcium responses after mitogen stimulation with PHA or anti-CD3, simultaneous use of indo-1 and immunofluorescence with flow cytometry. *J Immunol* 1986;137:952–961.
279. Manger B, Weiss A, Imboden J, Laing T, Stobo J. The role of protein kinase C in transmembrane signaling by the T cell receptor complex: effects of stimulation with soluble or immobilized T3 antibodies. *J Immunol* 1987;139:395–407.
280. Berry N, Ase K, Kishimoto A, Nishizuka Y. Activation of resting human T cells requires prolonged stimulation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2294–2298.
281. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989;341:197–205.
282. Imboden JB, Stobo JD. Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor: perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J Exp Med* 1985;161: 446–456.
283. Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda N, Mikoshiba K. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* 1989;342:32–38.
284. Sugawara H, Kurosaki M, Takata M, Kurosaki T. Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J* 1997;16:3078–3088.
285. Goldsmith M, Weiss A. Early signal transduction by the antigen receptor without commitment to T cell activation. *Science* 1988;240:1029–1031.
286. Lewis RS, Cahalan MD. Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca^{2+} and membrane Ca^{2+} current in human leukemic T cells. *Cell Reg.* 1989;1:99–112.
287. Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca^{2+} signals and immunosuppression. *Nature* 1996;383:837–840.
288. Putney JW, Bird GSJ. The signal for capacitative calcium entry. *Cell* 1993;75: 199–201.
289. Randriamampita C, Tsien RY. Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* 1993;364:809–814.
290. Gardner P. Patch clamp studies of lymphocyte activation. *Annu Rev Immunol* 1990;8:231–252.
291. Majerus PW, Ross TS, Cunningham TW, Caldwell KK, Jefferson AB, Bansal VS. Recent insights in phosphatidylinositol signaling. *Cell* 1990;63:459–465.
292. Toker A, Cantley LC. Signaling through the lipid products of phosphatidylinositide-3-OH kinase. *Nature* 1997;387:673–676.
293. Ward SG, Westwick J, Hall ND, Sansom DM. Ligation of CD28 receptor by B7 induces formation of D-3 phosphoinositides in T lymphocytes independently of T cell receptor/CD3 activation. *Eur J Immunol* 1993;23:2572–2577.
294. Ward SG, Reif K, Ley S, Fry MJ, Waterfield MD, Cantrell DA. Regulation of phosphoinositide kinases in T cells. *J Biol Chem* 1992;267:23862–23869.
295. Truitt KE, Hicks CM, Imboden JB. Stimulation of CD28 triggers an association between CD28 and phosphatidylinositol 3-kinase in Jurkat T cells. *J Exp Med* 1994;179:1071–1076.
296. Truitt KE, Mills GB, Turck CW, Imboden JB. SH2-dependent association of phosphatidylinositol 3′-kinase 85-kD regulatory subunit with the interleukin-2 receptor b chain. *J Biol Chem* 1994;269:5937–5943.
297. Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 1995;9:484–496.
298. Genot EM, Parker PJ, Cantrell DA. Analysis of the role of protein kinase C-α,-ε, and-ζ in T cell activation. *J Biol Chem* 1995;270:9833–9839.
299. Cantrell D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 1996;14:259–274.
300. Koretzky GA, Wahi M, Newton ME, Weiss A. Heterogeneity of protein kinase C isoenzyme gene expression in human T cell lines: Protein kinase C-β is not required for several T cell functions. *J Immunol* 1989;143:1692–1695.
301. Muramatsu M, Kaibuchi K, Arai K. A protein kinase C cDNA without the regulatory domain is active after transfection *in vivo* in the absence of phorbol ester. *Mol Cell Biol* 1989;9:831–836.
302. Monks CR, Kupfer H, Tamir I, Barlow A, Kupfer A. Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature* 1997;385:83–86.
303. Melloni E, Pontremoli S, Michetti M, et al. Binding of protein kinase C to neutrophil membranes in the presence of Ca^{2+} and its activation by a Ca^{2+}-requiring proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6435–6439.
304. Graber M, Bockenstedt LK, Weiss A. Signalling via the inositol phospholipid pathway by the T cell antigen receptor is limited by receptor number. *J Immunol* 1991;146:2935–2943.
305. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992;13:136–142.
306. Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991;66:807–815.
307. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:707–747.
308. Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 1991; 352:803–807.
309. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992;357:695–697.
310. O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neil EA. FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 1992;357: 692–694.
311. Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, et al. The T-cell transcription factor $NFAT_p$ is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 1993;365:352–355.
312. Nghlem P, Ollick T, Gardner P, Schulman H. Interleukin-2 transcriptional block by multifunctional Ca^{2+}/calmodulin kinase. *Nature* 1994;371:347–350.
313. Samelson LE, Harford JB, Klausner RD. Identification of the components of the

murine T cell antigen receptor complex. *Cell* 1985;43:223-231.
314. Acres RB, Conlon PJ, Mochizuki DY, Gallis B. Rapid phosphorylation and modulation of the T4 antigen on cloned helper T cells induced by phorbol myristate acetate or antigen. *J Biol Chem* 1986;261:16210-16214.
315. Shackelford DA, Trowbridge IS. Identification of lymphocyte integral membrane protein as substrates for protein kinase C. *J Biol Chem* 1986;261:8334-8341.
316. Downward J, Graves J, Cantrell D. The regulation and function of p21ras in T cells. *Immunol Today* 1992;13.89-92.
317. Polakis P, McCormick F. Structural requirements for the interaction of p21ras with GAP, exchange factors, and its biological effector target. *J Biol Chem* 1993; 268:9157-9160.
318. Schlessinger J. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *TIBS* 1993;18:273-275.
319. Izquierdo M, Downward J, Graves JD, Cantrell DA. Role of protein kinase C in T-cell antigen receptor regulation of p21ras: evidence that two p21ras regulatory pathways coexist in T cells. *Mol Cell Biol* 1992;12:3305-3312.
320. Downward J, Graves JD, Warne PH, Rayter S, Cantrell DA. Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* 1990;346:719-723.
321. Buday L, Egan SE, Rodriguez Viciana P, Cantrell DA, Downward J. A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 36-kDa membrane-bound tyrosine phosphoprotein is implicated in ras activation in T cells. *J Biol Chem* 1994;269:9019-9023.
322. Ravichandran K, Lorenz U, Shoelson SE, Burakoff SJ. Interaction of Shc with Grb2 regulates association of Grb2 with mSOS. *Mol Cell Biol* 1995;15:593-600.
323. Ravichandran KS, Lee KK, Songyang A, Cantley LC, Burn P, Burakoff SJ. Interaction of Shc with the ζ chain of the T cell receptor upon T cell activation. *Science* 1993;262:902-905.
324. McCormick F, Wittinghofer A. Interactions between Ras proteins and their effectors. *Curr Opin Biotechnol* 1996;7:449-456.
325. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Khwaja A, et al. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 1997;89:457-467.
326. Rayter SI, Woodrow M, Lucas SC, Cantrell DA, Downward J. p21ras mediates control of IL-2 gene promoter function in T cell activation. *EMBO J* 1992;11: 4549-4556.
327. Siegel JN, Klausner RD, Rapp UR, Samelson LE. T cell antigen receptor engagement stimulates c-raf phosphorylation and induces c-raf-associated kinase activity via a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 1990;265: 18472-18480.
328. Howe LR, Leevers SJ, Gomez N, Nakielny S, Cohen P, Marshall CJ. Activation of MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 1992;71:335-342.
329. Davis R. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem 1993;20:14553-14556.*
330. Nel AE, Hanekom C, Rheeder A, et al. Stimulation of map-2 kinase activity in T lymphocytes by anti-CD3 or anti-Ti monoclonal antibody is partially dependent on protein kinase C. *J Immunol* 1990;144:2683-2689.
331. Woodrow MA, Rayter S, Downward J, Cantrell DA. p21ras function is important for T cell antigen receptor and protein kinase C regulation of nuclear factor of activated T cells. *J Immunol* 1993;150:3853-3861.
332. Owaki H, Varma R, Gillis B, et al. Raf-1 is required for T cell IL2 production. *EMBO J* 1993;12:4367-4373.
333. Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* 1992;356:801-804.
334. Boise LH, Petryniak B, Mao X, et al. The NFAT-1 DNA binding complex in activated T cells contains Fra-1 and JunB. *Mol Cell Biol* 1993;13:1911-1919.
335. Northrup JP, Ullman KS, Crabtree GR. Characterization of the nuclear and cytoplasmic components of the lymphoid-specific nuclear factor of activated T cells (NF-AT) complex. *J Biol Chem* 1993;268:2917-2923.
336. Bustelo XR. The VAV family of signal transduction molecules. *Crit Rev Oncog* 1996;7:65 88.
337. Bustelo XR, Ledbetter JA, Barbacid M. Product of vav proto-oncogene defines a new class of tyrosine protein kinase substrates. *Nature* 1992;356:68-71.
338. Margolis B, Hu P, Katzav S, et al. Tyrosine phosphorylation of vav proto-oncogene product containing SH2 domain and transcription fctor motifs. *Nature* 1992;356:71-74.
339. Tarakhovsky A, Turner M, Schaal S, et al. Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in thè absence of Vav. *Nature* 1995;374:467-470.
340. Fischer K-D, Zmuldzinas A, Gardner S, Barbacid M, Bernstein A, Guidos C. Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4+CD8+ thymocytes. *Nature* 1995;374:474-477.
341. Wu J, Katzav S, Weiss A. A functional T-cell receptor signaling pathway is required for p95vav activity. *Mol Cell Biol* 1995;15:4337-4346.
342. Katzav S, Cleveland JL, Heslop HE, Pulido D. Loss of the amino-terminal helix-loop-helix domain of the vav proto-oncogene activates its transforming potential. *Mol Cell Biol* 1991;11:1912-1920.
343. Han J, Das B, Wei W, et al. Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Mol Cell Biol* 1997;17:1346-1353.
344. Kupfer A, Singer SJ. Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples. *Annu Rev Immunol* 1989;7:309-337.
345. Katzav S, Sutherland M, Packham G, Yi T, Weiss A. The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-Vav. *J Biol Chem* 1994; 269:32579-32585.
346. Motto DG, Ross EE, Wu J, Hendricks-Taylor LR, Koretzky GA. Implication of the GRB2-associated phosphoprotein SLP-76 in TCR-mediated IL-2 production. *J Exp Med* 1996;183:1937-1943.
347. Wu J, Motto DG, Koretzky GA, Weiss A. Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* 1996;4:593-602.
348. Grinstein S, Goetz-Smith JD, Stewart D, Beresford BJ, Mellors A. Protein phosphorylation during activation of Na+/H+ exchange by phorbol esters and by osmotic shrinking. *J Biol Chem* 1986;261:8009-8016.
349. Grinstein S, Goetz JD, Rothstein A. 22Na+ fluxes in thymic lymphocytes: II. Amiloride-sensitive Na+/H+ exchange pathway reversibility of transport and asymmetry of the modifier site. *J Gen Physiol* 1984;84:585-600.
350. Rosoff PM, Cantley LC. Stimulation of the T3-T cell receptor-associated Ca2+ influx enhances the activity of the Na+/H++ exchanger in a leukemic human T cell line. *J Biol Chem* 1985;260:14053-14059.
351. Wang T, Sheppard JR, Foker JE. The rise and fall of cAMP required for onset of lymphocyte DNA synthesis. *Science* 1978;201:155-157.
352. Ledbetter JA, Parsons M, Martin PJ, Hansen JA, Rabinovitch PS, June CH. Antibody binding to CD5 (Tp67) and Tp44 cell surface molecules: effects of cyclic nucleotides, cytoplasmic free calcium and cAMP-mediated suppression. *J Immunol* 1986;137:3299-3305.
353. Mills AJT, Forrest GA, Pious DA. Cyclic AMP-dependent regulation of mitosis in human lymphoid cells. *Exp Cell Res* 1974;83:335-343.
354. Smith JW, Steiner AL, Newberry WM, Parker CW. Cyclic AMP in human lymphocytes. Alterations after PHA stimulation. *J Clin Invest* 1971;50:432-441.
355. Novogrodsky A, Patya M, Rubin AL, Stenzel KH. Agents that increase cellular cAMP inhibit production of interleukin-2, but not its activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;114:93-98.
356. Patel MD, Samelson LE, Klausner RD. Multiple kinases and signal transduction. *J Biol Chem* 1987;262:5831-5838.
357. Imboden JB, Shoback DM, Pattison G, Stobo JD. Cholera toxin inhibits the T-cell antigen receptor-mediated increases in inositol trisphosphate and cytoplasmic free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5673-5677.
358. Cook SJ, McCormick F. Inhibition of cAMP of Ras-dependent activation of raf. *Science* 1993;262:1069-1072.
359. Atkinson JP, Kelley JP, Weiss A, Wedner HJ, Parker CW. Enhanced intracellular cGMP concentrations and lectin-induced lymphocyte transformation. *J Immunol* 1978;121:2282-2291.
360. Tsien RY, Pozzan T, Rink T. T cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca2+ and membrane potential in lymphocytes. *Nature* 1982;295: 68-71.
361. DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD. Voltage-gated K+ channel in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 1984;307:465-468.
362. Lewis RS, Cahalan MD. Subset-specific expression of potassium channels in developing murine T lymphocytes. *Science* 1988;239:771-775.
363. Gray LS, Gnarra JR, Russell JH, Engelhard VH. The role of K+ in the regulation of the increase in intracellular Ca^{2+} mediated by the T lymphocyte antigen receptor. *Cell* 1987;50:119-127.
364. Chandy KG, DeCoursey TE, Cahalan MD, McLaughlin C, Gupta S. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J Exp Med* 1984;160:369 385.
365. Lin CS, Boltz RC, Blake JT, et al. Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. *J Exp Med* 1993;177:637-645.
366a. Lowin-Kropf B, Shapiro VS, Weiss A. Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J Cell Biol* 1998;140:861-871.
366b. Stowers L, Yelon D, Berg LJ, Chant J. Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5027-5031.
367. Ley SC, Verbi W, Pappin DJC, Druker B, Davies AA, Crumpton MJ. Tyrosine phosphorylation of a tubulin in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1994;24: 99-106.
368. Kupfer A, Singer SJ, Dennert G. On the mechanism of unidirectional killing in mixtures of two cytotoxic lymphocytes. *J Exp Med* 1986;163:489-498.
369. Means AR, Dedman JR. Calmodulin-an intracellular calcium receptor. *Nature* 1980;285:73-77.
370. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 1994;12:735-773.
371. Lancki DW, Weiss A, Fitch FW. Requirements for triggering of lysis by cytolytic T lymphocyte clones. *J Immunol* 1987;138:3646-3653.
372. Poenie M, Tsien RY, Schmitt-Verhulst A-M. Sequential activation and lethal hit measured by $[Ca^{2+}]_i$ in individual cytolytic T cells and targets. *EMBO J* 1987;6: 2223-2232.
373. Shiver JW, Su L, Henkart PA. Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. *Cell* 1992;71:315-322.
374. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449-1456.
375. Shaw J-P, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. Identification of a putative regulator or early T cell activation genes. *Science* 1988;241:202-205.
376. Lewin B. Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors.

Cell 1991;64:303–312.

377. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:240–246.
378. Blackwell T. K., Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN, Weintraub H. Sequence-specific DNA binding by the c-myc protein. *Science* 1990;250: 1149–1151.
379. Prendergast GC, Lawe D, Ziff EB. Association of myn, the murine homologue of max, with c-myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* 1991;65:395–407.
380. Reed JC, Alpers JD, Nowell PC, Hoover RG. Sequential expression of protooncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3982–3986.
381. Ship MA, Reinherz E. Differential expression of nuclear proto-oncogenes in T cells triggered with mitogenic and nonmitogenic T3 and T11 activation signals. *J Immunol* 1987;139:2143–2148.
382. Grausz JD, Fradelizi D, Dautry F, Monier R, Lehn P. Modulation of c-fos and c-myc mRNA levels in normal human lymphocytes by calcium ionophore A23187 and phorbol ester. *Eur J Immunol* 1986;16:1217–1221.
383. Ullman KS, Northrup JP, Admon A, Crabtree GR. Jun family members are controlled by a calcium-regulated, cyclosporin A-sensitive signaling pathway in activated T lymphocytes. *Genes Dev* 1993;7:188–196.
384. Derijard B, Hibi M, Wu I-H, et al. JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994;76:1025–1037.
385. Deng T, Karin M. c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* 1994;371:171–175.
386. Zheng W-P, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997;89:587–596.
387. Hodge MR, Chun HJ, Rengarajan J, Alt A, Lieberson R, Glimscher LH. NF-AT-driven interleukin-4 transcription potentiated by NIP45. *Science* 1996;274: 1903–1905.
388. Ho I-C, Hodge MR, Rooney JW, Glimscher LH. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 1996;85:973–983.
389. Siebenlist U, Durand DB, Bressler P, et al. Promoter region of interleukin-2 gene undergoes chromatin structure changes and confers inducibility on chloramphenicol acetyltransferase gene during activation of T cells. *Mol Cell Biol* 1986;6:3042–3049.
390. Durand DB, Shaw J-P, Bush MR, Replogle RE, Gelagaje R, Crabtree GR. Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. *Mol Cell Biol* 1988;8:1715–1724.
391. Serfling E, Avots A, Neumann M. The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim Biophys Acta* 1995;1263:181–200.
392. Ullman KS, Flanagan WM, Edwards CA, Crabtree GR. Activation of early gene expression in T lymphocytes by Oct-1 and inducible protein, OAP40. *Science* 1991;254:558–562.
393. Jain J, Valge-Archer VE, Sinskey AJ, Rao A. The AP-1 site at-150 bp, but not the NF-kB site, is likely to represent the major target of protein kinase C in the interleukin 2 promoter. *J Immunol* 1992;175:853–862.
394. Jain J, Valge-Archer VE, Rao A. Analysis of the AP-1 sites in the IL-2 promoter. *J Immunol* 1992;148:1240–1250.
395. Kang S-M, Beverly B, Tran A-C, Brorson K, Schwartz RH, Lenardo MJ. Transactivation by AP-1 is a molecular target of T cell clonal anergy. *Science* 1992; 257:1134–1138.
396. Li W, Whaley CD, Mondino A, Mueller DL. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells. *Science* 1996;271: 1272–1276.
397. Fields PE, Gajewski TF, Fitch FW. Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells. *Science* 1996;271:1276–1278.
398. Ullman KS, Northrop JP, Verweij CL, Crabtree GR. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol* 1990;8: 421–452.
399. Lai J-H, Horvath G, Subleski J, Bruder J, Ghosh P, Tan T-H. RelA is a potent transcriptional activator of the CD28 response element within the interleukin 2 promoter. *Mol Cell Biol* 1995;15:4260–4271.
400. Ghosh P, Tan T-H, Rice NR, Sica A, Young HA. The interleukin 2 CD28-responsive complex contains at least three members of the NFkB family: c-Rel, p50 , and p65. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1696–1700.
401. Rooney JW, Sun YL, Glimcher LH, Hoey T. Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation. *Mol Cell Biol* 1995;15:6299–6310.
402. Shapiro VS, Truitt KE, Imboden JB, Weiss A. CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites. *Mol Cell Biol* 1997;17: 4051–4058.
403. McGuire KL, Iacobelli M. Involvement of Rel, Fos, and Jun proteins in binding activity to the IL-2 promoter CD28 response element/AP-1 sequence in human T cells. *J Immunol* 1997;159:1319–1327.
404. Kontgen F, Grumont RJ, Strasser A, et al. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev* 1995;9:1965–1977.
405. Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. Cell 1986;46:659–667.
406. Umlauf SW, Beverly B, Lantz O, Schwartz RH. Regulation of interleukin 2 gene expression by CD28 costimulation in mouse T-cell clones: both nuclear and cytoplasmic RNAs are regulated with complex kinetics. *Mol Cell Biol* 1995;15: 3197–3205.
407. Sugamura K, Asao H, Kondo M, et al. The interleukin-2 receptor g chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol* 1996;14:179–205.
408. Ko HS, Fu SM, Winchester RJ, Yu DTY, Kunkel HG. Ia determinants on stimulated human T lymphocytes: occurrence on mitogen- and antigen-activated cells. *J Exp Med* 1979;150:246–257.
409. Lanier LL, Buck DW, Rhodes L, et al. Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J Exp Med* 1988;167:1572–1585.
410. Haynes BF, Hemler ME, Mann DL, et al. Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes. *J Immunol* 1981;126:1409–1414.
411. Rothstein DM, Saito H, Streuli M, Schlossman SF, Morimoto C. The alternative splicing of the CD45 tyrosine phosphatase is controlled by negative regulatory trans-acting splicing factors. *J Biol Chem* 1992;267:7139–7147.
412. Bohnlein E, Lowenthal JW, Siekevitz M, Ballard DW, Franza BR, Greene WC. The same inducible nuclear proteins regulate mitogen activation of both the interleukin-2 receptor-alpha gene and type 1 HIV. *Cell* 1988;53:827–836.
413. Cross SL, Feinberg MB, Wolf JB, Holbrook NJ, Wong-Staal F, Leonard WJ. Regulation of the human interleukin-2 receptor α chain promoter: activation of a nonfunctional promoter by the transactivator gene of HTLV-1.*Cell* 1987;49: 47–56.
414. Leonard WJ, Kronke M, Peffer NJ, Depper JM, Green WC. Interleukin 2 receptor gene expression in normal human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6281–6285.
415. Smith KA, Cantrell DA. Interleukin 2 regulates its own receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:864–868.
416. Yamamoto Y, Ohmura T, Fujimoto K, Onoue K. Interleukin 2 mRNA induction in human lymphocytes: analysis of the synergistic effect of a calcium ionophore A23187 and a phorbol ester. *J Immunol* 1985;15:1204–1208.
417. Schreiber SL. Immunophilin-sensitive protein phosphatase action in cell signaling pathways. *Cell* 1992;70:365–368.
418. Waldmann T. The interleukin-2 receptor. *J Biol Chem* 1991;266:2681–2684.
419. Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 1993;73:5–8.
420. Horak I, Lohler J, Ma A, Smith K. Interleukin-2 deficient mice: a new model to study autoimmunity and self tolerance. *Immunol Rev* 1995;148:35–44.
421. Schorle H, Holtshke T, Hunig T, Schimpl A, Horak I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targetting. *Nature* 1991;352:621–624.
422. Kundig TM, Schorle H, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM, Horak I. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science* 1993;262:1059–1061.
423. Leonard WJ, Depper JM, Crabtree GR, et al. Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. *Nature* 1984;311:626–631.
424. Hatakeyama M, Tsudo M, Minamoto S, et al. Interleukin-2 receptor β chain gene: Generation of three receptor forms by cloned human α and β chain cDNA's. *Science* 1989;244:551–556.
425. Tsudo M, Karasuyama H, Kitamura F, et al. The IL-2 receptor β-chain (p70): Ligand binding ability of the cDNA-encoding membrane and secreted forms. *J Immunol* 1990;145:599–606.
426. Takeshita T, Asao H, Ohtani K, et al. Cloning of the γ chain of the human IL-2 receptor. *Science* 1992;257:379–382.
427. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6934–6938.
428. Lowenthal JW, Greene WC. Constrasting interleukin 2 binding properties of the α (p55) and β (p70) protein subunits of the human high-affinity interleukin 2 receptor. *J Exp Med* 1987;166:1156–1161.
429. Matsuoka M, Takeshita T, Ishii N, Nakamura M, Ohkubo T, Sugamura K. Kinetic study of interleukin-2 binding on the reconstituted interleukin-2 receptor complexes including the human γ-chain. *Eur J Immunol* 1993;23: 2472–2476.
430. Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, et al. Interleukin-2 receptor γ chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 1993;73:147–157.
431. Disanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:377–381.
432. Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 1995;3:521–530.
433. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 1995;268: 1472–1476.
434. Nakamura Y, Russell SM, Mess SA, et al. Heterodimerization of the IL-2 receptor β- and γ-chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature* 1994;

369:330–333.
435. Nelson BH, Lord JD, Greenberg PD. Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor β and γ chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature* 1994;369:333–336.
436. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 1995;13:369–398.
437. O'Shea JJ. Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: are we there yet? *Immunity* 1997;7:1–11.
438. Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* 1994;266:1045–1047.
439. Thomis DC, Gurniak CB, Tivol E, Sharpe AH, Berg LJ. Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3. *Science* 1995;270:794–797.
440. Russell SM, Tayebi N, Nakajima H, et al. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science* 1995;270:797–800.
441. Gaffen SL, Lai SY, Ha M, et al. Distinct tyrosine residues within the interleukin-2 receptor β chain drive signal transduction specificity, redundancy and diversity. *J Biol Chem* 1996;271:221381–21390.
442. Hatakeyama M, Kono T, Kobayashi N, et al. Interaction of the IL-2 receptor with the src-Family kinase p56[lck]: Identification of novel intermolecular association. *Science* 1991;252:1523–1528.
443. Horak ID, Gress RE, Lucas PJ, Horak EM, Waldmann TA, Bolen JB. T-lymphocyte interleukin 2-dependent tryosine protein kinase signal transduction involves the activation of p56[lck]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1996–2000.
444. Minami Y, Nakagawa Y, Kawahara A, et al. Protein tyrosine kinase Syk is associated with and activated by the IL-2 receptor: Possible link with the c-myc induction pathway. *Immunity* 1995;2:89–100.
445. Turner M, Mee PJ, Costello PS, et al. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 1995;378:298–302.
446. Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 1995;378:303–306.
447. Ravichandran KS, Burakoff SJ. The adaptor protein shc interacts with the interleukin-2 (IL-2) receptor upon IL-2 stimulation. *J Biol Chem* 1994;269:1599–1602.
448. Dudek H, Datta SR, Franke TF, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997;275:661–665.
449. Abraham RT, Wiedeerrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol* 1996;14:483–510.
450. Brown E, Beal PA, Keith CT, Chen J, Shin T, Schreiber S. Control of p70 S6 kinase by kinase activity of FRAP. *Nature* 1995;377:441–446.
451. Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, et al. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-1 by the mammalian target of rapamycin. *Science* 1997; 277:99–101.
452. Scherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Devel* 1995;9:1149 1163.
453. Nourse J, Firpo E, Flanagan W, et al. Interleukin-2 mediated elimination of the p27[Kip1] cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 1994;372:570–573.
454. Moldwin RL, Lancki DW, Herold KC, Fitch FW. An antigen receptor-driven interleukin 2-independent pathway for proliferation of murine cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med* 1986;163:1566–1582.
455. Laing TJ, Weiss A. IL-2 independent proliferation in human T cells. *J Immunol* 1988;140:1056–1062.
456. Schultz LD, Sidman CL. Genetically determined murine models of immunodeficiency. *Annu Rev Immunol* 1987;5:367–404.
457. Lorenz U, Ravichandran KS, Burakoff SJ. Lack of SHPTP1 results in src-family kinase hyperactivation and thymocyte hyperresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9624–9629.
458. Marengere LEM, Waterhouse P, Duncan GS, Mittrucker H-W, Feng G-S, Mak TW. Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science* 1996;272:1170–1173.
459. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science* 1995;270:985–988.
460. Cloutier J-F, Veillette A. Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50[csk] with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells. *EMBO J* 1996;15:4909–4918.
461. Latinis KM, Carr LL, Peterson EJ, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA. Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. *J Immunol* 1997;158:4602–4611.
462. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995;81:935–946.
463. Wilde DB, Fitch FW. Antigen-reactive cloned helper T cells. I. Unresponsiveness to antigenic restimulation develops after stimulation of cloned helper T cells. *J Immunol* 1984;132:1632–1638.
464. Williams ME, Shea CM, Lichtman AH, Abbas AK. Antigen receptor-mediated anergy in resting T lymphocytes and T cell clones: correlation with lymphokine secretion patterns. *J Immunol* 1992;149:1921–1926.
465. Nau GJ, Moldwin RL, Lancki DW, Kim D-K, Fitch FW. Inhibition of IL 2-driven proliferation of murine T lymphocyte clones by supraoptimal levels of immobilized anti-T cell receptor monoclonal antibody. *J Immunol* 1987;139: 114–122.
466. Jenkins MK, Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med* 1987;165:302–319.
467. Quill H, Schwartz RH. Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: Specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J Immunol* 1987; 138:3704–3712.
468. Lin H, Bolling SF, Linsley PS, et al. Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *J Exp Med* 1993;178:1801–1806.

第13章 辅助分子

Jeffrey A. Bluestone, Roli Khattri, and Gijs A, van Seventer①

历史回顾

在20世纪80年代早期,耶鲁大学Richaral Gershon博士因用四张历史性的,描绘免疫系统各种淋巴细胞亚类的幻灯片开始其演讲而闻名。首先,他演示一张用苏木素-伊红(HE)染色的单个淋巴细胞图片。该幻灯片被命名为“这是一个辅助性T细胞”,紧接其后的是另外几张HE染色的图像,它们是细胞毒性T细胞,抑制T细胞及B细胞,所有的图片都是相同的,每个圆形的淋巴细胞有一个平的表面,一个黑蓝色的核及一个小的,由白色、规则的胞质构成的边。各种淋巴细胞仅能通过幻灯片上的标题区别。粗略透视淋巴细胞的意义在于:仅HE染色图片不足以预测众多复杂的细胞功能,及表达于细胞膜表面的,数百种独特的,可用于区别每个淋巴细胞亚类及分化状态的细胞膜表面蛋白、糖蛋白、糖脂。 449

起初,由于缺乏血清学工具去检测单个的细胞类型,实验免疫学家依赖解剖学及染色体标志去区别各亚型淋巴细胞(例如产生抗体的B细胞与胸腺源的T细胞)。开始研究细胞表面辅助分子的单一目的在于开发能够区别淋巴细胞亚类的血清学试剂。淋巴细胞特异性血清学的发展使免疫学领域彻底改变[1]。在建立细胞分化抗原概念的基础上,用这些抗血清来确定能够区别及分离不同类型淋巴细胞亚类。针对细胞表面蛋白的抗血清,例如抗Ly-1及抗Ly-2,是区别辅助性T细胞及细胞毒性T细胞的标志。起初多克隆抗Thy-1抗体用来分离纯化小鼠T细胞群,针对胸腺细胞的抗θ抗血清首次被用来确定人的T细胞[2]。随着单克隆抗体技术的发展,鉴定不同淋巴细胞亚型上表达的表面分子的试剂出现爆炸式发展。在1996年,第六届国际白细胞培养大会正式命名表达在静息及活化淋巴细胞上的160多种单个细胞表面分子[3]。编码所有这些细胞表面分子的基因已被克隆,血清学表位已被用大量的单克隆抗体确定。为了确定这些广泛排列的细胞表面分子,国际白细胞工作组启动了分化群抗原(CD)命名法。

① J. A. Bluestone, R. Khattri, and G. A. van Seventer: Ben May Institute for Cancer Research, University of Chicago, Chicago, Illinois 60637.

虽然鉴定 CD 分子对免疫表型分析及描述是关键性的,真正的挑战还在于确定单个淋巴细胞上这些细胞表面分子的功能。T 细胞受体复合物在一个 T 淋巴细胞表面蛋白分子中的比例不到 1%。因此,细胞分化分子在淋巴细胞功能中的作用的研究变得同样重要。起初,人们认为这些细胞表面结构将能促进及补充淋巴细胞上抗原受体的抗原识别及信号转导功能。但是随后的研究表明,辅助分子的功能是非常复杂的。

450

过去的十年中,分子生物学技术的迅速发展增强了我们研究辅助分子的能力。本章并非对表达于 T 细胞上的各种活化及分化状态下的上百种分子作肤浅的研究,而是将讨论总体的进展变化,同时集中选择介导主要 T 细胞功能及 T 细胞调节的几个细胞表面分子进行讨论。

概述:T 细胞上辅助分子的功能

机体遇到外源性抗原发生一系列事件,包括病原体加工、呈递及随后的效应细胞活化。外源性抗原(如病毒细菌)进入机体,外周组织中的抗原呈递细胞如朗格汉斯细胞及其他树突细胞捕捉抗原,通过淋巴细胞管迁移到二级淋巴组织,去呈递主要组织相容性复合体(MHC)结合的病原体源的肽。T 细胞持续地经血流循环,指导淋巴结内细胞对外源性物质的呈递,循环的 T 细胞黏附于专门的高内皮小静脉,此后,外渗转移到下面的二级淋巴组织。细胞表面糖脂(又称作选择素)及可溶性的因子(称作趋化因子),介导归巢功能,以最大限度地运输 T 细胞到附带外源性抗原的 APC 位点。

T 细胞进入二级淋巴组织,在那里它们扫描 APC 细胞在 MHC 分子沟槽内呈递的抗原性的肽。这一初始的扫描需要紧密的细胞-细胞接触,后者由表达在 T 细胞及 APC 细胞上的黏附分子结合提供。如果没有发生特异性的识别,T 细胞则脱离然后移动至另外一个 APC 上搜寻,并重复扫描过程。当抗原特异性识别的确发生,T 细胞通过 TCR/CD3 复合体接受特异性活化信号,结果进一步增强及延长 T 细胞及 APC 细胞间的黏附作用,因此,黏附分子无论在 T 细胞及 APC 细胞间的抗原依赖性及非依赖性结合中都是重要的,紧随着这起初的抗原捕获过程的是通过共刺激分子相互作用以提供重要的降低抗原依赖性信号的传导阈值,促进克隆扩增,维持相应细胞存活,及促使 T 细胞分化成效应细胞来介导炎症、细胞毒性及体液免疫应答反应。

特异性辅助分子控制免疫应答的每个阶段,包括归巢、TCR 相互作用、黏附、T 细胞的共刺激作用。这些分子的相互作用决定免疫反应的效率及效果,通过严格的免疫系统的框架及放大的效应完成 TCR 识别的特异性。

T 细胞共刺激

总体情况

在 20 世纪 50 年代末期,Burnet 发表了他里程碑式的描述克隆选择学说的文章[4]。他的假说建立在他发现每个个体产生的抗体不针对自身分子的基础上。克隆选择学说假设成熟的 B 细胞及 T 细胞在发育过程暴露于大量的自身抗原,随后去除自身反应性克隆,使个体产生自身耐受。对 T 细胞而言,自身耐受的启动是 T 细胞发育过程中,在胸腺中心的克隆缺失的结果(见第 11 章)。然而并非所有的抗原都在胸腺内表达或转移到胸腺内。因此,机体能通过一些外周的过程维持对独特表达在胸腺外的,在器官发育、细胞死亡,或病毒感染过程中诱导出现的组织特异性自身蛋白的耐受,来阻止在成年动物中产生潜在的自身反应性免疫应答。双信号活化模型,一个首先被 Bretscher 及 Cohn 在 20 世纪 70 年代介绍的 B 细胞活化的概念[5]解释了维持外周耐受的机制。该模式认为 B 细胞结合 APC 上两个独立的结构,两者在 B 细胞有效活化的过程中都是必需的,每一个相互作用通过 B 细胞受体(表面免疫球蛋白 Ig)识别抗原启动。这一信号活化事件仅引起克隆麻痹,除非第二个细胞表面分子即共刺激分子在这一过程中衔接。关于 B 细胞活化的分步研究导致产生了相似的,由 Kevin Lafferty 提出的 T 细胞分步活化假设的基础性研究。他注意到,像 B 细胞一样,T 细胞既需要抗原识别(信号 1)又需要 APC 上的其他分子信号(信号 2)以使其完全活化[6]。异体移植反应的 APC 细

胞是造血细胞源的细胞，如树突细胞、巨噬细胞及活化的 B 细胞；因此，Lafferty 认为这些细胞拥有完全活化 T 细胞必需的共刺激信号。Lafferty 及 Talmage 用异体甲状腺器官进行研究，体外培养几天后去除骨髓源的 APC 细胞，消除了移植物的共刺激能力，导致永久性的移植物耐受。

T 细胞共刺激的概念导致产生一个新的鉴定细胞表面能够为 T 细胞提供共刺激信号的辅助分子的研究领域，自 1991 年以来，该领域已有上千篇文章发表。截至目前，已证实有超过 20 种分子（包括整合素、CD2、HSA、CD44、CD40L、CD43、4-1BB、CD30、OX40 及 CD28）能够增强 T 细胞对抗原性刺激的增殖反应及促进 T 细胞活化（图 13.1）。然而，每个分子的作用机制是不同的，有些能单纯地增强黏附，有些则能传递重要的生化信号，从而与 TCR 复合物传递的信号相补充。本部分我们将集中讨论两个共刺激类别，第一是 CD28/B7 代表的途径，它们提供给静息初始 T 细胞及记忆 T 细胞主要的共刺激信号；第二类，由肿瘤坏死因子受体（TNF-R）家族成员 CD40L，CD30 及 4-1BB 介导，是诱导活化的共刺激受体，它们增强 T 细胞扩增，促进 T 细胞分化，介导 T、B 细胞间的相互合作。

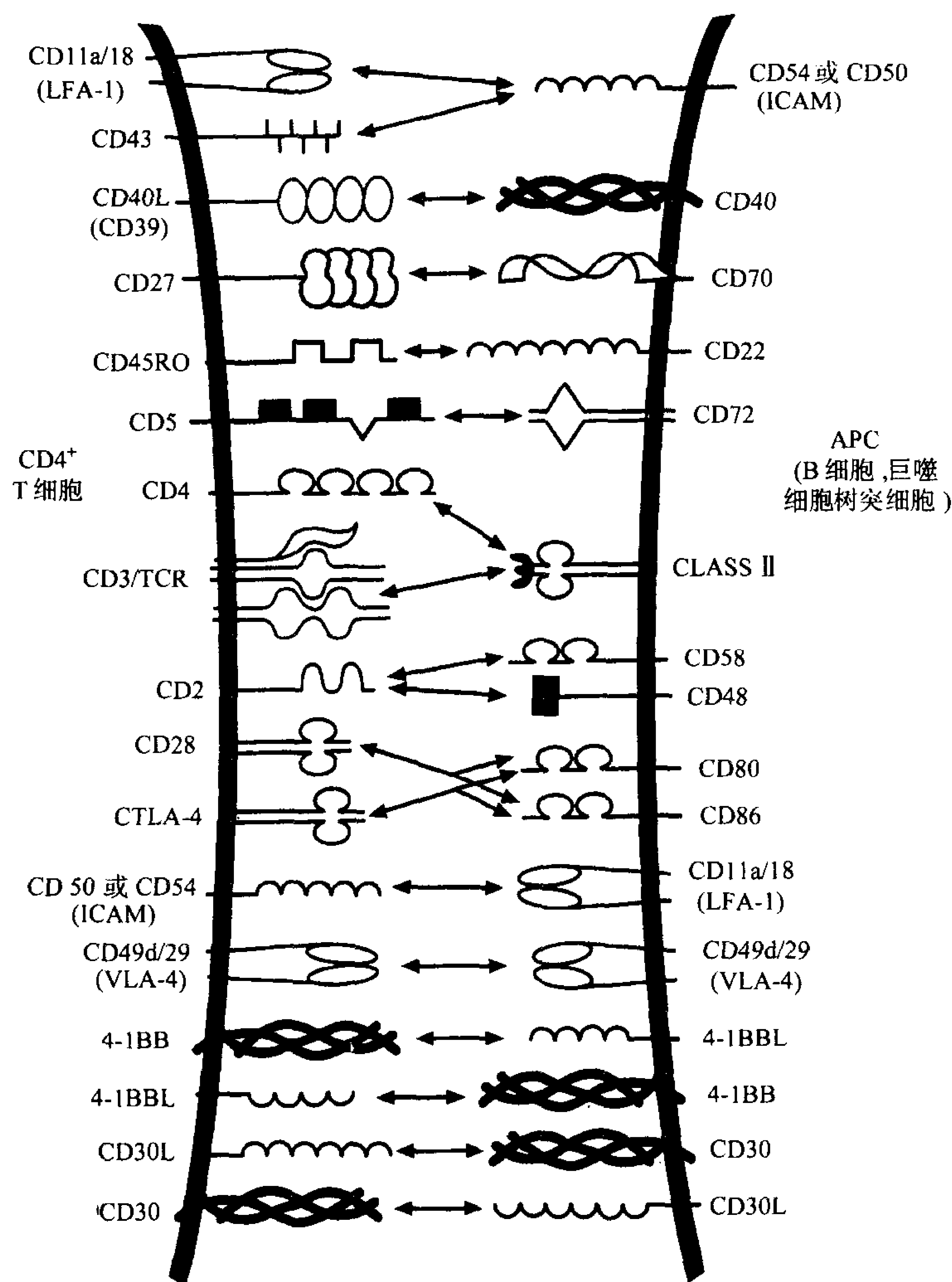


图 13.1　在 CD4⁺ 细胞和 APC 细胞间选择显示的辅助分子对。框架结构仅是代表性的并非单个分子的真实结构。

CD28、CTLA-4、CD80 及 CD86 的结构特征

451 过去的10年的研究发现,CD28/B7 途径在T细胞共刺激中的重要性越来越明显。在1987年,Jenins 及其同事表明 Th1 克隆在缺乏适当共刺激信号的情况下遇到抗原-MHC 复合物会变得功能性失活[7],经过重新刺激,这些无反应性T细胞也不能增殖及产生淋巴因子,最明显的是 IL-2。在初始活化阶段或加外源性 IL-2 或通过抗 CD28 的抗体或其配体 B7-1(CD80)及 B7-2(CD86)结合细胞表面的糖蛋白 CD28[8]可使无反应细胞发生逆转。事实上,将纯化的静息 $CD4^+$ T淋巴细胞暴露于 TCR 刺激因素,如固化的抗 CD3 单克隆抗体加 B7-1 或 B7-2 可以诱导 IL-2 的产生及T细胞增殖[9]。因此,CD28/B7 通路可以作为静息初始T细胞及记忆细胞上的主要的共刺激通路。

CD28

CD28 是一主要表达于T细胞及发育着的胸腺细胞上的细胞表面糖蛋白[8,10]。在正常情况下,50%的人 $CD8^+$ T细胞及所有 $CD4^+$ T细胞及所有小鼠T细胞表达 CD28。一部分血浆细胞及自然杀伤细胞(NK)表达 CD28,尽管这一糖蛋白在这些分化了的淋巴群体中的功能尚不清楚。CD28 分子的基因位于人2号染色体,q33 区[11],小鼠的位于1号染色体[12]。该基因结构上有4个外显子,外显子1编码信号肽序列,外显子2编码胞外 IgV 区样区域;外显子3和4分别编码跨膜区和胞质区。人类 CD28 表达为一个分子质量 44kDa 的Ⅰ型受体糖蛋白,包含134个氨基酸大小的细胞外区,27个氨基酸的疏水的跨膜区,41个氨基酸的胞质尾[13]。胞外区与 Ig 可变区(V)同源,有一个预测的片层夹心结构及三个互补决定区(CDR)环。这一 IgV 样区的后面
452 是一16氨基酸的伸展结构,包括一个卷入同源二聚体的半胱氨酸残基。但 CD28 也可在T细胞表面,尤其是鸡T细胞表面作为一个单体的糖蛋白而存在[14]。人、啮齿类、牛、鸟等 CD28 的氨基酸序列比较显示它们有显著的同源性(小鼠与人之间为68%)。CD28 在进化上的高度保守提示其在T细胞功能中的重要作用。在配体结合位点中有一个尤其高度同源的区域(在 CDR3 区一个六肽伸展结构 MYPPPY)。有趣的是,虽然牛 CD28 蛋氨酸被亮氨酸取代,它结合人 B7-2 的功能仍然存在,说明 MYPPPY 基序并非不可变[15]。

最后,值得注意的是,虽然 CD28 组成型地表达在大多数T细胞上,但其表达是动态的。T细胞活化后 CD28 的表达短暂升高,与其配体 B7 结合后则表达下调,CD28 表达的下调导致T细胞动员细胞内钙离子库能力下降,细胞内钙离子动员是一个效应T细胞信号中的关键成分[16]。

细胞毒性T淋巴细胞抗原-4

细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)是 CD28 的一个同源分子(30%同源性),该分子是在一个T细胞特异性活化的 cDNA 文库中发现的[17]。CTLA-4 表达在活化的 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T细胞上,表达水平比 CD28 低 10~100 倍,但比 CD28 结合 B7-1 及 B7-2 的解离常数高 20~50 倍[18~22]。CTLA4 的基因与 CD28 紧密连锁,且二者有相似的内含子/外显子结构,含一个细胞外 IgV 样区,一个跨膜区,一个胞质区[14,21,23]。CTLA-4 蛋白为一个Ⅰ型受体糖蛋白(33~45kDa),与 CD28 相似,有一个围绕 TYPPPY 的结合位点[8,20,24]。CTLA-4 在细胞表面既可以单体,也可以同源二聚体的形式表达,但不能与 CD28 聚合。二聚体的 CTLA-4 能够结合两个 B7-2 分子,具有通过交联后的分子及通过任一分子传导信号的潜能[25]。人、牛及小鼠 CTLA-4 分子胞质区的36氨基酸序列具有100%的保守性,但与 CD28 的胞质区仅有30%的同源性,提示一种重要的信号传导功能。

CD28 与 CTLA-4 还存在其他明显的不同。CD28 组成型地表达于大多数静息的人及小鼠T细胞上,但 CTLA-4 仅在T细胞活化后表达,48~72 小时达到高峰[18,20]。CTLA-4 蛋白的大部分仍在细胞内,它既表达在活化的 $CD4^+$ T细胞,又表达在活化的 $CD8^+$ T细胞[26,27]。胞质区引起快速吞饮作用的内在化基序(TTGUYVKMPPT)的作用是 CTLA-4 糖蛋白细胞内的定位[26]。CD28 分子的衔接是高表达 CTLA-4 所必需的。CD28 缺陷型T细胞活化后不能有效上调 CTLA-4 信使 RNA 水平,除非另加外源性 IL-2[27]、抗 CD28 单抗可加速人外周血淋巴细胞中 CTLA-4mRNA 的聚集,而 CTLA-4 上调的过程能被 CD28 的拮抗剂阻断[28]。因此,在

CD28 与 CTLA-4 表达与功能之间似乎存在协作关系。

B7-1(CD80)和 B7-2(CD86)

B 细胞活化分子 B7 或 BB-1(B7-1/CD80)[29]是第一个鉴定的 CD28 的配体,是基于转染 CD28 的 CHO 细胞结合一个淋巴母细胞系的实验。这一结合过程被 B 细胞活化标志 B7(CD80)反应的抗体所抑制。B7-1 的表达是非常广泛的,包括活化的 B 细胞、T 细胞、树突细胞、朗格汉斯细胞、活化的单核细胞、某些内皮细胞,及一些肿瘤细胞,人和小鼠的 B7-1 基因是 Ig 超家族的成员。外显子 1 编码信号肽;外显子 2、3 编码细胞外 IgV 样及 IgC(恒定区)样结构域;外显子 4 编码跨膜区;外显子 5 编码胞质尾[30]。B7-1 的基因在人和小鼠分别定位于 3 号和 16 号染色体[31,32]。在研究 B7-1 的过程中,几个研究小组注意到,某些可以结合可溶性或膜结合形式的 CD28 和 CTLA-4 的细胞并不与 B7-1 特异性单克隆抗体反应,[33,34]。这导致了第二个 B7 家族成员 B7-2(CD86)的鉴定和最终克隆[35]。尽管这两个基因仅拥有有限的序列同源性(大约 25%),但 B7-2 的总体结构与 B7-1 非常相似,尤其在胞质内尾部。Ig 样区和 CD28/CTLA-4 结合位点附近的序列同源性是最高的。B7-1 和 B7-2 与 CTLA-4 的亲和力比 CD28 高 20 ~ 50 倍。但 B7-2 与 CTLA-4Ig 解离的速度比 B7-1 快[22]。事实上,B7-1 与 B7-2 与 CTLA-4 相互作用的微细特异性是不同的,CTLA-4 中 MYPPPY 基序中一个氨基酸的突变完全消除了 B7-2 的结合,而保留了 B7-1 的反应性[36]。

B7-1、B7-2 分子不仅与受体的相互作用不同,而且它们的表达调节也存在明显的差异,两种分子均出现在活化的 APC 上,但当 B 细胞活化后 B7-2 水平增长的速度要比 B7-1 快得多。B7-2 表达上调在刺激后 6 小时内产生,18 ~ 24 小时到达最大表达量[37],作为对照,B7-1 表达的上升只到刺激后 24 小时才检测到,直到 48 ~ 72 小时后才到达最大水平。而且,定量分析表明活化的 B 细胞和树突细胞表达 B7-2 的水平比 B7-1 更高[38],而且 B7-2 是人树突细胞上 CD28 的主要功能性配体[39]。值得注意的是,B7-1 和 B7-2 均表达在啮齿类和人的 T 细胞上。B7-2 组成型表达在静息 T 细胞上,尤其是记忆 T 细胞,但当 T 细胞活化后表达下降,而 B7-1 不出现在静息 T 细胞上,而在 T 细胞接受信号后被诱导表达[40],这些分子在 T 细胞上的功能尚不清楚。然而 B7-1 在 T 细胞活化后显示被磷酸化;B7-2 在人 T 细胞上被选择性地糖基化,导致选择性结合 CTLA-4;而且阻断 B7 分子可增加 T 细胞的增殖及细胞因子产生。

细胞表面分子可调节 B7-1 和 B7-2 的表达,MHC Ⅱ类分子及 CD40 交联能上调 B7-1 和 B7-2 表达,用抗 Ig 抗体或抗原交联表面 Ig 能在 B 细胞表面快速诱导 B7-2 表达,使一个静息的 B 细胞转换成一个全能的 APC 细胞[37],但不能诱导可检测到水平的 B7-1[41]。细胞因子如 IL-4 及 γ 干扰素(IFN-γ)能快速增强 B7-2 的表达而对 B7-1 表达没有或仅有微弱的效应。其他信号下调 B7-1 及 B7-2 的表达。在已被 IFN-γ 或粒巨细胞集落刺激因子(GM-CSF)活化的单核细胞上结合 Fc 受体,可降低 B7-1 及 B7-2 的表达[42,43]。IL-10 阻止腹腔巨噬细胞上 B7-1 和 B7-2 的上调,但在人树突细胞下调 B7-2 不是 B7-1 的表达,提示 IL-10 的免疫抑制特征可能部分缘于它调节 CD28/CTLA-4 结合的结果[44]。不同细胞表面分子和细胞因子定性、定量调节 B7-1、B7-2 表达水平和表达时间的能力可能在免疫应答过程中产生不同的效应。

453

CD28 和 CTLA-4 通路在 T 细胞发育中的作用

早期的研究表明,CD28 在不成熟 $CD4^+$ $CD8^+$ T 细胞和成熟 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 胸腺细胞上呈高表达,这些胸腺细胞上高表达 CD28 提示 CD28/B7 的相互作用对 T 细胞的发育可能是关键性的。研究表明抗 CD28 的抗体能阻止非成熟胸腺细胞的凋亡,提示 CD28 在胸腺发育中的作用[45]。虽然研究显示单克隆抗体交联 CD28 可以通过增加 $CD4^+$ $CD8^+$ 非成熟胸腺细胞的凋亡来抑制 T 细胞发育[46],但 CD28 拮抗剂对一个Ⅱ类特异性 TCR 转基因鼠小的自身反应性细胞的阴性选择,或对内源性超抗原反应性 T 细胞缺失并无影响[47]。与这些观察结果一致的是,TcR 转基因 T 细胞,包括表达Ⅰ类和Ⅱ类限制的 TCRγδ 或 TCRαβ 的转基因 T 细胞,正常的 T 细胞的阴性或阳性选择在野生型和 $CD28^{-/-}$ 小鼠中并无区别。然而在用混合 $CD28^+$ 和 $CD28^{-/-}$ 骨髓重建的小鼠中 $CD28^+$ T 细胞的确具有选择性的生存优势[48]。因此虽然 CD28 和 CTLA-4 对发育并不重要,但在胸腺

细胞分化中可能发挥细微的作用。CTLA-4 在胸腺选择中的作用仍存在争议。起初用 CTLA-4 敲除小鼠进行的研究提示 CTLA-4 在胸腺选择中有潜在作用。在 2～3 周动物的胸腺中，CD4⁺ 和 CD8⁺ 成熟胸腺细胞的数目有一个急剧的增长[49]。但是最近 Allison 及其同事的研究提示这些细胞是缘于非控制性的淋巴增殖，及外周副胸腺淋巴结增大所致[50]。

CD28 和 CTLA-4 的功能

在结合 TCR 情况下衔接 CD28 对 T 细胞功能有多种影响后果。早期的研究表明：CD28 介导的 T 细胞共刺激能调节 CD4⁺ 及 CD8⁺ 淋巴细胞细胞因子的产生和增殖。CD28 衔接使 IL-2 的产生提高 100 倍，相比而言衔接小鼠 T 细胞的 CD28 仅在活化后产生少于十分之一量的 IL-2[51,52]。另外，其他细胞因子的分泌如 IL-4、IL-5、IL-13、IFN-γ、INF-α 和 GM-CSF 也在 CD28 衔接后出现上升[8,53]。CD28 介导的细胞因子产量的上升反映了其基因转录和 mRNA 稳定性的上升[54,55]，CD28 共刺激促进 IL-2 受体 α、β 和 γ 链的表达[56]和上调 IL-4 的反应性[57]。CD28 介导细胞因子调节的一个主要证据是观察到在 CD28 拮抗剂存在的情况下，Th1T 细胞克隆增殖抑制、IL-2 的产生阻断，致使细胞无反应性[8]。CD28 介导的共刺激或外源性 IL-2 能够逆转这些 T 细胞的无反应性，提示 CD28 在 T 细胞活化的主要作用是调节细胞因子的功能、水平。

CD28 依赖性的无反应性逆转仅限制于 Th1 T 细胞克隆。在没有 CD28 共刺激存在的情况下，静息的初始或记忆 T 细胞或该情况下的 Th2 克隆，在 TCR 介导活化后并不能变成无反应状态。然而这些细胞亚群的应答功能受到抑制，提示存在其他重要的，CD28 介导的 T 细胞效应[58]。用 CD28 敲除小鼠进行的研究，及在原代 T 细胞培养中使用 CTLA-4Ig 提供的资料暗示：结合 CD28 除了无反应性诱导外还可以调节多种 T 细胞功能。首先，资料表明 CD28 介导的共刺激反应能够调节静息 T 细胞反应的阈值，在提供有效 CD28 信号的情况下 T 细胞活化所需的 TCR 结合阈值明显地下降[59]。CD28 的信号传导也与 TCR 的衔接协同来增强淋巴细胞的存活[60]。CD28 共刺激诱导一种重要的与 T 细胞长期存活相关的细胞内因子 bcl-xL（见第 23 章）。加入细胞因子并不能模拟 CD28 的这种功能。第二，CD28 在 Th1/Th2 亚群分化中具有基础性作用。在缺乏 CD28 信号的情况下，TCR 特异性刺激诱导的 T 细胞活化偏向于 Th1 类型。CD28 敲除 T 细胞或用 CTLA-4Ig 阻断 CD28/B7 相互作用后产生 IFN-γ 而不是 IL-4[53,61]。相反，增强 CD28 的共刺激作用促进 IL-4 和 IL-5 的产生[61]。最后，CD28 可能对 CD8⁺ T 细胞分化到细胞毒性效应细胞的过程起重要作用。在人和鼠系统中，用 B7-1 转染系统刺激纯化的 CD8⁺ T 细胞促进了细胞毒性 T 细胞的发育[62]。事实上加上有力的共刺激可以排除 CD4⁺ T 细胞辅助作用，因为共刺激条件下活化的 CD8⁺ T 细胞的 IL-2 分泌能力增强。综上所述，这些资料提示 CD28/B7 相互作用在免疫应答过程中有多种作用，包括在某些条件下，免疫应答偏离导致耐受，改变 Th1/Th2 的平衡，调节细胞毒性效应细胞功能。

已明确 CD28 是一个共刺激分子，而 CTLA-4 的功能仍存在争议。一些 CTLA-4 在体外增殖应答中的作用研究提示，CTLA-4 像 CD28 一样，在活化的 T 细胞上起共刺激作用[63,64]。然而，其他在小鼠和人体中进行的其他功能研究表明，CTLA-4 能对活化的 T 细胞传递下调信号，体外阻断 CTLA-4/B7 的相互作有增强了的 T 细胞增殖和细胞因子的产生[28,65]，而且用单克隆抗体交联 CTLA-4 导致关键性的细胞周期进展因子受阻和 IL-2 受体表达的抑制[66]。更为重要的是，CTLA-4 敲除小鼠显示了深度的自发性自身免疫性疾病。在 2～3 周龄，CTLA-4 敲除小鼠显示重度淋巴增生混乱，发展成明显的自身免疫性心肌炎和胰腺炎并无一例外地在 4～5 周内死去[49]。最后，有意义的是注意到 CTLA-4 与人自身免疫性甲状腺病和胰岛素依赖性糖尿病的易感性遗传基因座之一相连锁[67]。

454

CD28 和 CTLA-4 作用的生化基础

CD28 介导 T 细胞共刺激的特性是：CD28 的信号是 TCR 非依赖性的，处于早期活化事件的下游。支持这一观点的是，CD28 传递给 T 细胞的信号能被时空性地与 TCR 信号分开。多数情况下 CD28 衔接后的生化事件与 TCR 交联结果相似[57]。在 CD28 结合后磷脂酰肌醇-3 激酶（PI-3K）与 CD28 胞质区连接[67]。相似的是，

CD28 与 GRB-2-SOS 复合物结合募集 LAT(P36),通过 Ras 途径启动 T 细胞活化下游信号[57,68]。最后,CD28 交联增强,TCR 介导信号激发的各种生化事件,包括 PLC-r,p56lck,及 Raf-1 激酶的活化,以及 Ca^{2+} 内流和磷酸肌醇的产生。

在这些生化途径中,c-Jun 的活化似乎仅受 CD28 的调节,c-Jun 是一种重要调节 IL-2 基因的重要的转录因子。c-Jun 磷酸化需要经 TCR 连接和 CD28 介导 Jun 特异性激酶 JNK1、JNK2 活化传递的 Ca^{2+} 信号[69]。CD28 与 B7-1 或 B7-2 的相互作用能激活 JNK[70],这与 CD28 共刺激增强 AP-1 介导的转录一致。有意义的是,阻断 ras/JNK 信号途径导致 T 细胞对抗原刺激失去反应,T 细胞活化 Ras 途径能力的丧失与不能激活丝裂原蛋白激酶 ERk-1、ERk-2 相关[71,72]。阻断 CD28/B7 也使得 AP-1 转录因子复合体不能活化。这为 T 细胞进入无反应性状态后不能启动 IL-2 基因转录提供了合理的解释。CD28 共刺激的另一个靶分子是 NF-κB。CD28 介导共刺激后,NF-κB 的抑制因子 IκB 被降解,使得 NF-κB 作用于 T 细胞活化的早期基因如 IL-2[73]。最后,itk,一个 Src 相关的酪氨酸激酶,在 CD28 衔接后数分钟内磷酸化并与 CD28 相连[74]。在 itk 敲除小鼠中,抗 CD28 诱导的 T 细胞增殖增强,与 itk 在调节 CD28 功能中的重要作用一致(Dan littman,私人通讯)。总之,生化研究提示 CD28/B7 和 TCR 信号途径既有独立性又有交互联系。

CTLA-4 调节免疫应答的生化基础还未完全鉴定。小鼠、牛、大鼠及人的 CTLA-4 胞质区序列几乎存在 100%的保守性。这种高度的同源性加之几个潜在磷酸化位点的出现,及与某些信号分子的联系提示 CTLA-4 信号在 TCR 及 CD28 信号通路中的重要调节作用。CTLA-4 分子分布于 TCR 活化帽区,为 CTLA-4 作用于邻近的 TCR 信号通路提供了机会[75]。而且从 CTLA-4 敲除小鼠分离出的 T 细胞显示出增强的 p56lck 和 p59fyn 酪氨酸激酶活性以及 TCR 信号分子如 shc 和 ZAP-70 的高度磷酸化[76]。

最近推测出 CTLA-4 参与 TCR 复合体和 CD28 信号事件的机制。CTLA-4 与磷酸酪氨酸磷酸酯酶 SHP-2 相互作用[76]。磷酸酯酶通过 SH2-磷酸酪氨酸与 CTLA-4 连接,结合点位于 CTLA-4YVKM 氨基酸顺序,这一顺序也是 PZA-3 激酶作用位点。而且,这一磷酯酶能够使 TCR-CD28 活化复合体相关的磷酸蛋白脱磷酸。在 CTLA-4 的胞质尾部存在第二个基于酪氨酸的基序(YFIP),这可能是 TCR 信号传导过程中其他磷酸酪氨酸结合蛋白的结合位点。基于这些资料可以推测,在某些情况下,CTLA-4 可能通过转位于 TCR-CD28 活化复合体为活化的 T 细胞传递负性信号,在那里它或者是由于脱离与 SHP-2 的联系使 T 细胞活化事件中重要的信号成分脱磷酸,或者竞争作为信号传导重要下游底物的关键信号分子,例如 PI-3 激酶或其他磷酸酪氨酸结合蛋白。最后与 CD28 相比 CTLA-4 与 B7-1 和 B7-2 有更高的亲合力,而且它也可以与 CD28 竞争配体,终止 CD28 信号。由此,CTLA-4 可能通过与 CD28 竞争共刺激配体影响 TCR-CD28 介导的传导[66]。

B7-1 和 B7-2 在 CD28 和 CTLA-4 功能中的作用

用转基因技术进行的体外研究证明,B7-1 和 B7-2 与 CD28 相互作用可促进抗原或丝裂原导致的 T 细胞增殖和 IL-2 的产生[77]。体内不同组织包括肿瘤和胰腺细胞上 B7-1 或 B7-2 的高表达导致了更有力的共刺激和随后的免疫增强。将 B7 转入建立起来的肿瘤中诱导出了活跃的免疫应答,结果是肿瘤消退和长期的肿瘤特异性免疫[78],这些结果提示,在细胞上表达 B7-1 或 B7-2 分子能提供足够的共刺激信号来启动有力的免疫应答。

鉴定正常 APC 细胞上 B7-1 共刺激的作用是非常困难的。抗 B7-1 单抗对初始混合淋巴细胞反应有很小的影响,在体内,体外,B7-1 缺陷小鼠能对外来抗原正常应答[58,79]。相反,阻断 B7-2 的衔接则深度影响 CD28 介导的 T 细胞共刺激,抗 B7-2 单抗可阻断同种移植排斥反应、自身免疫性疾病的发展、抗病毒应答的启动及对可溶性抗原的抗体应答[79]。总结起来,这些结果提示 B7-2 而不是 B7-1 是启动 T 细胞应答和为 B 细胞提供同源辅助的首要的共刺激分子。B7-2 在这种情况下的主导作用可能缘于 B7-2 具有共刺激初始 T 细胞群的独特能力。然而,这又似乎不太可能,因为如前所述,B7-1 和 B7-2 转染细胞对初始 T 细胞的共刺激效果一致。此外可能是 B7-2 在 APC 上表达的时空性的不同导致了它的优势作用。与 B7-1 不同,B7-2 组 成型表达于一些树突细胞和 B 细胞上,在炎症反应过程中某一 APC 亚群上的表达被快速上调[38]。

然而在特定情况下 B7-1 也能在体内提供重要的共刺激作用。在一实验性自身免疫大脑炎模型中，在临床缓解期阻断 B7-1 能够缓解中枢神经系统的病理反应和临床复发。抗 B7-1 的单克隆抗体对外源表位特异性的 T 细胞没有影响，但能阻止 T 细胞到对各不同自身抗原的损伤。在起初临床发作过程中这种由 B7-1 单克隆抗体介导的所谓表位扩散阻断[80]与 B7-1 而不是 B7-2 在造血细胞上的选择性上调有关。这与最近的研究一致，最近用 B7-1/B7-2 双敲除小鼠和抗 B7 抗体治疗，发现阻断两种共刺激配体完全阻断了初次 T 细胞应答[58]，与众多在人体的研究一致。后者发现慢性炎症反应中 B7-1 的表达上调。因此，B7-2 似乎在炎症和体液反应的起初，而 B7-1 在一些慢性炎症反应中起主导作用。B7-1 和 B7-2 可能由于分子的内在不同存在不同的功能。在特定的环境下，B7-1 似乎选择性地参与炎症应答，而 B7-2 优先促进体液应答[81]。例如尽管针对 B7-1 的单克隆抗体阻止了 Th1 介导的小鼠 EAE 的进展，抗 B7-2 单克隆抗体治疗却是使病情恶化。用表达 B7-1 的细胞刺激 T 细胞导致 Th1 而非 Th2 T 细胞的扩增，这些结果可能是由于 CD28 结合 B7-1 和 B7-2 有不同的结合区和不同的动力学，导致不同信号引起 T 细胞活化的偏向和随后 Th1/Th2 的分化。仍需进一步的研究来确定在正常或疾病条件下 B7-1、B7-2 在免疫应答调节中的确切作用。在 CTLA-4 的调节下，有趣的是在免疫应答的晚期阶段与各种 APC 和 T 细胞上 B7-1 的表达上调相一致。这些结果提示 CTLA-4 信号和 B7-1 在免疫应答晚期阶段衔接增强之间存在潜在的联系，而且这可以解释抗 B7-1 治疗反而促进一些自身免疫性疾病恶化的现象[37,80]。

其他共刺激途径

一些证据提示其他的共刺激分子可能替代或补充 CD28/B7 的相互作用，阻断 CD28 介导的信号并不能完全抑制初次 T 细胞应答。从 CD28 缺陷小鼠分离的 T 细胞对同种抗原、一般抗原、抗 CD3 单克隆抗体应答的结果表现为增殖。事实上 CD28 缺陷动物能够清除病毒感染和排除外源性组织移植物[82]。在一些免疫应答的过程中显示 CD28 分子传递共刺激信号的能力减弱。这些结果提示其他分子提供了重要信号来活化 T 细胞。在过去的几年中能够提供共刺激信号活化 T 细胞的膜表面分子的数量在增加。描述所有的这些分子是本章力所不能及的；有一些综述可提供参考[58,.83,84]。本部分的重点将讨论一类辅助蛋白，TNF-受体及 TNF 家族（图 13.2）。已表明 TNF 受体家族成员、CD30、CD40、4-1BB、CD27、Fas 和 OX40，以及 TNF 家族成员 TNF-α、TNF-β、CD30L、CD40L、4-1BBL 和 FasL 是 T 细胞应答重要的调节成分。许多 TNF 受体超家族成员能够调节细胞的生长和死亡。例如，Fas 和 TNF 受体配基结合到活化 T 细胞上能导致典型的 caspase 活化，引起凋亡。然而在特定的情况下，这些相同的细胞表面分子活化却促进细胞存活及增殖。这些分子活性的不同与它们胞质内区复杂的结构有关，后者既包括死亡效应区，又包括结合 TNF 受体相关因子（TRAF）促进 NF-κB 活化的氨基酸基序（第 23 章）。TNF 受体超家族的其他成员，例如 CD40，CD30 和 4-1BB 缺少导致死亡效应途径的细胞内区，因此，在 T 和 B 细胞选择性促进它们的共刺激途径，导致增强的细胞存活，促进细胞周期和调节 Th1/Th2 发育[83,84]，因此，这些辅助分子代表一类新的共刺激因子，它们在调节、活化淋巴细胞功能中起重要作用。

CD40L-CD40 相互作用首先参与了产生初次和再次抗体应答的过程，和 B 细胞记忆。激活 B 淋巴细胞 CD40 信号可增强同型 B 细胞聚集，B 细胞增殖，Ig 分泌以及 Ig 类别转换。而且在 $CD4^+$ T 细胞和单核细胞相互作用过程中 CD40L 和 CD40 的结合可以促进单核细胞产生 iNOS、IL-1、IL-6 和 GM-CSF；$CD4^+$ T 细胞和巨噬细胞、树突细胞相互作用诱导 IL-2 产生和增强对细胞内病原体的杀伤，$CD4^+$ T 细胞与内皮细胞相互作用促进黏附分子的表达和淋巴细胞的外渗[83]。

CD40 是一个 40 到 45kDa 的完整的膜蛋白，主要表达于不成熟和成熟 B 细胞、滤泡树突细胞、骨髓源的树突细胞、胸腺上皮、内皮细胞和活化的巨噬细胞。已有 CD40 表达在 T 细胞上的报道，然而它在这些细胞上的功能尚不清楚。CD40 糖蛋白的细胞外区包含四个同源重复半胱氨酸富含区（每个同源重复含 45 个氨基酸），后者是 TNF 受体家族的特征性基序。最近力图阐明 CD40 介导 B 细胞信号通路的生化基础，结果鉴定出 TRAF 蛋白家族成员与 CD40 胞质尾有联系。交联 CD40 使细胞内 TRAF 家族第二信使（尤其 TRAF-2 和

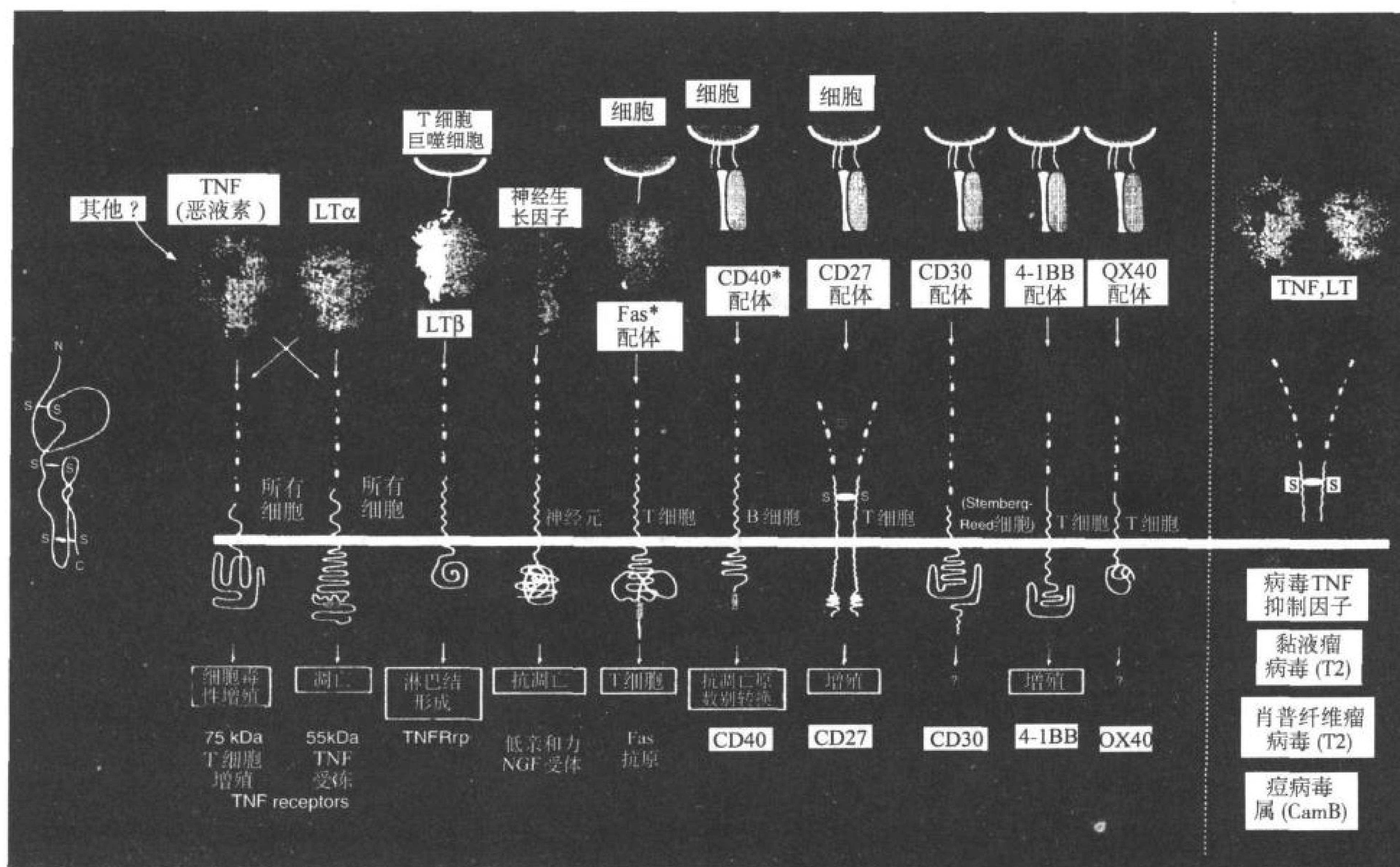


图 13.2 TNF 和 TNF 受体家族成员结构描绘图。在一些情况下结晶成像结构，分子质量和功能作用如图示，* 代表引起疾病的天然突变蛋白。

TRAF-3)成员多聚化，通过 NF-κB 家族及 AP-1 和 NF-AT 复合物诱导基因转录[85]。TRAF 家族成员和 CD40 胞质尾部的联系调节蛋白酪氨酸激酶和酪氨酸磷酸酯酶活性，从而影响细胞周期及 cdk 基因活性[86]，上调存活因子 bcl-2 和 bcl-xl 表达，防止 B 细胞凋亡。

CD40 的配体，[CD40L，又称糖蛋白[gp]39)，表达于活化的 $CD4^+$ 和一些 $CD8^+$ T 细胞、单核细胞、NK 细胞、人类肥大细胞和嗜碱性粒细胞上[83]。它是一个完整的Ⅱ型膜蛋白，序列上与 TNF 有同源性，预测的三级结构与 TNF 三聚体相似。因此经结合后它具有使 CD40 聚集的能力。在 $CD4^+$ T 细胞及一亚型 $CD8^+$ T 细胞活化后 4～6 小时内 CD40 配体被迅速诱导，24 小时后表达达到高峰，随后下降。体内静脉注射抗原导致一些变慢的 CD40L 表达动力学，在给予 T 细胞依赖性抗原后 3～4 天出现最大的 $CD40L^+$ 细胞频率。$CD40L^+$ T 细胞定位于淋巴滤泡的外套和中心细胞区和脾的小动脉周围区，与 $CD40^+$ B 细胞非常接近，起初的研究表明 CD40 配体通过与 CD40 的相互作用在 B 细胞信号中起重要作用。而且在人 $CD4^+$ 细胞上交联 CD40L 能够产生一个共刺激信号，近而上调 IL-4[87] 和细胞间黏附分子(ICAM-1)的表达。功能研究表明，用抗 CD40L 的单克隆抗体体内治疗可阻断抗体应答并可阻止几种不同动物模型中的自身免疫反应[83]。

457

CD40L-CD40 功能最重要的方面是它与 CD28 共刺激通路的内部关系。CD28/B7 依赖性的 CD40L 上调之后，CD40L-CD40 相互作用信号使 APC 细胞上调 B7-1 和 B7-2 表达，反过来增强 B 细胞、巨噬细胞和树突细胞的共刺激活性。因此 CD28/B7 和 CD40-CD40L 相互协同可启动和扩大 T 细胞依赖性免疫应答[89,90]。这在 CD40L 敲除小鼠中最为明显，该小鼠表现为 Th1 型免疫缺陷，包括抗病毒免疫缺陷和减弱的记忆性 $CD8^+$ T 细胞应答[90]。这些动物已表明有同种抗原应答缺陷，而这可在 B7-1 上调后得以恢复。事实上，在一自身免疫性模型中，Th1 缺陷能够通过在 CD40L 缺陷动物中注射表达 B7-1 的 B 细胞而得到逆转。因此，CD28/B7 和 CD40L-CD40 共刺激途径是内部相关和相互协同的。CD40 和 CD28 拮抗剂的协同在阻止小鼠模型的自身

免疫病、器官移植排斥、变应性接触性皮炎及抗体产生方面的，作用表现的尤为明显[83,91]（图 13.3）。

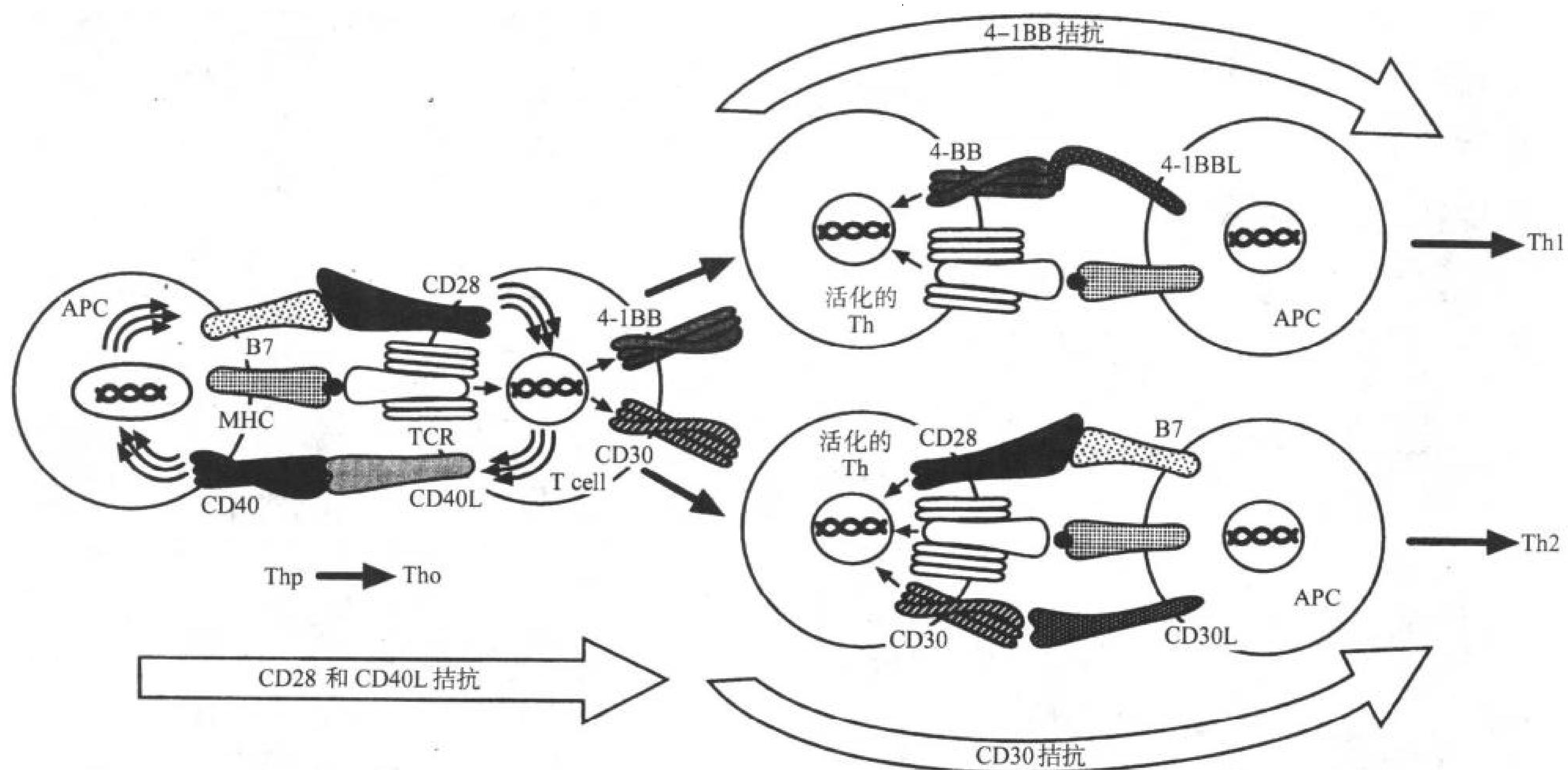


图 13.3　描绘在 T 细胞活化和分化过程中共刺激分子内部关系模型图。CD28/B7 和 CD40L-CD40 相互协同调节早期活化，分化事件，而 TNF-受体家族成员调节其后的步骤。

CD30-CD30L 和 4-1BB-4-1BBL 是可诱导的，能够调节细胞增殖和促进 T 细胞分化的共刺激分子[84]。CD30 首先被鉴定为一个霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤亚类，包括伯基特淋巴瘤病人中的里-施（Reed-Sternberg）细胞和 EB 病毒转化的 B 细胞上的血清学标志[92]。CD30 与淋巴组织恶性变的联系使其成为淋巴系统恶变细胞的一个有用的标记。然而，随后意识到 CD30 在活化的正常细胞上的表达提示其在免疫功能上有重要的作用。人和小鼠的 CD30 基因已被克隆，并证明是 TNF-受体家族成员。该基因编码一个高度糖基化的 120kDa 表面抗原。CD30 表达于多种活化的细胞上，包括 T 细胞、B 细胞和 APC 细胞，并受细胞因子如 IL-4 调节[93]。通过细胞表面 CD30 受体的信号能增强 EBV-永生化淋巴母细胞系 Ig 的分泌和活化 T 细胞的增殖。但是，在某些肿瘤细胞 CD30 能诱导调亡（见第 23 章）。尽管 CD30 被高度的糖基化并与其他家族成员离散，但它像本家族的其他成员一样，胞外区有富含半胱氨酸的基序。CD30 内部区域长 188 个氨基酸，含有潜在的丝/苏氨酸激酶和酪氨酸激酶磷酸化位点。几个研究小组的资料表明，CD30 的胞内区像 CD40 和其他家族成员一样，能够结合一些 TRAF 蛋白（TRAF-1、TRAF-2 和 TRAF-3），在 CD30 交联后可介导细胞内钙的释放及使 NF-κB 失活。CD30 衔接后可以增强病毒的复制和转录，这尤其与人免疫缺陷病毒（HIV）相关[94,95]。

4-1BB 既可以 30kDa 单体也可以 55kDa 同源二聚体的形成表达于活化的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞。细胞受刺激后 6 天达到表达高峰，加入细胞因子 IL-2 和 IL-4 后表达增强，并且主要限于 $CD45RO^+$ T 细胞。在亚适剂量 TCR 信号下，交联 4-1BB 能促进 T 细胞增殖及 IL-2 产生。4-1BB 胞质内的尾部包含一个已表明为 $p56^{lck}$ 结合位点的半胱氨酸-精氨酸-半胱氨酸序列。在特定的情况下，4-1BB 共刺激信号能启动 T 细胞以 CD28 非依赖性的方式增殖。激活 4-1BB 能够诱导 CD28 缺陷小鼠来源的 T 细胞增殖，联合应用 CD28 和 4-1BB 拮抗剂能最有效地阻断混合淋巴细胞反应。

CD30L 和 4-1BBL 是Ⅱ型膜蛋白，其 C 端（受体结合部分）与 TNF 细胞因子家族其他成员同源。CD30L 或 4-1BBL 或这两种糖蛋白表达在各种不同的活化的细胞上，包括 T 细胞、B 细胞、髓样细胞、巨噬细胞和树突细胞，CD30L 较家族其他成员有更高程度的糖基化，或许反映了 CD30 分子结构的离散性。在肿瘤系 T 细胞上结合 CD30L 诱导快速的 ERK 酪氨酸磷酸化和 ERK 底物髓基质蛋白磷酸化。CD30L 和 4-1BBL 均能在 TCR

交联的情况下诱导T细胞增殖,CD30L能诱导CD30⁺肿瘤细胞凋亡。交联CD30L分子引发增加的细胞因子IL-8的产生,诱导氧化爆发和增强IL-6的产生[95,96]。

CD30参与了T细胞发育,因为破坏CD30基因导致胸腺的细胞过多并在一定条件下影响阴性选择[97]。然而,CD30-CD30L和4-1BB-4-1BBL相互作用最有意义的方面是它们与Th1-Th2分化的明显联系[98]。虽然发现CD30对Th1和Th2表型细胞活化都具有共刺激特性,CD30优先表达于产生IL-4,IL-5 Th2型细胞因子的$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞克隆[98]。而且CD30的表达与IFN-γ的表达存在负相关关系。CD30介导的共刺激选择性地活化产生IL-4的T细胞。相反4-1BB在具有Th1表型的T细胞上高表达。4-1BB介导的T细胞活化与Th1分化一致尤其表现在联合CD28共刺激的情况下[97]。因此,4-1BB和CD30可能选择性地表达于不同的T细胞亚群,由这些可诱导的共刺激分子介导的共刺激效应可能分别指导T细胞分化成Th1和Th2型的T细胞(图12.3)。

共刺激通路的体内功能

CD28/B7相互作用在体内的重要性首先在同种和异种移植模型中得以阐明,发现CTLA-4Ig治疗导致长时间的移植物存活,而且可在多种情况下诱导供体特异性的耐受[37]。同时发现CTLA-4Ig治疗使发病率、死亡率的减少与同种移植物抗宿主病(GVHD)相关,并且阻止了一系列的自身免疫性疾病[37]。然而CTLA-4Ig的治疗效果取决于不同株的联合情况、种类及制剂剂量。最近尝试联合应用其他免疫抑制剂增强CTLA-4Ig治疗效果的努力取得了成功。例如,CTLA-4Ig联合供体特异性的外周血或骨髓输注可以导致供体特异性的耐受,而仅用CTLA-4Ig只能暂时延长移植物存活。在预防GVHD导致的死亡中,阻断CD28/B7和LFA-1-ICAM-1相互作用比仅用CTLA-4Ig更有效[99]。用CTLA-4Ig和亚适量的环孢菌素A比仅用CTLA-Ig能延长移植物存活时间[100]。联合CTLA-4Ig和CD40L抗体治疗对小鼠皮肤移植存活有不确定的结果[101]。CTLA-4Ig促进移植物接受的机制尚存在争议。除对细胞存活和无反应性诱导的效应外,一些研究还表明长期的移植物接受与免疫应答向Th2表型倾斜相关[100]。但尚不确定这种效应是否是CTLA-4Ig治疗的直接结果或间接地与移植物在动物体内长期的存在有关。

CTLA-4Ig治疗也深度地抑制体液免疫反应。对可溶性抗原如KLH或细胞结合抗原如绵羊红细胞的初次免疫应答能被CTLA-4Ig治疗完全阻断,而且也降低第二次或第三次对抗原的应答。由于CD28阻断可抑制体细胞的过度突变,在这种情况下产生的少量抗体与免疫原有较低的亲和力[102,103]。这些结果与CD28在调节Th2发育中的重要作用一致,也与在CD28敲除和CTLA-4Ig转基因小鼠发现的生发中心形成的深度下降吻合[51,58,61]。在这些动物中,Ig的基础水平仅是正常小鼠的20%、IgG1和IgG2b的水平急剧降低,而Th1类IgG2a型抗体的水平较正常小鼠升高。在CD28敲除小鼠中,T细胞依赖的抗体的产生是缺陷的。正常水平的抗VSV IgM型抗体(T非依赖性应答)在对初次刺激应答后产生,而在这些小鼠中没有T依赖性的IgG抗体产生。因此,阻断CD28/B7相互作用导致体内T细胞依赖性B细胞应答的重度缺陷。

最后,尽管治疗的时间和过程非常关键,阻断CD28可影响一些小鼠自身免疫性疾病模型的临床过程,包括Th1型的应答(非肥胖性糖尿病和EAE)或Th2型应答(肾小球肾炎或小鼠狼疮)[37]。在小鼠系统性红斑狼疮模型中,NZB/NZW F_1小鼠(B/W)自发性地发展成狼疮样自身免疫性疾病,特征是产生针对自身分子,如双链DNA的自身抗体。在检测出自身抗体前用小鼠CTLA-4Ig治疗这些小鼠能显著地抑制自身抗体的产生和疾病的进展,甚至在中断治疗之后仍有效。在一个EAE复发的模型中,在抗原呈递过程中给予CTLA-4Ig治疗阻止了疾病的临床进展。相同地,在出生后相对晚些时候用CTLA-4Ig治疗NOD小鼠阻止了糖尿病的发生。然而在EAE及NOD小鼠,早期的治疗实际上使疾病恶化[37,80]。这不仅强调了T细胞共刺激对自身免疫性疾病的复杂调节,同时显示了其在临床应用方面的潜力。

CD40L-CD40信号在体内有多种效果。CD40-CD40L相互作用对Th依赖性的抗体应答非常关键,因为在小鼠注射CD40拮抗剂如CD40Ig或抗CD40单克隆抗体促进B细胞在生发中心的凋亡,阻止B细胞分化,抑制小鼠狼疮性肾类和卵巢炎模型中抗体介导的自身免疫反应。其他Th1介导的免疫应答也受CD40L-CD40

阻断的影响,包括同种特异性 CTL 应答的产生,胶原诱导的关节炎和实验性自身免疫性大脑炎[83,90]。更惊奇的是,CD40 和 CD40L 敲除的小鼠以及 CD40L 基因 X 连锁突变的人类出现高 IgM 综合征,表现为产生生发中心能力,产生 IgG1 应答和产生记忆 B 细胞方面的选择性缺陷。因此 CD40-CD40L 的相互作用对促进体液免疫应答是关键性的。目前,研究正开始致力于确定其他共刺激通路拮抗剂的体内效应。

CTLA-4 在体内免疫调节方面起相反的作用。用 CTLA-4 拮抗剂如用抗 CTLA-4 单克隆抗体的 Fab 片段处理小鼠可上调 T 细胞的增殖和细胞因子的产生,增强了 T 细胞对抗原的应答,强化超抗原介导的毒性,以及增强抗病毒免疫[66,104],而且,体内阻断 CTLA-4 同时给以诱导耐受的抗原阻止了 T 细胞的克隆失活。这些结果提示 CTLA-4 介导的 T 细胞功能下调可能是初始 T 细胞免疫应答过程中抗原促使 T 细胞扩增和收缩的正常结果。最后,在一些小鼠自身免疫性疾病模型中,如复发/缓解型 EAE,阻断 CTLA-4/B7 相互作用促使疾病发作和疾病过程恶化[66]。CTLA-4 敲除小鼠显示出深度的自发性自身免疫病。在 2~3 周龄,CTLA-4 敲除小鼠显示出大量淋巴增生紊乱,发展成明显的自身免疫性心肌炎和胰腺炎,并无例外地在 4~5 周死亡。

小结

460

总之,T 细胞的活化是一个多步骤的过程,其中 CD28/B7 相互作用通过降低 TCR 信号阈值启动克隆扩增,促进细胞周期过程,防止细胞凋亡,启动 T 细胞沿着 Th1-Th2 途径分化。这些免疫应答的效果取决于抗原的剂量, APC 功能和细胞因子环境,以及共刺激的水平。免疫应答的早期,在低抗原密度的情况下,CD28 的衔接是重要的,并多依赖 B7-2 介导的共刺激。随着免疫应答的进展,B7-1 和 B7-2 均上调,增强的共刺激信号促进 T 细胞扩增和细胞因子产生及可能使 T 细胞应答朝 Th2 表型倾斜。因此,在这一过程中任一降低共刺激信号的试剂或环境均促进 Th1 型的应答。高水平的共刺激伴随高 TCR 结合可能事实上下调免疫应答。这种效果可能由于经由 TCR 和 CD28 的信号过于广泛,这可以解释高区耐受或克隆耗竭。另外,高的刺激可能大大上调活化 T 细胞上 CTLA-4 水平。由于 CTLA-4 的连接可以抑制免疫应答,CTLA-4 与 B7-1 的相互作用在一定条件下将进一步放大这种抑制效应。CD40-CD40L 的相互作用通过促进 APC 上调 CD28 的配体 B7-1 和 B7-2 而放大这些早期事件。这些早期活化事件诱导一系列可诱导的共刺激受体的表达。例如 CD30 和 4-1BB,可以促进效应细胞分化。所有的家族成员通过它们各自的功能与特异性的 TRAF 家族成员和 TRAF 衍生蛋白亚群相联系,并以此来调节不同的共刺激通路。这些共刺激通路一起控制免疫应答的启动和分化。

TCR 辅助受体分子:CD2 和 CD45

一般情况

TCR 是 T 细胞首要的抗原识别和信号传递结构。但是有效的 T 细胞活化不仅依赖 TCR 衔接,而且依赖于淋巴细胞上一些相关细胞表面蛋白,它们不直接参与抗原的特异性识别,但作为共同受体在细胞活化过程中起关键作用。这些细胞表面分子能增强 TCR 复合体的亲合力,或通过提供重要的与 TCR 相关的生化信号促进细胞与细胞间相互作用和活化。这些细胞表面信号分子有别于整合素和共刺激分子如 CD28,后者是依赖 TCR 的表达来行使其信号传导功能。典型的辅助受体分子是在第 11 章详细介导的 CD4 和 CD8 分子,本部分总结了其他两个研究较为详细的分子,CD2 和 CD45 的结构和免疫学特征。

CD2 的特征

CD2[又名 T11、leu5 和 LFA-2,绵羊红细胞(SRBC)受体]是一个 45~55kDa 的糖蛋白,表达于所有成熟人 T 细胞和胸腺细胞,大多数 NK 细胞和一小部分(9%~12%)骨髓细胞[105,106]。CD2 同源分子表达于啮齿类的胸腺细胞和外周 T 细胞,但也表达于小鼠 B 细胞和大鼠巨噬细胞[107,108]。人 CD2 基因定位于 1 号染色体 p13 中心两侧的基因座,小鼠相应基因位于 3 号染色体上[109]。人 CD2 基因编码一个 360 个氨基酸的多肽,而小

鼠的蛋白长度为322个氨基酸[110]，序列比较联合核磁共振分析和结晶学研究表明CD2有两个属于Ig超家族的蛋白结构域，一个连接部和一个茎结构。结构域Ⅰ含两个β片层形成的反向平行β环，是一个与其他Ig超家族成员相似的结构。

经典地用绵羊红细胞花结实验从单核细胞群中纯化人T细胞。这种纯化程序利用了人T细胞表面独特的能结合绵羊红细胞的结构。对单克隆抗体的PANEL分析表明CD2是SRBC的受体，因为抗CD2的单克隆抗体抑制了E-花结的形成。对CD2的结合位点进行表位分析后发现三个区域：I区有13个氨基酸组成，围绕第48个氨基酸；Ⅱ区围绕第95个氨基酸也由13个氨基酸组成；Ⅲ区围绕第140～142个氨基酸。I区和Ⅱ区的表位缺失突变导致T细胞花结和CD58结合功能的缺陷[111,112]。Ⅲ区相关的表位[$CD2RT_{11.3}$]位于I区和临近膜的细胞外Ⅱ区之间的CD2连接区，针对这一区的抗体不影响与CD58的结合[112,114]。CD2R在静息T细胞上微弱表达。在T细胞活化后的表达依赖于转录后构象的变化。CD2R的表达伴随着CD2在细胞-细胞接触区的聚集和重新分布。CD2有几个配体。它结合两个类似的糖蛋白，人CD58(LFA-3)及啮齿类CD48，二者在造血和非造血细胞上均广泛表达[109,115~120]。CD2结合CD48的亲和力($K_d = 60 \sim 90\mu mol/L$)远低于CD2与CD58相互间的亲合力($K_d = 10 \sim 20\mu mol/L$)[109,121]。CD58定位于染色体的1p13，CD48定位于1号染色体的远端，1q21-23。除此之外，CD2的配体CD58和CD48有一个相似的结构，它们属于Ig超家族中的亚家族，有一个N端的V组结构域(序列及结构与Ig可变结构域相似的结构域)和一个C端的C2组结构域(序列与结构与Ig恒定结构域相似的结构域)和一个保守的二硫键结合模式(图13.4)。两个CD2配体CD48和同工型的CD58均为糖基磷酯酰肌醇锚固的膜蛋白。这种膜结合形式提供高度的侧向移动性，增强CD2与配体相互作用。

461

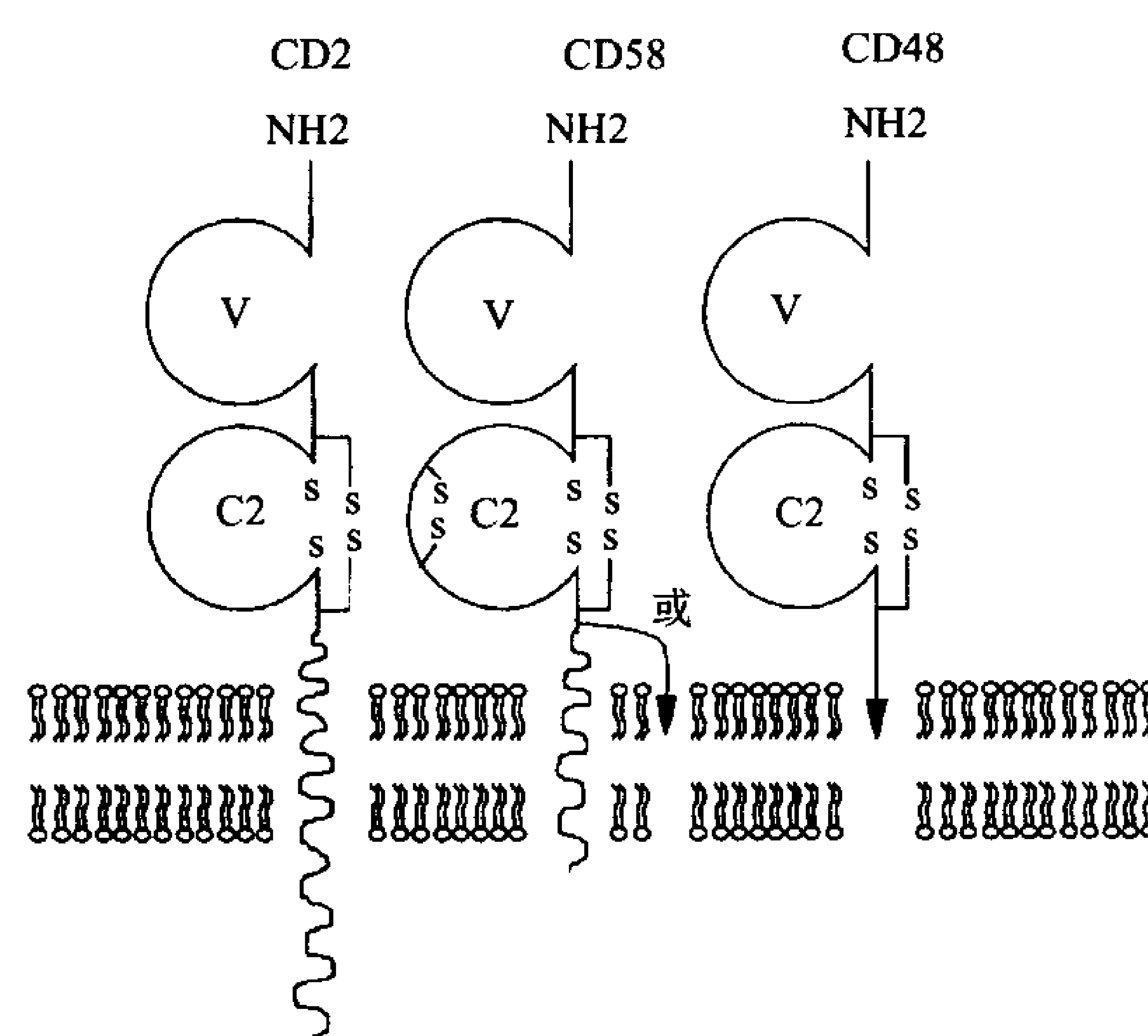


图13.4 CD2及其配体CD58，CD48是免疫球蛋白超家族中的亚家族成员。它们包括N端的V组结构域(一个序列及结构上与Ig可变结构域相似的结构域)C端的C2组结构域(一个序列及结构上与Ig恒定结构域相似的结构域)和一个保守的二硫键连接模式。CD2两种配体CD48及其同工型CD58均表达为GPI锚固的膜蛋白。

CD2与其配体CD58亲合力依赖于TCR复合体的活化信号[106,115,122]。TCR信号导致CD2胞质尾部发生改变，进而增强CD2胞外部分与其配体的亲合力(由内向外信号)。这种增强的亲合力可以被酪氨酸激酶的抑制剂抑制，或被升高的胞内环化单磷酸腺苷(cAMP)水平诱导。CD2亲合力的上调需要CD2 C端的天冬酰胺[106,115,122]。这些结果说明CD2-CD58相互作用在加强T细胞与APC接触，增强T细胞应答中有重要作用。

CD2功能

CD2与其配体的相互作用可促进T细胞和APC之间的黏附，提高TCR结合的总体亲合力。抗CD2的单克隆抗体，可溶性CD2配体，及针对CD2配体的抗体能抑制抗原特异性和非特异性的复合物形成，从而抑制T细胞增殖，细胞因子分泌及细胞毒性[105]。如前所述，TCR介导的活化对CD2的功能是重要的。因此CD2和TCR信号之间存在协同效应，因为通过每个分子的活化增强另一通路。而且，TCR和CD2的胞外部分有

相似的长度(大约75Å),CD2与其配体的相互作用为TCR抗原/MHC复合物相互作用的发生创造了一个理想的距离。CD2与TCR复合物的联系辅助TCR在细胞-细胞接触区的聚集,使低亲和力TCR/MHC相互作用保持稳定。

除增强T细胞黏附外,CD2的信号能以抗原依赖及非依赖途径促进T细胞活化[123,124]。由天然配体或单克隆抗体介导的CD2分子信号能以黏附非依赖的方式增强IL-2产生,其中由CD2单克隆抗体介导的T活化需要成对的单抗[113]。抗体对必须包括针对CD2R区的抗体,或联合抗CD2抗体加PMA[113,125]。除增强T细胞功能外,CD2的信号可以通过诱导无反应性状态或凋亡对T细胞应答起下调作用。丝裂原性抗 CD_2 抗体对联合IL-2诱导的T细胞活化对Fas非依赖性的凋亡敏感,这种情况发生在用针对不同于两个丝裂原抗体识别位点的第三个CD2特异性单抗刺激的情况下[126]。对凋亡的诱导限于活化的T细胞。而且在初次同种抗原刺激过程中阻断CD2-CD58和LFA-1-ICAM-1的相互作用导致抗原特异性无反应性状态[127]。在体内也有类似的发现,用非耗竭性抗CD2抗体处理小鼠导致T细胞对抗原刺激的无反应性[127]。CD2参与了T细胞细胞因子产生的调节。CD2的刺激使细胞因子谱向Th2样表型倾斜。用LFA-3,而不是ICAM-1可刺激 $CD4^+$ 记忆T细胞表达高水平的IL-5[128],而且联合应用抗CD2和抗CD28的单抗刺激T细胞克隆可增强IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、CSF-1、IL-10、INF-α的产生和IFN-γ的分泌,[129~133]其效果超过联合应用抗CD3和抗CD28的单抗。阻断CD2-CD58或促进CD2-CD48相互作用抑制了T细胞对IL-2的应答[134]。因此,除辅助T细胞黏附和增强T细胞活化外,CD2与其配体相互作用还可调节Th1、Th2细胞分化。

观察体内CD2的作用表明,加入抗CD2或抗CD48的单抗能抑制T细胞应答,例如抑制细胞毒性T细胞发育和迟发性变态反应[127,135~137]。抗CD2单抗在一系列器官移植模型中能有效阻止移植物排斥反应,及移植物存活伴随供体特异性的耐受。用人CD2转基因的CD2敲除小鼠和狒狒模型进行的心脏同种移植研究也观察到相似的结果[138~140]。但是在一临床试验中,抗CD2治疗联合抗LFA-1在免疫缺陷和人白血病骨髓移植中产生了不确切的结果[141]。在自身免疫性疾病模型中加入抗CD2抗体也观察到类似的抑制性效果。在实验性大鼠自身免疫性肾炎发作时给予抗CD2单抗能剧烈地抑制疾病的进展,如果在病程晚期给予则可预防病情恶化。此外,变应性疾病患者,Omenns氏综合征患者及重度真菌感染患者的细胞在体外受抗CD2和抗CD28刺激可产生高水平的IL-4[142]。结合抗CD2抗体能抑制T细胞对IL-12应答的作用,可以引出这样的假设:在所有这些模型中,CD2的衔接可抑制T细胞黏附和导致Th1细胞因子产生的选择性抑制。这将可以解释抗CD2抗体在移植和Th1介导的自身免疫中的免疫抑制效应,及在Th2型自身免疫中的恶化效应。

462

CD2功能的生化基础

起初CD2抗体能刺激T细胞的研究揭示了一个有别于由CD3-TCR介导的经典通路的T细胞活化旁路。但已表明CD2与TCR-CD3复合物相连,同时通过CD2的T细胞活化需要TCR-CD3表达,尤其是CD3ζ链的表达[115,143]。事实上,交联CD2并不能在CD3突变细胞系或TCR调变的静息细胞产生信号。因此,CD2信号通路与TCR信号复合体紧密相关。通过CD2的信号活化 $p56^{lck}$ 和PLC-r-1及诱导 Ca^{2+} 内流和cAMP产生[106,113,115]。CD2依赖性的T细胞信号需要CD2胞质尾部的结构[106],尽管它非CD58(LFA-3)结合所必需。最近用CD2跨膜区和胞质区或缺失或换用CD4、CD28或CD58相似区取代所进行的嵌合研究表明,CD2的胞质区为与TCR-CD3链相互作用所必需。然而,CD2胞质区缺失突变仍保留与CD45相互作用功能,提示CD2的胞外区主要负责与CD45的相互作用,CD2的胞质区高度保守(17%~84%的核苷酸同源性),最保守的部分富含脯氨酸。已知脯氨酸富含区可以结合Src同源3(SH3)区。P56LCK SH3区结合CD2胞质区的脯氨酸富含区。其他与CD2相关信号分子如 $p59^{fyn}$ 和PI-3激酶,也可以由它们的SH3区与CD2的脯氨酸富含区相互作用。总之,CD2与配体的相互作用增强T细胞的结合力,通过CD2胞质区的信号来增强T细胞信号效应。

CD45的特征

CD45(已知又称白细胞共同抗原,Ly-5、T200及B细胞形式的B220)是一种出现于所有造血细胞上的膜

结合形式的酪氨酸酯酶。CD45 基因(在小鼠定位于 1 号染色体,在人为 1q32),由 33 个外显子编码,其中外显子 3~15 编码胞外区,外显子 16 编码跨膜区,外显子 17~32 编码胞质内区。CD45 的细胞外区有一个包含几个 *O*-连接糖吸附位点的 N 端和一个半胱氨酸富含区。众多的外显子和不同的糖基化导致表达各种不同的细胞特异性的 CD45 同工型,它们由胞外区外显子 4、5 和 6 选择性拼接产生(又称为外显子 A、B、C)[144,145],结果深度影响 *O*-连接糖在各种同工型(isotform)的大小和程度。*O*-连接糖区被高度电荷化并形成硬竿状。因此外显子的不同应用使得细胞外区的长度从 28~51nm 不等。不同同工型 CD45 被不同拼接特异性和糖基化表位依赖性的单克隆抗体所识别[145]。识别限制性表位的抗体被称作 CD45R 特异性的。因此,CD45RA 特异性单抗识别一个依赖外显子 4 的 CD45 同工型,而 CD45RB 和 CD45RC 特异性抗体分别依赖于用外显子与 5 和 6 的同工型。在缺乏外显子 4、5 和 6 的情况下表达的 CD45 同工型被 CD45RO 特异性单抗识别(图 13.5)。

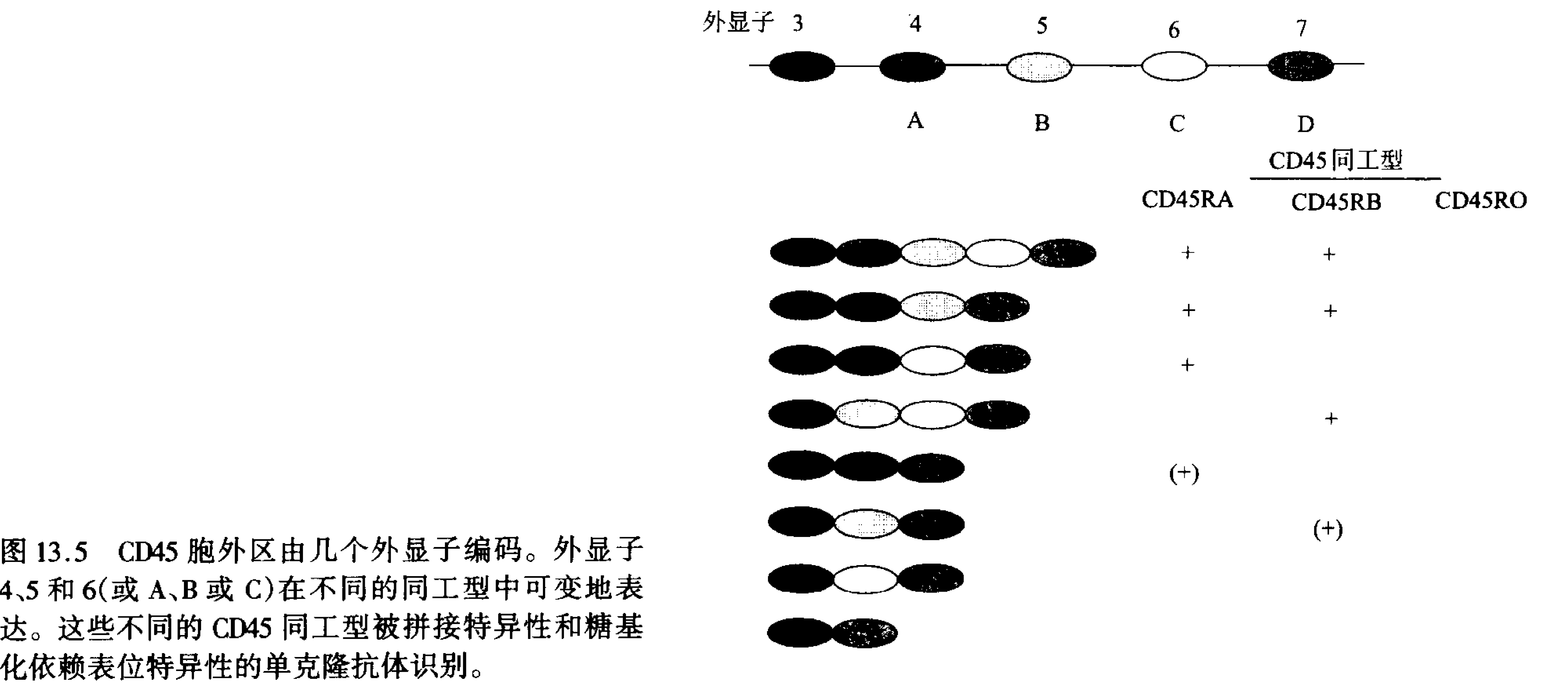


图 13.5 CD45 胞外区由几个外显子编码。外显子 4、5 和 6(或 A、B 或 C)在不同的同工型中可变地表达。这些不同的 CD45 同工型被拼接特异性和糖基化依赖表位特异性的单克隆抗体识别。

CD45 同工型的表达是复杂的,最早发育的 B 细胞和 TCR^- $CD4^-$ $CD8^-$ 胸腺细胞表达最大分子质量形式的 CD45,称为 CD45R/B220。这种形式的蛋白高度糖基化并包括所有的外显子。经刺激后,在非成熟的胸腺细胞转换成低分子质量的 CD45RO 同种型。随着胸腺细胞继续成熟和移入髓样区的外周出现高分子质量同工型(CD45RA、CD45RB 和 CD45RC),但变化是动态的。在人类,CD45RA 同工型可由 2H4 单抗检测,是初始 T 细胞亚类的标志。这些 T 细胞对丝裂原应答后增殖,但不能分泌促进 IgG 分泌型 B 细胞发育的细胞因子。在体外和体内刺激后,记忆/活化的 $CD4^+$ T 细胞表达 CD45RO 同工型,$CD45RO^+$ T 细胞群对丝裂原有低的应答性但能辅助 B 细胞分泌 IgG。他们运用的具体外显子不同,在啮齿类动物也观察到相似的变化。CD45 特异性抗体不能与小鼠 $CD4^+$ T 细胞反应,在啮齿类动物初始和记忆 $CD4^+$ T 细胞的区别在于 CD45RB 和 CD45RC 的表达不同。在小鼠初始 $CD4^+$ T 体细胞,在抗原暴露以后,每一个 $CD45RB^{hi}$ 表型下调成 $CD45RB^{lo}$ 表型,小鼠 T 细胞也在活化后表达 CD45R/B220 同工型,在大鼠高水平的 CD45RC 表达代表初始 T 细胞群,该分子在抗原刺激之后下调。$CD8^+$ 小鼠 T 细胞和 B 细胞表达多种 CD45 同工型(CD45R/B220 表达于成熟小鼠 B 细胞);然而它们与功能的联系尚不清楚,已有报道在自身免疫和炎症性疾病情况下 CD45 表达有改变,例如白血病和淋巴瘤细胞有下调的 CD45 表达,及在系统性红斑狼疮中出现的 CD45R 自身抗体[145]。这些变化的意义可能反映淋巴细胞群的变化而不是 CD45 在疾病进展中的直接作用。虽然抗 CD45 抗体能在体外调节淋巴细胞应答的现象提示 CD45 与配体的相互作用可能会调节 T 细胞功能,但对 CD45 的配体目前尚了解不多。事实上,高度保守的编码 CD45 胞外区外显子的运用模式,以及功能上不同的淋巴样和髓样亚群所用的不同同工型表达的紧密调节提示 CD45 胞外区对其功能有重要作用。一些研究提示,CD45 可能与凝集素或细胞表面的其他糖蛋白相互作用。例如,已报道有 B 细胞糖蛋白 CD22 及血清甘露聚糖结合蛋白(S-MBP),

463

一种参与天然免疫的钙离子依赖的C型凝集素与CD45糖部分相互作用[146,147]。S-MBP特异性地结合表达在$CD4^+$ $CD38^+$ $CD3^{lo}$非成熟胸腺细胞上的,CD45RO同工型中出现的高甘露糖型或杂合型*N*-连接低聚糖。在这方面,研究表明不同同工型CD45和TCR选择性的联系和活化。但是应该强调的是CD45胞外部分对这一功能并不重要。在CD45缺陷淋巴瘤系观察到的TCR应答缺陷(见下文)能用仅留胞质区的CD45嵌合蛋白补救[148]。

CD45在发育中的作用

在CD45敲除小鼠中发现CD45直接参与T细胞发育[149,150]。在这些小鼠中存在显著的从$CD4^-$ $CD8^-$胸腺细胞到$CD4^+$ $CD8^+$胸腺细胞的抑制和从$CD4^+$ $CD8^+$胸腺细胞到$CD4^+$及$CD8^+$胸腺细胞的抑制,最终导致成熟外周T细胞大幅减少(5%~10%),与野生型T细胞相比,这些小鼠中出现的少数$CD4^+$ $CD8^+$细胞对在体外TCR刺激应答中的凋亡信号更不敏感,但对不存在任何刺激情况下的凋亡易感。由此得出的假设是,CD45分子在各种状态下的T细胞发育中起重要作用,而且可能通过改变TCR刺激的阈值影响阳性选择和阴性选择。作为一种结果,CD45缺陷细胞将需要一个更强的信号进行阳性和阴性选择。因此,由于缺乏有效的信号,$CD4^+$ $CD8^+$胸腺细胞与阳性选择低亲和力肽相互作用可能死亡,而那些选择出的将是在阴性选择TCR刺激应答过程中对凋亡较不敏感者。

CD45功能

早期的研究表明缺乏CD45严重影响细胞的应答功能。而且同时交联CD45和抗原受体可阻断Ca^{2+}动员[151]。用抗CD45单抗在体处理小鼠可抑制T细胞依赖性抗原的应答[152]。这些功能研究提示,CD45在淋巴细胞活化中可能发挥重要作用。CD45对抗原特异性T细胞应答起关键作用的直接生化证据来自用CD45缺陷细胞进行的研究。发现这些突变的细胞系在众多TCR介导的信号事件中存在缺陷,例如酪氨酸磷酸化,磷酯酰肌醇的产生,Ca^{2+}内流,蛋白激酶C活化,IL-2分泌[145,149]。而CD45胞外区的作用尚需进一步研究,已表明该区发挥作用需要CD45胞质磷酸酯酶区且该区足以恢复CD45-细胞系的正常信号功能。这些研究已经在CD45外显子6敲除小鼠中获得证实,该小鼠发育出少数的外周T细胞,且大多对TCR刺激无反应[150]。但是CD45缺陷小鼠的T细胞对佛波酯和钙离子导入剂刺激能正常地增殖,提示这些细胞缺陷的信号与TCR活化信号接近。在B细胞也观察到类似的结果,加入CD45的单克隆抗体可以抑制正常B细胞对抗原刺激的应答,同时交联CD45和抗原受体阻止了钙离子动员。在小鼠体内注射B细胞表位特异性的抗CD45单抗抑制了T细胞依赖性抗体应答[145,152]。这些发现被用CD45缺陷小鼠进行的研究证实,其中B细胞对B细胞受体特异性抗体的刺激存在应答缺陷。受抗原刺激后,$CD45^-$ B细胞在Ca^{2+}动员、磷酯酶C活化、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和$P21^{ras}$活化存在缺陷。但是B细胞对CD40介导的信号并未在CD45缺陷小鼠中受到影响,且CD45缺陷型B细胞对T细胞非依赖性病毒抗原有正常应答[153]。这些结果提示在存在强的初次刺激的情况下,BCR和CD40信号足以完整地促进缺乏CD45的B细胞应答。

不同CD45同工型的功能尚不完全清楚。在脊椎动物CD45胞外区的序列比较表明三种同种型的胞外区高度保守。而表达不同同工型的T细胞亚群有不同的功能。$CD4^+$ CD45 RA T细胞(初始T细胞)对丝裂原应答后增殖良好,可为诱导B细胞分泌IgE提供足够的帮助,但在诱导IgG合成方面作用微弱。相反,CD45RO T细胞(记忆T细胞)对丝裂原应答较弱,但可辅助IgG而不是IgE的分泌。最近的研究提示CD45同工型在这些不同的功能中起重要作用。转染低分子质量CD45同种型的T细胞比转染高分子质量形式的能较好地对抗原刺激应答。对抗原应答的程度和CD45同工型与CD4共联结的能力相关。由于CD4和CD45的共联结不需要CD45的胞质部分,外部的区域对介导这一活性起重要作用[154]。仅某种CD45同工型参与调节细胞因子分泌的资料也支持CD45同工型有不同作用。用识别CD45同工型共有表位的单抗交联CD45可诱导INF-α、INF-β、IL-2和IL-3基因表达。这一效果对这一共有表位是特异性的,因为识别其他表位的抗体不诱导任何显著的细胞因子表达的上升。

由于 CD45 在 T 细胞活化中有关键作用,因而已变成一个有吸引力的,体内调节 T 细胞的靶分子。在一些不同的小动物模型中,CD45 抗体治疗在预防肾移植排斥中发挥有效作用,在肾同种移植后两次注射抗 CD45RB 抗体导致延长的同种移植物存活和小鼠正常的肾功能[155]。用抗 CD45RB 单抗处理也表明可以逆转急性肾移植排斥反应。这种免疫抑制效果是表位特异性的,因为纯化的抗 CD45 抗血清和泛 CD45 单抗不能有效延长移植物存活。已经在人体进行初步的研究。用大鼠抗 CD45 单抗预处理人肾同种移植物导致低的排斥率[156]。因此,体外观察到的 CD45 在 T 细胞活化中的关键作用得到体内研究的支持,后者表明用抗体调整 CD45 活性足以预防 T 细胞活化。

CD45 功能的生化基础

如前所述,CD45 是一个膜结合形式的酪氨酸磷酸酯酶。酪氨酸磷酸酯酶在免疫应答调节中扮演重要作用。多数情况下磷酸酯酶被认为可以通过使 TCR 信号附近的关键的生化中介体(如 $p56^{lck}$、ZAP-70、CP3 或 $p59^{fyn}$)脱磷酯。例如细胞内的磷酸酪氨酸磷酸酯酶(PTP)PTP-1C 和 PTP-1D 可通过直接影响 BCR 信号或调节 Fc 受体功能下调 B 细胞信号。而 CD45 是 TCR 信号的关键成分,因为在 TCR 刺激前调变 CD45 功能导致 TCR 与细胞内钙离子动员及与 Ca^{2+}/钙调素活化激酶活化的解除。CD45 通过调节 Src 家族激酶($p56^{lck}$ 中的 Tyr505 和 $p59^{fyn}$ 中的 Tyr528)C 端的负性调节酪氨酸磷酸化而上调 $p56^{lck}$ 和 $p59^{fyn}$ 酪氨酸激酶活性[144,145,149]。CD45 缺陷的细胞的负性调节酪氨酸的酪氨酸磷酸化增强,与低的 Src 激酶活性相关。此外在 CD45 缺陷细胞系,$p56^{lck}$ 在 Tyr394 是高度磷酸化的,CD45 的细胞内 $p56^{lck}$ Tyr394 是脱磷酸的。这表明 CD45 能通过调节活化与抑制位点的磷酸化较好地调节 $p56^{lck}$ 活性。事实上,$p56^{lck}$ N 端和 SH2 区与 CD45 胞质区存在直接的作用。在一些情况下,CD45 缺陷细胞系能通过它们的 TCR 传递信号,有意思的是,这些细胞的 TCR 信号传导与 Syk 而不是与 ZAP 酪氨酸激酶联系。这一信号途径似乎不依赖于 CD45 和 $p56^{lck}$。CD45 也可能直接调节 TCR 信号过程包含的其他分子的酪氨酸磷酸化。在 Jurkat 细胞转染最大的 CD45 同工型(ABC)可以增强 TCR 介导的酪氨酸磷酸化及增强 SLP-76 与 GNEF 和 Vav 的联系及 IL-2 的产生。有趣的是,转染最小分子质量 CD45 同工型 CD45RO 并不能在本系统中同样有效地上调 T 细胞信号。

与 T 细胞一样,CD45 缺陷性 B 细胞也表现为改变了的近端信号事件。Src 家族激酶正性自身磷酸化位点 Lyn 被高度磷酸化,而 C 端的负性调节酪氨酸被低磷酸化,与 CD45 介导的 B 细胞调节作用一致。因而与 T 细胞相似,Lyn 这一受体相关的 Src 家族激酶,是 B 细胞中 CD45 的潜在底物。因此,CD45 通过上调与 TCR 和 BCR 相联系的 Src 家族激酶的酪氨酸激酶活性调节 T 细胞和 B 细胞受体信号。

小结

辅助分子,例如 CD2 和 CD45,能通过增强 T 细胞与 APC 细胞相互作用的亲和力以及通过它们介导的胞内区信号事件辅助 T 细胞活化。已表明 CD2 与 CD48 和 CD58 相互作用,但 CD45 的配体尚未鉴定。因为不同形式 CD45 的表达在 T 细胞成熟和活化的过程中受到紧密调节,这表明 CD45 与 T 细胞或抗原呈递细胞上分子的相互作用可以调节淋巴细胞的活化。CD2 和 CD45 的胞内区均有信号传递功能。CD45 的胞内区具有酪氨酸磷酸酯酶活性,它通过正性调节 Src 家族激酶活性在启动 T 细胞受体结合事件中发挥关键作用。虽然 CD2 不直接作用于 TCR 信号传导,但是 CD2 的信号传导依赖 TCR 的表达。CD2 的胞内尾部联结的信号通路与 TCR 相似,因此 CD2 信号可以进一步增强 T 细胞活化。最近的实验证据强烈地提示体内 T 细胞的活化是包括由 TCR 和表达于细胞表面的众多辅助分子如 CD2 和 CD45 参与的,复杂调节活化过程。

465

T 细胞黏附的调节:整合素

一般情况

起初在 T 细胞表面鉴定的有重要功能的辅助分子之一是白细胞功能相关抗原(LFA),包括 LFA-1、LFA-2

和 LFA-3。针对这些表面抗原的单克隆抗体阻断了抗原特异的 T 细胞增殖和阻止了细胞毒性 T 细胞介导的细胞毒性[157]。有趣的是,三种 LFA 抗原均被鉴定为参与 T 细胞和其他细胞,细胞-细胞间接触的黏附分子。白细胞上表达最广泛的 LFA 抗原是 LFA-1,它是一个结构上与黏附分子相关的大家族,整合素超基因家族成员。另外两个 LFA-2 和 LFA-3 均是 Ig 超基因家族成员,它们形成 CD2(LFA-2)/CD58(LFA-3)受体/配体对,发挥辅助和黏附作用。黏附分子是首批在 T 细胞表面鉴定出的功能性辅助分子,这表明这一辅助分子亚群介导的黏附作用在促进抗原呈递细胞和周围细胞外基质(ECM)相互作用及促进关键 T 细胞信号传导中的重要作用。

现在已经清楚整合素超家族成员在 T 细胞活化的多个方面发挥重要作用。19 世纪 80 年代早期到中期收集到的证据表明,包含 LFA-1 的相互作用是 T 细胞,B 细胞和巨噬细胞间相互作用的主要黏附力[158~160]。该过程可以被描述为:T 细胞启动与抗原呈递细胞间抗原非依赖性黏附作用,扫描细胞表面特异性抗原,随后是更强烈的抗原依赖性黏附作用,使得 T 细胞活化、增殖、产生细胞因子或对靶细胞发挥致死性打击[161,162]。

整合素超基因家族特征

整合素超基因家族几乎表达于体内所有的细胞类型,且既参与细胞-细胞接触又参与细胞与胞外基质的相互作用[163,164]。整合素对多种不同的生理过程非常重要,包括胚胎发生、血栓形成和创伤愈合、肿瘤发生及免疫应答。整合素超基因家族由一些细胞表面 αβ 异二聚体组成。α、β 链是Ⅰ型跨膜糖蛋白,有单一的疏水跨膜区,一个短的胞质尾和一个经非共价连接形成异二聚体的胞外区。它们在细胞表面表达需要 α、β 两条链。多数整合素参与吸附胞外基质成分,但发现越来越多的分子也能结合表达于细胞表面的配体。图 13.6 描绘了 16 条 α 链和 8 条 β 链。最常用的描述一个异二聚体特异性的一致的命名法是将组成该异二聚体的 α、β 链特异化。α 链用数字或字母显示,αI ~ 9、αⅡb、αV、αE、αM、αL、αX 和 αD。β 链用数字区别 β1 ~ 8。与 β2 配对的 α 链均定位于人 16 号染色体(αM、αL、αX 和 αD)[165,166],而 β2 本身由 21 号染色体编码[165]。其他整合素链的基因座散布于整个基因组,主要集中于 2、12 和 17 号染色体,α4 和 αV 均位于 2 号染色体[167,168],β1 位于 10 号染色体[169]。α 和 β 链能在不同异二聚体中组合,形成多种独特的特异性(图 13.7)。通常 α 链仅能与一个特异的 β 链配对,而 β 链能与各种不同的 α 链配对。例如,β2 能与 αL、αM、αX 和 αD 链配对(图 13.6)。而且不同的 αβ 异二聚体有时能拥有相同的配体,如 αL、β2 和 αMβ2,均能结合 ICAM-1。虽然有多种整合素异二聚体能结合相同的配体,整合素异二聚体常结合不重叠的位点,提示不同整合素异二聚体的多聚复合体可以与相同的配体结合。整合素受体与其配体的亲和力可能显著不同;受体的生理活性常取决于配体表达的水平及位置。

整合素 α 链胞外部分由七个重复区组成。α 链间总体结构的同源性仅为 20% ~ 30%,短的胞质区同源性最少[170]。3 个或 4 个最近 C 端的胞外结构域有与钙镁结合蛋白、肌钙蛋白 C、钙调素和 parvalbumin 的"EF 手样"区非常同源的序列(图 13.8)。整合素结合功能受二价阳离子紧密调节,这可以解释该分子 EF 手样区的重要性,因为它具有二价阳离子结合能力[171]。αM 胞外区部分结晶结构显示它由 6 个 β 片层环绕以 7 个 α 螺旋组成[172]。这个结晶结构揭示了一个含金属离子(Mg^{2+})依赖黏附位点(MIDAS)的氨基酸序列,即 I 区的存在。仅有那些与 β2 组成亚家族的 α 链和 α1、α2、αE 链含有这种 I 区(图 13.8)[171]。最近,整合素 α 链的三维结构计算机模型预测显示它们折入 β 样推进区,由七个四链 β 片层围绕对称轴排列成隆凸状。在这个模型中,含有 Mg^{2+} 结合 MIDAS 序列的 I 区位于 β 推进中的顶端,而 Ca^{2+} 结合 EF 区位于 β 推进中较低的表面。β 链较 α 链间有较多的同源性(如 β1 和 β2 有 44% 同源性)。然而它们同样存在不同的结合特异[170]。有意义的是 β1、β2 和 β3 链拥有一个相似的 MIDAS 样序列,突变后可导致整合素-配体结合能力丢失[173,174]。这些结果与其他的结构研究结果一致,后者表明整合素 α 和 β 链 N 端联合可形成功能性的配体结合位点。

466

β1、β2 和 β7 亚家族参与了 T 细胞迁移,为 T 细胞增殖和效应功能提供辅刺激信号(图 13.6)。β2 整合素亚家族(或称白细胞整合素)是最具功能多样性的整合素亚家族,并有一个限于白细胞的表达模式[175]。这一

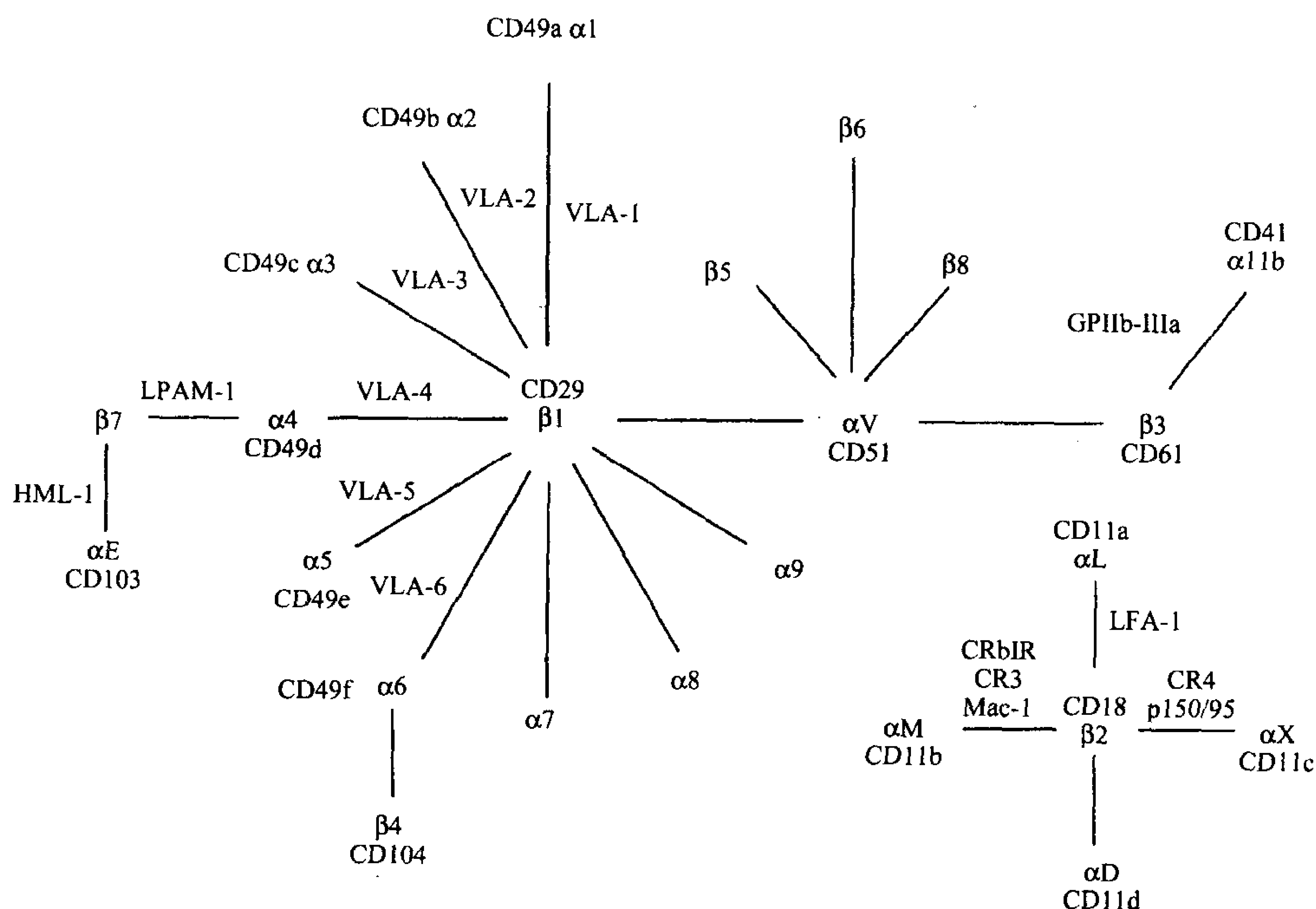


图 13.6 已知的整合素超基因家族中由 α 和 β 链形成的异源二聚体概况。

整合素受体	配体：胞外基质蛋白	配体：细胞表面蛋白
β1 超家族		
α1β1 (CD49a/CD29)	胶原蛋白，层粘连蛋白	
α2β1 (CD49b/CD29)	胶原蛋白，层粘连蛋白	
α3β1 (CD49c/CD29)	胶原蛋白，层粘连蛋白 纤连蛋白 (RGD)	
α4β1 (CD49d/CD29)	纤连蛋白 (CS-1)	VCAM-1(CD 106), MAdCAM-1
α5β1 (CD49e/CD29)	纤连蛋白 (RGD)	
α6β1 (CD49f/CD29)	层粘连蛋白	
αVβ1 (CD51/CD29)	纤连蛋白 (RGD)， 玻连蛋白 (RGD)	
β2 超家族		
αLβ2(CD11a/CD18)		ICAM-1(DC54),ICAM-2 (CD102),ICAM-3(CD50) 端脑素
αMβ2(CD11b/CD18)	C3bi,X 因子, 血纤蛋白原	ICAM-1
αXβ2(CD11c/CD18)	C3bi,血纤蛋白原	ICAM-1?
αDβ2(CD11d/CD18)		ICAM-3
β3 超家族		
αVβ3(CD61/CD51)	玻连蛋白 (RGD), 纤连蛋白 (RGD), 威勒布兰德因子， 血纤蛋白原，层粘连蛋白， 血小板反应蛋白， 骨桥蛋白	PECAM-1(CD31)
β4 超家族		
α6β4 (CD49f/CD104)	层粘连蛋白	
β7 超家族		
α4β7 (CD49d/CD?)	纤连蛋白 (CS-1)	MAdCAM-1,VCAM-1
αEβ7 (CD103/CD?)		E 钙黏着素

图 13.7 整合素异源二聚体在白细胞上的表达及其配体。

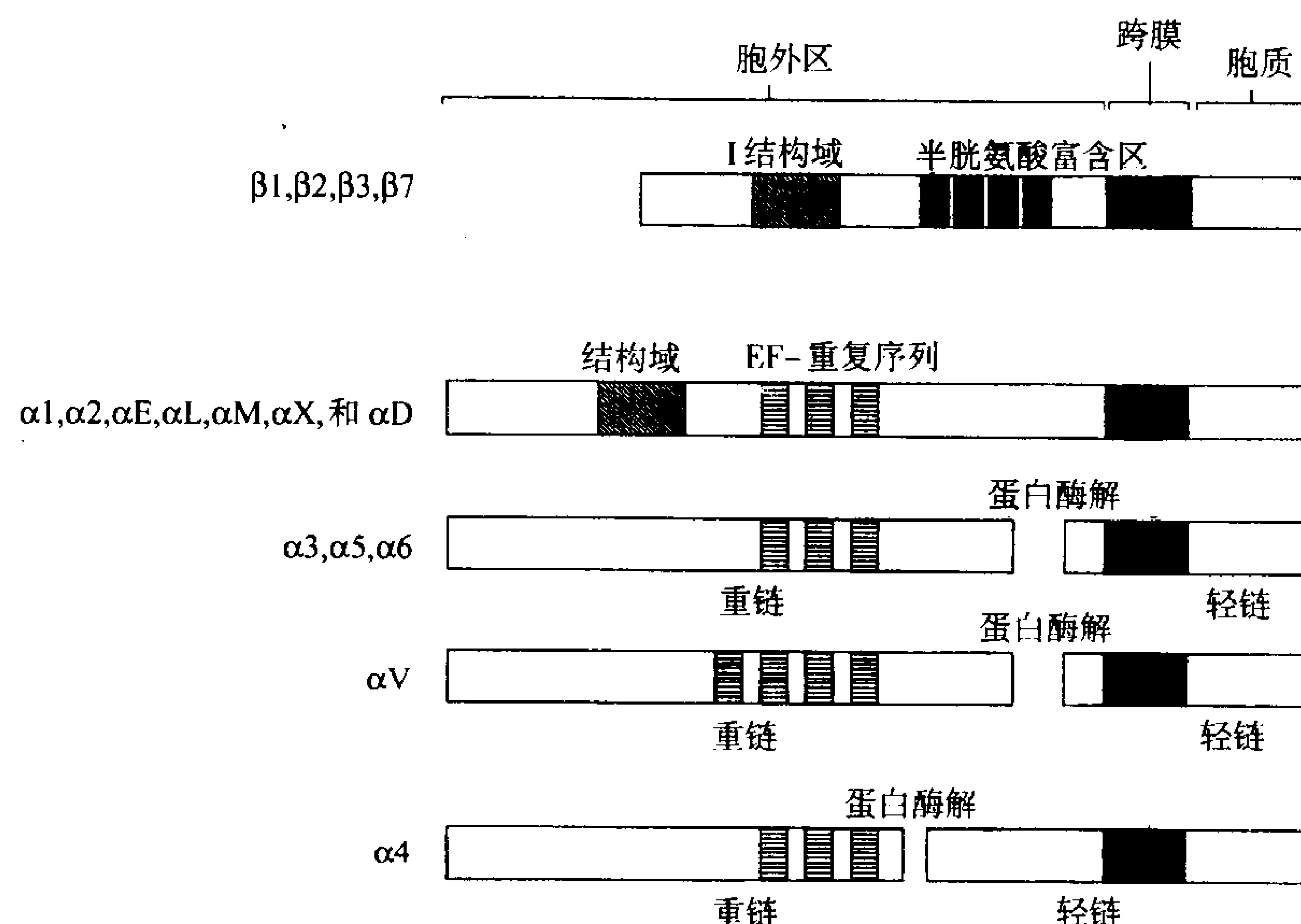


图 13.8　表达于白细胞上整合素的结构概括图。

家族的成员结合各种细胞表面分子,细胞外基质(ECM)蛋白和某些可溶的血液成分。这一亚家族由 αLβ2(LFA-1)、αMβ2(Mac-1)、αXβ2(P150/95)和 αDβ2 异二聚体。αLβ2 组成型表达于所有淋巴系和多数骨髓系细胞,在活化的 T 细胞上表达上调,在效应/记忆 T 细胞上保持上升(接近 2 倍)。αMβ2 和 αXβ2 糖蛋白的表达限于单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞及粒细胞和仅有的一个淋巴细胞亚群。仅有 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ CTL 克隆的一个亚群和小鼠的树突细胞表达 αXβ2[170,176],而 αMβ2 似乎是记忆 T 细胞的一个标志,因为它的表达随年龄增长而升高,且与 IL-4 和 IFN-γ 相关[177]。一个新的白细胞整合素,αDβ2 在一 T 细胞亚群、单核细胞、粒细胞、巨噬细胞,及在参与氧化爆发及粥样硬化坏死的泡沫巨噬细胞上低水平表达[178,199]。

β2 亚家族整合素的配体是各异的,它们包括各种 Ig 超基因家族成员(图 13.9)。αLβ2 的最主要和最高亲和力的配体是 ICAM-1,该分子是一个被广泛糖基化的细胞表面蛋白。ICAM-1 包括 5 个 Ig 样结构域,N 端结构域为 αLβ2 提供主要的结合位点[175]。其他 αLβ2 配体包括 ICAM-2,其细胞外 Ig 结构域仅与 ICAM-1 前两个 Ig 结构域同源(35%)[180];此外还包括 ICAM-3,其胞外结构域与 5 个 ICAM-1 胞外 Ig 结构域同源(48%)[181~182] ICAM-1 和 ICAM-2 与小鼠的同类分子有同源性[180~182]而 ICAM-3 则无。ICAM-1 表达于活化的 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和树突细胞,也可由前炎症细胞因子 IL-1、IFN-γ 和 TNF-α 诱导在血管内皮细胞和纤维细胞上表达。ICAM-2 组成型地表达于内皮细胞、T 细胞和单核细胞上,并不被细胞因子诱导上调,而 ICAM-3 表达限于造血细胞(淋巴单核和树突细胞)静息或活化的内皮细胞上未有表达。最近克隆出一个新的人 αLβ2 配体——端脑素[183,184]。端脑素是含 9 个 Ig 样结构域的 Ig 超家族成员(图 13.9),表达于中枢神经系统。它在 N 端的前 5 个结构域与 ICAM-1(50%)和 ICAM-3(55%)有高度的同源性。ICAM-1、ICAM-3 和端脑素在人 19 号染色体上的聚集以及它们相应 α 链受体(αL、αM、αD)在 16 号染色体的定位,提示这些整合素配体源于基因复制事件。尽管 ICAM-1 与 Mac-1 结合位点位于第三个 Ig 样结构域[185],它也能结合 αMβ2。αDβ2 也能结合 ICAM-3[187],而 αXβ2 结合 ICAM-1[186]、补体成分 C3bi、纤维蛋白原和脂多糖[187]。最后,αMβ2 也结合 C3bi、血纤蛋白原以及凝血成分因子 X[175](图 13.7)。

β1 整合素亚家族[以前认为是非常晚期活化抗原(VLA)][188],广泛表达于许多组织类型,且几乎仅结合 ECM(图 13.7)[163,175]。这些整合素与 ECM 蛋白的结合通常是直接识别纤连蛋白和玻连蛋白共有的特殊肽序列 Arg-Gly-Asp(RGD)。然而 α4β1 也能通过另一氨基酸序列 EILDV 结合纤连蛋白,EILDV 由 CS-1 位点编码,由选择性拼接产生[163]。α4β1 异二聚体是仅有的结合 ECM 蛋白、纤连蛋白和细胞表面分子,血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)的 β1 亚家族成员[189,190](图 13.9)。VCAM-1 是一个 Ig 超基因家族成员,在人中定位于 1 号染

467

469

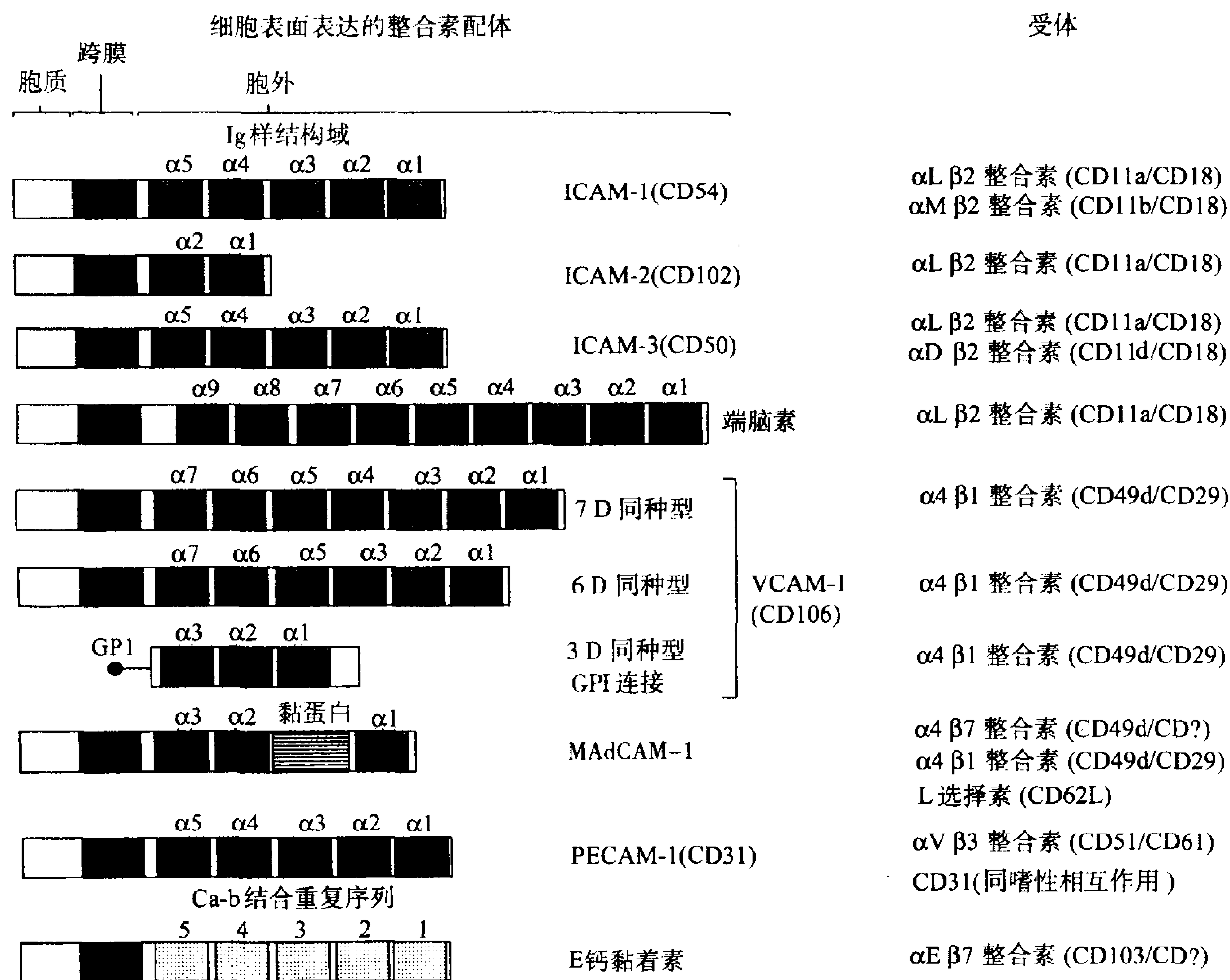


图 13.9 细胞表面表达的白细胞整合素配体的总体结构。

色体[191]。α4β1 配体以几种不同的形式存在,包括一个七 Ig 样结构域形式,一个选择性拼接的六 Ig 样结构域形式和一个炎症特异性的,表达于小鼠细胞上的磷酯酰肌醇的截短的锚状形式[175,192](图 13.9)。α4β1 与 VCAM-1 的结合主要通过识别 N 端的第一个 Ig 样结构域,但也包括同源的第四个 Ig 样结构域来完成[193]。因此,整合素 α4β1 与纤连蛋白和 VCAM-1 的结合是通过整合素异二聚体上功能不同的位点发生[194]。同种间的相互作用能够通过两个表达于抗原呈递细胞上的 α4 分子(或 α4β1 或 α4β7)直接相互作用产生[195]。

多数与 β1 相连的 α 链经历转录后的修饰(图 13.8)。在邻近跨膜区的胞外区,α3、α5、α6 和 αV 链被蛋白水解过程剪切,但仍可通过与 β1 链的二硫键连接表达于细胞表面。α4 链在邻近 EF 手区发生蛋白水解剪切[196],与 β1 链的联结之后迅速将这些 α 链切成两部分[170]。

淋巴细胞上 β1 整合素亚家族成员的表达与它们的分化状态相关。初始 T 细胞表达低水平的 α4β1 异二聚体。相反,活化的 T 细胞和静息的记忆 T 细胞表达高水平 α4β1 和其他亚家族成员,包括 α3β1、α5β1 和 α6β1[197]。事实上,长时间的体外刺激(7~14 天)也能导致 α1β1 和 α2β1 在淋巴细胞上的表达[198]。B 细胞和单核细胞表达不同水平的这些 β1 整合素[170]。β1 家族的 ECM 配体广泛表达于整个身体,而 VCAM-1 有一个非常限制性表达的模式,表达限于炎性内皮细胞、滤泡状树突细胞、脾和胸腺中的某些巨噬细胞、纤维细胞样滑膜细胞、骨髓和基质[170]。IL-4 和某些炎性细胞因子如 TNF-α、IFN-γ 和 IL-1 诱导 VCAM-1 在内皮细胞上的表达,提示这一 α4β1 配体可能在局部炎性位点起主导作用。

β7 整合素亚家族参与了 T 细胞到派尔集合淋巴结这一衬于肠道的二级淋巴组织的归巢[175,199]。β7(以前为 βp)链与两种不同的 α 链 α4 和 αE 配对。α4β7 整合素,又称为淋巴细胞派尔集合淋巴结黏附分子-1(LPAM-1),其功能是作为肠归巢受体[200],与黏膜地址素细胞黏附分子(MAdCAM-1)结合有高的亲和力[201]。整合素 α4β7 也能低亲和性地与较为广泛表达的纤连蛋白和 VCAM-1 分子相互作用[202]。MAdCAM-1 或黏膜血管地址素跨膜糖蛋白的基因定位于人类 10 号染色体[203]。它的胞外部分由 3 个 Ig 样结构域和一个高度糖基化

的,富含丝/苏氨酸残基的黏蛋白样结构域组成。N端的两个Ig样结构域与ICAM-1和VCAM-1有同源性,而第三个Ig样结构域与IgA $C_\alpha2$结构域相似。这一黏蛋白样序列位于第2和第3Ig样结构域之间[204](图13.9),在派尔集合淋巴结的后毛细血管HEV,这个MAdCAM-1黏蛋白样区能被作为一个L选择素功能性配体的糖部分修饰,该部分为一个带有植物血凝素样区细胞表面表达的黏附分子的,选择素家族的成员[205]。MAdCAM-1有影响黏蛋白样区的选择性拼接转录,这可以阻止L选择素配体在HEV外的表达[203]。

470

MAdCAM-1的表达在发育过程中发生变化。新生小鼠MAdCAM-1在所有淋巴结的HEV表达,但在成年小鼠MAdCAM-1在外周淋巴结中并不表达,但相反表达于派尔集合淋巴结的HEV,肠相关固有层和泌乳乳腺管[206]。前炎性细胞因子TNF-α和IL-1诱导MAdCAM-1在小鼠内皮细胞表达[207]。所有的初始T和B细胞表达整合素α4β7,以使它们通过派尔集合淋巴结循环。然而,仅有一亚群效应/记忆T细胞保持α4β7表达,并因而具有进入非炎症性肠相关固有层的能力。整合素α4β7在特定条件下,如在体外葡萄球菌肠毒素超抗原诱导T细胞活化的情况下[208]下调。目前尚不清楚体内正常免疫应答过程中整合素α4β7调节的机制。

能与β7配对的α链是αE,又称αIEL或α290,αEβ7异二聚体表达于肠黏膜的[209]上皮内淋巴细胞(IEL)上,与黏膜上皮细胞表达的E钙黏着素结合[210](图13.9)。转化生长因子β能在体外上调αE的表达[211],肠相关黏膜出现高水平的TGF-β被认为是IEL上表达这种整合素的诱发因素。虽然整合素α4β7真正功能是作为肠归巢受体,整合素αEβ7更作为一个滞留受体,在IEL从血管外渗入肠相关固有层后,将其定位于肠上皮。

最后,虽然β1、β2和β7整合素亚家族是主要的免疫学相关整合素亚家族,其他整合素也在免疫系统中发挥关键作用。受体αVβ3表达在γδT细胞上并提供增殖必需的共刺激信号[213]。αVβ3也结合血小板内皮细胞黏附分子-1(PECAM-1)。后者又称CD31[213],是一个表达于各种细胞,包括T细胞和内皮细胞上的Ig超基因家族成员(图13.9)。另一个整合素亚家族成员,层粘连蛋白受体(α6β4)可能在胸腺细胞发育中起作用,因为它的表达在早期小鼠胸腺细胞群中受到调节[214]。

整合素功能

T细胞移入组织需要T细胞衔接并通过内皮细胞外渗[175,199,215],这是一整合素依赖的过程。最近的模型研究发现趋化因子可传递重要的,通过上调T细胞上的整合素亲合力来促进内皮细胞结合的生化信号[216~218]。由炎性内皮细胞或其下面的组织释放的趋化因子能与表达在内皮细胞腔面的蛋白多糖结合[219],或直接作用于内皮细胞表面,如最近描述的膜结合细胞因子fractalkine[220]。在细胞沿着内皮细胞通过的时候,它们通过选择素和整合素α4微弱黏着。T细胞表达相应的趋化因子受体来结合内皮细胞表达的或结合的趋化因子。趋化因子受体传递的信号导致整合素亲合力快速上调。上调的整合素亲合力(α4β4、α4β7和β2)导致细胞迁移的捕获、强烈的黏附和细胞渗透。经过这一趋化因子介导的黏附后,T淋巴细胞移入组织,在那里它们参与炎症应答,这个外渗过程依赖CD31[221]。它们能结合表达于T细胞和内皮细胞上的CD31或αVβ3(图13.10)。

整合素对参与免疫监视的T细胞也是至关重要的。当静息T细胞经过血流循环的时候,它们特异性地黏附到二级淋巴器官毛细血管后小静脉或HEV上的特异内皮细胞,从血流外渗到下面的二级淋巴组织。此时的归巢受体为外周淋巴结受体L选择素,特异性地结合称为黏蛋白的组织结合形式的蛋白多糖的糖部分。外周淋巴结至少表达两种HEV特异性的选择素配体或外周淋巴结定位素:糖基化的细胞黏附分子-1(GlyCAM-1)和一个特异性糖基化形式的CD34[222,223]。在肠黏膜区,HEV表达一种L选择素配体,该配体也出现于MAdCAM-1黏蛋白区上[205]。派尔集合淋巴结HEV中MAdCAM-1的表达可使其与L选择素和α4β7整合素有效地结合,两者均表达于初始T细胞上。L选择素结合GlyCAM-1后可诱导高亲和力的受体,进而上调β2整合素介导的结合,但并不影响整合素表达的水平[224]。这种机制可使静息初始T细胞在不需要趋化因子的情况下结合及迁移入二级淋巴组织。由于T细胞表达多数趋化因子受体需要前T细胞的活化,因而这种机制显得尤为重要。因此,由L选择素启动的整合素结合可以特异性地促进初始T细胞的黏附或迁移,而趋化

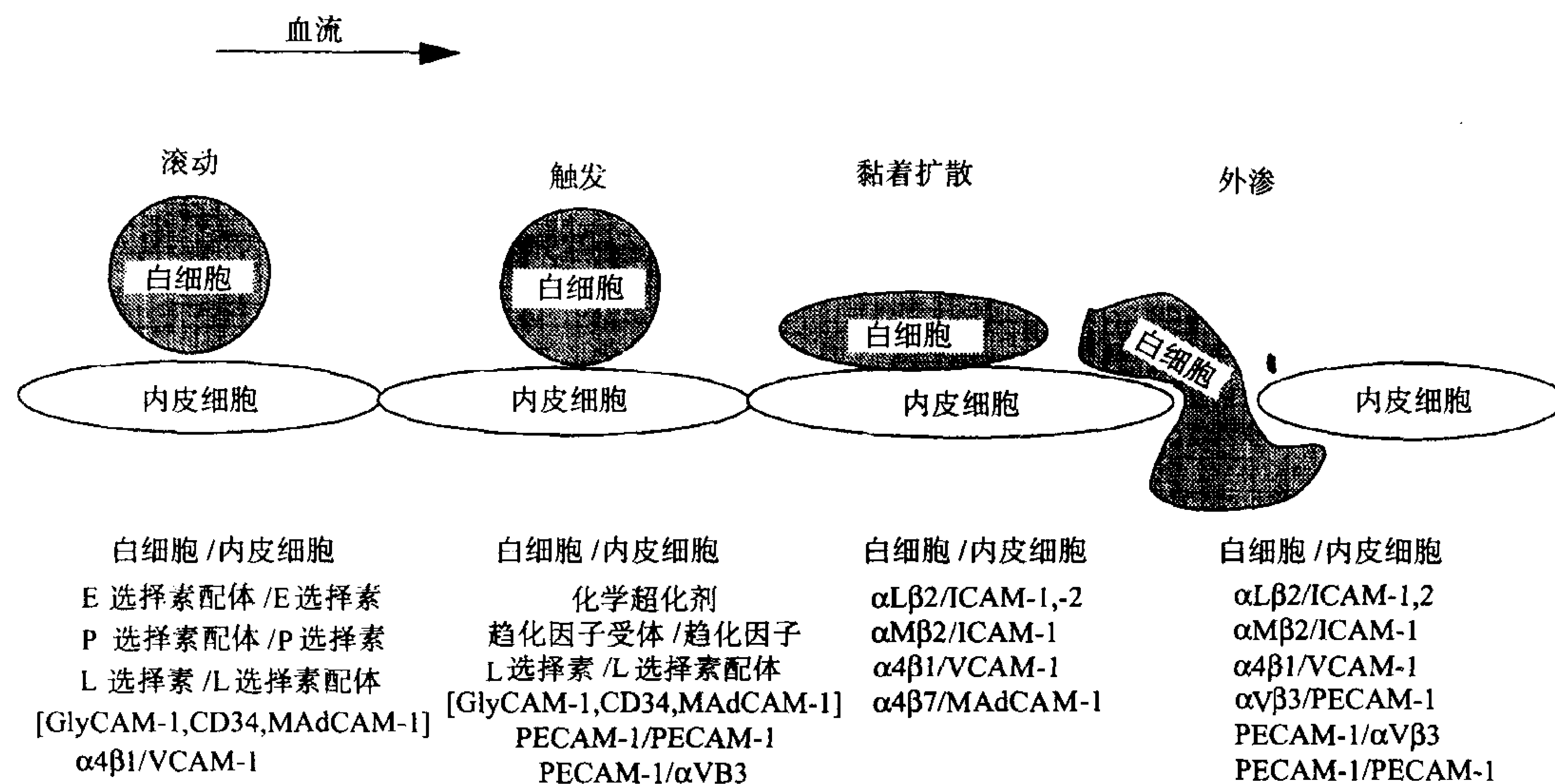


图 13.10 白细胞黏附及迁移出血流的多步骤模型。

因子诱导的整合素黏附对记忆/效应 T 细胞可能具有重要意义。

整合素功能的调节

T 细胞的迁移活性是免疫应答启动和进展的关键，该过程直接依赖于黏附和归巢受体的黏附特性。然而这一重要的过程引发一个疑问，黏附分子如何调节它们的结合活性，以保证迁移出、入内皮细胞和引流淋巴结所需要的结合-分离特性？淋巴细胞通过紧密调节整合素受体的亲合力和亲和力解决了这个问题。活化诱导的整合素胞外区构象变化可以调节整合素的结合，由此使低亲和力的受体变成高亲和力的受体[225,226]。这些构象的变化依赖特异性二价阳离子的存在，它们与整合素胞外区结合。将 β2 整合素结合的 Ca^{2+} 换成 Mg^{2+}；或将 β1 整合素的 Ca^{2+} 换成 Mn^{2+} 可导致受体与其配体的亲和力增强[227]。用构象特异性的标记性单克隆抗体在新近活化的效应/记忆 T 细胞上检测到高水平的活化型 αLβ2 的表达[228]。用抗原依赖或非依赖性的信号刺激 T 细胞可增强整合素的亲合力。单抗交联 CD3 可引发增强的 ICAM-1 与抗原呈递细胞或 ECM 蛋白的结合，该过程由 αLβ2 介导[229,230]。整合素介导的淋巴细胞亲合力受抗原非依赖性信号调节[231~233]。交联静息 T 细胞上 ICAM-3 或 CD28 可导致 αLβ2 受体亲和力的上升[231,234]。因而，整合素结合受到 TCR 依赖和非依赖信号事件的紧密调节，以促进细胞黏附和在抗原结合前或结合过程中增强 T 细胞活化。同时，受体-配体相互作用的总体亲合力能在不影响单个受体的亲和力的情况下被重新调节[235]。例如 PMA 诱导的整合素与 ICAM-1 或纤连蛋白结合的增强即是细胞骨架重新组织，诱导细胞扩散以及增强整合素整体亲合力，但不产生高亲和力整合素受体的一个结果[236,237]。亲合力能发生改变的机制包括侧向移动性增强[238]，招募受体到接触区域，或受体胞质区与细胞骨架成分加强的联系。

471

有趣的是，趋化因子诱导的整合素亲合力上调能通过影响整合素的亲合力和亲和力实现。趋化因子结合到它们的受体这一包含 G 蛋白的偶联分子的七个跨膜区上，通过一种不包括整合素受体胞外区构象改变的，肌动蛋白依赖的机制，调节 β1 和 β2 整合素与 VCAM-1，纤连蛋白，ICAM-1 的结合[216~218]。类似的效应也见于嗜酸性粒细胞趋化因子诱导的 α4β1 与 VCAM-1 的结合[239]。此外，趋化因子可以通过诱导构象改变诱导出高亲和力的整合素受体，如观察到的趋化因子暴露后，嗜酸性粒细胞表达的 αMβ2 高亲和力结合到 ICAM-1 上[239]。

传出/传入信号

活化诱导的整合素结合活性变化是由于细胞内的生化信号改变了细胞外的构象。整合素受体的传出信

号不同于整合素介导的，作为细胞外配体结合结果的传入信号。传出信号调节整合素结合的本质尚不清楚，但胞质部丝/苏氨酸、酪氨酸磷酸化是导致整合素与其配体亲合力上升的关键的调节因素。整合素胞质区保守的基序(NPXY)被鉴定为另一个重要的，受 PMA 诱导的整合素结合位点[240]。αLβ2 的 αL 链是组成型丝/苏氨酸磷酸化的，而 β2 链仅在 PMA 活化后其丝/苏氨酸才被磷酸化，提示蛋白激酶 C 的直接或间接作用。然而整合素转录后修饰的作用尚不清楚。虽然 β2 链的缺失突变研究已表明：包括三个连续的苏氨酸(Thr 758~760)的一 C 端 5 氨基酸伸展结构对 PMA 诱导的 β2 与 ICAM-1 的结合是关键的，但胞质区 N 端的 28 个氨基酸可以被去除。而且由构象特异性单抗进行的研究表明，去除 C 端的 5 氨基酸序列并不改变受体的亲合力，但阻止了结合所需的受体后事件[241]。虽然 PMA 刺激 T 细胞可诱导 β2 链丝氨酸 756 的磷酸化，但这一磷酸化并非 PMA 诱导的 β2 与 ICAM-1 的结合所需要[242]。CD2 和 CD28 诱导的 β1 整合素结合可被渥曼青霉素，一个 PI-3 激酶抑制剂阻断，提示这一激酶的活化可能是对诱导整合素结合起关键作用，同时已表明趋化因子受体介导的信号有一个小的鸟嘌呤三磷酸结合蛋白(GTP) Rho 家族参与[245]。

最近发现一个称为 cytohesin 或整合素调节蛋白(integrin regulating protein，IRP)的家族[246]。其中一个成员能特异性地通过它与 β2 胞质区的相互作用调节 β2 整合素的配体黏附。IRPS 通过一个叫做 sec-7 的结构域与整合素链相互作用，调节黏附的增强。Sec-7 功能区与酵母的一个控制高尔基体转运的蛋白质同源，且能作为 ARF 家族小 GTP 酶的 GTP 转换因子。有意思的是，IRP 的一个 Sec-7 结构域也具有 GTP 转换因子活性。此外，这些蛋白质包含一个血小板-白细胞 C 激酶底物(pleckstrin)同源区，且有两个 cytohesin 家族成员可结合 PtdIns(3,4,5)P3[247]，并可由 PI-3 激酶连结它们的功能。因此这一新型细胞内分子具有结合和调节整合素功能及作为桥连整合素与重要细胞内产生化通路分子编辑器的能力。

整合素分子的传出信号受到细胞表面分子和细胞内蛋白相互作用的调节。例如，CD47 分子，又知为整合素相关蛋白(integrin-associated protein，IAP)，是含一个单一胞外 Ig 样区的跨膜分子，可为整合素介导的 Ca^{2+} 内流形成钙离子通道，同时可调节多种 αVβ3 整合素-配体结合功能。相同地，抗体交联与 β3 和 β1 联系的四次跨膜 CD9 蛋白能影响 B 细胞上整合素结合活性[248]。已发现四个其他的四次跨膜蛋白，CD81、CD82、CD63 和 CD53 与 α4β1 相关[249]。纤维蛋白溶酶原活化受体(uPA-R)与 αLβ2 和 αMβ2 相关[250,251]，αMβ2 能通过 αM 中一个凝集素样位点与 FcRⅢβ(CD16)结合[252]。上述现象表明细胞表面分子相互作用可调节整合素结合与信号传导的早期事件。

最后，虽然众多研究都集中于如何通过细胞内的信号上调整合素结合功能方面，同样重要的是那些使 T 细胞与 ECM 或呈递细胞脱离的下调整合素结合的生化事件，起初对这一现象的观察来源于发现 αLβ2 介导的与 ICAM-1 的结合被能上升的细胞内 cAMP 水平，这一促进 cAMP-依赖激酶(PKA)活性的事件，[229]下调。这一激酶已表明可以破坏肌动蛋白丝，导致 αLβ2 与细胞骨架解离，降低整合素-配体相互作用的总体亲和力[253]。而且整合素高亲和力构象可以被 GTP 结合蛋白 H-Ras 和它的效应物激酶 Raf-1 改变。高亲和力整合素的结合与 EPK/MAP 激酶途径的活化相关[254]，提示 Ras 连接的 MAP 激酶途径可能在整合素功能中介导一个负反馈回路。

如前所述，抗原依赖及非依赖性 T 细胞与呈递细胞间的耦合作用能被抗 αLβ2 的单抗所阻断[161,162]。这证明这一黏附途径可作为黏胶把细胞聚在一起。然而，越来越清楚的是发现整合素结合也启动关键的细胞内信号事件。在 TCR 信号存在的情况下，膜结合形式或固化的可溶性 ICAM-1 交联 αLβ2 能增强 T 细胞增殖应答[255,256]。事实上一些整合素配体——包括 ICAM-2、ICAM-3 和 β2 整合素配体 VCAM-1，纤连蛋白和层粘连蛋白能在这一环境中为 T 细胞提供共刺激信号[257~260]。这种增强的 T 细胞应答性不单纯是黏附增强的结果[261]。整合素与配体结合后可以传递信号，辅助刺激促进 T 细胞增殖和细胞因子分泌。ICAM-1 和 VCAM-1 介导的共刺激可促进分泌各种细胞因子，如 IL-2、IL-4 和 IFN-γ[261]，与 CD28/B7 和 CD2/LFA-3 共刺激不同，ICAM-1 和 VCAM-1 衔接不刺激活化的 T 细胞，也不能诱导能换救 T 细胞于活化诱导的凋亡的存活信号[262]。此外，ICAM-1 和 VCAM-1 介导的 T 细胞活化能增强 CD28 的反应性[263,264]。β1 整合素介导能使一些非淋巴细胞免于凋亡的信号[265,266]，衔接玻连蛋白受体 αVβ2 对 γδT 细胞克隆有[213]辅刺激效应。然而，整合素介导的 T

472

细胞活化不限于辅刺激方面。抗原非依赖性的整合素活化 T 细胞能通过 α4β1 结合于 VCAM-1 发生,能在 T 细胞表面诱导分泌一个 720kDa 明胶酶[267]。T 细胞分泌的 methalloprotease,如明胶酶,被认为能够促进 T 细胞从内皮细胞基质膜的外渗[268]。

T 细胞整合素介导的确切信号传导途径将需进一步阐明,T 细胞结合到固化的纤连蛋白或抗 β1 整合素单克隆抗体可诱导多种信号事件,包括 PLC-γ1、pp59[fyn]、pp56[lck]、pp125[fak]、MAP 激酶[269]细胞骨架蛋白桩蛋白(paxillin)[272]。用抗体交联 T 细胞上的 αLβ2 或共固化的抗 CD3 单抗和 ICAM-1 能诱导延长的 PLC-α1 酪氨酸磷酸化[273],PIP_2 水解,和细胞内钙离子的持续升高[274,275]。相似的 αVβ2 整合素与 VCAM-1 交联不诱导 PLC-γ1 酪氨酸磷酸化,提示整合素调节特异性依赖于它们结合的配体[273]。整合素 β2 链的胞质区结合细胞骨架蛋白细丝蛋白[276],而 β2 整合素亚单位已有报道结合踝蛋白(talin)、α- 辅肌动蛋白和一个丝/苏氨酸激酶及整合素连接的激酶 p59[ilk][277,278]。在体外,非受体酪氨酸激酶局灶黏附激酶(pp125[fak])能结合包含 β1、β2 和 β3 整合素胞质尾部共有序列的 GST 融合蛋白[279]。β1 链信号连接到 FAK 的重要性通过功能性研究得以说明,该研究证明 T 细胞结合到纤连蛋白或 VCAM-1,与抗 CD3 抗体强烈地协同启动 β1 整合素介导的 FAK 酪氨酸磷酸化[280]。β1 与 FAK 的联结对整合素介导的信号尤为关键,因为 FAK 不仅可以作为细胞骨架分子如踝蛋白[281]和桩蛋白[270]的对接蛋白,而且与其他效应通路如 PI-3 激酶和 RAS 相联系。在纤维母细胞 β1 链结合纤连蛋白导致 FAK397 酪氨酸的自身磷酸化,导致非受体酪氨酸激酶 pp60[src]的结合,结合后可转磷酸化 FAK 到 Tyr925 上,使得 FAK 与 Grb-2 和 Sos 结合[282]。这些生化事件可以启动 Grb-2 或 Sos 活化 Ras,导致细胞增长和分化。此外,PI-3 激酶能同样通过 FAK 中的 Tyr397 自身磷酸化[283]导致细胞骨架重新组织和细胞移动性的改变。综合这些结果显示 FAK 在调节 T 细胞 β1 整合素传入信号中起关键作用。

体内整合素通路的重要性

整合素的免疫及生理学意义在天然缺失突变或通过遗传工程缺陷表达某个整合素链的个体中得到最好的阐明。在人类一个罕见的常染色体隐性遗传紊乱,1 型白细胞黏附缺陷(LDA-1),是由于缺少或缺陷表达 β2 整合素链,进而影响 αLβ2、αMβ2 和 αXβ2 表达[284]。这些个体常遭受细菌和真菌感染,伤口愈合功能减弱。这一紊乱影响白细胞与内皮细胞的结合、趋化性和吞噬作用。然而 T 细胞功能是亚有效性的,LDA-1 病人也可清除病毒感染,提示其他的黏附途径如 α4β1/VCAM-1 可能补偿 T 细胞上 β2 整合素的一些功能。这些研究已在 αLβ2 遗传缺陷的小鼠证实。αL 敲除小鼠显示正常的 CTL 抗病毒应答,但不能排斥免疫原性肿瘤[285,286]。αLβ2 和 ICAM-1 都缺陷的小鼠也观察到类似的抗病毒免疫应答的能力[287]。ICAM-1 缺陷小鼠能进一步抵抗脓毒性休克[288]及肾脏和大脑的缺血再灌注损伤[289,290]。有意思的是,这些小鼠不能显示超抗原诱导的 $CD4^+$ T 细胞增殖[291]。不幸的是,β1 整合素或 VCAM-1 缺陷的胚胎是不能发育的[292~295],因为胚胎的和胚外的循环系统发育缺陷[294,295]。然而可以用无 β1 整合素胚胎干细胞产生嵌合的小鼠。在这些情况下体内 T 和 B 细胞的发育均受到损害,因为缺少造血干细胞从卵黄囊到胎儿肝的归巢[296]。无 β7 嵌合小鼠证明 β7 整合素在肠相关免疫应答中的关键作用。这些整合素缺陷动物全无肠相关淋巴组织(GALT)[297]。无 α4 嵌合小鼠也由于缺乏 α4α7 的整合素表达因而也无 GALT,及此外伴随主要的 T 细胞和 B 细胞发育缺陷[298]。B 细胞分化阻止在前 B 细胞阶段,而 T 细胞数量和表型虽然在血流和二级淋巴器官正常,但在派尔集合淋巴结是异常的,此外,α4 缺陷小鼠与野生型相比,T 细胞数随年龄直线下降而胸腺快速退化。突变小鼠证明了这些分子在淋巴细胞发育和归巢中的重要作用。

这些研究结果带来一种在各种临床情况下应用整合素拮抗剂进行治疗的急切愿望,目前正在评价临床试验的效果。针对 αLβ1 和 ICAM-1 的抗体已用于移植模型以抑制移植排斥,以达到阻止白细胞迁移入移植物和细胞接触介导的移植物损伤。用特异性抗体处理已显示,仅通过用抗 ICAM-1 单抗预处理移植组织即能增强肾和胰岛同种移植物的存活[300]。事实上,在大鼠心脏移植模型中,短暂的联合应用抗 αLβ2 和抗 ICAM-1 单抗[301]或抗 α4 和抗 VCAM-1 单抗处理可以防止排斥和使受体耐受期延长[302]。整合素结合拮抗剂的治疗效果在各种不同自身免疫疾病中得到检测,阻断 α4β1 或 VCAM-1 防止 EAE 的被动转移[303]。有趣的是,在同一

模型中,针对趋化因子 MIP-1α 而不是 MCP-1 的抗体阻止了 EAE 的被动转移[304],提示 α4β1 介导的对脑内毛细血管内皮细胞的结合是通过这种趋化因子调节的。

整合素的生理学重要性不局限于免疫细胞功能。许多病原性有机物特异性地运用整合素或它们的配体实现它们的致病过程。已表明 αLβ1 整合素 I 区是埃可病毒的受体[305]。超过 90%的人鼻病毒这一普通感冒的病因,特异性地应用整合素配体 ICAM-1 作为一个受体[306,307]。事实上,已表明可溶性 ICAM-1 在实验模型中是一个有效的鼻病毒感染抑制剂[308,309]。原生动物寄生虫——恶性疟原虫引起的疟疾,以感染红细胞作为其生活周期的一部分,感染的红细胞结合于内皮细胞上的各种黏附分子[310],最近鉴定出的疟原虫红细胞膜蛋白-1 可以结合黏附分子 CD34,和 ICAM-1 及血小板凝血酶敏感蛋白[311]。感染的红细胞结合到脑血管活化内皮细胞上的 ICAM-1 被认为是常见的致死性大脑疾病的病因[312]。细菌也通过结合整合素感染细胞。侵袭素,一个假结核耶尔森氏菌来源的膜蛋白,可以结合 α4β1 整合素,甚至可以引发 T 细胞辅刺激信号[313]。另一个细菌膜蛋白 intimin,表达在内源性致病性大肠杆菌上,能结合 α4β1 和 α4β7 整合素[314]。

小结

T 细胞最重要的功能特征之一是它们可以贯穿整个机体进行自由迁移,经历紧密的细胞-细胞接触,或短暂或较长,这取决于 T 细胞遇到的细胞的本质。这个过程需要分子相互作用的复杂的调节,以允许细胞间黏附和脱黏附。整合素是细胞表面表达的异二聚体,它们决定性地参与了抗原依赖性和抗原非依赖性的 T 细胞与呈递细胞和 ECM 的黏附相互作用过程。尤其是 T 细胞表达的整合素 αLβ2 和 α4β1,α4β7 直接参与了归巢和外渗到组织的过程。αLβ2 以及 α4β1 在 T 细胞-APC 相互作用中发挥主要作用。结合配体的整合素受体可被细胞活化或传出信号迅速上调,这包括来自趋化因子受体,TCR/CD3 复合体和各种辅助分子的信号。增强的整合素受体结合受下面因素的影响,通过异二聚体胞外部分构象改变而上调整合素受体亲和力以及,通过改变受体后配体结合事件而上调总体亲合力,导致细胞的渗出;此外,整合素能在结合其配体后以一种传入方式传导信号。整合素的重要性已经在器官移植、体内感染和自身免疫病模型明显地表现出来,上述结果促进了整合素拮抗剂在临床实践中的应用。

(韩根成 译)

参考文献

1. Cantor H, Boyse EA. Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *J Exp Med* 1975;141:1376–1389.
2. Boumsell L, Bernard A, Coppin H, et al. Human T cell differentiation antigens and correlation of their expression with various markers of T cell maturation. *J Immunol* 1979;123:2063–2067.
3. CD Antigens 1996. *Immunol Today* 1997;18:100–101.
4. Burnet FM. *The Clonal Selection Theory of Immunity.* Nashville, TN: Vanderbilt University Press, 1959.
5. Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonself discrimination. *Science* 1970; 169:1042–1049.
6. Lafferty KJ, Gill RG. The maintenance of self-tolerance. *Immunol Cell Biol* 1993;71:209–214.
7. Jenkins MK, Pardoll DM, Mizuguchi J, Quill H, Schwartz RH. T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: Fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. *Immunol Rev* 1987;95:113–135.
8. June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994;15:321–331.
9. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 1991;173:721–730.
10. Gross JA, Callas, E, Allison, JP. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J Immunol* 1992;149:380–388.
11. Lafage-Pochitaloff M, Costello R, Couez D, et al. Human CD28 and CTLA-4 Ig superfamily genes are located on chromosome 2 at bands q33-q34. *Immunogenetics* 1990;31:198–201.
12. Howard TA, Rochell JM, Seldin MF. CD28 and CTLA-4, two related members of the Ig supergene family, are tightly linked on proximal mouse chromosome 1.
13. Lee KP, Taylor C, Petryniak B, Turka LA, June CH, Thompson CB. The genomic organization of the CD28 gene. Implications for the regulation of CD28 mRNA expression and heterogeneity. *J Immunol* 1990;145:344–352.
14. Lindsten T, Lee KP, Harris ES, et al. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol* 1993;151:3489–3499.
15. Parsons KR, Young JR, Collins BA, Howard CJ. Cattle CTLA-4, CD28 and chicken CD28 bind CD86: MYPPPY is not conserved in cattle CD28. *Immunogenetics* 1996;43:388–391.
16. Linsley PS, Bradshaw J, Urnes M, Grosmaire L, Ledbetter JA. CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling. *J Immunol* 1993;150:3161–3169.
17. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature* 1987;328:267–270.
18. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 1991;174: 561–569.
19. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994;1:405–413.
20. Lindsten T, Lee KP, Harris ES, et al. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol* 1993;151:3489–3499.
21. Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattëi MG, Luciani MF, Golstein P. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* 1991;147:1037–1044.
22. Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1994;1:793–801.
23. Dariavach P, Mattëi MG, Golstein P, Lefranc MP. Human Ig superfamily CTLA-4

gene: Chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 1988;18:1901–1905.
24. Linsley PS, Greene JL, Tan P, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1992;176:1595–1604.
25. Linsley J, Nadler SG, Bajorath J, et al. Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules. *J Biol Chem* 1995;270:15417–15424.
26. Shiratori T, Miyatake S, Ohno H, et al. Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity* 1997;6:583–589.
27. Alegre ML, Noel PJ, Eisfelder BJ, et al. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J Immunol* 1996;157:4762–4770.
28. Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 1996;183:2541–2550.
29. Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5031–5035.
30. Freeman GJ, Gray GS, Gimmi CD, et al. Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7. *J Exp Med* 1991;174:625–631.
31. Freeman GJ, Disteche, CM, Gribben JG, et al. The gene for B7, a costimulatory signal for T-cell activation, maps to chromosomal region 3q13.3-3q21. *Blood* 1992;79:489–494.
32. Fernandez-Ruiz E, Somoza C, Sanchez-Madrid F, Lanier LL. CD28/CTLA-4 ligands: The gene encoding CD86 (B70/B7.2) maps to the same region as CD80 (B7/B7.1) gene in human chromosome 3q13-q23. *Eur J Immunol* 1995;25: 1453–1456.
33. Lenschow DJ, Su GH-T, Zuckerman LA, et al. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90: 11054–11058.
34. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, et al. Cloning of B7-2: A CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 1993;262: 909–911.
35. Azuma MD, Ito H, Yagita K, et al. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 1993;366:76–78.
36. Truneh A, Reddy M, Ryan P, Lyn SD. Differential recognition by CD28 of its cognate counter receptors CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2): Analysis by site-directed mutagenesis. Mol Immunol 1996;33:321–334.
37. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 System of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233–258.
38. Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, et al. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: Abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 1994;180:1849–1860.
39. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, et al. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 1994;180:1841–1847.
40. Prabhu Das MR, Zamvil SS, Borriello F, Weiner HL, Sharpe AH, Kuchroo VK. Reciprocal expression of costimulatory molecules, B7-1 and B7-2, on murine T cells following activation. *Eur J Immunol* 1995;25:207–211.
41. Freeman GJ, Freedman AS, Segil JM, Lee G, Whitman JF, Nadler LM. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J Immunol* 1989;143:2714–2722.
42. Stack RM, Lenschow DJ, Gray GS, Bluestone JA, Fitch FW. IL-4 treatment of small splenic B cells induces costimulatory molecules B7-1 and B7-2. *J Immunol* 1994;152:5723–5733.
43. Barcy SM, Wettendorff O, Leo J, et al. FcR cross-linking on monocytes results in impaired T cell stimulatory capacity. *Int Immunol* 1995;7:179–189.
44. Ozawa H, Aiba S, Nakagawa S, Tagami H. Interferon-gamma and interleukin-10 inhibit antigen presentation by Langerhans cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7-1) expression. *Eur J Immunol* 1996;26:648–652.
45. Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Amieson JC. Activation-induced by apoptosis in CD4- cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 1992;175:331–340.
46. Punt JA, Osborne BA, Takahama Y, Sharrow SO, Singer A. Negative selection of CD4+CD8+ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *J Exp Med* 1994;179:709–713.
47. Amsen D, Kruisbeek AM. CD28-B7 interactions function to co-stimulate clonal deletion of double-positive thymocytes. *Int Immunol* 1996;8:1927–1936.
48. Walunas TL, Sperling AI, Khattri R, Thompson CB, Bluestone JA. CD28 expression is not essential for positive and negative selection of thymocytes or peripheral T cell tolerance. *J Immunol* 1996;156:1006–1013.
49. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995;3:541–547.
50. Chambers CA, Cado D, Truong T, Allison JP. Thymocyte development is normal in CTLA-4-deficient mice. *Proc Nat Acad Sci* 1997;94:9296–9301.
51. Shahinian AK, Pfeffer K, Lee TM, et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 1993;261:609–612.
52. Green JM, Noel PJ, Sperling AI, et al. Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* 1994;1:501–508.
53. Seder RA, Germain RN, Linsley PS, Paul WE. CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production. *J Exp Med* 1994;179:299–304.
54. Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 1991;251:313–316.
55. Lindsten T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 1989;244:339–342.
56. Cerdan C, Martin Y, Couroul M, Mawas C, Birg F, Olive D. CD28 costimulation upregulates long-term IL-2R beta expression in human T cells through combined transcriptional and post-transcriptional regulation. *J Immunol* 1995;154:1007–1013.
57. Ward SG. CD28: a signaling perspective. *Biochem J* 1996;318:361–377.
58. Sperling AI, Bluestone JA. The complexities of T cell co-stimulation: CD28 and beyond. *Immunol Rev* 1996;153:155–182.
59. Muraille E, DeBecker G, Bakkus M, et al. Co-stimulation lowers the threshold for activation of naive T cells by bacterial superantigens. *Int Immunol* 1995;7: 295–304.
60. Sperling AI, Auger JA, Ehst BD, Rulifson IC, Thompson CB, Bluestone JA. CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. *J Immunol* 1996;157:3909–3917.
61. Rulifson IC, Sperling AI, Fields PE, Fitch FW, Bluestone JA. CD28 co-stimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J Immunol* 1997;158:658–665.
62. Warnier G, Duffour MT, Uyttenhove C, et al. Induction of a cytolytic T-cell response in mice with a recombinant adenovirus coding for tumor antigen P815A. *Int J Cancer* 1996;67:303–310.
63. Linsley PS, Greene JL, Tan P, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1992;176:1595–1604.
64. Wu Y, Guo Y, Huang A, Zheng P, Liu Y. CTLA-4-B7 interaction is sufficient to costimulate T cell clonal expansion. *J Exp Med* 1997;185:1327–1335.
65. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 deliver opposing signals which regulate the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 1995;182:459–65.
66. Bluestone JA. Commentary: Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance? *J Immunol* 1997;158:1989–1993.
67. Donner H, Rau H, Walfish PG, et al. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:143–146.
68. Raab M, Cai Y-C, Bunnell SC, Heyeck SD, Berg LJ, Rudd CE. $p56^{Lck}$ and $p59^{Fyn}$ regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3-kinase, growth factor receptor-bound protein GRB-2, and T cell-specific protein-tyrosine kinase ITK: Implications for T-cell costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8891–8895.
69. Su B, Jacinto E, Hibi M, Kallunki T, Karin M, Ben-Neriah Y. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 1994;77:727–736.
70. Nunes JA, Battifora M, Woodgett JR, Truneh A, Olive D, Cantrell DA. CD28 signal transduction pathways. A comparison of B7-1 and B7-2 regulation of the MAP kinases: ERK2 and JUN kinases. *Mol Immunol* 1996;33:63–70.
71. Li W, Whaley CD, Mondino A, Mueller DL. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells. *Science* 1996;271: 1272–1276.
72. Fields PE, Gajewski TF, Fitch FW. Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells. *Science* 1996;71:1276–1278.
73. Lai JH, Horvath G, Li Y, Tan TH. Mechanisms of enhanced nuclear translocation of the transcription factors c-Rel and NF-kappa B by CD28 costimulation in human T lymphocytes. *Ann NY Acad Sci* 1995;766:220–223.
74. August A, Gibson S, Kawakami Y, Kawakami T, Mills GB, Dupont B. CD28 is associated with and induces the immediate tyrosine phosphorylation and activation of the Tec family kinase ITK/EMT in the human Jurkat leukemic T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9347–9351.
75. Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 1996;4:535–543.
76. Waterhouse P, Marengere LE, Mittrucker HW, Mak TW. CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunol Rev* 1996;153:183–207.
77. Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, et al. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol* 1995;154:97–105.
78. Yang G, Hellstrom KE, Hellstrom I, Chen L. Antitumor immunity elicited by tumor cells transfected with B7-2, a second ligand for CD28/CTLA-4 costimulatory molecules. *J Immunol* 1995;154:2794–2800.
79. Borriello F, Sethna MP, Boyd SD, et al. B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1997;6:303–313.
80. Bluestone JA, Miller S. The yin/yang of CD28 T-cell costimulation in autoimmunity. In: Banchereau J, Dodet B, Schwartz R, Trannoy E, eds. *Immune Tolerance*. Paris: Elsevier, 1996:105–113.
81. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: Application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995;80:707–718.
82. Kawai K, Shahinian A, Mak TW, Ohashi PS. Skin allograft rejection in CD28-deficient mice. *Transplantation* 1996;61:352–355.
83. Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhlmann JE, Noelle RJ. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* 1996;14:591–617.

84. Romagnani S. Role for CD30 antigen in human T helper 2-type responses. *Ciba Found Symp* 1995;195:55–62.
85. Kehry MR. CD40-mediated signaling in B cells balancing cell survival, growth, and death. *J Immunol* 1996;156:2345–2348.
86. Ishida T, Kobayashi N, Tojo T, Ishida S, Yamamoto T, Inoue J. CD40 signaling-mediated induction of Bcl-XL, Cdk4, and Cdk6. Implication of their cooperation in selective B cell growth. *J Immunol* 1995;155:5527–5535.
87. Blotta MH, Marshall JD, DeKruyff RH, Umetsu DT. Cross-linking of the CD40 ligand on human CD4+ T lymphocytes generates a costimulatory signal that up-regulates IL-4 synthesis. *J Immunol* 1996;156:3133–3140.
88. Barrett TB, Shu G, Clark EA. CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells. *J Immunol* 1991;151:1722–1729.
89. Ding L, Green JM, Thompson CB, Shevach EM. B7/CD28-dependent and -independent induction of CD40 ligand expression. *J Immunol* 1995;155:5124–5132.
90. Grewal IS, Flavell RA. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* 1996;153:85–106.
91. Hollander GA, Castiglia E, Kulbacki R, et al. Induction of alloantigen-specific tolerance by B cells from CD40-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:4994–4998.
92. Smith CA, Gruss H-J, Davis T, et al. CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell* 1993;73:1349–1360.
93. Bowen MA, Lee RK, Miragliotta G, Nam SY, Podack ER. Structure and expression of murine CD30 and its role in cytokine production. *J Immunol* 1996;156:442–449.
94. Duckett CS, Gedrich RW, Gilfillan C, Thompson CB. Induction of nuclear factor B by the CD30 receptor is mediated by TRAF1 and TRAF2. *Mol Cell Biol* 1997;17:1535–1542.
95. Del Prete G, Maggi E, Pizzolo G, Romagnani S. CD30, Th2 cytokines and HIV infection: A complex and fascinating link. *Immunol Today* 1995;16:76–80.
96. Hurtado JC, Kim SH, Pollok KE, Lee ZH, Kwon BS. Potential role of 4-1BB in T cell activation. Comparison with the costimulatory molecule CD28. *J Immunol* 1995;155:3360–3367.
97. Kim Y-J, Kim SH, Kwon BS. Human 4-1BB (CD137) signal regulates CD28 costimulation to promote type I cytokines. *Eur J Immunol* 1998;28:881–890.
98. Romagnani S. Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:225–235.
99. Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Gray GS, Vallera DA. Co-blockade of the LFA1-ICAM and CD28/CTLA4:B7 pathways is a highly effective means of preventing acute lethal graft-versus-host disease induced by fully major histocompatibility complex-disparate donor grafts. *Blood* 1995;85:2607–2618.
100. Judge TA, Tang A, Turka LA. Immunosuppression through blockade of CD28:B7-mediated costimulatory signals. *Immunol Res* 1996;15:38–49.
101. Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996;381:434–438.
102. Ferguson SE, Han S, Kelsoe G, Thompson CB. CD28 is required for germinal center formation. *J Immunol* 1996;156:4576–4581.
103. Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: Expression and function. *J Exp Med* 1994;180:631–640.
104. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996;271:1734–1736.
105. Bierer BE, Sleckman BP, Ratnofsky SE, Burakoff SJ. The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Annu Rev Immunol* 1989;7:579–599.
106. Collins TL, Hahn WC, Bierer BE, Burakoff SJ. CD4, CD8 and CD2 in T cell adhesion and signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 1993;184:223–233.
107. Yagita H, Nakamura T, Asakawa J, et al. CD2 expression in murine B cell lineage. *Int Immunol* 1989;1:94–98.
108. Williams AF, Barclay AN, Clark SJ, Paterson DJ, Willis AC. Similarities in sequences and cellular expression between rat CD2 and CD4 antigens. *J Exp Med* 1987;165:368–380.
109. Davis SJ, van der Merwe PA. The structure and ligand interactions of CD2: Implications for T-cell function. *Immunol Today* 1996;17:177–187.
110. Seed B, Aruffo A. Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:3365–3369.
111. Peterson A, Seed B. Monoclonal antibody and ligand binding sites of the T cell erythrocyte receptor (CD2). *Nature* 1987;329:842–846.
112. Bernard A, Knowles RW, Naito K, et al. A unique epitope on the CD2 molecule defined by the monoclonal antibody 9-1: Epitope-specific modulation of the E-rosette receptor and effects on T-cell functions. *Hum Immunol* 1986;17:388–405.
113. Meuer SC, Hussey RE, Fabbi M, et al. An alternative pathway of T-cell activation: A functional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* 1984;36:897–906.
114. Li J, Smolyar A, Sunder-Plassmann R, Reinherz EL. Ligand-induced conformational change within the CD2 ectodomain accompanies receptor clustering: Implication for molecular lattice formation. *J Mol Biol* 1996;263:209–226.
115. Collins TL, Kassner PD, Bierer BE, Burakoff SJ. Adhesion receptors in lymphocyte activation. *Curr Biol* 1994;6:385–393.
116. Selvaraj P, Plunkett ML, Dustin M, Sanders ME, Shaw S, Springer TA. The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. *Nature* 1987;326:400–403.
117. Shaw S, Luce GE, Quinones R, Gress RE, Springer TA, Sanders ME. Two antigen-independent adhesion pathways used by human cytotoxic T-cell clones. *Nature* 1986;323:262–264.
118. Takai Y, Reed ML, Burakoff SJ, Herrmann SH. Direct evidence for a receptor-ligand interaction between the T-cell surface antigen CD2 and lymphocyte-function-associated antigen 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:6864–6868.
119. Kato K, Koyanagi M, Okada H, et al. CD48 is a counter-receptor for mouse CD2 and is involved in T cell activation. *J Exp Med* 1992;176:1241–1249.
120. van der Merwe PA, McPherson DC, Brown MH, et al. The NH2-terminal domain of rat CD2 binds rat CD48 with a low affinity and binding does not require glycosylation of CD2. *Eur J Immunol* 1993;23:1373–1377.
121. Dustin ML, Sanders ME, Shaw S, Springer TA. Purified lymphocyte function-associated antigen 3 binds to CD2 and mediates T lymphocyte adhesion. *J Exp Med* 1987;165:677–692.
122. Hahn WC, Rosenstein Y, Calvo V, Burakoff SJ, Bierer BE. A distinct cytoplasmic domain of CD2 regulates ligand avidity and T-cell responsiveness to antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:7179–7183.
123. Krensky AM, Sanchez-Madrid F, Robbins E, et al. The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2, and LFA-3: Cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J Immunol* 1983;131:611–616.
124. Palacios R, Martinez-Maza O. Is the E receptor on human T lymphocytes a "negative signal receptor"? *J Immunol* 1982;129:2479–2485.
125. Bernard A, Knowles RW, Naito K, et al. A unique epitope on the CD2 molecule defined by the monoclonal antibody 9-1: Epitope-specific modulation of the E-rosette receptor and effects on T-cell functions. *Hum Immunol* 1986;17:388–405.
126. Mollereau B, Deckert M, Deas O, et al. CD2-induced apoptosis in activated human peripheral T cells: A Fas-independent pathway that requires early protein tyrosine phosphorylation. *J Immunol* 1996;156:3184–3190.
127. Guckel B, Berek C, Lutz M, Altevogt P, Scirrmacher V, Dyewski BA. Anti-CD2 antibodies induce T cell unresponsiveness in vivo. *J Exp Med* 1991;174:957–967.
128. Semnani RT, Nutman TB, Hochman P, Shaw S, van Seventer GA. Costimulation by purified intercellular adhesion molecule 1 and lymphocyte function-associated antigen 3 induces distinct proliferation, cytokine and cell surface antigen profiles in human naive and memory CD4+ T cells. *J Exp Med* 1994;180:2125–2135.
129. Cerdan C, Martin Y, Brailly H, et al. IL-1 alpha is produced by T lymphocytes activated via the CD2 plus CD28 pathways. *J Immunol* 1991;146:560–564.
130. Cerdan C, Razanajaona D, et al. Contributions of the CD2 and CD28 T lymphocyte activation pathways to the regulation of the expression of the colony-stimulating factor (CSF-1) gene. *J Immunol* 1992;149:373–379.
131. Santi, AG, Campanero MR, Alonso JL, Sanchez-Madrid F. Regulation of tumor necrosis factor (TNF)-α synthesis and TNF receptors expression in T lymphocytes through the CD2 activation pathway. *Eur J Immunol* 1992;22:1253–1259.
132. Van der Pouw-Kraan T, Van Kooten C, Rensink I, Aarden L. Interleukin (IL)-4 production by human T cells: Differential regulation of IL-4 vs. IL-2 production. *Eur J Immunol* 1992;22:1237–1241.
133. Valentine H, Groux H, Gelin C, Chretien I, Bernard A. Modulation of lymphokine release and cytolytic activities by activating peripheral blood lymphocytes via CD2. *J Immunol* 1990;144:875–882.
134. Gollob JA, Ritz J. CD2-CD58 interaction and the control of T-cell interleukin-12 responsiveness. Adhesion molecules link innate and acquired immunity. *Ann NY Acad Sci* 1996;795:71–81.
135. Qin L, Chavin KD, Lin J, Yagita H, Bromberg JS. Anti-CD2 receptor and anti-CD2 ligand (CD48) antibodies synergize to prolong allograft survival. *J Exp Med* 1994;179:341–346.
136. Chavin KD, Qin L, Lin, J, Woodward et al. Anti-CD48 (murine CD2 ligand) mAbs suppress cell mediated immunity in vivo. *Int Immunol* 1994;6:701–709.
137. Chavin KD, Qin L, Yon R, Lin J, Yagita H, Bromberg JS. Anti-CD2 mAbs suppress cytotoxic lymphocyte activity by the generation of Th2 suppressor cells and receptor blockade. *J Immunol* 1994;152:3729–3739.
138. Woodward JE, Qin L, Chavin KD, et al. Blockade of multiple costimulatory receptors induces hyporesponsiveness: Inhibition of CD2 plus CD28 pathways. *Transplantation* 1996;62:1011–1018.
139. Kapur S, Khanna A, Sharma VK, Li B, Suthanthiran M. CD2 antigen targeting reduces intragraft expression of mRNA-encoding granzyme B and IL-10 and induces tolerance. *Transplantation* 1996;62:249–255.
140. Kaplon RJ, Hochman PS, Michler RE, et al. Short course single agent therapy with an LFA-3-IgG1 fusion protein prolongs primate cardiac allograft survival. *Transplantation* 1996;61:356–363.
141. Cavazzana-Calvo M, Bordigoni P, Michel G, et al. A phase II trial of partially incompatible bone marrow transplantation for high-risk acute lymphoblastic leukaemia in children: Prevention of graft rejection with anti-LFA-1 and anti-CD2 antibodies. Societe Francaise de Greffe de Moelle Osseuse. *Br J Hematol* 1996;93:131–138.
142. Holter W, Schwarz M, Cerwenka A, Knapp W. The role of CD2 as a regulator of human T-cell cytokine production. *Immunol Rev* 1996;153:107–122.
143. Beyers AD, Spruyt LL, Williams AF. Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8

and CD5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2945–2949.

144. Janeway CA Jr. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:645–674.
145. Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: An emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 1994;12:85–116.
146. Stamenkovic I, Sgroi D, Aruffo A, Sy MS, Anderson T. The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and α2-6 sialytransferase, CD75, on B cell. *Cell* 1991;66:1133–1144.
147. Uemura K, Yokota Y, Kozutsumi Y, Kawasaki T. A unique CD45 glycoform recognized by the serum mannan-binding protein in immature thymocytes. *J Biol Chem* 1996;271:4581–4584.
148. Hovis RR, Donovan JA, Musci MA, et al. Rescue of signaling by a chimeric protein containing the cytoplasmic domain of CD45. *Science* 1993;260:544–546.
149. Frearson JA, Alexander DR. Protein tyrosine phosphatase in T-cell development, apoptosis and signalling. *Immunol Today* 1996;17:385–391.
150. Kishihara K, Penninger J, Wallace VA, et al. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* 1993;74:143–156.
151. Justement LB, Brown VK, Lin J. Regulation of B-cell activation by CD45: A question of mechanism. *Immunol Today* 1994;15:399–405.
152. Domiati-Saad R, Ogle EW, Justement LB. Administration of anti-CD45 mAb specific for a B cell-restricted epitope abrogates the B cell response to a T-dependent antigen in vivo. *J Immunol* 1993;151:5936–5947.
153. Byth KF, Conroy LA, Howlett S, et al. CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4-CD8- thymocytes, and B cell maturation. *J Exp Med* 1996;183: 1707–1718.
154. Novak TJ, Farber D, Leitenberg D, Hong SC, Johnson P, Bottomly K. Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition. *Immunity* 1994;1:109–119.
155. Lazarovits AI, Poppema S, Zhang Z, et al. Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB. *Nature* 1996;380:717–720.
156. Goldberg LC, Bradley JA, Connolly J, et al. Anti-CD45 monoclonal antibody perfusion of human renal allografts prior to transplantation. A safety and immunohistological study. CD45 Study Group. *Transplantation* 1995;59:1285–1293.
157. Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK, Marlin SD. The lymphocyte function associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: Cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol* 1987;5:223–252.
158. Martz E. LFA-1 and other accessory molecules functioning in adhesions of T and B lymphocytes. *Hum Immunol* 1987;18:3–37.
159. Sanders VM, Snyder JM, Uhr JW, Vitetta ES. Characterization of the physical interaction between antigen-specific B and T cells. *J Immunol* 1986;137: 2395–2404.
160. Golde WT, Kappler JW, Greenstein J, Malissen B, Hood L, Marrack P. Major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. VIII. Role of the LFA-1 molecules. *J Exp Med* 1985;161;635–640.
161. Spits H, an Schooten W, Keizer G, et al. Alloantigen recognition is preceded by nonspecific adhesion of cytotoxic T cells and target cells. *Science* 1986;232: 403–405.
162. Shaw S, Luce GE. The lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 and CD2/LFA-3 pathways of antigen-independent human T cell adhesion. *J Immunol* 1987;139:1037–1045.
163. Shimizu Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *FASEB J* 1991;5:2292–2299.
164. Hynes RO. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 1987;48:549–554.
165. Corbi AL, Larson RS, Kishimoto TK, Springer TA, Morton CC. Chromosomal location of the genes encoding the leukocyte adhesion receptors LFA-1, Mac-1 and p150,95. Identification of a gene cluster involved in cell adhesion. *J Exp Med* 1988;167:1597–1607.
166. Wong DA, Davis EM, LeBeau M, Springer TA. Cloning and chromosomal localization of a novel gene-encoding a human beta 2-integrin alpha subunit. *Gene* 1996;171:291–294.
167. Fernandez-Ruiz E, Pardo-Manuel de Villena F, Rubio MA, Corbi AL, Rodriguez de Cordoba S, Sanchez-Madrid F. Mapping of the human VLA-alpha 4 gene to chromosome 2q31-q32. *Eur J Immunol* 1992;22:587–590.
168. Fernandez-Ruiz E, Pardo-Manuel de Villena F, Rodriguez de Cordoba S, Sanchez-Madrid F. Regional localization of the human vitronectin receptor alpha subunit gene (VNRA) to chromosome 2q31→q32. *Cytogenet Cell Genet* 1993;62:26–28.
169. Wu JS, Giuffra LA, Goodfellow PJ, et al. The beta subunit locus of the human fibronectin receptor: DNA restriction fragment length polymorphism and linkage mapping studies. *Hum Genet* 1989;83:383–390.
170. Shevach EM. Accessory molecules. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*, 3rd ed. New York: Raven, 1992:531–575.
171. Stewart M, Thiel M, Hogg N. Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7:690–696.
172. Lee JO, Rieu P, Arnaout MA, Liddington R. Crystal stucture of the A-domain from the a-subunit of the integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* 1995;80:631–638.
173. Loftus JC, Smith JW, Ginsberg MH. Integrin-mediated cell adhesion: The extracellular face. *J Biol Chem* 1994;269:25235–25238.
174. Bajt ML, Goodman T, MacGuire SL. Mutation of a ligand binding domain of 3 integrin. *J Biol Chem* 1994;269:20913–20919.
175. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301–314.
176. Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, DeSales L, Steinman RM. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1990;171:1753–1771.
177. Hoshino T, Yamada A, Honda J, et al. Tissue-specific distribution and age-dependent increase of human CD11b- T cells. *J Immunol* 1993;151:2237–2246.
178. Van der Vieren M, Le Trong H, Wood CL, et al. A novel leukointegrin, αdβ2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity* 1995;3:683–690.
179. Dalinenko DM, Rossitto PV, Van der Vieren M, et al. A novel canine leukointegrin, alphadbeta2, is expressed by specific macrophage subpopulations in tissue and in a minor CD8+ lymphocyte subpopulation in pheripheral blood. *J Immunol* 1995;155:35–44.
180. de Fougerolles AR, Stacker SA, Schwarting R, Springer TA. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp Med* 1991;174:253–267.
181. de Fougerolles AR, Springer TA. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J Exp Med* 1992;175:185–190.
182. Fawcett J, Holness CLL, Needham LA, et al. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* 1992;360:481–488.
183. Tian L, Yoshihara Y, Mizuno T, Mori K, Gahmberg CG. The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. *J Immunol* 1997;158:928–936.
184. Mizuno T, Yoshihara Y, Inazawa J, Kagamiyama H, Mori K. cDNA cloning and chromosomal localization of the human telencephalin and its distinctive interaction with lymphocyte function-associated antigen-1. *J Biol Chem* 1997;272: 1156–1163.
185. Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 1991;65:961–971.
186. Blackford J, Reid HW, Pappin DJC, Bowers FS, Wilkinson JM. A monoclonal antibody, 3/22, to rabbit CD11c which induces homotypic T cell aggregation: Evidence that ICAM-1 is a ligand for CD11c/CD18. *Eur J Immunol* 1996;26: 525–531.
187. Ingalls RR, Gollenbock DT. CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1995;181:1473–1479.
188. Hemler ME. VLA proteins in the integrin family: Structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 1990;8:365–400.
189. Osborn L, Hession C, Tizard R, et al. Direct cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 1989;59:1203–1211.
190. Pepinsky B, Hession C, Chen L, et al. Structure/function studies on vascular cell adhesion molecule-1. *J Biol Chem* 1992;267:17820–17826.
191. Cybulsky MI, Fries JW, Williams AJ, et al. Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7859–7863.
192. Moy P, Lobb R, Tizard R, et al. Cloning of an inflammatory-specific phosphatidyl inosotol-linked form of murine vascular cell adhesion molecule-1. *J Biol Chem* 1993;268:8835–8841.
193. Vonderheide RH, Tedder TF, Springer TA, Staunton DE. Residues within a conserved amino acid motif of domains 1 and 4 of VCAM-1 are required for binding of VLA-4. *J Cell Biol* 1994;125:215–222.
194. Elices MJ, Osborn L, Tanaka Y, et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 1990;60:577–584.
195. Altevogt P, Hubbe M, Ruppert M, et al. The α4 integrin chain is a ligand for α4β7 and α4β1. J Exp Med 1995;182:345–355.
196. Teixido J, Parker CM, Kassner PD, Hemler ME. Functional and structural analysis of VLA-4 integrin α4 subunit cleavage. *J Biol Chem* 1992;267:1786–1791.
197. Shimizu Y, van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. Costimulation of proliferative responses of resting CD4- T cells by the interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin. *J Immunol* 1990;145:59–67.
198. Hemler ME, Jacobson JG, Brenner MB, Mann D, Strominger JL. VLA-1: A T cell surface antigen which defines a novel late stage of human T cell activation. *Eur J Immunol* 1985;15:502–508.
199. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272: 60–66.
200. Hu MCT, Crowe DT, Weissman IL, Holzmann B. Cloning and expression of mouse integrin beta p(beta 7): A functional role in Peyer's patch-specific lymphocyte homing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:8254–8258.
201. Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, et al. Alpha4 beta7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MadCAM-1. *Cell* 1993;74:185–195.
202. Andrew DP, Berlin C, Honda S, et al. Distinct but overlapping epitopes are involved in alpha 4 beta 7-mediated adhesion to vascular cell adhesion molecule-1, mucosal addressin-1, fibronectin, and lymphocyte aggregation. *J Immunol* 1994;153:3847–3861.
203. Sampaio SO, Li X, Takeuchi M, et al. Organization, regulatory sequences, and

alternatively spliced transcripts of the mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) gene. *J Immunol* 1995;155:2477–2486.
204. Briskin MJ, McEvoy LM, Butcher EC. MadCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. *Nature* 1993; 363:461–464.
205. Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MadCAM-1. *Nature* 1993;366:695–698.
206. Mebius RE, Streeter PR, Michie S, Butcher EC, Weissman IL. A developmental switch in lymphocyte homing receptor and endothelial vascular addressin expression regulates lymphocyte homing and permits $CD4^{+}$ $CD3^{-}$ cells to colonize lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11019–11024.
207. Sikorski EE, Hallmann R, Berg EL, Butcher EC. The Peyer's patch high endothelial receptor for lymphocytes, the mucosal vascular addressin, is induced on a murine endothelial cell line by tumor necrosis factor-alpha and IL-1. *J Immunol* 1993;151:5239–5250.
208. Hernandez-Caselles T, Martinez-Esparza M, Lazarovits AI, Aparicio P. Specific regulation of VLA-4 and alpha 4 beta 7 integrin expression on human activated T lymphocytes. *J Immunol* 1996;156:3668–3677.
209. Cepek KL, Parker CM, Madara JL, Brenner MB. Integrin $\alpha_E\beta_7$ mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol* 1993;150:3459–3470.
210. Cepek KL, Shaw SK, Parker CM. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-Cadherin and the $\alpha_E\beta_7$ integrin. *Nature* 1994;372:190–193.
211. Kilshaw PJ, Murant SJ. Expression and regulation of beta 7 (beta p) integrins on mouse lymphocytes:relevance to mucosal immune system. *Eur J Immunol* 1991; 21:2591–2597.
212. Halvorson MJ, Coligan JE, Sturmhofel K. The vitronectin receptor (alpha V beta 3) as an example for the role of integrins in T lymphocyte stimulation. *Immunol Res* 1996;15:16–29.
213. Piali L, Hammel P, Uherek C, et al. CD31/PECAM-1 is a ligand for $\alpha v\beta 3$ integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol* 1995;130:451–460.
214. Wadsworth S, Halvorson MJ, Coligan JE. Developmentally regulated expression of the beta 4 integrin on immature mouse thymocytes. *J Immunol* 1992;149: 421–428.
215. Dunon D, Piali L, Imhof BA. To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:714–723.
216. Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1b. *Nature* 1993;361: 79–82.
217. Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ, Taub DD. Chemokines regulate T cell adherence to recombinant adhesion molecules and extracellular matrix proteins. *J Immunol* 1996;156:932–938.
218. Carr MW, Alon R, Springer TA. The C-C chemokine MCP-1 differentially modulates the avidity of beta 1 and beta 2 integrins on T lymphocytes. *Immunity* 1996;4:179–187.
219. Tanaka Y, Adams DH, Shaw S. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today* 1993;14:111–114.
220. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with Cx3C motif. *Nature* 1997;385:640–645.
221. Wakelin MW, Sanz MJ, Dewar A, et al. An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane. *J Exp Med* 1996;184:229–239.
222. Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, et al. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* 1992;69:927–938.
223. Baumhueter S, Singer MS, Henzel W, et al. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 1993;262:436–438.
224. Hwang ST, Singer MS, Giblin PA, et al. GlyCAM-1, a physiological ligand for L-selectin activates 2 integrin on naive peripheral lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184:1343–1348.
225. Dransfield I, Cabanas C, Craig A, Hogg N. Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J Cell Biol* 1992;116:219–226.
226. van Kooyk Y, Weder P, Hogervorst F, et al. Activation of LFA-1 through a Ca2(+)-dependent epitope stimulates lymphocyte adhesion. *J Cell Biol* 1991;112:345–354.
227. Shimizu Y, Mobley JL. Distinct divalent cation requirements for integrin-mediated $CD4^{+}$ T lymphocyte adhesion to ICAM-1, fibronectin, VCAM-1, and invasin. *J Immunol* 1993;151:4106–4115.
228. Picker LJ, Treer JR, Nguyen M, Terstappen LW, Hogg N, Yednock T. Coordinate expression of beta 1 and beta 2 integrin "activation" epitopes during T cell responses in secondary lymphoid tissue. *Eur J Immunol* 1993;23:2751–2757.
229. Dustin ML, Springer TA. T-cell receptor crosslinking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 1989;341:619–624.
230. Shimizu Y, van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature* 1990;345: 250–253.
231. Campanero MR, del Pozo MA, Arroyo AG, et al. ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway. *J Cell Biol* 1993;123: 1007–1016.
232. Shimizu Y, van Seventer GA, Ennis E, Newman W, Horgan KJ, Shaw S. Crosslinking of the T cell-specific accessory molecules CD7 and CD28 modulates T cell adhesion. *J Exp Med* 1992;175:577–582.
233. van Kooyk Y, van de Wiel-van Kemenade P, Weder P, Kuijpers TW, Figdor CG. Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature* 1989;342:811–813.
234. Turcovski-Corrales SM, Fenton RG, Peltz G, Taub DD. CD28:B7 interactions promote adhesion. *Eur J Immunol* 1995;25:3087–3093.
235. Stewart M, Hogg N. Regulation of leukocyte integrin function: Affinity vs. avidity. *J Cell Biochem* 1996;61:554–561.
236. Faull RJ, Kovach NL, Harlan JM, Ginsberg MH. Stimulation of integrin-mediated adhesion of T lymphocytes and monocytes: Two mechanisms with divergent biological consequences. *J Exp Med* 1994;179:1307–1317.
237. Stewart MP, Cabanas C, Hogg N. T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is controlled by cell spreading and the activation of integrin LFA-1. *J Immunol* 1996;156:1810–1817.
238. Kucik DF, Dustin ML, Miller JM. Brown EJ. Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *J Clin Invest* 1996;97:2139–2144.
239. Weber C, Katayama J, Springer TA. Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10939–10944.
240. O'Toole TE, Ylanne J, Culley BM. Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the b-subunit: sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol-ester-stimulated phsophorylation site. *J Biol Chem* 1995;270:8553–8558.
241. Peter K, O'Toole TE. Modulation of cell adhesion by changes in the $\alpha L\beta 2$ (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction. *J Exp Med* 1995;181:315–326.
242. Hibbs ML, Jakes S, Stacker SA, Wallace RW, Springer TA. The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen 1 beta subunit: Sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol exter-stimulated phosphorylation site. *J Exp Med* 1991;174:1227–1238.
243. Shimizu Y, Mobley JL, Finkelstein LD, Chan AS. A role for phosphatidylinosotol 3-kinase in the regulation of beta 1 integrin activity by the CD2 antigen. *J Cell Biol* 1995; 131:1867–1880.
244. Zell T, Hunt SW 3rd, Mobley JL, Finkelstein LD, Shimizu Y. CD28-mediated up-regulation of beta 1-integrin adhesion involves phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 1996;156:883–886.
245. Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* 1996;271:981–983.
246. Kolanus W, Nagel W, Schiller B, et al. AlphaL beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* 1996;86:233–242.
247. Klarlund JK, Guilherme A, Holik JJ, et al. A human exchange factor for ARF contains sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* 1996;384:481–484.
248. Masellis-Smith A, Shaw ARE. CD9 regulated adhesion. Anti-CD9 monoclonal antibody induce pre-B cell adhesion to bone marrow fibroblasts through de novo recognition of fibronectin. *J Immunol* 1994;152:4630–4640.
249. Mannion BA, Berditchevski F, Kraeft SK, Chen LB, Hemler ME. Transmembrane-4 superfamily proteins CD81 (TAPA-1), CD82, CD63, and CD53 specifically associated with integrin alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29). *J Immunol* 1996; 157:2039–2047.
250. Xue W, Kindzelskii AL, Todd RF, Petty HR. Physical association of complement receptor type 3 and urokinase-type plasminogen activator receptor in neutrophil membranes. *J Immunol* 1990;152:4630–4630.
251. Bohuslav J, Horesji V, Hansmann C, et al. Urokinase palsminogen activator receptor, b2-integrins, and src-kinases within a single receptor complex of human monocytes. *J Exp Med* 1995;181;1381–1390.
252. Stockl J, Majdic O, Pickl WF, et al. Granulocyte activation via a binding site near the C-terminal region of complement receptor type 3 α-chain (CD11b) potentially involved in transmemebrane complex formation with glycosylphosphatidylinositol-anchored FcvRIIIB (CD16) molecules. *J Immunol* 1995;154;5452–5463.
253. Rovere P, Inverardi L, Bender JR, Pardi R. Feedback modulation of ligand-engaged $\alpha L/\beta 2$ leucyte integrin (LFA-1) by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Immunol* 1996;156:2273–2279.
254. Hughes PE, Ranch MW, Pfaff M, et al. Suppression of integrin activation: A novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell* 1997;88:521–530.
255. Altmann DM, Hogg N, Trowsdale J, Wilkinson D. Cotransfection of ICAM-1 and HLA-DR reconstitutes human antigen-presenting cell function in mouse L cells. *Nature* 1989;338:512–524.
256. van Seventer GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* 1990;144:4579–4586.
257. Damle NK, Klussman K, Aruffo A. Intercellular adhesion molecule-2, a second counter-receptor for CD11a/CD18 (leukocyte function-associated antigen-1), provides a costimulatory signal for T-cell receptor-initiated activation of human T cells. *J Immunol* 1992;148:665–671.
258. Hernandez-Caselles T, Rubio G, Campanero MR, et al. ICAM-3, the third LFA-1 counterreceptor, is a co-stimulatory molecule for both resting and activated T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1993;23:2799–2806.
259. Davis LS, Oppenheim-marks N, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Lipsky PE. Fibronectin promotes proliferation of naive and memory T cells by signaling through both the VLA-4 and VLA-5 integrin molecules. *J Immunol* 1990;145: 785–793.

260. Nojima Y, Humphries MJ, Mould AP, et al. VLA-4 mediates CD3-dependent CD4+ T cell activation via the CS1 alternately spliced domain of fibronectin. *J Exp Med* 1990;172:1185–1192.
261. van Seventer GA, Newman W, Shimizu, Y, et al. Analysis of T cell stimulation by superantigen plus histocompatibility complex class II molecules or by CD3 monoclonal antibody: costimulation by purified adhesion ligands VCAM-1, ICAM-1, but not ELAM-1. *J Exp Med* 1991;174:901 913.
262. Damle NK, Klussman K, Leytze G, et al. Costimulation with integrin ligands interacellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 augments activation-induced death of antigen-specific CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 1993;151:2368–2379.
263. Damle NK, Klussman K, Leytze G, et al. Costimulation via vascular cell adhesion molecule-1 induces in T cells increased responsiveness to the CD28 counter-receptor B7. *Cell Immunol* 1993;148:144–156.
264. Damle NK, Klussman K, Linsley PS, Aruffo A, Ledbetter JA. Differential regulatory effects of intercellular adhesion molecule-1 on costimulation by the CD28 counter-receptor B7. *J Immunol* 1992;149:2541–2548.
265. Boudrea N, Sympson CJ, Werb Z, Bissel MJ. Supression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995;267:891–893.
266. Zhang Z, Vuori K, Reed JC, Ruoslahti E. The $\alpha5\beta1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and upregulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6161–6165.
267. Romanic AM. Madri JA. The induction of 72 kD gelatinase in T cells upon adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent. *J Cell Biol* 1994;125:1165–1178.
268. Leppert D, Waubant E, Galardy R, Bunnett NW, Hauser SL. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol* 1995;154: 4379 4389.
269. Sato T, Tachibana K, Nojima Y, D Avirro N, Morimoto C. Role of the VLA-4 molecule in T cell costimulation. Identification of the tyrosine phosphorylation pattern induced by the ligation of VLA-4. *J Immunol* 1995;155:2938–2947.
270. Tachibana K, Sato T, D'Avirro N, Morimoto C. Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. *J Exp Med* 1995;182:1089–1099.
271. Milnegishi M, Tachibana K, Sato T, Iwata S, Nojima Y, Morimoto C. Structure and function of Cas-L, a 105-kD Crk-associated substrate-related protein that is involved in beta 1 integrin-mediated signaling in lymphocytes. *J Exp Med* 1996:184:1365–1375.
272. Yamada A, Nikaido T, Nojima Y, Schlossman SF, Morimoto C. Activation of human CD4 T lymphocytes. Interaction of fibronectin with VLA-5 receptor on CD4 cells induces the AP-1 transcription factor. *J Immunol* 1991;146:53–56.
274. Wacholz MC, Patel SS, Lipsky PE. Leukocyte function-associated antigen 1 is an activation molecule for human cells. *J Exp Med* 1989;170:431–448.
275. van Seventer GA, Bonvini E, Yamada H, et al. Costimulation of TCR/CD3-mediated activation of resting human CD4+ T-cells by LFA-1 ligand ICAM-1 involves prolonged inositol phospholipid hydrolysis and sustained increase of intracellular Ca^{2+} levels. *J Immunol* 1992;149:3872–3880.
276. Sharma CP, Ezzell RM, Arnaout MA. Direct interaction of filamin (ABP280) with the $\beta2$ integrin subunit CD18. *J Immunol* 1995;154:3461–3470.
277. Hannigan GE, Leung-Hagestein C, Fitz-Gibbon L, et al. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new $\beta1$-integrin-linked protein kinase. *Nature* 1996;379:91–96.
278. Dedhar S, Hannigan GE. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. Curr Opin Cell Biol 1996;8:657–669.
279. Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking β integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* 1995;130:1181–1187.
280. Maguire JE, Danahey KM, Burkly LC, van Seventer GA. T cell receptor- and beta 1 integrin-mediated signals synergize to induce tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125FAK) in human T cells. *J Exp Med* 1995;182;2079–2090.
281. Chen HC, Appeddu PA, Parsons JT, Hildebrand JD, Schaller MD, Guan JL. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem* 1995;270:16995–16999.
282. Schaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 1994;372:786–791.
283. Chen HC, Appenddu PA, Isoda H, Guan JL. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1996;271:26329–26334.
284. Anderson DC, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: An inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu Rev Med* 1987;38:175–194.
285. Shier P, Otulakowski G, Ngo K, et al. Impaired immune responses towards alloantigens and tumor cells but normal thymic selection in mice deficient in the beta2 integrin leukocyte function-associated antigen-1. *J Immunol* 1996;157: 5375–5386.
286. Schmits R, Kundig TM, Baker DM, et al. LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *J Exp Med* 1996; 183:1415–1426.
287. Christensen JP, Marker O, Thomsen AR. T-cell-mediated immunity to lymphocytic choriomeningitis virus in beta2-integrin (CD18)- and ICAM-1 (CD54)-deficient mice. *J Virol* 1996;70:8997–9002.
288. Xu H, Gonzalo JA, St Pierre Y, et al. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med* 180:95–109.
289. Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest* 1996; 97:1056–1063.
290. Soriano SG, Lipton SA, Wang YF, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *Ann Neurol* 1996;39:618–624.,
291. Gonzalo JA, Martinez C, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC. ICAM-1 is required for T cell proliferation but not for anergy or apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in vivo. *Int Immunol* 1995;7:1691–1698.
292. Fassler R, Meyer M. Consequences of lack of $\beta1$ integrin gene expression in mice. *Genes Dev* 1995;9:1896–1908.
293. Stephens LE, Sutherland Ae, Klimanskaya IV, et al. Deletion of $\beta1$ integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation. *Genes Dev* 1995;9: 1883–1895.
294. Kwee L, Baldwin HS, Shen HM, et al. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development* 1995;121:489–503.
295. Gurtner GC, Davis V, Li H, McCoy MJ, Sharpe A, Cybulsky MI. Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: Essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev* 1995;9:1–14.
296. Hirsch E, Iglesias A, Potocnik AJ, Hartmann U, Fassler R. Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of $\beta1$ integrins. *Nature* 1996;380:171–175.
297. Wagner N, Loehler J, Kunkel EJ, et al. Essential role for $\beta7$ integrins in the formation of gut associated lymphoid tissue. *Nature* 1996;382–370.
298. Arroyo AG, Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Differential requirements for $\alpha4$ integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell* 1996;85:997–1008.
299. Cosimi AB, Conti D, Delmonico FL, et al. In vivo effects of monoclonal antibody to ICAM-1 (CD54) in nonhuman primates with renal allografts. *J Immunol* 1990;144:4604–4612.
300. Zeng Y, Torres MA, Thistlethwaite JR Jr, Montag A, Bluestone JA. Prolongation of human pancreatic islet xenografts by pretreatment of islets with anti-human ICAM-1 monoclonal antibody. *Transplant Proc* 1994;26:1120.
301. Isobe M, Yagita H, Okumura K, Ihara A. Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with anti-ICAM-1 and anti-LFA-1. *Science* 1992;255:1125–1127.
302. Isobe M, Suzuki J, Yagita H, et al. Immunosuppression to cardiac allografts and soluble antigens by anti-vascular cellular adhesion molecule-1 and anti-very late antigen-4 monoclonal antibodies. *J Immunol* 1994;153:5810–5818.
303. Yednock TA, Cannon C, Fritz L, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by antibodies against $\alpha4\beta1$ integrin. *Nature* 1992;356:63–66.
304. Karpus WJ, Lukacs NW, McRae BL, Strieter RM, Kunkel SL, Miller SM. An important role for chemokine macrophage inflammatory protein-1a in the pathogenesis of the T cell-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1995;155:5003–5010.
305. King SL, Cunningham JA, Finberg RW, Bergelson JM. Echovirus 1 interaction with the isolated VLA-2 I domain. *J Virol* 1995;69:3237–3239.
306. Staunton DE, Merluzzi VJ, Rothlein R, Barton R, Marlin SD, Springer TA. A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinovirus. *Cell* 1989;56:849–853.
307. Greve JM, Davis G, Meyer AM, et al. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* 1989;56:839–847.
308. Marlin SD, Staunton DE, Springer TA, et al. A soluble form of intercellular adhesion molecule-1 inhibits rhinovirus infection. *Nature* 1990;344:70–72.
309. Martin S, Casasnovas JM, Staunton DE, Springer TA. Efficient neutralization and disruption of rhinovirus by chimeric ICAM-1/immunoglobulin molecules. *J Virol* 1993;67:3561–3568.
310. Pasloske BL, Howard RJ. Malaria, the red cell, and the endothelium. *Ann Rev Med* 1994;5:283–295.
311. Baruch DI, Gormely JA, Ma C, Howard RJ, Pasloske BL. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3497–3502.
312. Rudin W, Eugster HP, Bordmann G, et al. Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor-alpha/beta-deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and T helper type 1 response. *Am J Pathol* 1997;150:257–266.
313. Ennis E, Isberg RR, Shimizu Y. Very late antigen 4-dependent adhesion and costimulation of resting human T cells by the bacterial beta 1 integrin ligand invasin. *J Exp Med* 1993;177:207–212.
314. Frankel G, Lider O, Hershkoviz R, et al. The cell-binding domain of intimin from entreopathogenic *Escherichia coli* binds to beta 1 integrins. *J Biol Chem* 1996; 271:20359–20364.

第四篇　免疫系统的组成

第14章　淋巴组织和器官

Louis J. Picker and Mark H. Siegelman①

479　在哺乳动物的抗原特异性免疫系统中，每个免疫细胞仅仅识别所有潜在抗原性物质的一小部分，高效的免疫效应机制可选择性地靶向外来物，这种进化发育的结果极大地提高了机体免疫防御的有效性。然而，在发现侵入病原体方面，免疫系统这一进化的高级形式与相对简单的、非抗原特异性机体防御机制（天然机体防御机制，如吞噬）相比，明显存在着一些逻辑上的问题。在非抗原特异性系统中，各个组分可广泛地与多种病原体发生反应，在病原体入侵局部即可启动抗微生物应答；相反，抗原特异性系统的各功能组分之间是不可相互替代的，它们是一群数量庞大的、各自独立的细胞克隆，每个克隆仅对其相应特异性的抗原发生应答。事实上，小鼠体内免疫球蛋白库可能的多样性（约 10^{11} 种组合）[1] 远远高于每只小鼠在任何时刻体内的 B 细胞总数（$< 10^9$）。这些克隆的活化常需要其相应特异性抗原的激发，以及它们与抗原（非）特异性辅助细胞的复杂作用。在这样的前提下，可以想像免疫系统实现对种类繁多的抗原的应答，必须依赖所有抗原可能存在部位的免疫细胞克隆及辅助细胞之间持续不断的相互作用；考虑到机体巨大的皮肤黏膜表面积和数量有限的抗原特异性淋巴细胞，上述免疫系统的作用模式令人难以想象。另外，天然免疫机制是由许多与哺乳细胞截然不同的微生物分子成分（如脂多糖等细菌胞壁成分）激发的，而抗原特异性免疫是由无数的小分子表位激发，其中包括一些病原体和机体共有的表位。这样使避免自身免疫反应的发生成为抗原特异性免疫机制的一个重要问题，而天然免疫机制则不存在这样的问题。

如此看来，虽然免疫系统的基本组成单位是众多独立的抗原特异性淋巴细胞克隆，但成功的机体免疫防御则必须是这些细胞克隆进行高度系统化的合作，以便于在抗原通过任何途径侵入机体时，机体都可以发生高效的、持续的针对外来抗原的免疫反应，同时避免发生对机体正常组织的自身免疫反应。在系统水平，一个抗原特异性免疫系统面临着三种不同的复杂任务。首先，它必须提供一个可有效促进多能干、非功能性前

① L. J. Picker and M. H. Siegelman: Department of Pathology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75235-9072.

体细胞发育为克隆多样性淋巴细胞群落的微环境，这些淋巴细胞可区分众多外源性抗原与自身抗原。其次，免疫系统必须可以将抗原与那些稀少的带有相应抗原受体的成熟淋巴细胞一起带到一个含有所需辅助细胞特化的微环境中，该微环境能促进和调节抗原所诱发免疫细胞的克隆增殖及分化。最后，该系统还必须可以将效应淋巴细胞和记忆淋巴细胞输送到机体合适的部位，以便于它们充分发挥免疫功能，清除急性感染以及保护机体组织以后免受同一病原体的再次感染。

哺乳动物的免疫系统通过将其主要的功能划分给机体内不同的淋巴组织和器官来达到上述的要求，又借周密的淋巴细胞靶向运送和再循环系统将这些免疫组织及器官统一起来。因此，本章的目的就在于以下三方面：①考察免疫系统的系统生理学，包括机体初级、二级和三级淋巴组织的结构、功能和相互依存关系以及相关的免疫微环境；②阐述这些特化的淋巴微环境发挥效应以及归巢过程中将这些不同免疫位点联接起来的细胞及分子机制；③强调在系统水平考察免疫系统的重要性，因为只有这样，才能对免疫系统在机体防御机制中的作用充分理解。 480

免疫系统的分级

从免疫学的角度，机体各种组织在功能上可以划分为初级、二级、三级淋巴器官。初级淋巴组织的微环境可促进无功能前体细胞发育为功能成熟的初始 T 和 B 细胞，其中发生的关键事件包括：①抗原识别能力的成熟，先后发生抗原受体[免疫球蛋白(Ig)和 T 细胞受体(TCR)]基因的重组、这些受体的表达和具有适宜功能受体的细胞的筛选；②必要细胞组分(细胞表面分子和相关信号传导通路)的发育，这些组分参与免疫细胞与辅助细胞相互作用以及分化为功能上迥然不同的记忆和效应细胞群落；③归巢能力的获得，使得免疫细胞可以参与再循环和在外周适当微环境的“定居”。二级淋巴组织是指那些初始淋巴细胞第一次与外来抗原相遇的部位，这些组织的结构和分布有利于将任何部位的外来抗原运送到高度组织化的淋巴微环境中，进而促进抗原依赖性的淋巴细胞活化和初始 T 和 B 细胞分化扩增为效应和记忆群落；在这级淋巴组织也发生抗原受体库的再选择，那些逃避了初级淋巴组织选择过程的自身免疫性淋巴细胞在这里可能被删除或失活。最后，三级淋巴组织包含所有发生免疫效应的部位，在这些部位记忆和效应淋巴细胞充分发挥其免疫效应，分泌免疫球蛋白、细胞毒性、迟发型超敏反应或免疫调节。这些部位相当于免疫系统防御外来微生物侵入的“战场”，广义上包括机体所有的组织，但其中数量上最为重要的部位是那些与外环境直接接触的组织，主要是皮肤和胃肠道、肺、泌尿生殖道黏膜。

在小鼠和人类这两个研究较为透彻的哺乳动物体内，某些淋巴组织的功能集中在上述三个免疫功能之一，故传统上将它们归类于初级、二级或三级淋巴组织。其中包括胸腺、骨髓(初级淋巴组织)，淋巴结、派尔集合淋巴结、脾(二级淋巴组织)和皮肤、黏膜固有层(三级淋巴组织)。然而，值得注意的是：初级、二级或三级淋巴组织实现各自功能的部位高度依赖于种属特性和生理状态，有可能某单一组织或器官却具有一种以上的免疫功能。例如，免疫应答主要特征性地发生在三级淋巴组织，但它们在初级和二级淋巴组织中也可以发生。这方面，典型的初级淋巴组织骨髓就是一个浆细胞重分布的主要部位[2-4]，故而它也是一个关键的 B 细胞效应器官。在小鼠和人类，肠道的集合淋巴小结原则上属于二级淋巴器官(详见下文)，但在别的物种(尤其是羊)，它们则是 B 细胞系生成的主要部位[5,6]，属于初级淋巴组织。即使在同一物种，某个部位的功能属性也可以发生改变。例如，在持续存在慢性炎症的情况下，皮肤等三级淋巴组织能转变成二级淋巴组织，具备相应的结构特征[7]。如此看来，要阐明淋巴组织的生理学，就需要先弄清这些淋巴组织所具有的各种特化功能。每种淋巴组织被有机地组织成离散的微环境，这些微环境是各种淋巴细胞亚群和辅助/基质细胞不同形式的组合，正是这些微环境的分布形式和调控状态决定了整体的功能。需强调的是，在微环境中，淋巴细胞和基质细胞的存在呈相互依赖性。事实上，可以进一步阐明：所有这些不同的组成成分，以及相关的分化上皮间存在着复杂的相互作用，进而共同实现成熟淋巴组织的某种特化的免疫功能。

初级淋巴组织:淋巴细胞发生部位

由未成熟前体细胞向功能成熟的淋巴细胞发育,这一过程在许多方面与红细胞系、髓系及巨核细胞系等造血细胞系类似。所有这些细胞都源于一种共同的、可自我更新的造血干细胞,这些干细胞主要分布于骨髓(胚胎早期除外);进而经基因表达的调控,形成成熟细胞的特定形式和功能[8~12]。然而,成熟淋巴细胞存在明显的异质性,表现在抗原识别特异性(如游离抗原或与自身 MHC 分子结合的表位)及终末功能(如生成抗体或细胞毒效应或淋巴因子分泌),这就使得它们的产生有一定的特别之处。在造血细胞系中,只有淋巴细胞在细胞系特异性分化的同时,还需利用种系基因构建庞大的异质性初级抗原受体库,此后进一步修饰该受体库使得成熟淋巴细胞具备适当的功能。

在多数情况下,T 细胞参与启动和调节免疫反应,从而在识别自身和异己机制中发挥着重要作用,这就决定了该细胞亚群的初级抗原受体库需要经过较为严格的筛选。事实上,正是这些对 T 细胞识别过程的要求促进了胸腺的进化发育,它作为一个高度特化的初级淋巴组织,其主要功能即是产生成熟的初始 T 细胞群落,这些 T 细胞构成适当的抗原受体库,可以识别与自身 MHC 抗原结合的外源性(而非自身的)抗原成分。因此,绝大多数早期 T 细胞前体细胞离开骨髓后,需迁移到胸腺中经历阳性和阴性选择的"强化教育"。虽然也有证据表明初级 B 细胞库需经克隆选择过程,但目前认为该选择机制不如 T 细胞的严格。事实上,B 细胞库通常包含有自身反应性克隆[13]。外周 B 细胞的免疫球蛋白 V 区,已证明在使用频率上存在着一定的倾向性,但仍不知该倾向性是缘于优先重组等遗传机制,还是由于一种尚知之甚少的克隆选择过程[14]。总之,B 细胞系的"初级训育"可能不如 T 细胞的严格,这可能也解释了为什么仅在骨髓中 B 细胞即可由多能干细胞完全发育为成熟的处女型 B 细胞。然而,需要指出的是:现在认为接触外界抗原并不影响初级 T 细胞库的形成,即与外界抗原的接触不会引起 T 细胞抗原受体基因的改变[15,16],而 B 细胞正好相反,在外周免疫系统中 B 细胞与抗原的接触可以导致 B 细胞库结构和功能上重大的改变。

481

骨髓:结构和功能

骨髓主要包含于长骨的圆柱型空腔和椎体、胸骨、肋骨等海绵状骨及颅骨、盆骨等扁平骨的骨间隙中,约占成年人总体重的 5%。它是多数哺乳动物体内的主要造血器官,参与个体出生后所有血液有形成分的生成,而这些成分多数是需要不断更新,这就决定了骨髓是一个特殊的动态器官系统,时刻监视和满足机体内对各种血细胞的需要。骨髓微环境中所含细胞种类及细胞分化类型极为丰富,这也对应于骨髓在造血、淋巴细胞发育和免疫应答等机制中多种重要的功能。

骨髓是一个富含细胞的组织,其中存在从干细胞到成熟血细胞(T 细胞例外,见下文)发育过程中的各种血细胞前体,以及巨噬细胞、网状基质细胞和数量可调的脂肪组织[17]。骨髓由于与骨相邻,其最大扩展容积被严格限定,也只有在生理应激条件下它才可能达到其最大容积。然而,骨髓中脂肪组织所占的空间(在成人约占 50% ~ 70%)代表一种造血功能的储备,当机体需要额外造血时,这些脂肪组织所在部位可以恢复造血功能。骨髓腔被动脉灌注,这些动脉浸入骨中直接排空到静脉窦中,后者是一系列错综复杂、相互交通的静脉腔隙并最终汇集形成较大的静脉。骨髓中的造血成分包含在那些不规则的间质索条中,它们被所谓的骨髓基质所支撑;而这些骨髓基质是由网状基质细胞、巨噬细胞、脂肪细胞以及相关的胞外基质共同组成,可以为成簇的造血细胞提供机械性支撑和分化所需的诱导性接触及各种因子。造血组织并非随机地在骨髓腔中分布,通常早期前体细胞邻近于骨膜,而较为成熟的细胞则向中央突进入骨髓腔。不同的细胞系以不同的形式分布于静脉窦附近,但所有成熟产物最终都会被运送到静脉窦中,以便进入外周(在骨髓中无淋巴管)。

其他造血干细胞是淋巴细胞和血细胞的共同前体细胞

为保持机体生命中的造血功能,现在认为造血多能干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)应该可以:①自我更新;②沿多个途径分化(多向分化);③在动物模型中,能使致死量放射线照射后的动物免于造血衰竭性死

亡，并可长期重建其全部造血功能。在个体发育过程中，HSC 经过广泛迁移直至最终永久定居在骨髓中。小鼠的胚胎造血始于妊娠第 7.5 天，位于卵黄囊血岛和某些大动脉周边区域；约从妊娠第 11 天到第 15 天（在人妊娠的第 3 个月），来自这两个部位的干细胞迁移至肝脏，短暂停留后便迁移至它们在骨髓中最终定居部位。

早期研究通过将骨髓细胞有限稀释后注射到致死量放射线照射后的动物体内，进而发现了上述多能干细胞的存在和骨髓基质微环境在决定其终末分化方向的重要作用[18~22]。注射这些骨髓细胞后，分析不同的脾细胞克隆（包括它们的染色体标记）发现多种不同种类的细胞可能都来源于一种细胞，从而证明了多能干造血前体细胞的存在。此外，负责形成这些脾细胞克隆的骨髓细胞在长骨中呈一定的空间分布，细胞数量从骨髓腔骨内膜处到轴心处逐渐减少[23]。而且，这些克隆里包含可连续传代的细胞，若再次注射到小鼠体内可形成更多的脾脏造血克隆（满足自我更新的要求），也可使致死量射线照射的小鼠免于造血功能衰竭性死亡。按照细胞学标准，淋巴细胞前体也应该包含在这些脾脏造血克隆中[22]。因此，虽然至今未直接分离到多能干细胞（HSC），我们依然可以推测其存在，由它们可生成所有循环血液细胞。

早期 HSC 富集实验应用速度和平衡离心等物理性细胞分离技术来获得包含干细胞活性的细胞亚群[25,26]。以后发展出更为准确的分离方法，这些方法常采用细胞表面分子的特异性单克隆抗体，这才使得精确分离和鉴定 HSC 成为可能[8~10,27~29]。在小鼠，包含 HSC 的细胞亚群呈现为 $Thy\text{-}1^{lo}$、$Ly\text{-}6A/E^{+}$、$c\text{-}kit^{+}$，而粒单核细胞、淋巴细胞和红细胞（Lin^{-}）的许多细胞系标志则呈阴性；在骨髓中，它们存在的比例是 1/1000 ~ 1/2000[8]。体外骨髓基质培养系统的出现使我们能够分析 HSC 更多的分化产物，该系统部分地复制了骨髓微环境从而可以支持髓系[30,31]和 B 淋巴细胞系[32]的分化。最近，已从这些体外培养系统中分离出克隆性的干细胞系，它们可经长期选择性分化为髓系或（和）前 B 细胞系[34~36]。已证明：少至单独一个公认的 HSC 即可发生多向分化和重建所有造血淋巴细胞系[37,38]。然而，有的研究者认为 HSC 的长期重建功能是与放射保护效应及脾细胞克隆形成现象（CFU-S）并无关系[39~42]。这是一个重要的特性，因为长期重建功能是真正 HSC 功能的一个关键特征。利用 Rh123 染料可以优先聚集在代谢活跃的细胞的线粒体中的特性，用线粒体 Rh123 染色法将 $Thy\text{-}1^{lo}$、Lin^{-}、$Ly\text{-}6A/E^{+}$ 细胞亚群进一步划分，其中 $Rh123^{lo}$ 亚群（与 $Rh123^{hi}$ 亚群相比）包含了 HSC 主要的自我更新和长期造血功能重建的活性[37,43]。这样看来，分离获得均一的小鼠 HSC 指日可待。

482

近年来，在分离人 HSC 方面也取得了相当的进展，但有关对人体造血功能的研究仍存在过多依赖体外检测的局限性。最初人们认为在细胞表面分子 CD34 是人骨髓祖细胞的标志，在体外造血相关的细胞因子可使该型细胞发生高度的增殖效应[44,45]。后来，研究者发展了人干细胞培养体系，使得这些原始祖细胞分化出髓系和红系血细胞[46~48]。应用体内免疫功能缺陷性小鼠（SCID），研究者将 $CD34^{+}$ 祖细胞的分化潜能扩展至包括向 T 和 B 淋巴细胞系的分化[49~51]。$CD34^{+}$ 细胞在体内的造血重建活性也在致死量照射的狒狒[52]和病人体内得到证实[53]。因而，CD34 已成为临床骨髓移植时 HSC 的主要标志[54]，并且可能通过表型区分长期自我更新、多分化潜能的人 HSC（$CD34^{+}/CD38^{-}$）和只能分化为一种或另一种细胞系的 HSC（$CD34^{+}/CD38^{+}$）[10,55]。对人 HSC 认识的深入，已经并必将对人类基因性和肿瘤性疾病的治疗方法产生广泛的影响。

骨髓微环境：干细胞因子及其配体分子的确定突出了微环境的重要作用

HSC 到达骨髓后，人们推测它们会巢居在相应适宜的微环境中，至于这些微环境的生理、生化特性尚有待进一步阐明。众多营养性基质细胞、网状细胞、内皮细胞、脂肪细胞和巨噬细胞，以及支持性胞外基质成分，共同满足 HSC 维持和自我更新所需的要素。虽然对于这些要素的复杂性尚知之甚少，但有证据表明细胞表面的黏附性相互作用是不可或缺的。黏附受体也参与胚胎 HSC 从卵黄囊向胎肝的迁移机制，因为有研究表明该过程依赖一种 β1 整合素[56]。因此，黏附作用是血细胞发育过程中的一种重要机制。

利用两个造血功能缺陷的小鼠突变系，对其中分子损伤机制的研究，详尽揭示了骨髓微环境和 HSC 发育之间的重要关系。这两个小鼠突变系中，一个在 5 号染色体的白斑（W）基因座发生突变，另一个则发生在 10 号染色体的 steel（Sl）基因座；两者都在生殖系统发育、黑色素细胞生成、造血功能（巨红细胞性贫血和放射线敏感性增加）上存在类似的缺陷。移植实验表明 W 表型的缺陷位于 HSC 水平，而 Sl 表型则源于支持 HSC 的骨髓微环境的缺陷[57~59]。最初的突破是确定了 W 基因座编码原癌基因 c-kit，它是具有酪氨酸激酶活性

的细胞表面受体家族的成员之一[60,61]。由于 Sl 和 W 基因座存在互补关系，那么显然 S1 的基因产物[干细胞因子(SCF)]可能就是 c-kit 的配体，事实上这已被多个研究组证实[62~68]。c-kit 配体由骨髓基质细胞产生，存在膜固型和溶解型两种形式，并已证明：①它具有肥大细胞生长因子活性[63,64,67]；②与其他细胞因子协同在体外刺激造血克隆生成[64,66~68]；③给 Sl 缺陷小鼠体内应用，可部分地纠正巨红细胞性贫血和肥大细胞缺陷[62]；④在灵长类[69]和小鼠[70,71]体内促进造血；⑤在小鼠接受照射前，体内输注 HSC 祖细胞可使之免于致死量照射所引起的造血功能衰竭[72,73]。c-kit 及其配体相互作用的阐明，是研究者开始在分子水平上揭示造血细胞与骨髓基质成分间动态作用的标志之一；同时它们也成为一个范例，极大地促进了研究者去研究造血机制的分子细节、以及分离可使 HSC 发生选择性生长和扩增的细胞因子或不同因子的组合。在这方面，已经鉴定出另一个 c-kit 的类似物——flk-2，它在多能干细胞群落中富集，参与淋巴细胞的造血生成[74,75]。此外，转录共活化因子核心结合蛋白 β(CBFB)被靶向阻断后可引起肝脏造血功能的缺陷[76,77]，这进一步扩展了参与造血细胞发育复杂过程的分子种类。

骨髓中的 B 淋巴细胞发育

脊椎动物的体液免疫由免疫系统中的抗体生成细胞承担，它们源于 B 淋巴细胞。成熟 B 细胞的标志是其膜表面克隆表达抗原受体(膜 Ig)，该受体为两个重链(H)和两个轻链(L)组成的四聚体。在成年动物体内，这些细胞主要来源于骨髓，这一发育过程是不依赖抗原的，由 HSC 发育为表达有膜 Ig 的初始 B 细胞，或“处女型”B 细胞。与抗原相遇主要发生在它们迁移至外周淋巴器官之后，在那里可发生扩增并分化为浆细胞和记忆 B 细胞(见下文)，其中浆细胞是体液免疫应答中终末分化的、可分泌 Ig 的效应细胞。虽然 B 细胞在生成和效应阶段都可存在于骨髓，但是这里我们将仅限于论述早期 B 细胞系在骨髓中的发育过程，即在循环的初始 B 细胞出现前的阶段。同时我们也会将注意力集中于传统的 B 细胞，而在以后的内容中介绍相对独立的 B 细胞系——B-1 或 Ly-1⁺ B 细胞。

483

在胚胎发育早期，B 淋巴细胞发育的位点先后由胎盘和胎血迁移至胎肝，又到脾[78]，最后在骨髓中定居。在多数已研究的哺乳动物中，骨髓是前 B 细胞(pre-B cell)连续发育的主要部位[79~81]。在小鼠骨髓中，约30%的有核细胞为 B 系细胞[82]。整个生命周期中正是在这一器官由少量 B 淋巴祖细胞不断产生大量的未成熟 B 细胞。然而，已发现在其他物种中，B 细胞也是可以在非骨髓部位产生的，如小鸡 B 细胞发育主要在法氏囊[83]，而在羊胚胎和新生期，B 细胞主要产生于回肠的集合淋巴结[6]。

B 细胞成熟的进程常从下列两个方面判定：①B 细胞系特有的细胞表面抗原或胞内蛋白的表达；②Ig 基因的状态，从 Ig 基因 DNA 片段(V、D 和 J)的重排，到胞质内重链和轻链的先后表达，然后两者在胞内组装，表达于细胞表面。B 细胞发育第一个阶段的特征是某些早期 B 细胞系表面抗原的上调，如人[84~87]的 CD19、CD34、CD10 和小鼠[88,89]的 B220 和 CD43(S7)；以及重排激活基因 RAG-1 和 RAG-2 等 Ig 基因重排所需机制的加强[90,91].此后，早期祖细胞首先重排其 DNA 片段(V、D、J 和 C)形成编码 IgM 重链 μ 的连续性基因片段[92]。一般 B 细胞内重排的次序为 D_H 片段先与 J_H 片段接合，紧接着 V_H 片段接合到 D_HJ_H 上；随后，轻链的 V_κ 与 J_κ，以及 V_λ 与 J_λ 先后发生重排。在 V 区基因发生重组的同时，末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)基因被短暂激活并受到精确调控，该酶可以在上述某些基因片段的末端插入核苷酸(N 区)；当这些片段重排时，种系源性的抗体氨基酸序列就进一步改造，从而可能改变或产生了新的抗体结合特异性，如此实现了 Ig 的多样性[93~95]。与 Ig 基因重排相平行，正在成熟的 B 细胞会出现一整套表面抗原表达，直至最终产生成熟的初始 B 细胞表型[84,88]。

传统上，依照 Ig 表达情况，即细胞无 Ig 表达、胞质内表达重链 μ 或细胞表面表达完整的 Ig，可将 B 前体细胞(表达 B 细胞系特异性表面抗原)依次划分为原 B 细胞(pro-B cell)、前 B 细胞(pre-B cell)和成熟的处理 B 细胞(virgin B cell)。自从发现前 B 细胞特异性基因，这一传统的分类法就需要更新。该基因和其他 λ 基因共同位于小鼠的 16 号染色体，可编码一些 Ig 链相关的蛋白质，称之为 λ5 或 ε(在人类)和 VpreB；这些蛋白之间能以非共价键相结合，形成一种原始的轻链类似物。在前 B 细胞中，λ5 蛋白能以二硫键与重链 μ 结合，进而表达在细胞表面[96~101]。其同源基因和细胞表面蛋白也已在人类和其他哺乳动物中鉴定出[102~105]。虽然含有这些替代性轻链的细胞表面 Ig 首先鉴定于前 B 细胞系，但目前在正常小鼠骨髓中某些区域的前 B 细胞

中也已经证明该类分子的存在[106~108]。有研究表明尚存在其他的替代性 Ig 基因产物[109,110]，其中某些可能被表达在细胞表面[111]；最近发现：在 μ 基因表达前，替代性轻链能与一系列包括 gp130 在内的糖蛋白结合[112]。这些替代性 Ig 多肽在 B 细胞分化中有明显的作用（详见下文），此外这些新结构的存在使得我们可以重新划分 B 细胞分化的阶段，即将 B 细胞成熟过程按照以下事件划成几个连续的阶段：前 B 细胞表面不同替代性 Ig 的出现，以及它们随后被含 κ 或 λ 链的成熟 Ig 取代（图 14.1）。显然，这样的划分法要求进一步阐明这些替代性 Ig 及其配体的多样性，并弄清楚它们在 B 细胞系连续分化过程中的表达模式。

B 系前体细胞在骨髓中的原位成熟呈向量性进程，多数未成熟的前 B 细胞分布在近骨内膜的微环境中，随着分化的进行，它们渐向心地扩展到骨髓腔内（图 14.1）。较为成熟的 B 前体细胞位于中央，常与巨噬细胞紧密接触；最终在中央静脉窦中集合成簇，在输出到外周前经历最后的成熟[113~115]。因此，本质上，B 细胞

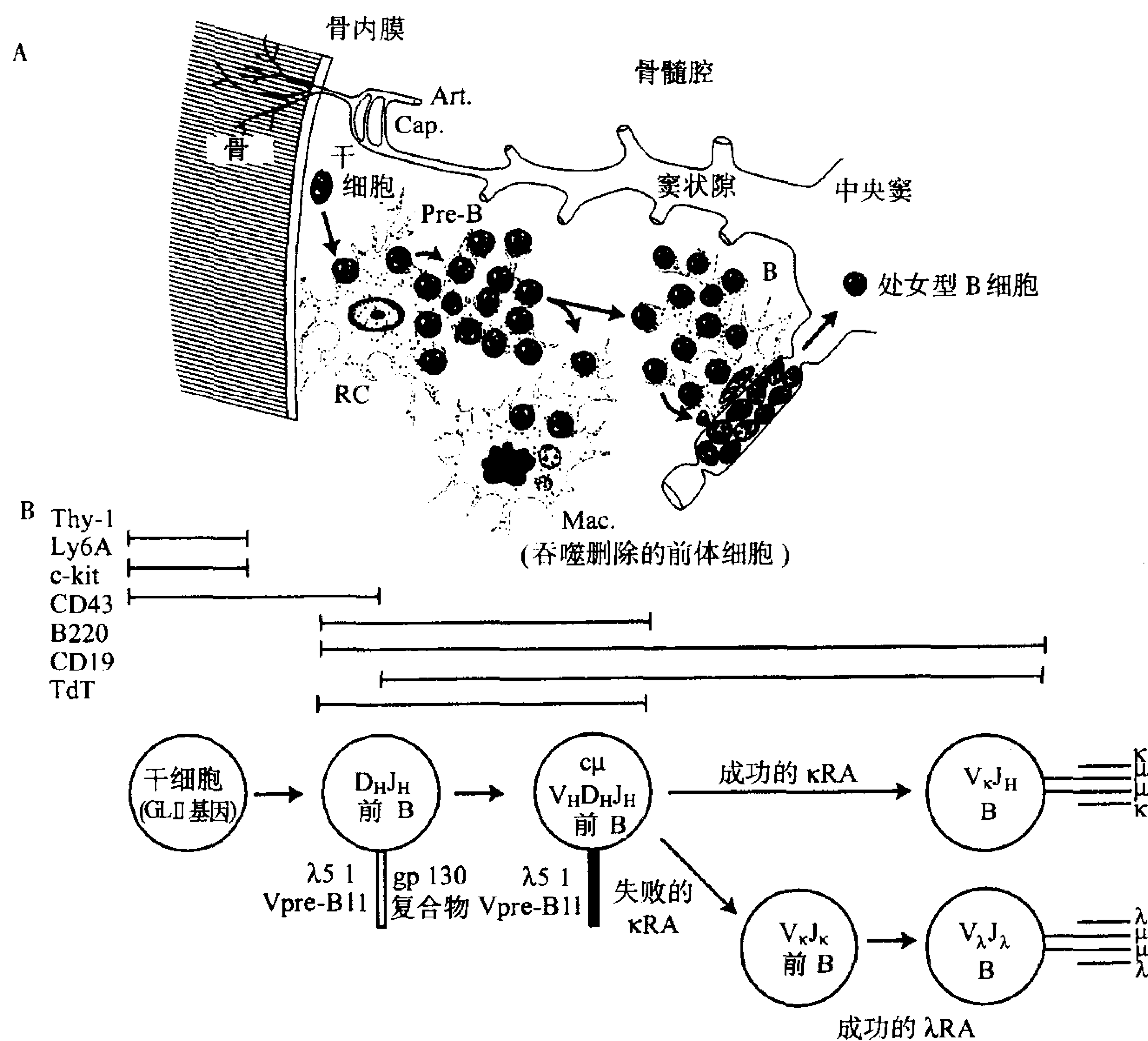


图 14.1　B 细胞在骨髓中的生成。A：骨髓腔中 B 细胞成熟示意图。整个发育过程始于骨内膜处，逐渐向骨髓腔中央过渡；在髓腔处，终末成熟细胞被排空到窦状隙中，后者又汇集形成中央静脉窦，进而通到外周。连续的箭头（从左向右）图示了 B 细胞前体发育成熟的各阶段。在左侧近骨表面处图示了一个干细胞。与附近基质内网状细胞（RC）的紧密接触支持了 B 细胞发育分化的整个过程。只有小部分 B 细胞可以成功地在胞膜上表达有效的 Ig 基因重组产物。因而，多数细胞是无效的，会被局部的巨噬细胞捕获和清除掉。存活下来的成熟 B 细胞会继续在支持性基质细胞的孵育下通过最后的发育阶段，最终成熟的处女型 B 细胞经静脉窦网排入外周循环中。（本图经允许改编于参考文献[115]。）B：B 细胞在骨髓分化过程中的表面标志。图示了小鼠 B 细胞成熟的三方面特点。①成熟依赖的 B 细胞标志表达模式（上方）：其中，Thy-1、Ly6A、c-kit、CD43、CD19 和 B220 是 B 细胞从干细胞开始分化各阶段的全部细胞表面标志；而 TdT（末端脱氧核苷酸转移酶）是 B 细胞在重链基因重组阶段胞内表达的一种酶。（上方横线代表各分子标志表达的时期。）②Ig 基因重排模式——含有种系 Ig 基因（GL）的干细胞逐渐发育为前 B 细胞，该过程中先成功地重排了重链可变区片段，后发生 κ 或 λ 轻链重排（RA），直至在胞膜上表达成熟的膜 Ig 分子（sIg）。其中，轻链是先发生 κ 链的重排，若失败，则随后发生 λ 链重排。③替代性 Ig 表达模式——细胞表面 λ5 和 VpreB 的表达（共同形成替代性轻链）在前 B 细胞阶段出现，起初明显与一个糖蛋白复合体相连，以后则一个成熟 μ 链相连（见正文）。

辐射状分布的成熟路径类似于其他造血细胞系(见上文)。B前体细胞的成熟依赖和受控于它们和骨髓基质细胞间的相互作用,包括细胞间的接触及可溶性因子传递的信号[32、34、116~121]。细胞间接触的重要性体现在以下一系列黏附系统,它们被认为在功能上参与基质和淋巴细胞间的相互作用,包括纤连蛋白[122]、蛋白多糖连接成分CD44及其受体之一,透明质酸[123,124]、淋巴祖细胞表面的整合素分子VLA-4(α4β1)[125]及其位于干细胞表面的配体VCAM-1[126]、神经细胞黏附分子[127]和胞膜蛋白多糖胶原[128]。通过靶向基因座敲除进一步证实了α4整合素在B和T细胞发育中的重要作用[129]。基质细胞可分泌多种短效生长因子,其中尤其IL-7已被证明在原B细胞和前B细胞某些分化阶段中,参与细胞的维持和扩增[130~134]。IL-11也是一个基质细胞源性的细胞因子,可刺激浆细胞瘤细胞系的生长、B细胞分化和巨核细胞生长[135];另一个是胰岛素样生长因子1(IGF-1),它也可以调节原B细胞的生长[136]。最后,早期前B细胞可表达c-kit,该分子与骨髓基质细胞表面的c-kit受体相互作用,也可以影响B细胞的生成过程[137、138]。

B细胞系分化的一个重要方面是其发育过程中前体细胞被清除的程度。在成年小鼠体内每天约有5×10^7个B细胞生成,但其中不到25%得以存活最终进入外周[139~141]。在羊的回肠派尔集合淋巴结(该动物产生B细胞的主要部位)中,95%以上的细胞发生了凋亡(参见“胸腺”部分)[142,143]。类似的大规模B细胞凋亡性消耗也存在于鸡的法氏囊[143]。在多数哺乳动物的骨髓,B细胞在向中央静脉窦迁移发育途中,现在推测与它们始终紧密接触的巨噬细胞能够及时清除缺陷的、不合适的、潜在有害的B细胞。所清除的多是Ig基因发生了不适当重组的前B细胞,因为该重组过程是不精确的,常产生一些不能正确组装或在细胞表面表达的缺陷性Ig蛋白。目前还不清楚是否像T细胞在胸腺里发育一样,B细胞发育过程中也存在一种筛选机制可以将自身反应性B细胞克隆清除掉。然而,有证据表明在B细胞发育过程中存在着删除或灭活自身反应性B细胞克隆的机制(诱导耐受)[148~150]。

在骨髓中,快速、有效地筛选出那些发生了功能性Ig重组和表达有完整表面Ig分子的B细胞,是通过目前尚未能完全阐明的信号机制介导的。骨髓微环境很可能通过B细胞表面完整的Ig分子传递一些信号,这些信号是维持B前体细胞的发育能力和正确分化所需要的。在分化早期,与替代性轻链(SL)相结合的完整μ链可以传递这样的信号;在分化晚期,成熟的Ig分子促进了这一功能。当一个功能性Ig分子出现在B细胞表面时,上述信号也可以反馈性抑制重组机制,从而保证每个前B克隆只表达一种功能性Ig分子。目前已有相当多的证据支持这一结论,转基因动物模型的研究表明前B细胞的存活需要膜表面表达Ig分子,后者还可抑制胞内的重链和轻链基因进一步重组[151~154]。也有证据表明:①细胞表面SL/μ链交联(甚至仅SL链),能传导Ca^{2+}释放和酪氨酸激酶磷酸化的信号[155~157];②靶向敲除λ5基因,可导致小鼠骨髓中B细胞发育停滞在前B细胞阶段从而出现B细胞缺陷[158]。因此,SL链可能在第二个重链基因座等位基因排除和由前B细胞向前BII阶段扩增过程中发挥重要作用[159]。最后,Ig相关信号转导分子mb-1(Igα)和B29(Igβ),被认为与TCR相关CD3分子功能类似,它们与替代性Ig在前B细胞系和早期B细胞可以介导信号转导和所结合抗原的内吞以进一步呈递[157,165,166]。总之,这些发现表明成熟的或替代的Ig分子在B细胞发育中发挥着关键的作用。然而,必须指出:关于这些前B细胞Ig分子的天然配体或这些配体发挥作用的生理环境,目前我们仍知之甚少。

在骨髓和外周的B细胞发育过程中,B细胞库经筛选排除其中的自身反应性克隆。其中的筛选机制可能类似于T细胞的相应机制(见“胸腺”部分),但T细胞和B细胞在抗原识别(如T细胞识别抗原需要MHC)和功能上的固有差异决定了B细胞筛选的要求及严格性可能不如T细胞。已表明可产生自身抗体的B细胞会发生克隆清除,该机制包括早期发育的停滞和以后的细胞死亡[146,167,168],且可发生在外周及中枢淋巴器官[169,170]。B细胞耐受也可通过诱导无反应状态(或免疫无反应性)来实现[145,150,171]。近来,发现另一个调整B细胞受体库的机制,称为“受体编辑”(receptor editing)。将自身抗原特异性Ig基因的转染到转基因小鼠体内,相关研究表明转入的自身反应性轻链的表达受到抑制,而有利于内源性轻链的表达,后者改变了所生成抗体的特异性从而排除了自身反应性[172~175]。分化过程中对某轻链的的选择,可以通过将一个不同的V区基因重组到同一轻链的恒定区位点或仅是简单地将一个重链与一个无关轻链搭配,如此一个非自身反应性轻链就替代了原来的自身反应性轻链。虽然有研究提示B细胞库可能是配体选择性的,但直到最近才有证据表明在B细胞发育过程中存

在阳性选择机制,即在识别自身抗原的基础上促进有用的特异性B细胞克隆的发育[177~179]。然而,在外周(如生发中心)B细胞亲和力成熟过程中,阳性选择的作用日益明显(见"二级淋巴组织"部分)。

骨髓中T淋巴细胞生成

我们将在以后的章节中讨论胸腺在T细胞生长、发育和成熟过程中的重要作用。然而,胸腺内T细胞生成源于骨髓来源的干细胞[180],那么就出现这样一个问题:前胸腺细胞在定居胸腺前是否在骨髓中已经过了向T细胞系的分化和诱导?体外研究表明这种在骨髓中的预分化是存在的。在无胸腺(裸)小鼠和正常小鼠的骨髓中都已发现存在一个低水平表达TCR相关复合物CD3的细胞群落。若将这些细胞与特定的生长因子共育,它们可以分化成为较为成熟的T细胞表型[181]。利用一些细胞表面标志,如那些被ER-MP-12[182]和Joro75[183]抗体识别的标志,可以鉴定出骨髓中那些具有在胸腺增殖潜能的细胞群落。同样,表达早期T细胞标志CD7的人骨髓细胞若进行有限稀释性培养,也可表现出明显的生成T细胞克隆的能力,伴随一系列成熟T细胞特异性表面标志的顺序表达[184]。更有研究采用高清晰度多道流式细胞仪发现骨髓干细胞中存在这样一个亚群,它们与最早期的胸腺细胞具有非常相似的表型,包括共表达干细胞标志CD34和T细胞限制性的标志,如CD2、CD7和胞质内的CD3[11]。此外,有报道:利用三个细胞表面标志分离得到的一个骨髓细胞亚群,若输注到SCID小鼠体内,可以重建T细胞,而非B细胞的发育[185]。最近,在小鼠胎血中分离到一个T细胞祖细胞,其表型为Thy-1$^+$、c-kit^{lo}和CD3$^-$[186],进一步表明在它们定居胸腺以前已发生了诱导分化。另外,在成人血中分离到一个CD4$^+$CD3$^-$前体细胞,它表达部分重排的TCRβ和RAG-1,可以发育成表型成熟的T细胞,这可能是一个胸腺前体细胞或代表一种胸腺外发育途径[187]。总之,这些发现表明在骨髓中发生了一定程度的向T细胞系的诱导分化。然而,有实验观察到纯化的HSC可以直接定居到照射过的胸腺中,以及胸腺中也包含CD34$^+$前体并能在某些条件下生成髓系红细胞和B细胞前体[37,188~191],这些现象提示有可能多能干细胞HSC可以迁移至胸腺中,进而参与成熟胸腺细胞的生成。但我们应谨慎地解释上述现象,因为在实验条件下我们观察到原始的未经诱导分化的HSC可以重建胸腺,并不一定暗示在正常生理条件下HSC发挥同样的功能。

486

关于B和T细胞系是否可能存在同一种祖细胞也是一个很有趣、争论不少的问题。一些实验利用逆转录病毒性标记来示踪细胞的发育,发现B和T细胞与髓系细胞源于同一前体细胞[192]。用长期培养的骨髓细胞有限稀释后输注到照射过的SCID小鼠体内进行重建功能研究,表明B和T细胞的功能都可以重建,这也表明存在某种单一的前体细胞同时生成B和T细胞[193]。最近,通过对小鼠靶向基因敲除,特别是一些调节转录的基因,为该问题提供了进一步的证据。Ikaros基因在造血组织中特异地编码一个锌指DNA结合蛋白,当敲除该基因后,甚至最早期的B、T细胞,NK细胞系前体的发育都会被完全阻断,而髓系和红系发育正常[194]。使E2A或Pax-5基因失活,则导致原B细胞的发育停滞在CD43$^+$阶段。最后,最近有证据表明在小鼠和人体内存在一种表型不连续的祖细胞亚群,它们可以生成淋巴细胞前体,而非髓细胞前体。在人类中,一个表型为CD34^{hi}Lin$^-$CD10$^+$骨髓细胞亚群可能专一地包含B、T、NK和DC的前体细胞[198];在小鼠中,相应的细胞亚群表型为Lin$^-$、IL-7R$^+$、Sca-1^{lo}、c-kit^{lo}[198a]。这样看来,现在越来越多的证据表明确实存在着一种专职的全部淋巴细胞的前体细胞。

关于T细胞前体向胸腺归巢的机制也正在取得一定的进展。主要由于所涉及的细胞数目比较稀少,这使得研究该过程难度较大。类似于循环细胞向其他组织的特异性迁移,T细胞前体必须首先遇到胸腺微血管,再黏附,后游移出血管。但尚不确定是否有特异性黏附分子参与这一特异性归巢路径。广泛表达的蛋白多糖连接家族成员CD44,已被证明也表达在早期胸腺前体细胞表面,可能起着促进向它们胸腺归巢的作用[199];Vanin-1是一个新的细胞表面糖蛋白,已被证明参与骨髓细胞与胸腺微血管截面的黏附作用和胸腺的长期重建[200]。

胸腺:供T淋巴细胞发育的特化微环境

Miller最早用新生期胸腺切除实验证明了胸腺是一个免疫器官[201],这之前普遍认为它与免疫无关。现在我们知道胸腺是T细胞生成的主要场所,具有如下重要免疫功能:①接受T细胞前体;②是T细胞成熟、驯育和筛选的主要发育中心;③调控成熟T细胞释放人外周。胸腺细胞的成熟包括淋巴原细胞与非淋巴细胞

成分间的一系列复杂的相互作用，这些作用发生在淋巴细胞在胸腺结构里各种不同微环境中的游移过程。这一过程的存活细胞经历了一系列有序的诱导和驯育机制，最终表达一些T细胞系特异性基因，尤其是TCR基因(γ、δ、α、β)的重组和细胞表面表达。在胸腺逗留的结果是产生了一个成熟的初始T细胞，它具有一种特异性抗原受体，可在自身MHC分子限定下特异性识别某外来抗原，同时又尽可能地避免自身免疫反应的发生。本章在阐明胸腺结构的基础上将详细探讨上述机制。

胸腺的解剖

胸腺是一个锥形器官，位于胸骨后的纵隔上腔。它由左右对称的两叶组成，其基底部位于心包表面，两叶上端延伸入颈根部。与其他淋巴器官相比，胸腺发育开始较早，虽然它的绝对生长大约持续到青春期，其相对质量在出生时最大，人的胸腺最大质量为30~40g[202]，青春期以后，胸腺便开始发生进行性退缩；到成年期，胸腺内大部分被脂肪组织替代，其中散布一些淋巴上皮组成的团块，具有潜在的功能[17]。

一种很薄的结缔组织囊包裹着胸腺，并反复延伸入胸腺形成结缔组织隔膜，将胸腺两叶分隔成胸腺小叶。这些隔膜内也含有血管、输出淋巴管和神经。胸腺没有明显的输入淋巴管。每个小叶可以划分为两层，外围富含淋巴细胞的区域称为皮质，而中央富含上皮的区域称为髓质(见图14.2和图14.3)。此外，还存在一个独立的很薄的囊下层，它被认为是那些刚迁入胸腺的未成熟细胞停留的部位。输出淋巴管在皮髓交界处(corticomedullary junction，CMJ)形成，在胚胎发育期生长中的隔膜延伸、扩展并终止于该区域。也正是在CMJ，隔膜内的血管穿入皮质和髓质。隔膜宽大的末段形成血管周的间隙，胸腺周围基质和外周利用此间隙可进行细胞和溶质的交换。在这些间隙中存在着髓细胞、浆细胞和肥大细胞，它也是胸腺B细胞群落定居的部位，这些B细胞的形式可以是游离的，也可以是淋巴滤泡，甚至是活化的生发中心[203]。这些间隙区域与胸腺实质之间明显被上皮屏障间隔[204]，这提示两者间的物质交换存在限制性(见下文)。

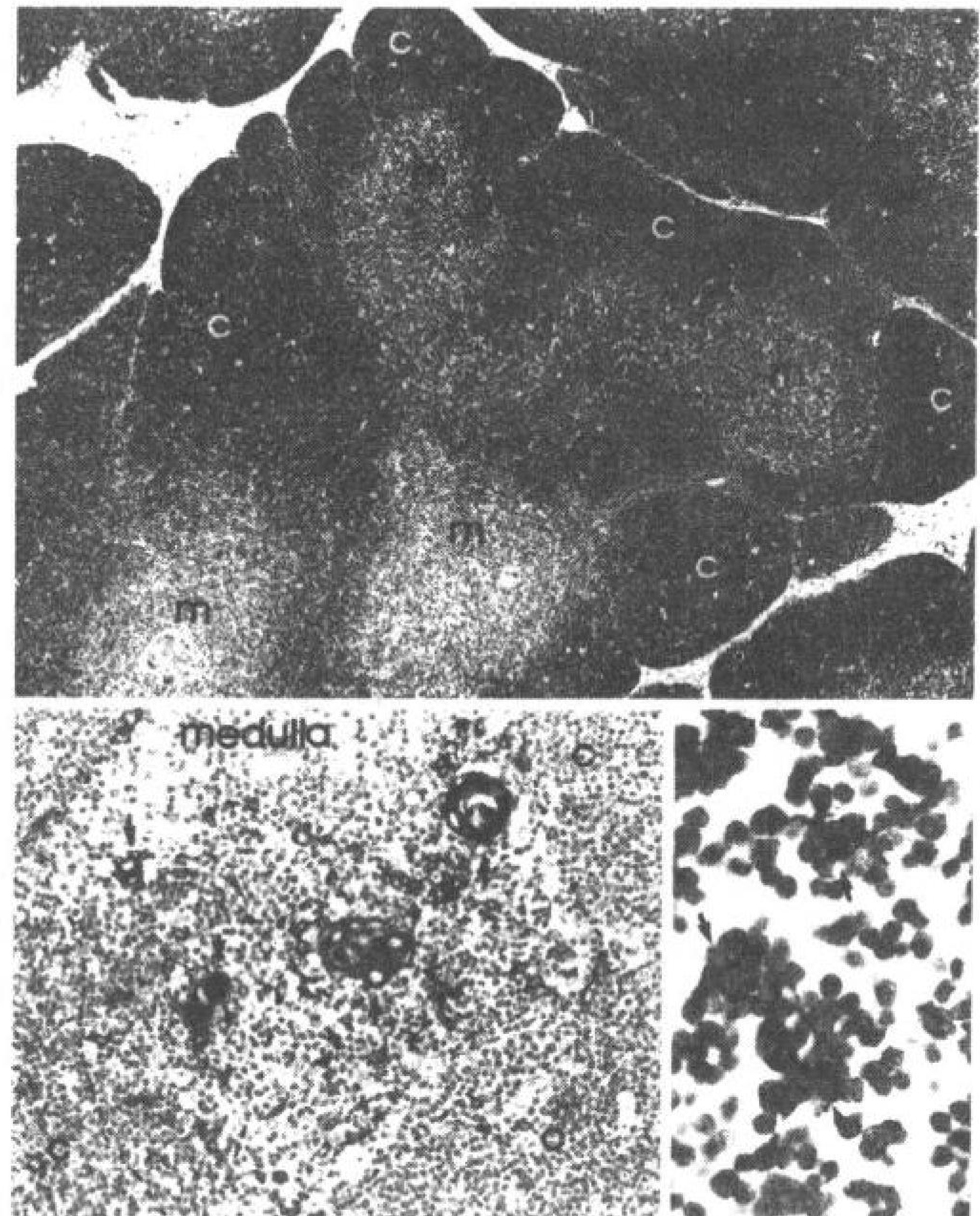


图14.2 胸腺的组织结构。上图：人胸腺小叶的低倍镜观察，显示了深染(黑色)的皮质区(c)和浅染(灰白色)的髓质区(m)。纤细的结缔组织隔将多面体形的胸腺小叶彼此分开，并提供了胸腺的血管供应(HE染色)。下左图：免疫组化显示人胸腺髓质上皮细胞内角蛋白，高倍镜下观察。[虚线指出了髓质与邻近皮质(c)间的界线]。注意其中存在两种深染的髓质上皮细胞，一种为较粗糙的球形结构，称为Hassall氏小结(箭头所示)，另一种为梭形或星形分散的单个细胞。下右图：免疫组织化学显示人胸腺皮质的上皮细胞内角蛋白，可见树突细胞形态(深染、箭头所示)。这些细胞与成熟中的胸腺细胞紧密接触(胸腺细胞簇集在树突上皮细胞的突起处)。

从胚胎学的角度看，胸腺与其他淋巴器官的区别在于其实质主要是从上皮细胞发育来的。现在普遍认为人类的胸腺上皮胚芽源于：①第三咽囊的内胚层；②相应鳃裂的内胚层；③咽弓相关间质中的基质细胞，它们来源于神经嵴。内胚层和外胚层两类上皮间的相互作用是发育形成正常胸腺结构所必须的，这已在裸鼠胚胎发育中得以证实，它们的第 三个裂隙的外胚层在 11.5 天后消失，这就导致内胚层的进一步发育停滞，胸腺将不会发育为淋巴器官[205]。切除实验同样表明神经嵴是胸腺正常发育所必需的[206]，所导致的缺陷在某些人类临床综合病症会有阐述（见第 43 章），如德乔治综合征和皮埃尔·罗宾综合征（Pierre Robin Syndrome）。总之，不同类型的上皮和神经嵴衍生物间适当的相互作用是正常胸腺发育所必需的。 *487*

在胸腺出现血供前，循环的淋巴前体细胞开始迁移入上皮性胸腺胚芽中。在鸟和小鼠模型中，淋巴祖细胞在胚胎发育的特定时间周期性地迁移入胸腺，进一步形成永生化的 T 淋巴细胞分化群落[207,210]。最近的研究表明：这种迁移模式在小鼠体内一直持续到出生后早期[211]。这些不断迁入的前胸腺细胞最先来源于早期造血中心、卵黄囊和大动脉周围血岛，以后是胎肝，出生后来源于骨髓[180]。

胸腺上皮微环境

胸腺上皮在胸腺细胞发育中起着决定性作用，所以这里我们将对其组成详加论述。成熟胸腺中包含多种形态各异的上皮细胞[214,215]，它们分布的区域中存在着胸腺细胞的不同分化群落（见下文）（图 14.3）。从外周向胸腺内部解剖，首先遇到的是囊下管周上皮细胞。这种上皮细胞形成平展的鞘，覆盖在胸腺囊的内表面和所有的管周间隙，从而形成紧密完整的包鞘，将胸腺内部空间与周边含血管的间质分隔开来。囊下上皮形成的血管鞘一直延续到毛细血管水平。这种衣鞘被认为是构成所谓胸腺-血液屏障的基础[216,217]，该屏障将胸腺皮质（而非髓质）与循环抗原隔离开。但事实上已发现抗原可以经穿血管途径进入胸腺皮质，这使得我们不得不质疑所谓胸腺-血液屏障的严格性[218~220]。此外，单核巨噬细胞和（或）树突（并指状）细胞也可以携带抗原从外周经正常的细胞转运途径进入胸腺皮质[221~223]。因此，胸腺细胞不仅接触胸腺内细胞所表达的自身抗原，而且可以接触来自外周的外源性抗原。皮质胸腺细胞和皮质上皮细胞常紧密接触。事实上，在这些上皮细胞胞质内常可见单个或成群的胸腺细胞被包卷或吞噬，形成大的淋巴上皮复合体（图 14.2）。在髓质和 CMJ 存在不同的上皮细胞，它们也与胸腺细胞紧密接触，但其中的胸腺细胞的密度低于皮质内。已证明髓质上皮的胚胎来源不同于皮质上皮[224]。按照经典和非典型 MHC 相关分子表达情况，可以将成年小鼠的胸腺髓质上皮划分为两个表型不同的亚群[225]，已鉴定出一个具有潜在功能的髓质上皮细胞亚群，它们表达一个可与荆豆凝集素 UEA-1 结合的岩藻聚糖集团[226]。这种形态特别的上皮细胞呈树突状，而非"竹片状"，且表到高水平的 MHCⅡ分子。而另一种上皮细胞在髓质中形成特征性结构，称为 Hassall 氏小结，它是胸腺在光镜下最显著的结构（图 14.2）。在人胎儿期约第 10 周时，Hassall 氏小结的雏形呈现为分散的小管状上皮细胞簇[227]。在成熟的 Hassall 氏小结中，上皮细胞呈洋葱样排列在中央，并高度角质化，其抗原特征与外胚层上皮细胞相似[228~231]。目前我们仍不清楚这些特征性结构的实际功能，但它们常与细胞残骸和细胞死亡产物密切接触，从这点我们可推测它们可能相当与胸腺细胞的墓地。 *488* *489*

在体外鉴定的小鼠胸腺"看护"细胞（thymic nurse cell，TNC）可能就是皮质上皮细胞[232]；从人胸腺分离得到的 TNC 表达 MHC 表面结构[233]，而这些结构实际是上皮细胞合成的[234]。因为 MHC 分子是 T 细胞识别库形成的关键因素[235~240]，表达 MHC 分子的上皮细胞就具有功能上的重要性，它们与淋巴细胞间的亲密结合提示：正是这些上皮细胞促使 T 淋巴细胞获得 MHC 限制性和被筛选获得识别自我与非我的能力（见下文）。胸腺上皮也能分泌自己的细胞因子，包括 IL-1、IL-3、IL-6、IL-7、淋巴细胞抑制因子（LIF），和 GM-CSF[241~244]。这些上皮来源的细胞因子必然参与胸腺内存在着的细胞因子间动态性相互作用，可能以并列或先后的方式调控胸腺前体细胞经过胸腺中的不同发育阶段。此外，胸腺上皮细胞还表达多种表面黏附分子（如 LFA-3 和 ICAM-1），它们与淋巴细胞表面的相应配体互补（如 CD2 和 LFA-1）。这些黏附分子-配体对可能介导这些细胞间的相互黏附，在胸腺细胞发育过程中也可能与适当的共刺激分子一起转导活化信号[246,247]。

最后，胸腺还可以分泌一些肽类激素[248~251]和趋化性多肽[252,253]。它们由胸腺上皮细胞合成，其中一些只能由这些细胞合成，如胸腺素。我们仍不清楚这些胸腺激素的确切生理功能，目前认为它们可能参与干细

胞诱导分化为前胸腺细胞、T细胞表面标志的诱导、激活和增强效应细胞的功能。有研究提示某些胸腺多肽在胸腺外T细胞发育中可能发挥一定效应。给切除胸腺的新生期小鼠注射神经多肽—促甲状腺素释放激素,发现可促进肠上皮内T细胞的发育[254];在无胸腺(nu/nu)小鼠体内过表达IL-6相关抑瘤素M,可导致成熟T细胞在外周的积聚[255]。

骨髓来源的非淋巴性细胞

现在认为单核细胞和树突细胞前体(后者是一类髓源性职业抗原呈递细胞,详见下文)[256,257]与胸腺祖细胞一起进入胸腺,后在胸腺中各自分化为一般的巨噬细胞(主要分布在皮质,尤其是CMJ区)和并指状细胞(主要分布在髓质)(图14.3)。胸腺并指状细胞的显著特征是具有很多胞质凸起和树突,并形成不规则的网络,在上皮细胞和淋巴细胞间延展。常可见淋巴细胞被这些突出包绕。在人类,这些细胞表达大量的MHC II类分子,在体外是高效的抗原呈递细胞[259]。这些细胞可能参与了TCR库的筛选机制(详见下文)。在皮质中,胸腺细胞围绕在巨噬细胞周围,形成玫瑰花环样结构。巨噬细胞在胸腺中的功能变化很大,因为它们是高效的吞噬细胞,而绝大多数细胞是在胸腺中死亡的,所以巨噬细胞的功能可能与清除这些非存活细胞有关。事实上,在胸腺巨噬细胞的吞噬小泡中可发现消退过程中的淋巴细胞。同时,巨噬细胞还可以分泌多种细胞因子,其中一些可能在T细胞发育和增殖的不同阶段发挥作用[245]。最后,巨噬细胞和并指状细胞一样表达MHC抗原,可作为免疫系统的抗原呈递细胞,这提示它们也通过阳性和阴性选择机制,参与调控外周TCR库的形成。

胸腺中最后一种非淋巴性细胞成分是肌样细胞,它是一种功能未定的特殊肌细胞,来源于神经嵴,主要散布或成簇分布在髓质中[260]。这些细胞包含排列杂乱的肌丝,也存在肌动蛋白、结合蛋白、横纹肌肌球蛋白和细胞表面乙酰胆碱受体。现在认为这些特化的细胞可能参与重症肌无力的发病机制;也发现在某些条件

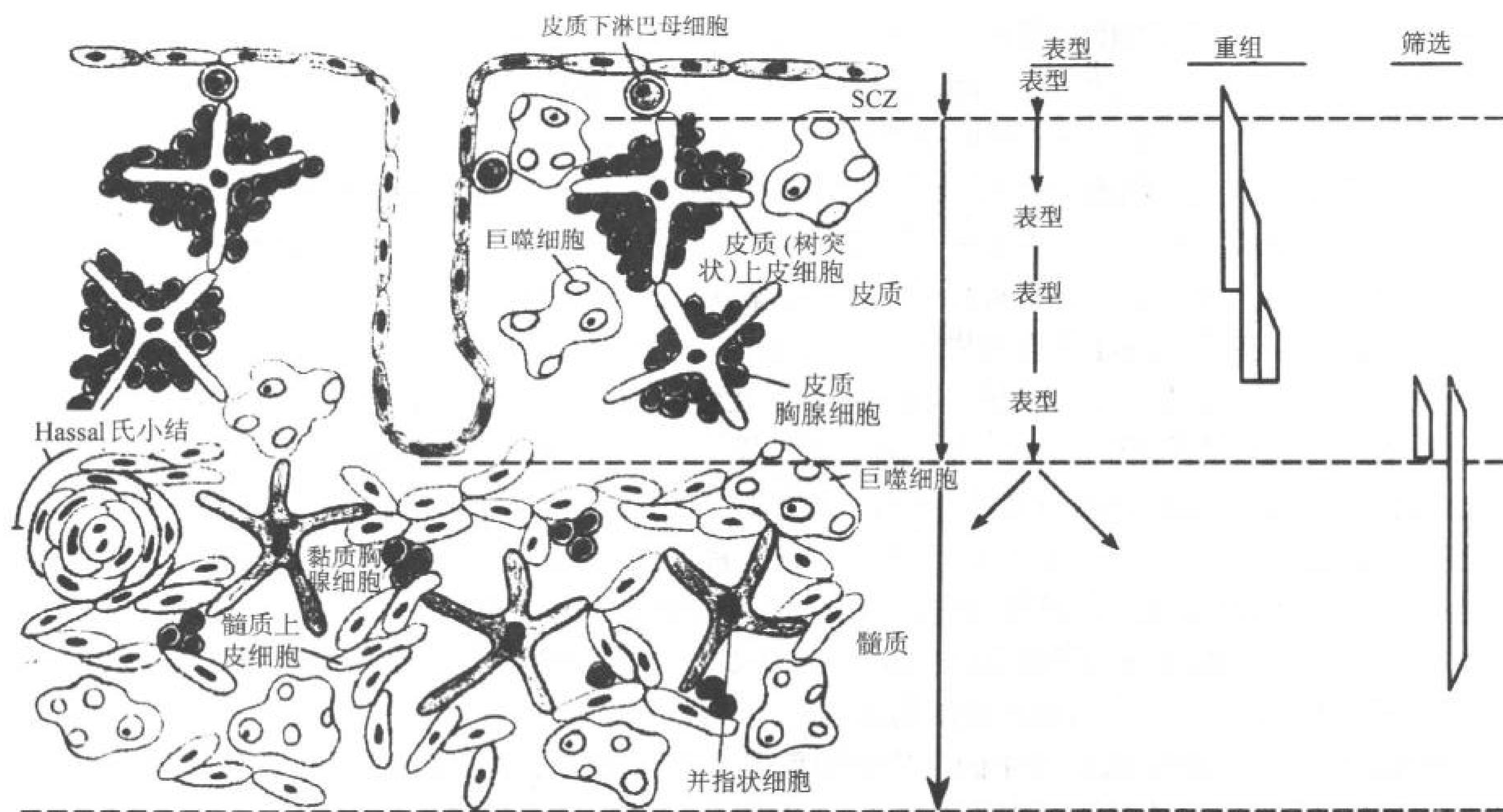


图14.3 胸腺微环境中T细胞系的发育。左侧:胸腺结构示意图。图示了囊下区(SCZ),皮质和髓质三个主要部分,在胸腺表面可见一层皮质上层细胞,结缔组织隔延伸入胸腺中(下方的上皮层随之内陷),终止于皮质和髓质的交界处,并将胸腺分隔成小叶,本图中显示了两个小叶结构。皮质下T淋巴母细胞可见存在于SCZ(第一层中),这些非常不成熟的细胞主要定居于该区。下一层即为皮质,其中混杂有多种细胞,包括巨噬细胞及密集的皮质胸腺细胞,后者与邻近上皮细胞的树突状突起紧密接触,这种相互作用对胸腺细胞的成熟具有重要意义。胸腺内最深一层为髓质,其中含有较多的上皮细胞,形态多为规则的圆形或梭形,不同于皮质中上皮细胞的复杂突起。其中也含有巨噬细胞、并指状细胞和一些分数的髓质胸腺细胞。右侧:图示了胸腺细胞以SCZ向髓质成熟的过程中,在胸腺各部分相应所发生的细胞表面表型,TCR基因重排和筛选事件。(详见正文。)

下，它们可以分化为横纹肌细胞[261]。

胸腺结构和功能概述

胸腺包含三种不同表型和不同成熟度的成分：①囊下区，它是骨髓来源的祖细胞进入胸腺的部位，也是最原始的淋巴母细胞的定居点；②下皮质区，其中密集小淋巴母细胞，它们被皮质上皮细胞紧密盘绕，经历基于 MHC 的筛选而大量凋亡；③髓质，包含边缘粗钝的竹片状上皮细胞，其中定居着中等大小的淋巴细胞，它们在此经过最后的筛选和成熟，进而释放到外周。我们将就目前所知，尽可能地把淋巴细胞发育的不同阶段与胸腺的不同区域联系起来。这样，我们首先需要阐述 T 淋巴细胞前体表型成熟的各个阶段和这些细胞不同阶段在胸腺中的迁移过程。

490

正如前述，前胸腺细胞从骨髓迁移入胸腺定居，虽有证据表明它们在迁移前已至少分化获得一些 T 细胞系的特征，但目前关于该类细胞的本质仍有一定的争议。公认的小鼠前胸腺细胞在一定水平表达多种标志，包括 Thy-1、热稳定抗原（heat-stable antigen，HSA）、Pgp-1、H-2、Sca-1（Ly-6-A/E），还有最近鉴定的低水平表达的 CD4[262~265]。这些细胞在种系基因中含有所有 TCR 基因[265]。目前我们仍不明确这些胸腺细胞前体所具备的各种表面标志的功能意义。但 CD4 肯定在 T 细胞发育早期不发挥关键作用，因为以纯合子的形式敲除该基因座的小鼠在 T 细胞发育早期并未出现明显的缺陷[266]。公认的人胸腺细胞前体表达一套独特的分子标志，包括 CD7、CD2、CD34 和胞质 CD3[11,267,268]。由于这些进入成年胸腺的细胞数目相对较少，我们很难确定它们确切的进入位点。在小鼠中，已证明原细胞是通过髓质和 CMJ 区的小静脉进入胸腺的[269]；在胸腺重建小鼠体内，也发现循环细胞首先出现在 CMJ 区，后迁移到囊下区[270]。

通常可以根据 TCR 基因状态和细胞表面标志分类来判定 T 细胞发育阶段。最早期的胸腺细胞是与公认的前胸腺细胞极为相似的母细胞，它们表达一些 T 细胞系标志（在小鼠为 Thy-1 和较早期低水平的 CD4；在人类为 CD7/CD2/CD5/胞质 CD3），其后不再表达 CD4、CD8 和 CD3，其中 CD4 很快从极早期迁移入胸腺的前胸腺细胞表面消失。这一细胞群落常被称为 CD4/CD5 双阴性（DN）或 CD3/CD4/CD8 三阴性（TN）胸腺细胞亚群[11,267,268,271~279]，它们约占所有胸腺细胞总数的 1%～3%（图 14.3）。这些细胞在 DN 阶段即开始重组其 γ、δ、β 基因座（β 基因座最先）[283,280]，在 DN 成熟阶段更为广泛，从而形成两种主要的不同 T 细胞群落：①表达 TCRγδ 的 T 细胞[281,282]，它们仍保持 DN 状态（或以后仅表达 CD8）并较早地离开胸腺在三级淋巴组织中进一步分化成熟（见三级淋巴组织）；②是主要的发育途径，可发育进入 $CD4^+/CD8^+$（双阳性，DP）阶段，最终分化为表达 TCRαβ、$CD4^+$ 或 $CD8^+$（单阳性，SP）的 T 细胞。这一选择过程涉及复杂的生化和基因调控机制，目前尚未完全阐明。在分化的 DN 阶段，特征之一即是原始的前胸腺细胞群落发生明显的扩增。有研究将多能干细胞直接注射到照射后的小鼠胸腺中，发现在胸腺细胞早期分化之后，它们会扩增 50 倍并持续较长的时间，然后明显转化为 $Thy\text{-}1^{high}$ DN 表型，又发生约 10 倍的增殖，进而分化到 DP 阶段[188]。

DN 细胞短暂经过一个 $CD4^-/CD8^+$ 或 $CD4^+/CD8^-$ 中间阶段进入 $CD4^+/CD8^+$ DP 表型，这取决于所研究物种或小鼠种系的不同[11,283~289]。在 DP 阶段一个关键的调控环节是 β 链的成功重组，它要先于 α 链的任何重组[290~292]。可能与早期 B 细胞发育过程中 λ5 和 VpreB 基因表达模式很类似，现在认为 TCRβ 链起初是与一个非多态性的 33 kDa 糖蛋白一同表达在发育中的胸腺细胞表面，该糖蛋白被称为前 TCRα 或 pTα，可能作为 α 链的一种替代参与调节发育中胸腺细胞的存活和（或）扩增，直至筛选出最终的 α 链。最终的 α 链等位基因排除现在认为发生在阳性选择过程[296]。大多数胸腺细胞（85%～90%）为 DP 表型，它们是胸腺皮质的主要组成细胞。然而，它们绝不是一个均一的群落；在以后的成熟过程中，它们会有多种其他分化标志发生典型的上调和/或下调[11]。虽然所有这些分子标志必定具有一定的功能意义，但对 TCR 库发育最为重要的成熟事件是 TCR 基因重组的延续，它始于 DN 阶段，最终导致 DP 胸腺细胞表面 TCR 和 CD3 的共同表达。DP 群落同样可以划分为表达和不表达 αβTCR 两种细胞亚群。细胞表面 TCR 的表达是以后阳性和阴性选择机制的先决条件，即决定该高效筛选过程的存活细胞，这将在下文详加论述。

DP 群落中约 25% 为大的分裂期母细胞，而其他 75% 为小的非分裂 G_0 期细胞[298]。因为这个阶段的细胞源于之前非成熟细胞的几次增殖，它们在被清除或完全成熟前只能发生最后的几次细胞分裂（DP 阶段整

个转化期平均约 3 天),但它们仍是胸腺内分裂细胞的大多数[298~300]。它们也是最具动态性的胸腺细胞群落,每天约有 1/3 被替代;从 DN 末期到 DP 末期,在小鼠胸腺内约发生 50 倍的增殖,相当于每天产生约 5×10^7 个细胞。经过筛选,DP 最终发育为成熟的 SP 细胞(表达 CD4 或 CD8),每天大约产生 $1\times10^6\sim2\times10^6$ 个这样的成熟细胞并输出到外周。

大多数 DP 细胞的归属一直是免疫学中争论的问题。按照多个标准来衡量,从胸腺中分离到的 DP 细胞是功能缺陷的[301],通常在向淋巴器官迁移的胸腺细胞中也找不到该类细胞[302]。普遍认为此阶段胸腺细胞的过量增殖(超过补充外周 T 细胞池所需量)使得 97% 以上的胸腺细胞在胸腺内死亡成为必然[303,304]。然而,相关组织学却观察到很小范围的胸腺内细胞死亡[305],这似乎与前观点相违。而认识到凋亡是胸腺内细胞死亡的一个机制,一定程度上解决了这个矛盾[306,307]。凋亡可定义为程序性细胞死亡,不伴有坏死;其特征是胞质内形成小泡和内源性内切酶的激活,后者可将 DNA 裂解为寡聚核苷酸片段(在分离胶中可形成梯度样条带),这是染色体和核浓缩的结果。凋亡依赖于死亡细胞 RNA 和蛋白质的合成。

然后,凋亡细胞被巨噬细胞吞噬。有关凋亡的信号转导机制仍未阐明,在体内那些表达抗自身抗原 TCR 的细胞中,钙离子的上调可能是导致胸腺内细胞死亡的活化信号[308]。在胸腺的巨噬细胞内可发现凋亡细胞和细胞碎片[309],动力学证据也支持胸腺内细胞死亡机制[304]。最近,用检测胸腺组织内 DNA 片段断裂的方法找到了一些更直接的证据支持胸腺内凋亡。这样,可以直接观察到被巨噬细胞吞噬的凋亡细胞[310]。动物模型系统体外和体内的证据也支持凋亡机制的合理性[311~313]。例如,在表达某多肽抗原特异性 TCR 的转基因小鼠胸腺内,胸腺细胞也经历从未成熟到成熟表型的发育,若给这些小鼠注射该多肽抗原,可导致 $CD4^+/CD8^+/TCR^{lo}$ 未成熟胸腺细胞的快速凋亡性清除[313]。前癌基因 bcl-2(抗凋亡)的转基因小鼠会出现胸腺内凋亡受阻,继而伴随 T 细胞成熟和发育的改变[314,315],而在胸腺细胞发育的 DP 阶段该分子表达则出现上调[316]。诱导凋亡的表面分子 Fas 也参与胸腺细胞的清除机制[317,318],但 bcl-2 和 Fas 都不能完全解释了阴性选择机制,该机制在没有 Fas 或有 bcl-2 参与的情况下仍可发生。最后,虽然多数证据表明胸腺内死亡占优势,但仍不能完全排除另一种可能性,即:有些应该被清除的 T 细胞输出后很快在肝、脾或肠内被清除[321]。虽然有关细胞清除的机制尚未完全阐明,但无疑这种细胞清除机制是调控 TCR 库形成的主要方式。

491

随着 DP 胸腺细胞的成熟,它们逐渐不再表达 CD4 或 CD8[形成 SP($CD4^+$ 或 $CD8^+$)胸腺细胞],而表面 CD3 和 TCR 表达增加,并调整其他抗原(如归巢受体)的表达直至形成初始外周 T 细胞[11]。这一从 DP 向 SP 阶段的转变被认为伴随着成熟中的胸腺细胞由皮质向髓质中的逐渐迁移。较多的树突细胞和巨噬细胞存在于 CMJ 区,它们排列成向下延伸的花边状网络,与胸腺囊垂直相交。这一网络可能形成一个阴性选择栅栏(见下文),只有那些存活下来的细胞才可以进入终末分化阶段。这一存活过程涉及某些细胞表面标志上调,以及一些抗凋亡分子 bcl-2[316]。据推测,约有 10%~15%的 SP,即 $CD3^{high}$ 胸腺细胞(多分布在髓质中)经过这一终末筛选过程。直到最近几年,才出现一些有关胸腺细胞从皮质到髓质这一关键迁移步骤的线索。有研究表明:该过程涉及胸腺细胞表面的整合素 VLA-4 和 VLA-5 与胸腺基质的纤维连接素间的相互作用[322]。胸腺细胞在髓质中的周转时间要比其 DP 阶段在皮质的长久[299,300,323]。虽然它们在髓质中的变化与在皮质中相比较轻微,但在 TCR 触发活性和细胞表面标志方面明显发生了一定程度的髓质性成熟[324~326]。另外,虽然髓质胸腺细胞与成熟的外周 T 细胞相比,在大小、胞质密度和表面抗原方面均有一定差别[327],但有证据表明这些细胞至少已经具备了成熟 T 淋巴细胞的多数特征。例如,研究表明从胸腺刚迁出的多数细胞在表型上是成熟的,因为它们表面标志与外周 T 细胞和髓质中的胸腺细胞相似,而截然不同于皮质胸腺细胞[327]。然而,一些胸腺迁出的细胞是可能在外周经过某些终末表型改变的[328]。髓质胸腺细胞如何被筛选输出到外周的机制目前尚未完全阐明,但存在一些可能的机制,包括在髓质中的终末扩增[329~331]。成熟胸腺细胞在 CMJ 区离开胸腺的位点可能是高内皮毛细血管后静脉、穿囊动脉的厚双壁毛细血管或淋巴管[332]。其中淋巴管起源于 CMJ,该区的静脉周围腔内常可见充满着淋巴细胞[333,334]。

值得注意的是:一些表型成熟的,甚至一些抗原活化的外周 T 细胞可以迁移入胸腺,定居在髓质中并在那里参与 SP 池[335~338]。目前仍不清楚这些归巢的外周 T 细胞在胸腺中的作用,但有可能它们是一种外周免

疫反应反馈和调节 T 淋巴细胞形成的机制。另外，在敲除 TCRα 链基因的小鼠体内，TCRαβ 不能在表面表达[339]；在 SCID 小鼠体内，存在同样的重组缺陷[340]，其胸腺结构发生了一定改变，不再发育形成髓质。若给 SCID 小鼠输注 TCR^+ 细胞，它们的胸腺可以恢复相对正常的结构[341]；在 TCR 转基因小鼠模型中，也证明重建正常的胸腺结构绝对依赖于 TCR 复合体的完全组合[342]。这些研究都提示了胸腺发育对 TCRα 链和 β 链的依赖性，也再次强调了淋巴细胞发育和淋巴器官发育间是一种交互的、可塑的关系。

胸腺内 T 细胞抗原受体库的形成：阳性和阴性选择

从进化发育角度来看，胸腺的主要免疫学功能是形成 TCR 库，它可以识别自身 MHC 分子结合的无数种外源性抗原，而非单独的自身抗原。基于对自身抗原的识别，使合适的 T 细胞免于程序性死亡，并将这些自身耐受的 T 细胞释放到外周，如此实现上述功能。形成众多 TCR 的重组机制可能并非完全随机，有证据表明在发育期间存在着 V_α 向 J_α 和 V_β 向 J_β 连接的倾向[343~347]，这一重组事件由复杂的生物化学和基因调控机制负责，且独立于机体内表达的自身抗原，包括 MHC 分子。这些基因机制会产生大量 TCR，推测它们所包含的结构基序对自身 MHC 抗原从无亲和力到高亲和力，从中筛选出最终的功能性 TCR 库。体细胞基因改变在记忆性 B 细胞抗原受体库形成过程中的有着重要的作用，但 TCR 库形成过程中该机制作用不明显[348~350]，这提示 TCR 库的形成可能是一个单纯的筛选过程。这样胸腺具有双重功能：第一，从初级 TCR 池中筛选出那些可识别自身 MHC 分子的 TCR(所谓的阳性选择)；第二，从这个"临时"的 TCR 池中清除那些与自身 MHC 分子有高亲和力的 TCR，否则它们进入外周将会导致自身免疫反应(所谓的"阴性选择")。这样最终的 TCR 库中就包含了那些与自身 MHC 分子有弱的 或一般亲和力的 TCR，当自身 MHC 分子的肽结合凹槽中结合了外源性抗原肽时，这些 TCR 可以高效地识别相应的结构改变[351,352]。 492

本质上，可以将胸腺看作一个 TCR"进化"的场所，其关键作用是提供一个微环境，使得那些具有适当 TCR 的 T 细胞克隆具有很大的生存优势，而将那些不适当的 T 细胞克隆通过凋亡或其他机制删除掉。显然，这些 T 细胞的 TCR 特异性在被筛选之前，首先需要重排其 TCR 基因(包括成熟的 α 和 β 链)，并将形成的惟一的 TCR 结构表达在细胞表面。从前文可知，这个条件只有在胸腺细胞进入 DP 阶段才能具备。因而现在认为，筛选过程通常限于一个相当短的时相内，大约对应于 DP 阶段，随后增殖停止，也可能扩展至髓质里的 SP 阶段(图 14.3)[286,353~357]。这样就大体描述了胸腺内细胞筛选这一难题的框架，在该过程中一些不连续的、至今尚不能分成亚群的胸腺细胞快速经历上述关键性事件。

阳性选择：保留可识别自身 MHC 的胸腺细胞克隆

胸腺细胞的阳性选择主要依赖于其 TCR 分子和胸腺微环境中结合有内源多肽的 MHC Ⅰ和Ⅱ类分子的恰当结合。胸腺内如何在识别自身分子的基础上最终筛选出特异性识别外源性抗原的 T 细胞，这一基本问题仍待阐明；然而，这一过程的结果是形成"倾斜的"T 细胞库，可识别外源性抗原肽和自身 MHC 形成的复合物。$CD4^+$ T 细胞缘自与自身 MHC Ⅱ类抗原的相互作用，而 $CD8^+$ T 细胞缘自与自身 MHC Ⅰ类抗原的相互作用[362~366]。这两类 MHC 分子都存在于胸腺皮质里的树突上皮细胞[367]，以及骨髓来源的巨噬和树突细胞。皮质胸腺细胞与上皮细胞间形态学上存在紧密的接触(可见到胸腺细胞被上皮细胞膜完全包裹，见图14.2)；组织化学研究也表明在发育的胸腺细胞与上皮细胞接触部位存在受体"帽"结构，提示 TCR 与其配体的相互作用[368]；照射和脱氧鸟苷这些可去除髓源性成分[240,276,369,370]，但胸腺组织却对两者存在相对的耐受性，这些都提示皮质上皮细胞在这一基本的细胞间相互作用中有着重要的作用。相关转基因小鼠的研究也支持这一结论，这些转基因小鼠带有一个特异的 TCR 异二聚体基因和一个 MHC Ⅱ类抗原基因，该 TCR 可以特异识别该 MHC 抗原，而该 MHC 抗原可以特异地在不同胸腺部位表达。后者是通过改造启动子序列使该基因仅在胸腺内某区域内的特定类型细胞中表达[371,372]。只有当胸腺皮质上皮细胞表达该 MHC 抗原时，一些转基因系统中的阳性选择过程才会被影响[365,366,373]。有关胸腺上皮细胞参与的阳性选择机制直接证据也已存在[374]。在 relB 缺陷小鼠的异常胸腺中，不存在髓质上皮(事实上不存在髓质结构)或树突细胞[375]，但仍存在阳性选择机制。这样看来，胸腺皮质上皮对阳性选择机制来说不仅是必要条件，可能也是充分条件。

虽然对皮质上皮细胞在阳性选择中的重要作用似乎已达成共识，但尚存在不同的观点。现在知道，在外

周免疫应答中髓源性细胞作为抗原呈递细胞起着关键作用；也许受此观点的影响，有证据表明对照射耐受的髓源性细胞（如巨噬细胞和树突细胞）也参与了阳性选择过程，也已发现这些细胞表面有胸腺细胞簇集[376,377]。而且，在敲除了 β_2 微球蛋白基因的小鼠模型中，不能表达自身 MHC Ⅰ类抗原，移植入造血细胞（即髓源性细胞）后则可出现明显（虽然减弱）的 MHC Ⅰ类抗原依赖性的阳性选择作用[378]。此外，在胸腺内注射纤维母细胞系也可诱发阳性选择[379,380]。因此，虽然在某些实验条件下非上皮细胞可诱发阳性选择，但胸腺内上皮细胞可能是生理条件下该选择过程主要的（如果不是惟一的）诱发细胞。

可能影响阳性选择的主要因素（变量）包括：①对选择配体的亲和力，由 TCR 密度、配体密度和结合常数决定；②发育过程中胸腺细胞活化状态和/或信号转导机制及其与 TCR 聚合相耦联机制的变化[381,382]；③胸腺基质细胞群落的差异，它们包含不同的被 MHC 分子呈递的抗原多肽池[383]。大量研究支持一种分化的亲和力模型，即与 TCR 的低亲和力结合可导致阳性选择，而高亲和力结合则导致阴性选择[384]。由此我们可推测：TCR 与 MHC 分子间以恰当的亲和力结合，为这些发育过程中的胸腺细胞提供了一定的保护信号，否则它们就会发生凋亡从而被清除。相关实验支持该推断。例如，在一个早期转基因小鼠模型中，转有来自 $H\text{-}2^b$ 小鼠的一个可以与 $H\text{-}2L^d$ 反应的 TCR 基因，当该小鼠与原来的 $H\text{-}2^b$ 系回交时，所得到的小鼠外周 T 细胞（主要是 $CD8^+$ 型）仅有表达该 TCR 基因的 T 细胞[363]；这提示，带有该 TCR 的胸腺细胞是否可以存活，决定于它们与原来选择它们时的 MHC 分子间适当的相互作用，若缺失该 MHC 分子，将导致相应表达该 TCR 分子的 T 细胞的清除。同样，在另一个独立的转基因小鼠模型中，识别 $H\text{-}D^b$ 结合的雄性特异性 H-Y 抗原的 αβTCR 的选择需要 $H\text{-}2D^b$ 的 MHC 背景，即表达该 TCR 的 T 细胞只有在 $H\text{-}2D^b$ 系小鼠体内才可以经阳性选择以相当数量出现在外周（仅限于雌鼠，不表达 H-Y 抗原）[362,364,385]。虽然这些结果限于 TCR 和 MHC Ⅰ类分子限制的抗原，但应用来自 MHC Ⅱ类限制性克隆的 TCR 也得到相似的结果[365,386]。

基因敲除技术也促进了我们对阳性选择机制的认识。敲除 β_2 微球蛋白基因后，细胞表面的 MHC Ⅰ类分子不能正常表达，这使得外周 $CD8^+$ 成熟 T 细胞的缺失[387,388]。同样，MHC Ⅱ类分子缺失的小鼠也会出现外周成熟 $CD4^+$ T 细胞的产生[389,390]。MHC Ⅱ相关恒定链参与抗原肽与 MHC Ⅱ分子的正确结合以及向内质网的转运，若该分子缺失，细胞表面 MHC Ⅱ类分子表达减少，进而导致外周成熟 $CD4^+$ T 细胞减少[391]；同样当敲除 TAP-1 基因时，MHC Ⅰ类分子表达减少，使阳性选择和循环 $CD8^+$ T 细胞的缺失[392]。有关实验也揭示了受体重排机制的作用。该机制通过末端脱氧核苷酸转移酶（terminal deoxynucleotidyl transferase，TdT）在 TCR 基因 VDJ 或 VJ 连接序列上增加核苷酸，如此形成了 TCR 识别抗原的多样性。若敲除 TdT 基因，令人费解的是，增加了从 DP 细胞池中进行阳性选择的效率，这提示未经 TdT 修饰的种系 TCR 构象可能较修饰后更倾向于识别自身抗原[393,394]。

通过不连续性有限的 MHC 分子突变体实验[395~399]，已证实 TCR 与 MHC 分子结合巢中抗原肽间的基本作用，MHC 分子可以结合自身或外源性抗原肽。抗原肽结合巢中氨基酸残基的轻微改变都可以消除对 TCR 库和抗原肽结合的阳性选择作用。因为 T 细胞是在胸腺内基于识别 MHC-自身肽复合物来被筛选的，这就意味着：T 细胞对外源抗原肽的识别，可能缘于之前在胸腺内 TCR 筛选过程，而该过程是基于识别呈递有模拟性自身抗原肽的 MHC 分子。有研究表明：阳性选择和识别一个卵白蛋白（OVA，外源性抗原）的一个表位对 MHC 分子抗原结合巢中的氨基酸残基有类似的要求，这也支持上述推测[397]。相关转基因小鼠模型研究，一个是基于 TCR 对 I-Eb400 的识别，另一个是基于对 $H\text{-}2K^b$ 及其突变体的识别，也都精妙地证明了 MHC 分子多肽结合区域在阳性选择中的重要作用，而且 CD4SP 细胞的阳性选择也依赖于内源性多肽[402,403]。通过 MHC 缺陷性小鼠体外胚胎胸腺器官培养（fetal thymic organ culture，FTOC）研究 TCR 转基因胸腺细胞发育，也进一步强调了多肽和多肽-MHC 密度在 TCR 库形成过程和阳性及阴性选择过程中的关键作用[404~409]。然而这些发育中筛选过程的确切机制仍有待阐明。

在上述筛选过程中，除外 TCR 和 MHC 分子，有研究表明 CD4 和 CD8 共受体也发挥一定作用[410,411]。通过同源重组分别将 CD4 和 CD8 分子敲除掉，证实了 CD4 在辅助性 T 细胞发育及 CD8 在细胞毒性 T 细胞发育中各自发挥着一定的作用[266,412~415]。然而，目前仍不清楚从 DP 阶段分别下调 CD4 和 CD8 分子过程中的确

切信号。最后，有研究也提示在阳性和阴性选择过程中，信号转导通路中的成分可能以不同的形式出现在相应胸腺细胞中[416~426]。

阴性选择：清除有害的自身反应性 TCR

生物体不能对自身细胞发动免疫反应，即免疫耐受机制，是对免疫系统的一项基本要求。虽然有证据表明在某些条件下 T 细胞耐受可以在外周免疫系统中产生，但更多的证据表明该耐受机制主要在胸腺中诱导产生。因此，胸腺中那些具有一定自身反应性的 T 细胞克隆通过阳性选择存活下来的同时，其中一些与 MHC-自身肽有太强结合力的克隆必须被清除掉（克隆清除）或至少被失活（克隆无反应性或麻痹）。本节将主要论述阴性选择的克隆清除机制，但我们一开始需承认也存在一些众所周知的非清除机制，如无反应性[430,431]、共同受体分子下调[432,433]或上调 T 细胞活化阈值[434]。

早期研究识别特定自身抗原的 TCR V_β 的限制性谱，使得我们可以第一次系统地考察这些过程，尤其是那些支持克隆清除机制的环节[435~438]。在这些模型中，对某抗原（通常是 Mls 或 I-E 决定簇）特异性的细胞常优先高表达某些 TCR V_β 结构线，这样可以通过使用特异性 V_β 抗体来检测和定量研究这些细胞。若在胸腺中表达这些自身抗原成分，表达有这些特定 V_β 结构域的外周 T 细胞就会缺失。例如，在表达 I-E 抗原的小鼠外周和成熟的胸腺细胞池中，表达有 I-E 特异性 $V_\beta17a$ 的 T 细胞会被选择性清除，而它们却以预期的数量存在于小鼠未成熟的 DP 胸腺细胞群落中。

这提示胸腺中免疫耐受的诱导可能发生在未成熟胸腺细胞选择性向成熟胸腺细胞池迁移的时候，其关键的结合点在 DP 阶段。另外，$V_\beta17a$ 阳性（低密度）细胞分布于胸腺皮质，而不在髓质，这说明髓质或 CMJ 是阴性选择的部位。在胸腺皮质中表达 I-A 抗原的小鼠和 relB 缺陷性小鼠（缺失胸腺髓质结构，包括树突细胞和 UEA-1 髓质上皮细胞，见下文）都表现出阴性选择机制的缺陷，这也说明了胸腺髓质在阴性选择过程中的关键作用[375,470]。

TCR 转基因小鼠的出现（转入某些潜在的自身反应性 TCR）为我们提供了又一种研究胸腺内克隆清除机制的手段[432,439~445]。然而，必须注意到：TCR 表达时相与水平都直接影响正常的筛选机制，而在转基因模型（常存在明显的非生理 TCR 表达调控）中可能得出错误的结论（尤其是这些过程的时相）。例如，在 H-Y 特异性 TCR 转基因模型中[444]，已发现克隆清除可能发生在 DP 阶段以前。

虽然这些结果很有趣，提示 CD4 或 CD8 分子的表达可能不是阴性选择所必需，但并不意味着阴性选择通常发生在该阶段，因为转入的 TCR 基因表达未经成熟。基于亲和力观点的模型一般认为阴性选择过程发生在相对较晚的时相[271]，因为 TCR 表达量随着其成熟过程而增加，只有高亲和力的相互作用才可能导致克隆清除。直接在胸腺内注入正常的 DP 细胞团，证明只有在细胞经阳性选择进入 SP 阶段后，才能发生阴性选择[446]。在 TCRβ 链转基因小鼠体内（其内源性 α 链的正常重组为细胞表面 TCR 表达的先决条件），成熟的外周 SP 型 T 细胞被清除掉，而 DP 型细胞很少被影响[441]，这也支持前述结论。然而，用抗 CD4 单抗阻断了 $CD8^+$ SP 型 T 细胞的清除，这提示阴性选择也可以发生在 DP 阶段[447,488]；在另一个 αβTCR 转基因模型中，该转基因受体为 H-2 限制的 LCMV 抗原和 Mls^a 特异性，研究表明自身反应性 T 细胞被清除的成熟时期有很大范围的变化，该过程依赖于胸腺内自身抗原的性质[442,445]。最后，有证据表明相当的小 DP 型胸腺细胞，包括不太成熟的 TCR^{low} 和较为成熟的 TCR^{high} 细胞，可经凋亡而被清除[449,450]。总之，这些研究表明介导阴性选择的微环境结构不是特定地限于某个单一的胸腺细胞分化阶段。我们难以确定一个阴性选择的特定时间点，可能也反映了胸腺内 T 细胞筛选机制发生在多个发育时相，以使该过程愈加严格，避免自身反应性细胞逃逸到外周（见下文）。

494

大量实验表明：在胸腺阴性选择过程起关键作用的细胞是骨髓源性的巨噬细胞或树突（并指状）细胞。应用不同的模型，研究表明植入异体胸腺可导致对移植性异体抗原的耐受；若事先清除异体胸腺中的造血性淋巴细胞，则不可诱发耐受[451~454]。在小鼠出生时，注射耐受剂量的半异体细胞可诱发 T 细胞耐受，研究表明该耐受机制需要供体的造血性淋巴细胞进入受体小鼠的胸腺内[455]。基于骨髓嵌合模型的研究也提示对

照射相对耐受的髓源性细胞参与了上述清除机制[456~458]。在体外胸腺器官培养研究中,纯化的树突细胞可导致T细胞耐受[459];转基因小鼠体内实验中,表达I-E抗原的树突细胞可诱发阴性(而非阳性)选择[460]。因此,骨髓来源的巨噬细胞,尤其是树突细胞可能是阴性选择机制中主要有效的细胞成分[461]。该作用符合目的论的观点,因为树突细胞在外周是激活初始T细胞的主要抗原呈递细胞;因而,从成熟的初始T细胞库中删除那些能识别DC表面通常存在的MHC分子-自身肽复合物的T细胞,就极为重要。换言之,DC相关的"自我"必须被成熟T细胞免疫忽视,因为DC相关的外源性多肽是外周免疫应答首要的诱发条件。

关于髓源性细胞在阴性选择中进行筛选的机制目前仍未阐明,但现在认为这些细胞表面上调的MHC抗原密度、特定的黏附分子和这些细胞呈递的相应致耐受性多肽都参与该过程[462]。这种筛选的高效性已在一个转基因小鼠实验中证实,该小鼠仅在胸腺髓质中的相对少数髓源性细胞中表达I-E抗原,而其对表达$V_{\beta}17a$的T细胞清除程度与正常小鼠一样彻底[372]。其中辅助-共刺激分子ICAM-1和B7.1的作用已有研究[463]。将转染有MHC Ⅰ类分子以及ICAM-1和(或)B7.1分子的果蝇细胞作为抗原呈递细胞,研究表明表达B7.1或ICAM-1和B7.1两者可诱发相应转有TCR基因的DP胸腺细胞凋亡,而仅表达ICAM-1则可抑制凋亡的发生。这一结果相当有意义,因为在胸腺髓质中ICAM-1和B7.1两分子一起表达在上皮和髓源性细胞上,而在发生阳性选择的皮质上皮仅表达ICAM-1(非B7.1)分子[464~466]。因此,我们必须注意到完成最终的筛选过程不仅需要TCR与肽-MHC复合物间的相互作用,还需要有T细胞和其微环境间的相互作用,后者包括共同受体分子、黏附分子、共刺激分子、胞外基质分子等。

与阳性选择相反,早期研究表明胸腺上皮细胞不能诱导清除表达TCR V_{β}的胸腺细胞[467]。然而,在一些研究中,胸腺髓质上皮细胞能够诱导某些分化T细胞的耐受(虽然常非清除),这些T细胞常是多肽或次要MHC和MHC抗原特异性的[453,457,468,469];例如,在嵌合有I-E$^-$骨髓的小鼠体内,I-E$^+$的胸腺上皮细胞可以清除I-E特异性T细胞[371,439]。髓质上皮细胞具有许多类似与髓源性树突细胞的特点,包括树突样形态、MHC Ⅱ类分子高表达、稳定表达B7和表达NF-kB转录因子relB[464,471];选择性在UEA-1髓质上皮细胞表达I-E抗原的转基因模型中,研究表明这些上皮细胞参与超抗原特异性T细胞的阴性选择过程[465,472]。现在认为胸腺细胞与胸腺上皮细胞的自我间相互作用通常导致非清除性耐受,而与血源性细胞间的相互作用则导致清除[427,428,474]。考虑到免疫系统的首要任务是避免自身免疫应答,我们自然可以理解阴性选择如何要发生在多个胸腺细胞发育阶段,并需要多种类型细胞参与,且通过多种机制实现[442,445,475]。这样的筛选系统就存在多个"监察"点,以保证不让那些可能导致病理性自身免疫应答的T细胞释放入外周[271]。

随着分离和克隆胸腺基质细胞群落技术的进展,我们将可以对在复杂生物模型中观察到的现象进行更详细和系统的分析。例如,已获得一个胸腺基质细胞克隆性细胞系,可作为研究克隆清除的模型[476]。当KLH-I-E特异性Th细胞克隆与这些细胞共培养时,若不存在KLH,可出现增殖;但当加入KLH时,KLH可能被这些基质细胞呈递,从而导致Th细胞生长的完全抑制,这依赖于MHC分子的正常表达和基质细胞分泌的一种细胞因子,即胸腺基质源性T细胞生长因子(thymic stroma-derived T-cell growth factor,TSTGF)。最近,也获得了胸腺上皮细胞系,在体内和体外都证明它们参与T细胞的阳性和(或)阴性选择机制[477~479]。

二级淋巴组织:免疫致敏和淋巴细胞由初始型向记忆-效应型转变的部位

二级淋巴器官所独有的、明确的功能是启动免疫应答,即将抗原和初始淋巴细胞共同带到高度分化的淋巴微环境,后者可促进这些淋巴细胞发生抗原特异性克隆扩增以及向记忆-效应细胞亚群的分化。这一功能与二级淋巴组织的如下结构特征相对应,而这些结构特征在体内所有部位的二级淋巴组织具有普遍性。第一,所有二级淋巴组织都可通过特殊的机制使得抗原或带有抗原的辅助细胞从相应特定区域进入适当的淋巴微环境,所谓"特定区域"指二级淋巴组织相关的抗原进入机体部位的非淋巴组织。第二,所有这些组织具有特殊的血管结构变化,以利于血中淋巴细胞,尤其是初始淋巴细胞的回流。最后,所有二级淋巴组织内常并存有不同的淋巴微环境,即形成所谓T细胞区和B细胞区。正如我们以下所讨论,这些命名欠准确,因为B细胞发挥功能的主要部位在T区,反之亦然。不过,这种命名法确定了这两个独特、但相互影响的微环境,

495

后者是二级淋巴组织发挥功能的基础。

这些共有结构特征在不同类型的二级淋巴组织中，其终末分化形式也不同，例如淋巴结、黏膜相关淋巴组织（派尔隼，阑尾）以及脾脏，这些终末淋巴结构也反映了各自不同的功能。其中，淋巴节是输入淋巴管的终点，这些淋巴管从体内的多数组织中引流淋巴液（细胞外液），同时将这些组织中沉积的抗原带回到淋巴结中；脾脏则可以滤过血液，捕获那些侵入血管系统的抗原；黏膜相关淋巴组织，由以派尔集合淋巴结为典型，包含特化的淋巴组织可以捕获穿越黏膜上皮的抗原。

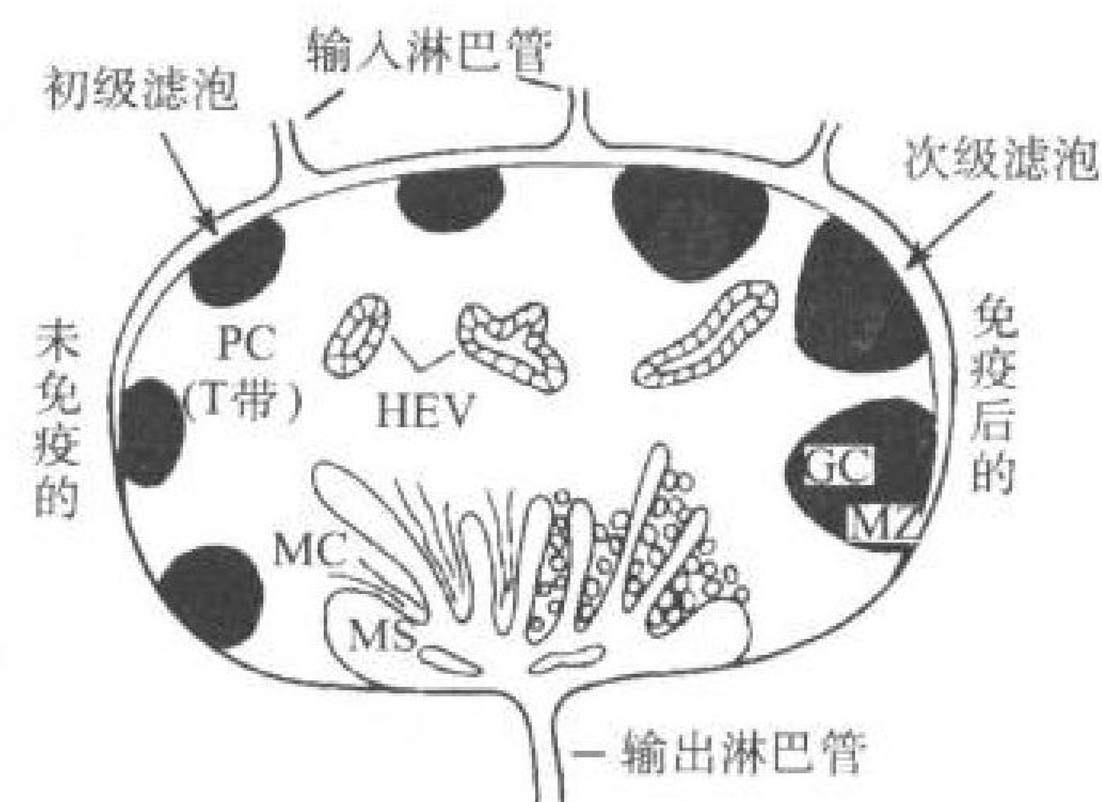
二级淋巴组织：结构和组成

因为捕获抗原和动员淋巴细胞是二级淋巴组织的主要功能，我们有必要了解这些组织的结构及其与相关脉管系统的关系，后者在淋巴结发挥其功能的过程中起着关键性作用。淋巴节是一个完整的淋巴脉管系统，该系统由一系列薄壁的特化的脉管组成，这些脉管起源于细胞外间隙微细的逐渐汇合的毛细管道[17]。毛细淋巴管为盲端，液体和淋巴细胞及辅助细胞等有形物质可自由渗透。连接淋巴内皮细胞和邻近胶原束的锚定丝可使这些通道保持开放，即使在由于免疫炎性反应导致胞外液压增加时。毛细淋巴管广泛分布，但主要集中在皮肤和胃肠道、呼吸道、泌尿生殖道黏膜下，这些部位也是淋巴生成的主要部位。而在中枢神经系统、眼球或脾脏和骨髓中由静脉窦营养的部分则不存在淋巴管。网状的毛细淋巴管最终汇集到较大的淋巴管（输入淋巴管），后者再向前汇聚并排空到区域淋巴节。这样，每个淋巴结或一群淋巴结就负责机体内由输入淋巴管支配的特定区域。

淋巴结为卵形（豆形）、有包膜的结构，成簇分布在机体的特定部位，多为血管交汇处，如腋窝、腹股沟和颈部或小肠系膜[17,480]。其解剖特点是：多条输入淋巴管从淋巴结的凸面进入，而在相对的所谓淋巴结脐面，有淋巴结动脉进入和淋巴结静脉及输出淋巴管穿出（图 14.4 上一幅）。输出淋巴管（包含滤过的淋巴液和淋巴细胞）继续向上延伸，汇聚到更大的淋巴管和中央淋巴结，最后它们全部汇入一条淋巴管—胸导管。后者接着汇入回流心脏的大静脉之一，这样就将淋巴液及其内细胞（主要是再循环的淋巴细胞，见下文）输回到血流中。

在淋巴结内（图 14.4），输入淋巴管开口在囊下（边缘）窦，后者呈裂隙状将纤维性包膜与其下方高度组织化的淋巴组织（淋巴节皮质）分隔开。在囊下窦中，可见淋巴细胞，但主要是巨噬细胞、树突细胞和目前尚知之甚少的基质细胞。总之，流入囊下窦的淋巴液和有形成分（包含细胞）必须经放射状窦腔来流过皮质区的高密度淋巴细胞渗透区，从而到达淋巴结的中央区——髓质。髓质中基质细胞和绞原纤维分枝状排列，其间为富含巨噬细胞和浆细胞的髓窦。这些髓窦汇聚到输出淋巴管。正是基于这样的解剖结构，从远端组织中由淋巴管运送到淋巴结内的抗原在滤过淋巴结皮质的过程中，可以与免疫系统充分地接触。淋巴细胞，尤其是初始型，也不断地流经皮质区。这些初始型淋巴细胞是通过皮质 T 区（所谓的侧皮质区）内独有的毛细血管后小静脉进入淋巴结的，该区域也正是因此而命名为 T 区（图 14.4 和图 14.5）。这些特化的静脉具有高、立方形内皮细胞，故而称它们为“高内皮静脉”（HEV）[481]。HEV 表达特殊的黏附分子，可以与淋巴细胞表面的相应受体（归巢受体）相互作用，如此高效地将循环中淋巴细胞（尤其是初始淋巴细胞）动员入侧皮质区。一些记忆和效应细胞也可以通过 HEV 游走入皮质区；另外，由于它们还具备游走入三级淋巴组织的能力，所以它们还可以通过输入淋巴管进入淋巴结。淋巴结皮质区致密的淋巴组织，使得该区内的绞原纤维框架及相关的胞外基质成分不太明显，而这些纤维和基质是淋巴细胞的支架，帮助它们进一步迁移到特化的淋巴结微环境或输出淋巴管中。有趣的是，这些纤维支架是由 HEV 呈辐射状到达囊下窦的，并已证明它们是一种快速将可溶性因子由输入淋巴管运送到 HEV 的通道[482]；当组织中存在炎性免疫刺激物时，这些因子可以调控淋巴细胞通过 HEV 被动员的活性。关于淋巴细胞归巢的生理和分子机制将在以后章节中详述。

皮质区可大致划分为两个结构和功能上的区域，即前面提到的 T 区和 B 区[481,483]（图 14.4 和图 14.5）。在淋巴结中，B 区主要由 B 细胞组成，呈现为结节或滤泡状。这些滤泡中的非 B 细胞包括形成支架的所谓滤泡树突网织细胞（FDC）、分化的巨噬细胞（可染体巨噬细胞）和少量的T细胞，主要是$CD4^+$记忆-效应细胞



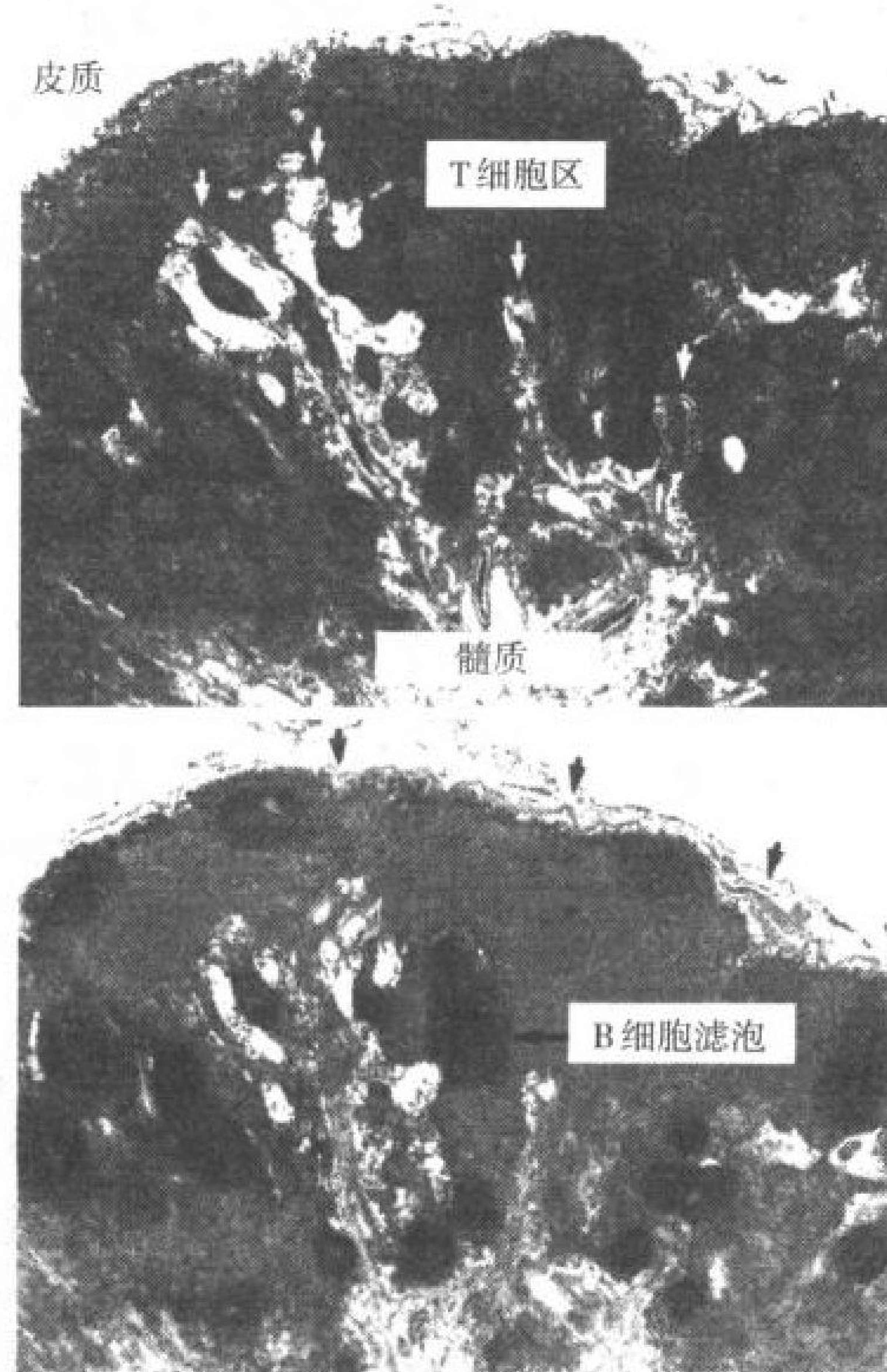


图 14.4 淋巴结的结构之一。**上图**:淋巴结结构示意图。输入(回流)淋巴结排空入淋巴节凸面处,那里紧邻淋巴结皮质,皮质中分布有以 B 细胞为主的淋巴滤泡和以 T 细胞为主的副皮质区(PC,也称为 T 细胞区)。在一个静息(未免疫的)淋巴结中,主要的淋巴滤泡是静息 B 细胞构成的初级滤泡(左侧)。而免疫后,多数则为次级滤泡(右侧),其中含有活化的生发中心(GC)B 细胞,外周为静息的皮质区(MZ)细胞。在副皮质区内存在有特化的内皮性静脉(HEV),它是淋巴细胞(尤其初始)循环时出入淋巴结的部位。淋巴结髓质由交替分布的髓索组成,在一个免疫后的淋巴结内,该处常充满了浆细胞(右侧)和髓窦(MS),后者汇集形成"输出"淋巴管。**中图和下图**:分别为一个抗原刺激后的人淋巴结 HE 染色结果(中)和用 B 细胞特异性单抗免疫组化染色的结果(下)。HE 染色图中的白色箭头标示了扩张的髓窦,可见向上延伸入皮质中。在髓质中,这些扩张的静脉窦汇集形成大的输出淋巴管。在该区域也可观察到扩张的静脉(含深染的红细胞)。注意在皮质中散布着众多 B 细胞滤泡。下图中,黑色箭头标示了纤维性淋巴结包囊,紧邻其下存在有裂隙样空间,相当于边缘(囊下)窦。输入淋巴管(本图中看不到)即排空到这边缘窦中。输入淋巴管中的抗原经富含淋巴细胞的皮质滤过后,才进入髓窦和输出淋巴管中。

496 (见下文)。这些滤泡可以从形态上划分为两类:初级滤泡和二级滤泡(图 14.5)。前者由小的静息 B 细胞与松散的 FDC 网络组成,而后者包含由活化 B 细胞和相对致密的 FDC 网络及分散的可染体巨噬细胞共同组成的核心区(生发中心),其外周由静息 B 细胞和疏松的 FDC(与初级淋巴滤泡中的一致)包绕(帽区)。典型的淋巴滤泡常分布在紧邻囊下窦的上皮质区,但在皮质的其他区域也可见到。某淋巴结中滤泡数量以及初级与次级淋巴滤泡的相对比例取决于该淋巴结的免疫状态,那些静息的淋巴结(没有或少有免疫原流入)常仅 *498* 有一些散在的初级淋巴滤泡,而那些免疫过的淋巴结中皮质区常发生增生,其内充满多个次级淋巴滤泡。这些滤泡间是副皮质区,其内主要分布着 T 细胞($CD4^+$ T 数量通常是 $CD8^+$ T 细胞的 3 倍以上),还有特征性的 HEV。副皮质区还存在着一种特殊的树突细胞(不同于前面提到的 FDC),它们的树突在邻近的淋巴细胞间迂回,并因而命名为并指状细胞。在发生细胞和体液免疫应答过程中,这些微环境组成间复杂的相互作用将在下文阐述。

黏膜相关二级淋巴组织的结构组成,在不同部位存在一定程度的差异,但总体上说,这些组织之间以及与淋巴结间高度类似[17,484,485]。这些黏膜淋巴组织与淋巴结之间的主要差别在于它们接触抗原的机制不同:在黏膜二级淋巴组织,抗原是穿过黏膜上皮到达淋巴组织的,而非经输入淋巴管。事实上所有包含一个与外

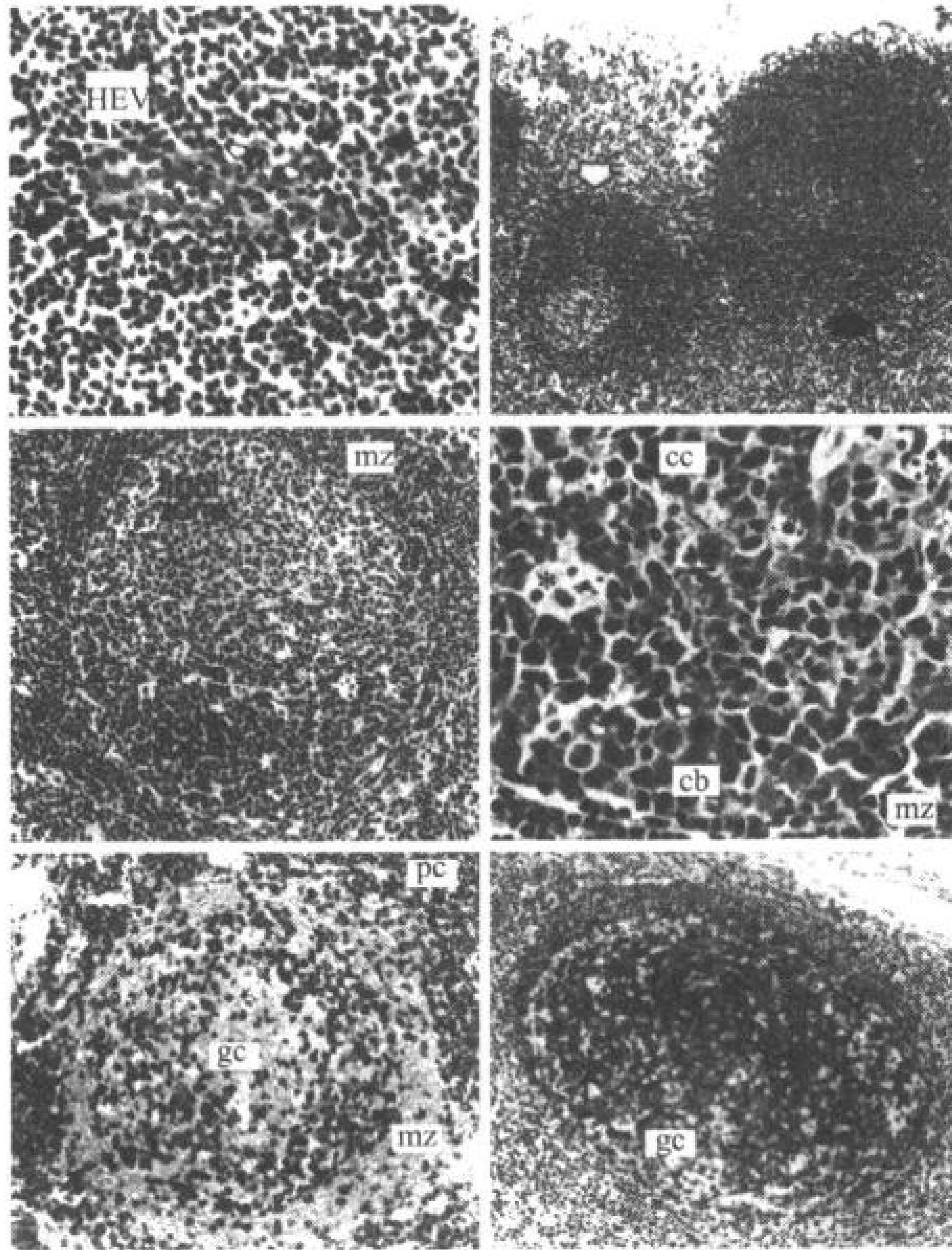


图 14.5 淋巴结的结构之二。**上左图**:高倍镜观察一个抗原刺激后的人淋巴结之副皮质区(HE 染色),可见一个高内皮静脉(HEV)处有淋巴细胞正在穿越(白色小箭头;注意在内皮细胞内或内皮细胞间有深染的小淋巴细胞核和静脉周围的纺锤状细胞)。多数副皮质细胞为小的静息淋巴细胞(主要是 T 细胞),但偶而也可观察到淋巴母细胞(黑色大箭头,很可能为 T 淋巴母细胞)。**上右图**:为囊下皮质区,包含一个初级 B 细胞滤泡(黑箭头),和一个邻近的早期生发中心(白箭头),在后者中增殖的生发中心淋巴母细胞将初级滤泡中的 B 细胞推挤至外周(形成边缘区)。这些生发中心细胞尚未极化形成成熟生发中心特有的亮区和暗区(HE 染色)。**中左图**:一个成熟的生发中心,其周围分布有已变薄的边缘区(mz);其内较易辨认出极化形成的一个含中央母细胞的暗区和一个含中央细胞的亮区(HE 染色)。**中右图**:高倍镜观察同一生发中心,显示了暗区与亮区的交界。中央母细胞(cb)一律为圆形核的大细胞,核内含有松散的染色质和明显的核仁。这些细胞几乎全部处于分裂周期中,可见众多分裂细胞形态(白箭头)。而中央细胞(cc)是一些直径变化较大的 B 细胞,其胞核不规则,常呈断裂状,核内染色质浓缩、核仁缺失或较不明显。这些细胞来源于增殖中的中央母细胞,而其自身可能不能发生增殖。仅在亮区与暗区交界处,可见多个可染的巨噬细胞(*)。这些细胞内含有吞噬的凋亡中央细胞残骸。**下左图**:一个生发中心用 T 细胞特异性单抗免疫组化染色。深染的 T 细胞(多为 $CD4^+/CD45RA^-/RO^+$ 记忆-效应型、MHC Ⅱ类限制性辅助性 T 细胞)虽为一个较少的细胞群落,但它们在生发中心内(gc)并非少见,而在边缘区(mz)则分布较少。与生发中心相反,副皮质区(pc)内含有多量的 T 细胞,其中混杂有初始型和记忆-效应型、$CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞。**下右图**:一个生发中心用滤泡树突细胞特异性单抗免疫组织化学染色,明显可见深染的 FDC 树突状突起。

界直接接触之黏膜表面的器官内,都存在二级淋巴组织,包括胃肠道、肺和泌尿生殖道。然而,这些结构的分布呈现高度的种属差异。例如,在人类中,约有 1000 个独立的派尔集合淋巴结结构(小肠的二级淋巴组织)集中在末段回肠;而在小鼠或大鼠中,约 2~11 个相对较大的派尔集合淋巴结均匀地分布在整个小肠;在猪中,联合派尔集合淋巴结几乎包含了回肠远段 100cm 的所有表面上皮[486]。同样,支气管相关二级淋巴组织是兔的一种固定的重要的淋巴组织,而在人类则不是[487]。这种种属差异可能缘于各物种生存环境的差异,不同的生存环境使得物种所接触的抗原种类和部位也迥然各异(如肠内正常菌群的属性和分布)。黏膜相关二级淋巴组织的大小和分布还取决于个体的抗原接触史。前文也提到过,慢性炎症刺激可使得黏膜及非黏膜部位出现不典型的二级淋巴组织。

黏膜器官的二级淋巴组织常分布在固有层内,即紧邻黏膜上皮富含血管的结缔组织,但也可以延伸到更深的层次[17]。与淋巴结相似,这些淋巴组织也呈现有明显的 B 淋巴细胞滤泡,外周由类似于淋巴结副皮质区的 T 细胞区包绕(图 14.6),也存在 HEV。这些结构显然是由正常或近期感染的固有层(三级淋巴组织,见下文)分化形成的,在这些三级淋巴组织中散布着许多淋巴组织成分(主要是效应成分),但未形成明显的形态组织。覆盖这些二级淋巴组织的黏膜上皮细胞呈现适应于其免疫功能的改变,尤其便于摄取肠腔内抗原并将其穿过上皮转运到淋巴组织内。在小肠派尔集合淋巴结中,这些特化的上皮细胞命名为 M 细胞(微皱褶细胞,因其特征性的腔细胞表面而得名),已证明该细胞可以将蛋白质乃至完整微生物大小的颗粒从肠腔转运到固有层中的淋巴组织中[486]。黏膜二级淋巴组织周围的毛细淋巴管丛可以将淋巴细胞、辅助细胞,以及抗原转运到输出淋巴管中,最后汇入胸导管。

脾是体内最大的淋巴器官,约含体内 25% 的淋巴细胞[488]。其血流量相对于它的大小而言是巨大的:在

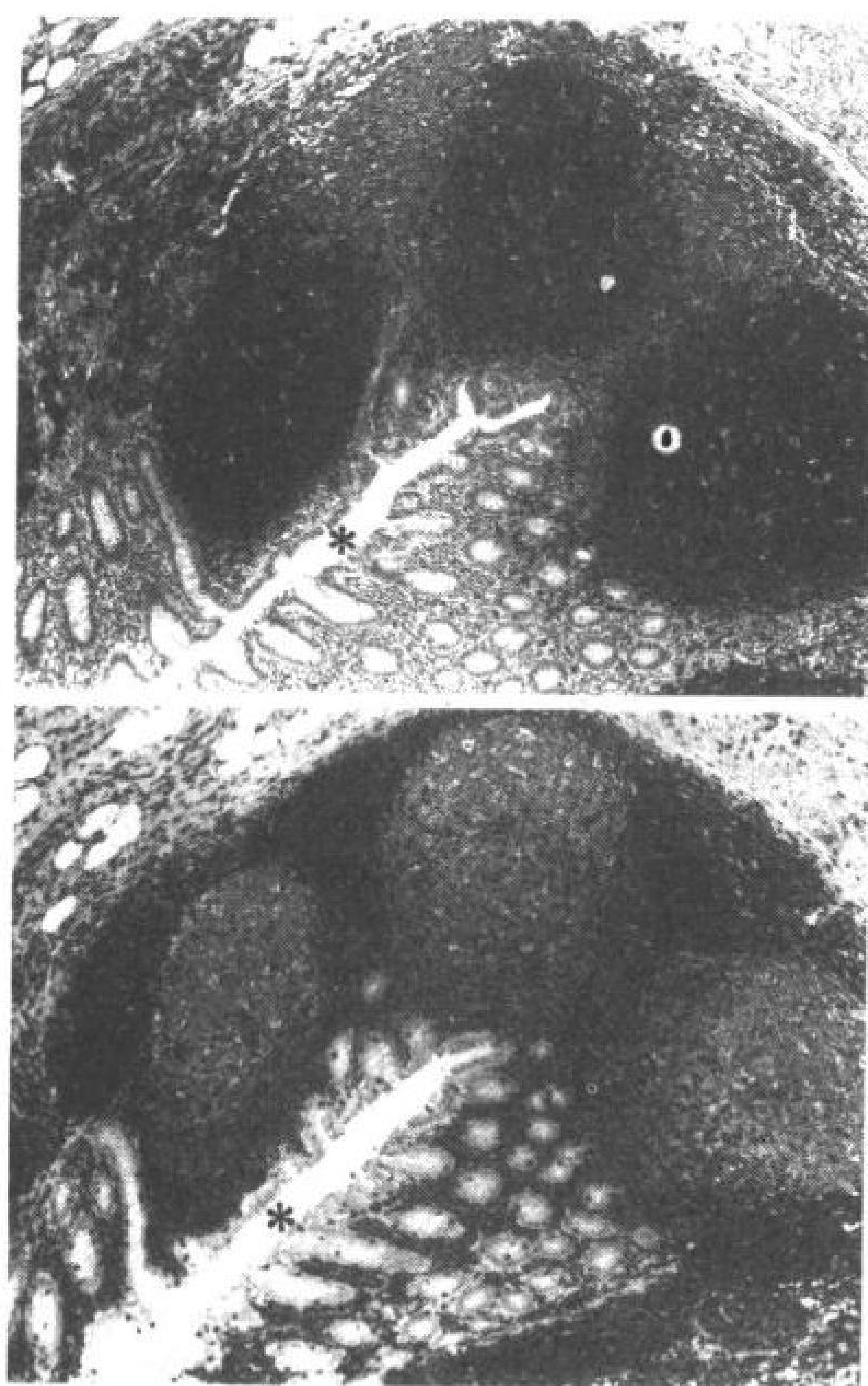


图 14.6　黏膜相关二级淋巴组织的结构。分别用 B 细胞和 T 细胞特异性单抗免疫组化染色的人阑尾结构(上和下图，* 号标示阑尾腔，注意阑尾上皮和腺体)，显示了二级淋巴组织特征性的 B 细胞区和 T 细胞区并列分布(前者在抗原持续刺激的阑尾中几乎全部分布于次级滤泡)。HEV 存在于该组织的 T 细胞区，但低倍镜下观察不明显。

人体内，这个 100～150g 的器官(占体重的 < 0.3%)却每分钟接受约 200～300ml 的血液(约占心输出量的 5%)[489]。这么大量的血液经脾内的红髓滤过，除去循环中的颗粒性物质和损伤的红细胞[17,490,491]。同时，这样的血流也将抗原和淋巴细胞运输到脾内免疫功能较强的其他部位。这些部位，即白髓(在人体内占脾脏实质的 15%)，是脾内的二级淋巴组织，组成了针对血源性抗原免疫应答的主要启动者[492,493]。与前述别的二级淋巴组织一样，白髓在流入抗原和淋巴细胞的血管周围存在 B 和 T 细胞区。这种结构一定程度上有别于淋巴结和派尔集合淋巴结，因而将它们分开描述[17,490,493,494](图 14.7)。

脾动脉在脾门处入脾，随即分支为较小的小梁动脉，后者又分支为更小的中央动脉。这些中央动脉穿过脾实质，最终分支为帚形动脉，并排空入红髓。在中央动脉和帚形动脉周围，淋巴细胞呈同心环鞘状分布，其中主要为 T 细胞。这些环鞘称为动脉周围淋巴鞘(periarterial lymphatic sheath，PALS)，组成了脾的 T 细胞区。初级或次级 B 淋巴滤泡通常周期性地在动脉分支位点出现，作为动脉周围淋巴鞘的外延。这些滤泡在结构上类似于其他二级淋巴组织中的对应结构。在初级滤泡或次级淋巴滤泡的帽区(以及鼠类的 PALS)周围是边缘区。边缘区虽然并非脾所独有，但在脾中却相对显著和固定地存在着(见下文)，其中包含 T 和 B 细胞(B 细胞占大多数，图 14.7)，现在认为正是在这里脾内 B 和 T 细胞初次接触血液带来的抗原[493]。事实上，边缘区是 B 和 T 细胞进入白髓的主要部位。脾没有 HEV，这种特化的边缘区窦(由中央动脉的小动脉分支供血)被认为发挥着类似于其他二级淋巴组织中 HEV 的功能[490]。也有报道边缘区在初次免疫应答过程中，至少是一些记忆 B 细胞产生的位点[495,496](见下文)。在除脾以外的其他二级淋巴组织中，边缘区并非一个形态显著的组成，但有证据表明在淋巴结和黏膜相关二级淋巴组织中的 B 细胞区发挥着类似边缘区的作用，尤其在免疫激活状态下[497,498]。

二级淋巴组织的功能：产生记忆和效应淋巴细胞

在初级淋巴组织中新生成的淋巴细胞输出到外周免疫系统中，可以识别和启动针对相应抗原的免疫应答，但这样的初次免疫所激发的免疫效应常比相同抗原再次免疫(二次免疫)时迟缓且低下。这种再次遇到同样抗原所激发的增强性免疫应答被命名为免疫记忆，在 B 和 T 细胞介导的免疫反应中都存在[15]。正如下文将要阐述的，目前的研究提示虽然 B 和 T 细胞的免疫记忆机制在细胞和分子水平存在着差异，但有一点两者是相同的，即二次应答中增强的免疫活力和效应是通过两个方面来实现的：①抗原特异性的淋巴细胞数量上的增加；②可能更为重要的一点，即抗原诱发初始淋巴细胞向记忆或效应细胞的性质上的分化。(B 细胞的效应细胞——浆细胞，与小记忆 B 细胞或记忆 B 母细胞易于区分；而记忆和效应 T 细胞群，就我们所知，在细胞水平有很大的重叠性，因而将二者联合命名为记忆-效应细胞。) 对于 T 淋巴细胞，由初始 T 细胞向记忆-效应 T 细胞转化过程中的增殖与分化是发生在二级淋巴组织中，并表现在以下几方面的变化：①活化机制；②效应机制(包括分泌细胞因子或介导细胞毒作用)；③归巢能力(见下文)，而对大多数 T 细胞而言，它们

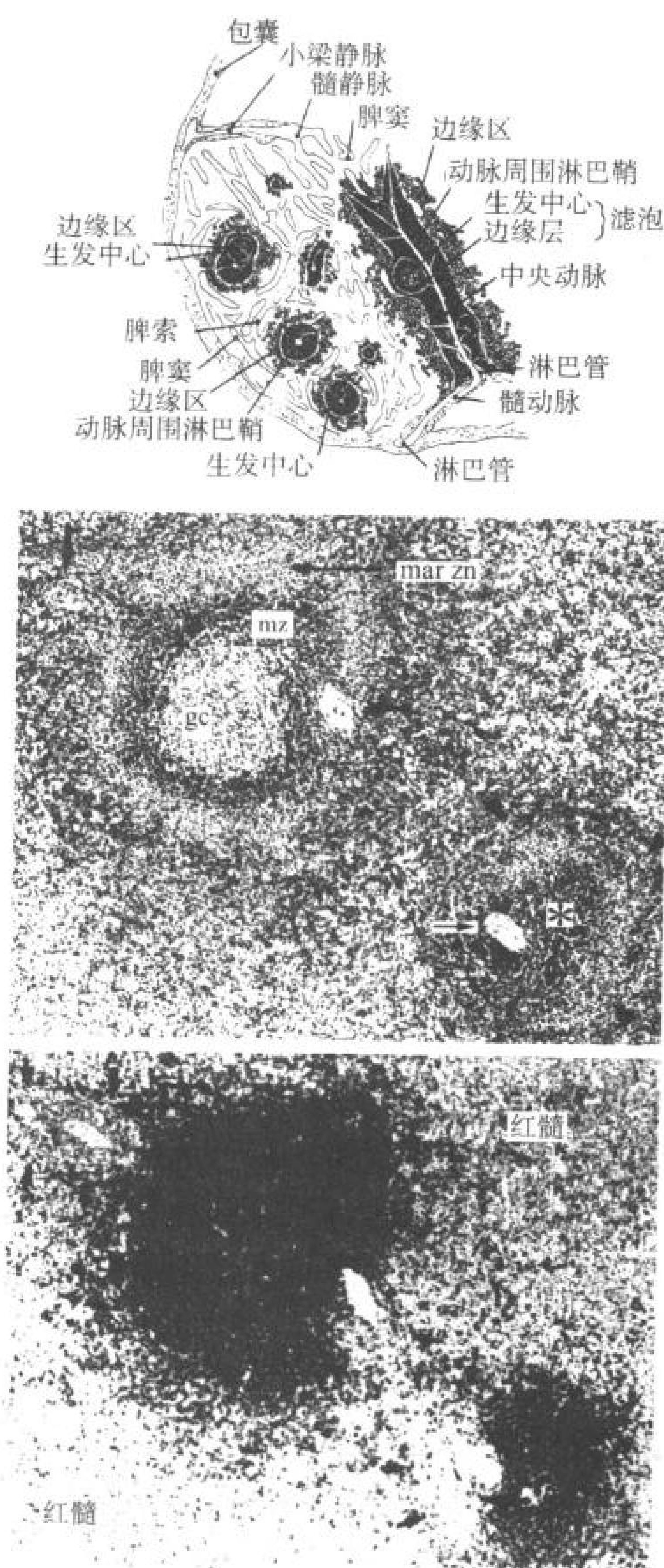


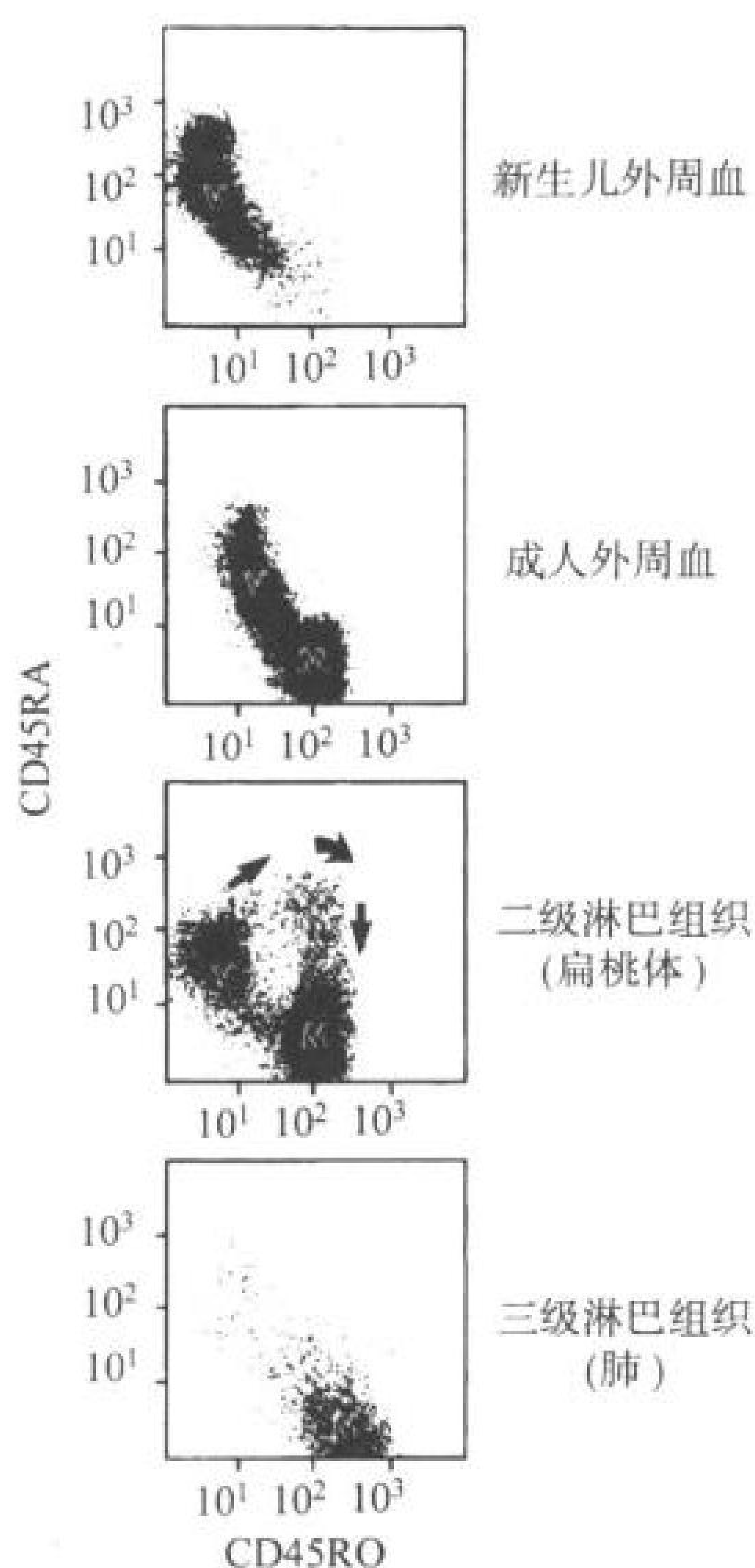
图 14.7 脾的结构。上图:脾结构示意图(经允许,选自 Weiss L, Tavassoli M. Anotomic hazards to the passage of erythrocytes through the spleen. Semin Hematol 7:372, 1970.)。中和下图:抗原刺激后人脾的 HE 染色(中图)或 B 细胞特异性单抗免疫组化染色(下图)。中图可见白髓及邻近的 3 个笔刷形动脉(小箭头)。在低倍镜下较易观察到动脉周围淋巴鞘——脾 T 细胞区,与深染的 B 细胞区相比呈现浅色(小箭头)。在上方和中间动脉之间的 B 细胞区呈现边质区(mz)内典型的生发中心(gc)分布特点,两动脉位于生发中心的边缘区内(marg. zn)。在最下方动脉周围的白髓中,切片过程丢失了生发中心,只显示了皮质区(*)和周围的边缘区(箭头)。

的抗原识别能力则无改变(即,通常 TCR 库不存在胸腺发育后的改变)[15,16,499,500]。对于 B 细胞,由初始向记忆或效应的转变过程较为精细,包括它们向不同记忆和效应细胞(浆细胞)的分化,以及它们的抗原受体——效应分子(免疫球蛋白)基因结构的改变,增加这些效应分子对抗原的亲和力(所谓的亲和力成熟)和它们的效应活性(即 Ig 类别向功能性表型的转化)。以下还会讲到,外周 B 细胞的成熟发生于二级淋巴组织的 T 细胞区,以后则转移至生发中心的特化微环境。

T 细胞在二级淋巴组织中的分化

如同前述初级淋巴组织中 T 和 B 细胞发育一样,相关功能标准和特定 T 细胞成熟状态之表型标志的建立,使得我们可以较为容易地分析二级淋巴组织中 T 淋巴细胞由初始向效应转化过程中的各种分化改变。在成熟的人类免疫系统中,按照外周 T 细胞相关功能和表型的特定组合,包括活化条件、效应功能(如合成细胞因子)、归巢行为、黏附功能和细胞表面标志,可将它们(含 $CD4^+$ 和 $CD8^+$)划分为两个主要的亚群,即初始和记忆-效应型。其中初始 T 细胞亚群,主要分布于未成熟(新生的)免疫系统(图 14.8),类似于最为成熟的胸腺细胞[501-503],它们具有以下特点:①对抗原再次刺激低或无反应性[502,504-506];②低或无能力产生 IFN-γ、IL-4 等效应细胞因子[507-512];③TCR 介导的激活过程需要较高的共刺激信号[513-515];④不能有效地成熟为

MHC 限制性杀伤性 T 细胞[516,517]；⑤高效地在体内二级淋巴组织中定居，而非三级淋巴组织[518~521]；⑥发生凋亡的可能性相对较低[522,523]；⑦与这些功能特点相对应，其 CD45 蛋白酪氨酸磷酸酶以 RA 异构体为主[524~531]；⑧一致低表达某些黏附分子，如 CD11a/CD18（LFA-1）、CD54（ICAM-1）、CD2、CD58（LFA-3）、CD44 及凋亡启动分子 CD95/FAS[523]，以及至三级淋巴位点（如皮肤）的选择性归巢受体 CLA[501,502,524,531~534]；⑨一致高表达至外周淋巴结的归巢受体 L 选择素和共刺激分子 CD27[501,535,536]；⑩一致适度表达至派尔集合淋巴结的归巢受体 α4β7 凝集素[531,537]。



502

图 14.8　多参数（三色）流式细胞仪（CD3，CD45RA 和 CD45RO）显示了人血和淋巴组织中 CD45RA 阳性/RO 阴性或低表达的初始（v）和 CD45RA 阴性/RO 高表达的记忆-效应（m）T 细胞亚群的分布情况。这些样品中分选 $CD3^+$ 亚群，即为纯 T 细胞（每个黑点代表一个细胞）。新生儿外周血中的 T 细胞本质上全为初始细胞；而成人外周血 T 细胞中初始和记忆-效应细胞数目大致相等。这与它们各自相对的免疫经验一致。在（出生后）二级淋巴组织中，如扁桃体，也同时存在两型 T 细胞，此外还观察到一个 $CD45RA^+/RO^+$ 过渡型细胞亚群。在体内和体外，抗原刺激后的初始 T 细胞沿着箭头所示方向，经各中间阶段最终分化为记忆-效应型[526]。在三级淋巴组织中的 T 细胞，如此处的肺内 T 细胞，多数为记忆-效应细胞。（注：此处忽略了"逆化"的 $CD45^+RA^+/RO^{low}$ 型 $CD8^+$ 记忆 T 细胞。）

相反，记忆-效应亚群包含了大多数能与回忆性抗原发生应答的 T 细胞，这些细胞也可以在体外由前述初始细胞经适当激活而产生[509,526,538]，主要表达低分子质量（高活性）的 CD45 RO 异构体（但一些公认的记忆 $CD8^+$ T 细胞却表达 CD45RA，见下文），呈现高效的效应功能（产生效应细胞因子、细胞毒性），高表达的 CD95/FAS，凋亡的易发性，高水平的 CD11a/CD18 和其他常见的黏附分子，L 选择素、α4β7 凝集素、CD27 的不均一表达（同上所述）。最重要的是，记忆-效应 T 细胞不同于其表型和功能同源的初始前体细胞之处在于它们显著的功能多样性（图 14.9 和图 14.16）。整个记忆-效应细胞亚群包括了多种不同功能活性的细胞群落，它们在归巢-迁移行为、细胞因子生成和分泌活性甚至活化阈值等重要功能属性上呈现相当的异质性，下文将详细阐述。记忆-效应 T 细胞的 TCR 库是抗原选择性的（见下文）[500]，但除了极少数的例外，该 TCR 库在 T 细胞由初始向记忆-效应转化过程中不发生结构上的改变（与 B 细胞相反），因而可以说该库是原来胸腺选择形成的初始 T 细胞库的一部分。

上述记忆-效应 T 细胞分化的特异性标志主要适用于人类，但现在知道在动物（尤其是鼠类）模型中，也存在类似的初始-记忆 T 细胞分类[540]。小鼠和大鼠的这些细胞亚群的分型一定程度上还阐明的不如人类的清楚，因为：①相对于人类，鼠类已知的标志尚比较少；②许多已研究过的标志表达存在种属间的差异。例如，虽然鼠类也表达与人类相似的 CD45 异构体，但它们在 T 细胞成熟和实现功能过程中的表达调节形式，则不同与人类的[541,542]；因此，应谨慎地在物种间推测初始型向记忆-效应型转变的表面标志变化。需要指出的是，研究任何物种初始型与记忆-效应 T 细胞间的分化，不能仅依赖于一种或两种表型标志，而必须依据相应细胞的复合表型。例如，目前普遍认为 CD45 的 RA 和 RO 异构体可用来分别区分人类的初始和记忆-效应 T 细胞。这个标准对 $CD4^+$ T 细胞一般仍然适用，但已有研究表明有相当一部分记忆 $CD8^+$ T 细胞可以逆反表达这些异构体（如，可以是 $CD45RA^+/RO^-$ 表型），而保持记忆细胞其他的表型和功能特点[531,543~545]。

记忆-效应细胞存在功能异质性首先是在 20 世纪 70 年代和 80 年代早期的淋巴细胞归巢实验中证实的（虽然不被多数人知道）[520,546]。这些研究表明某些细胞亚群在静脉注射后，呈现不同的向黏膜和外周部位迁移特性，现在这些细胞被分类为记忆-效应 T 和 B 细胞。更多的研究证实了这些早期发现，并表明记忆-效应 T 细胞归巢受体的表达和归巢行为（到二级和三级淋巴位点）存在高度的异质性（见下文"归巢"部分）。然而，直到 20 世纪 80 年代晚期发现记忆 T 细胞合成细胞因子的异质性，这类细胞的特化功能才被广泛认识

到[547]。最先是在小鼠不同的 CD4$^+$ T 细胞克隆中，证实它们的细胞因子合成-分泌存在着不同形式。通常存在两种形式：①Th1 型，主要分泌 IL-2、IFN-γ 和 TNF-β；②Th2 型，主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10(及后来的 IL-13)[548,549]。这些 Th1 和 Th2 克隆的生理意义体现在体内不同部位的 Th1 和 Th2 极化样细胞因子反应，它们与针对不同感染因素的免疫保护机制有关[547,550,551]。在人类 CD4$^+$ T 细胞克隆中证明存在类似的细胞因子分泌形式，同样在体内炎症或超敏反应位点也存在细胞因子极化[552~558]。最近，多道流式细胞仪的出现使我们可以同时检测单一的、刚分离的、端正激活的记忆-效应 T 细胞产生的多种细胞因子，有关研究表明这些 T 细胞分泌的细胞因子谱远较所谓 Th1/Th2 模式复杂(图14.9)[506,511,559]。这些研究表明：虽然在整个 CD4$^+$ 记忆-效应 T 细胞群落中细胞因子的分泌有一定的偏向性或主要模式，但其中至少存在一小群细胞因子的分泌可以呈现出所有可能的形式(如同时分泌不同的细胞因子)，这也说明每一种细胞因子合成的调节可能是相互独立的。最后，值得注意的是，研究表明合成细胞因子同样是 CD8$^+$ T 细胞的一项关键效应机制，比如在控制一些非溶细胞性病毒感染中起着关键作用[560,561]；与 CD4$^+$ 记忆-效应细胞相似，CD8$^+$ 记忆-效应细胞分泌的细胞因子也呈现相应的类似性[562~564]。

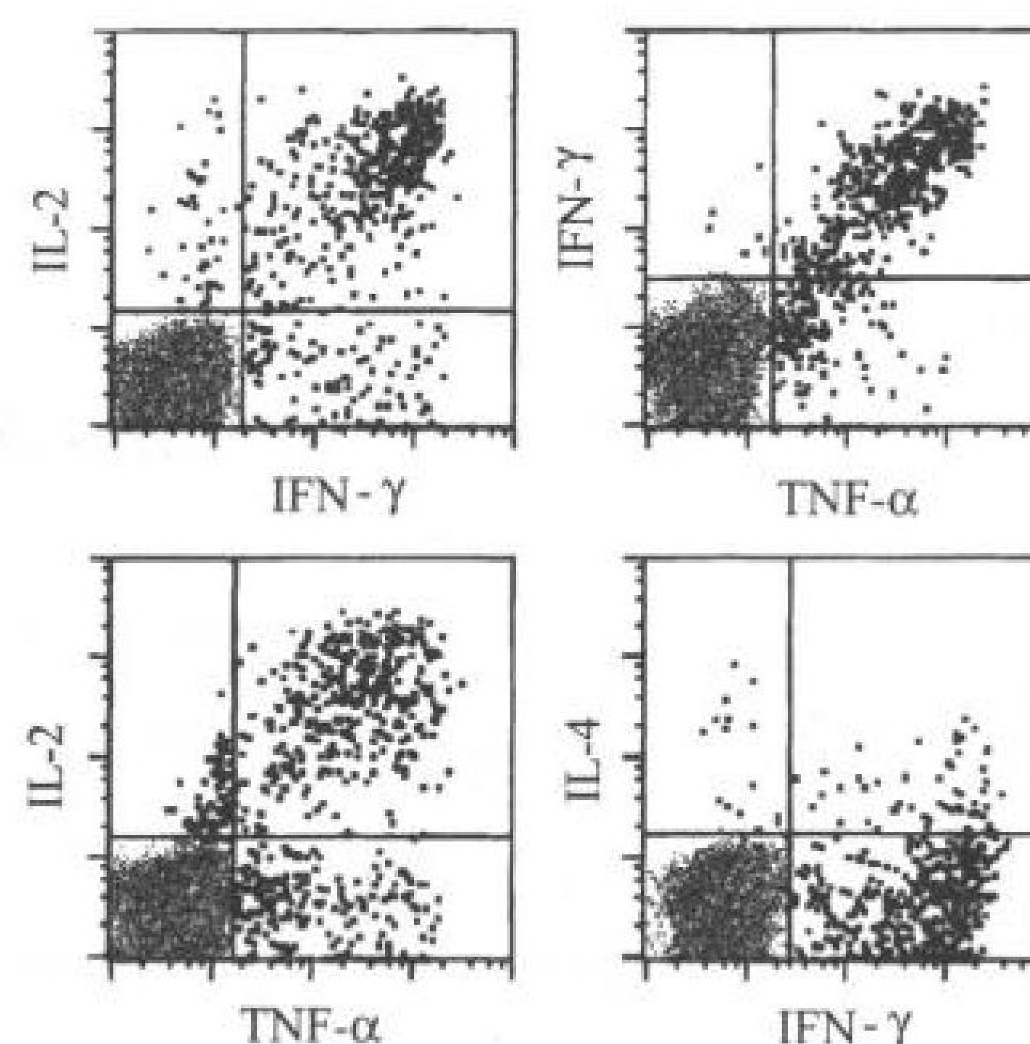


图 14.9　根据特异性抗原刺激后 T 细胞分泌的细胞因子谱，显示记忆 T 细胞的异质性。用巨细胞病毒刺激 T 细胞后，抑止其细胞因子分泌(使所生成的细胞因子贮留于胞内，后特异性染色)。这里用流示细胞仪显示了 CD4$^+$ 记忆 T 细胞分泌细胞因子的情况。每一个黑色或灰色点代表一个 CD4$^+$ T 细胞(共显示了 45 000 个)，其中较大的黑点代表那些反应性细胞。注意虽然多数应答细胞同时生成 IFN-γ、TNF-α 和 IL-2，但许多应答细胞亚群产生的细胞因子是这三种细胞因子和 IL-4 的各种可能性组合。而且细胞因子谱因抗原类型的不同而变化；例如，在一个过敏体质的个体内一个变应原可以使 T 细胞产生较高水平的 IL-4。

总之，这些研究勾勒出了一条特征性的分化路径，开始于功能有限的初始 T 细胞，然后分化为功能异质性的记忆-效应 T 细胞，后者具有了成熟的效应活性和向淋巴组织以外的炎症部位迁移的能力。因为初始 T 细胞主要地(如果不是专一地)分布于二级淋巴组织，自然从初始型型向记忆-效应型细胞分化的路径发生在这些部位(至少在这些部位启动，见下文)。与此相一致，已在小鼠和人的二级淋巴组织中观察到初始和记忆-效应 T 细胞的表型和功能上的转变[500,526,565]，事实上仅在这些部位观察到(图 14.8)。而且，如果明显阻断初始 T 细胞 向淋巴结中的迁移(如在 L 选择素敲出小鼠体内)，虽然 T 细胞仍然可以分化为相应的效应细胞[566]，但局部接种的抗原不能触发皮下 T 细胞介导的超敏反应。 *503*

上述 T 细胞从初始型向记忆-效应型分化的路径是由抗原启动的，这一点有别于初级淋巴组织中 T 细胞的分化。在不存在抗原时，初始 T 细胞是一群存活期较长的稳定细胞群落，它们在各种二级淋巴组织间不断游走[329,518,567]。当它们遇到合适的抗原呈递细胞呈递的相应抗原时，就会被激活，进而发生扩增，经历从初始向记忆-效应表型及功能上的相关变化(图 14.10)。在这一初始 T 细胞活化过程中，局部微环境以不同方式调控着上述向记忆-效应 T 细胞分化的过程，从而产生前述记忆-效应 T 细胞的功能异质性[520,521,547]。显然，由特定细胞因子或细胞-基质或细胞-细胞间的黏附作用(后者又称为共刺激)向活化的初始 T 细胞所传递的信号，决定了以后所产生的记忆 T 细胞的归巢受体表达模式、细胞因子合成能力，也许还有活化阈值(即对共刺激信号的依赖程度)。例如 IL-12 可促进记忆-效应 T 细胞再次刺激后产生高水平的 IFN-γ，而 IL-4 则促进 T 细胞优先分泌 IL-4[568,569](见第 26 章)。这一记忆-效应 T 细胞功能的协同调节机制较为复杂，仍尚未完全阐明；但目前认为：在机体内某特定二级淋巴组织分布区域内的(三级)淋巴组织，可通过产生一些可溶性或细胞性调节成分来影响该淋巴组织中产生的记忆-效应 T 细胞的功能特性。例如，在皮肤回流淋巴结内针对某皮肤病毒的初始型 T 细胞，在特定微环境调控下分化为可定向归巢到皮肤的记忆-效应 T 细胞[329]，并可分泌某种具有适宜功能(如抗病毒)的细胞因子，如 IFN-γ。这样的系统可依据局部条件，通过局部微环境精确调控免疫效应应答的性质。 *504*

介导初始 T 细胞活化和分化是二级淋巴组织中 T 细胞区的一个特有功能，有关这一功能的生理基础，目前尚未完全阐明；一个可能的解释是：同时存在初始 T 细胞（可选择性迁移到这些部位）和初始 T 细胞活化所需的特定辅助性细胞。初始和记忆-效应 T 细胞亚群的活化依赖于对“自身 MHC-抗原肽”复合物的识别，其中 $CD8^+$ T 细胞识别 MHC Ⅰ类分子，而 $CD4^+$ T 细胞识别 MHC Ⅱ类分子。本质上，所有类型的细胞均可表达 MHC Ⅰ类分子，同时多种细胞可表达或被诱导表达 MHC Ⅱ类分子，但不是所有这些类型的细胞能够加工和呈递抗原给 T 细胞，尤其初始 T 细胞。在这方面树突细胞独树一帜，它们是髓源性辅佐细胞的一个细胞系或某些细胞系的相关细胞群，具有特征性的外形、不能黏附到组织培养表面、缺乏吞噬活性、高表达 MHC 分子，最重要的是具有启动未致敏免疫系统中的 T 细胞应答这一独特功能[256]。

在各种体内外有关辅佐细胞功能的研究中（尤其那些包含初始 T 细胞的研究），树突细胞（DC）的功能效率通常高出其他类型辅佐细胞 1～2 倍[571～576]。例如，体外将某蛋白抗原负载 DC，然后仅注射 10^5 个 DC 即可有效地激活那些回流淋巴结中 $CD4^+$ T 细胞；反之注射 10 倍数量的脾细胞（主要是 B 细胞）或腹腔巨噬细胞则很少或不能活化 $CD4^+$ T 细胞[573]。DC 发挥高效抗原递呈功能的分子基础，包括高水平表达的 MHC 分子（小鼠的 I-A 和 I-E，人的 HLA-DP-DQ 和-DR）；以及可诱导表达高水平的多种细胞黏附分子，这些分子参与和/或放大 T 细胞活化机制[256,576～578]，这些黏附分子包括 β2 整合素、ICAM-1（CD54：T 细胞 LFA-1 的配体）、LFA-3（CD58：T 细胞 CD2 的配体）和 B7-1/B7-2（CD80/CD86；T 细胞共刺激分子 CD28 的配体）。此外，DC 还具有一

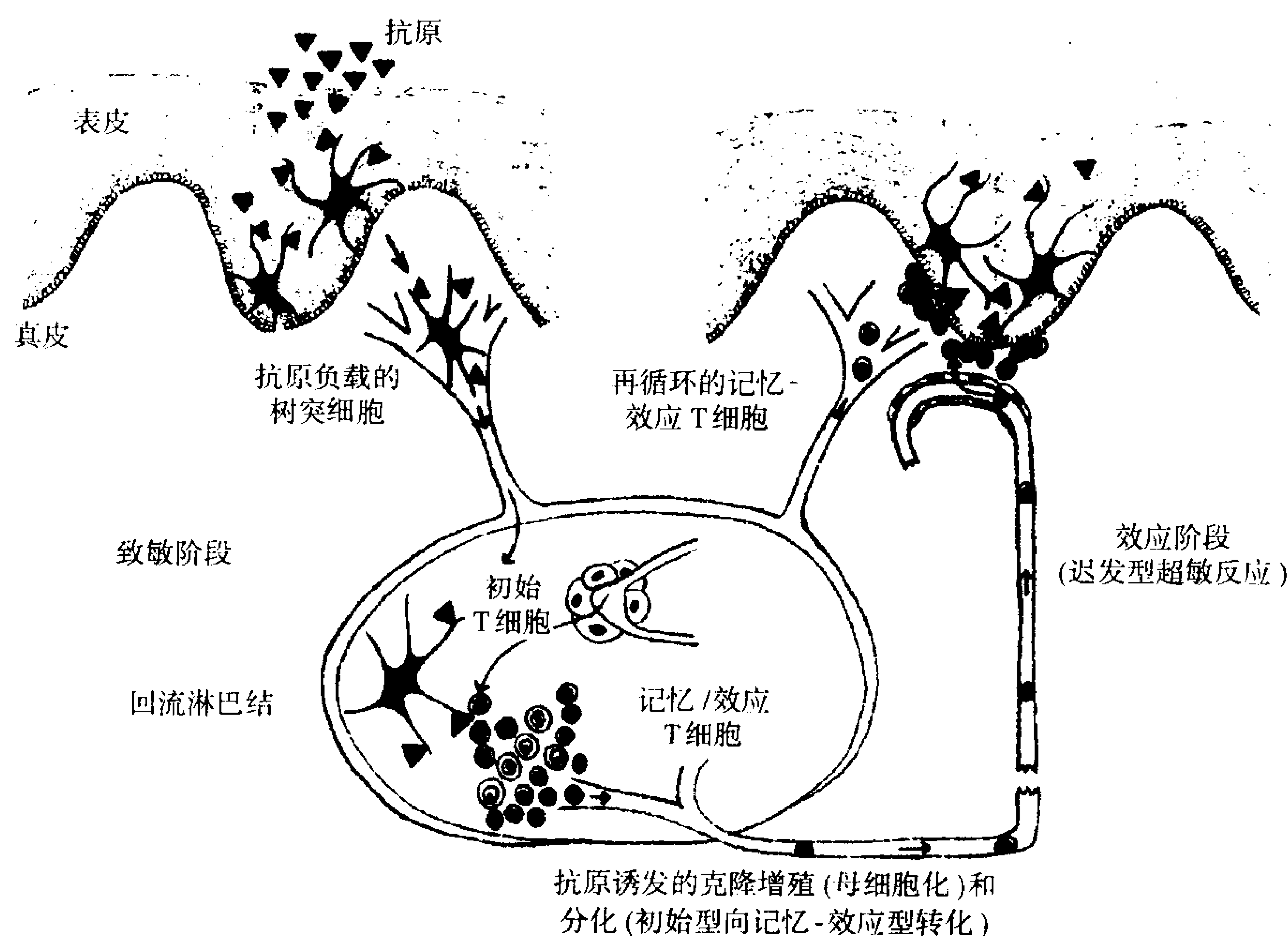


图 14.10 T 细胞免疫应答的诱发需要二级和三级淋巴组织之间的功能协作。本图示意了表皮接触抗原后诱发迟发型超敏反应的过程。表皮树突细胞捕获抗原，并将之转运到回流淋巴结内，在那里抗原被呈递给抗原特异性初始 T 细胞（经 HEV 进入淋巴结）。历史上，这些可移动的树突细胞依据所在部位而各有名称：在皮肤中，称之为朗格汉斯细胞；在淋巴中，称之为隐匿细胞；在淋巴结内，称之为并指状细胞。但事实上，它们是在不同功能阶段的同种细胞。在淋巴结微环境的影响下，抗原刺激后的初始淋巴细胞被诱导增殖，并经历成熟过程的改变，如获得复杂的效应功能、选择性迁移到三级位点，并伴随由初始向记忆-效应的转化。然后这些记忆-效应 T 细胞可以迁移到皮肤中，并通过分泌细胞因子或直接与其他细胞的接触，诱发局部的炎症反应，即迟发型超敏反应。应注意的是：任何记忆-效应 T 细胞，只要具备合适的归巢受体，都可以游走到皮下炎症部位这一过程并非抗原限制性。那些抗原特异性的记忆-效应 T 细胞仅是所有渗出 T 细胞中的一部分（由它们执行相应的应答机制）。

项独特的功能，即捕获和加工抗原，并将它们以免疫原的形式保留较长时间[256,528,579,580]。事实上，DC 在体内的分布和迁移特点明显支持这一假说，即 DC 是一类高度特化的、用来捕获和转运外来抗原的细胞[256]。DC 已被证明存在于血液、二级淋巴组织中的 T 细胞区(称为并指状细胞)、输入淋巴管(所谓的隐匿细胞)、皮肤(郎罕氏细胞)，以及几乎所有其他已研究过的三级淋巴组织中(肺、胃肠道、肝、心肌)。(正如胸腺章所述，DC 也存在于初级淋巴组织中，并在 TCR 库的形成过程中发挥关键作用)。有研究用荧光素 FIFC 作为接触性抗原，可以直接观察到表皮内朗格汉斯细胞摄取皮肤表面的荧光素抗原，并经输入淋巴管将它们转运到回流淋巴结中的 T 细胞区[579,581](图 14.10)。从皮肤中分离获得新鲜的曾接触过抗原的朗格汉斯细胞，研究表明它们显然可以有效激活抗原致敏过的记忆-效应 T 细胞，而非初始 T 细胞。然而，将这些接触过抗原的朗格汉斯细胞在体外短期培养后，则可使它们能够有效的激活初始 T 细胞[582]。而且，在加工完整蛋白抗原的能力上，新鲜分离的朗格汉斯细胞远高于培养后的朗格汉斯细胞[583]。总之，这些结果表明：虽然外周组织中的 DC 专职用来摄取和加工抗原，但它们只有在由外周向二级淋巴组织迁移过程中才获得启动免疫应答的能力，以激活初始 T 细胞。有研究将输入淋巴管去除后，阻止了初始 T 细胞的活化，这也表明负载有抗原的 DC 需发生迁移，这一过程在启动免疫应答中发挥着关键作用。在肺和小肠中，已证明 DC 发挥着同样的作用，即摄取抗原，激活局部二级淋巴组织中的初始细胞[585,586]；血液中负载抗原的 DC 也被证明可以迁移到脾脏白髓中的 T 细胞依赖区(在那里，它们呈现为典型的并指状细胞，并激发免疫应答[587])，或迁移入肝脏并到达肝脏的回流淋巴结中[588]。这些事实提示 DC 是免疫应答输入部分的关键环节，在外周组织中捕获抗原、经血液和淋巴转运抗原、最后在二级淋巴组织中将抗原呈递给 T 细胞。同时，在效应部位，DC 也能作为记忆-效应 T 细胞的抗原呈递细胞[582~584]，但其他表达 MHC 分子的非专职辅佐细胞可能也发挥同样的功能。

新产生的记忆-效应 T 细胞经输出淋巴管离开二级淋巴组织，最终入血，再借助适当的归巢受体不断地游走到组织中(图 14.10)。当组织中出现炎症后，这种迁移明显增加；在这些组织中，记忆细胞一旦遇到特异的抗原，便会很快(几小时内)被激活成为效应细胞。已知记忆 T 细胞极易发生程序性细胞死亡(凋亡)，现在认为：那些与抗原发生反应的记忆细胞中，部分在效应状态可以发挥其特有的效应功能，然后在该过程中死亡[589~593]；而一些记忆细胞会存活下来甚至发生扩增，最终又进入记忆-效应 T 细胞的再循环细胞池中。重要的是，这些细胞也可以重复初次遇到抗原时所启动的分化过程，即从初始向记忆-效应转化。这些记忆细胞可以依据局部细胞因子和共刺激信号的种类，来调整(或加强)其原有的功能活性。

对这些记忆-效应 T 细胞在长时间内的功能变化尚知之不多。众所周知，记忆 T 细胞在几年乃至十几年之后，当再次遇到相应抗原时，仍可以发生针对该抗原的应答，但有关 T 细胞记忆的维持机制，却尚有争论，包括记忆-效应 T 细胞的生命周期和更新率是否依赖于持续的抗原刺激，以及记忆-效应 T 细胞表型的稳定性等。有关研究已建立了一个记忆细胞稳态模型，也许有助于解决这些争论[506,521,594,595]。这一模型认为：针对不同抗原的记忆-效应淋巴细胞克隆之间存在着生存竞争，而对于某特定抗原特异性的记忆-效应细胞克隆，它所具有的这种竞争能力直接决定了相关免疫记忆的稳定性，即克隆型别竞争；这些克隆为进入特化的微环境而竞争，为这些微环境所提供的营养性或调节性因子而竞争，各自的竞争能力决定了各自细胞存活、扩增、分化和死亡之间的平衡。保护性巢隙(niche)是可以提供记忆 T 细胞存活因素的结构，它在空间和数量上都是有限的，而那些处于这些保护性巢隙之外的记忆-效应 T 细胞会死亡，特别是那些在不利的微环境中遇到抗原或其他刺激的 T 细胞。当这些支持营养性巢隙过于拥挤时，为进入这些位置的竞争就会增加，进而触发细胞凋亡直至细胞数目和支持营养因素之间再次达到平衡。相反，当一个巢隙空缺时，其中的支持营养因素会有利于在该处定局的所有或多数细胞的存活，直至该巢隙被占满，记忆细胞间的生存竞争又被恢复。这些生存因素可能包括：细胞因子或黏附分子偶联所产生的营养性信号，以及可干扰死亡促进信号的阻断性因子。事实上，微环境中一系列复杂信号的临时整合，决定了某特定记忆细胞的最终命运。

505

因为在成年期的多数时间内，记忆 T 细胞的总数是相对恒定的[540,596]，那么这一模型就提示：当新的记忆细胞由初始前体细胞产生或由已存在的记忆细胞扩增而出现时，它们进入再循环细胞池的同时，会导致一些不相关的免疫记忆细胞发生丢失。因此，与某特定抗原特异性克隆似乎无关的免疫事件也可能影响该克隆

的稳定性。事实上,如果针对某特定抗原的记忆细胞不断被以后抗原刺激所扩增的记忆细胞"竞争出局",那么该抗原特异的T细胞记忆最终可能会完全失去。这些组织中的抗原可及性就是影响克隆存活最有效的因素之一,而针对某抗原的T细胞稳定性会明显受影响于以后遇到抗原的数量和种类。所以,某抗原特异性记忆T细胞的存活是否需要不断地接触抗原,在个体之间就存在差异,而取决于个体接触其他抗原的性质和频率;在那些接触抗原总体上较少的个体中,维持某抗原特异性的免疫记忆就相对较少地依赖于该抗原的持续存在,因为相应记忆细胞克隆间的竞争较弱。有趣的是,在艾滋病患者中,机体频繁接触抗原,且由于病毒的破坏使得保护性巢隙不断减少,这时在记忆T细胞群体中的克隆组成比例会发生戏剧性改变,即选择性保留或扩增那些较常见病原体(如E细胞病毒)特异性的 $CD4^+$ 记忆T细胞,而损失那些较少见病原体(如腮腺炎病毒)的记忆细胞[506]。

对于那些不存在于胸腺选择过程中的自身抗原,机体建立相应免疫耐受的机制,也可用该模型解释。例如,针对皮肤角质细胞上某自身抗原,机体在一定条件下发生了免疫应答,并产生相应的记忆细胞(或是针对外来抗原的,但与该自身抗原有交叉反应),但这些记忆细胞的长期存活会不具有竞争优势;它们会迁移到皮肤中,然后可能在一个不利的微环境中再次接触到该自身抗原(如这些抗原存在于非抗原呈递细胞表面,无适当的共刺激信号或细胞因子来支持);这样,这些记忆细胞就会发生凋亡,实现"外周"清除。

B细胞在二级淋巴组织中的分化

T和B细胞在二级淋巴组织中的成熟路径在许多方面极其相似。两者都是将初始淋巴细胞释放入外周,这些淋巴细胞虽具备了对抗原的识别能力,却尚无有效的功能;两者都是在二级淋巴组织中首次与抗原相遇,进而发生抗原诱发的成熟性分化直至产生效应细胞。然而,B细胞主要功能是产生和维持一定水平的特异性Ig,这一功能相对较为特异,自然在一些主要方面又不同于T细胞。

也许B细胞和T细胞介导的免疫应答最明显的不同之处,在于它们各自的抗原受体库通过不同机制发生改变以增强其功能。正如前述,T细胞在整个免疫应答中起着关键性作用,其识别抗原的方式具有独特之处(即需要在自身MHC的背景中来识别抗原),这些决定了TCR库很大程度上是在胸腺这一初级淋巴组织中形成的,而不依赖于外源性抗原。而在二级淋巴组织中,T细胞接触抗原后发生的成熟分化,主要体现于其效应和归巢机制;这样,记忆-效应T细胞就是一个本质上未发生改变的初始T细胞库的亚群,是那些正好遇到了抗原的T细胞克隆。相反,B细胞直接通过抗原受体(BCR)来识别抗原,并且要尽快地产生高亲和力的Ig来结合抗原发挥其效应;这种抗原识别机制和独特的功能决定了在二级淋巴组织中抗原诱发的B细胞分化机制呈现为一个复杂的、多层次的系统,对多数抗原而言,其中包含了基因水平的改变和基于抗原亲和力的抗原受体(Ig)筛选[15,598~601]。这样看来,B细胞在二级淋巴组织中会发生抗原依赖性突变和筛选,以增加记忆性Ig库的亲和力和有效性[15,16],这一点与T细胞不同。与胸腺中T细胞库的筛选过程相对应,B细胞库的筛选作为一个精细调控的过程,发生在一种特化的微环境中,即生发中心[598~605]。

体液免疫应答的快速性和有效性,即B细胞所分泌Ig相对高的亲和力和功能有效性,决定了B细胞在二级淋巴组织中的成熟过程分为二个阶段。针对一个新抗原的初级抗体应答,在起始阶段(前3~4天)初始B细胞很快转化为寿命较短的浆细胞,后者可产生未发生基因改变的低亲和力Ig,其中多为IgM型[598,599,604~609]。对于多数蛋白抗原(T细胞依赖性抗原),这一初始的抗体应答仅是B细胞应答的早期阶段,而对于多种碳水化合物性抗原(所谓的非T细胞依赖性抗原),可能只会发生该类初始应答。这些初始应答在感染的初级阶段对控制微生物扩散有着重要作用[详见下文有关B-1($Ly-1^+$)B细胞章节],但可能尚不足以完全清除病原或防止再感染。幸运的是,对于T细胞依赖性抗原,在初次免疫或感染的抗体反应晚期(通常4~5天之后),或在一些情况下仅在同一抗原再次免疫(再感染)之后,体内会出现第二阶段的抗体反应。这一阶段中可产生:①寿命较长的浆细胞,它们可以产生高亲和力(发生了基因改变)和高滴度的抗体,其中主要是非IgM类(多为IgG或Ig A,还有一些IgE);②记忆B细胞,它们在再次遇到相同抗原时,可以分化为相同的浆细胞[598,599,609,610]。这些第二阶段产生的抗体,其可变区具有高亲和力,它们又与各种功能特化的高效非IgM恒定区相连接,加之应答后期产生的较高抗体滴度,这些因素一起来清除那些对体液免疫敏感的感

506

染原[15]。而记忆 B 细胞的存在，使得机体再次被免疫时，可以迅速产生高亲和力的血清 Ig，以防止多种微生物的再次感染[611]。

在鼠类模型中有关外周 B 细胞功能的研究表明针对一个 T 细胞依赖性抗原的体液免疫应答是按以下次序发生的(图 14.11)[2,7,598,599,601,604,606~609,612,613]。再循环的初始 IgD⁺、IgM⁺ B 细胞经 HEV 或经脾的边缘窦进入二级淋巴组织。若未遇到相应的抗原，这些细胞会穿越 T 细胞区(或边缘区)，迁移到初级淋巴滤泡或二级淋巴滤泡的皮质区(静息 B 细胞会被排挤出二级淋巴滤泡的生发中心)。这些初始 B 细胞周期性地离开初级滤泡或皮质区，经输出淋巴管和胸导管或脾红髓再进入循环，然后可再循环到二级淋巴组织中的另一个初级滤泡或皮质区。这些细胞可能就这样不断地在二级淋巴组织内不同位点之间循环，直到死亡或在穿越 T 细胞区(或边缘区)时遇到相应的特异性抗原(见“淋巴细胞归巢”部分)。

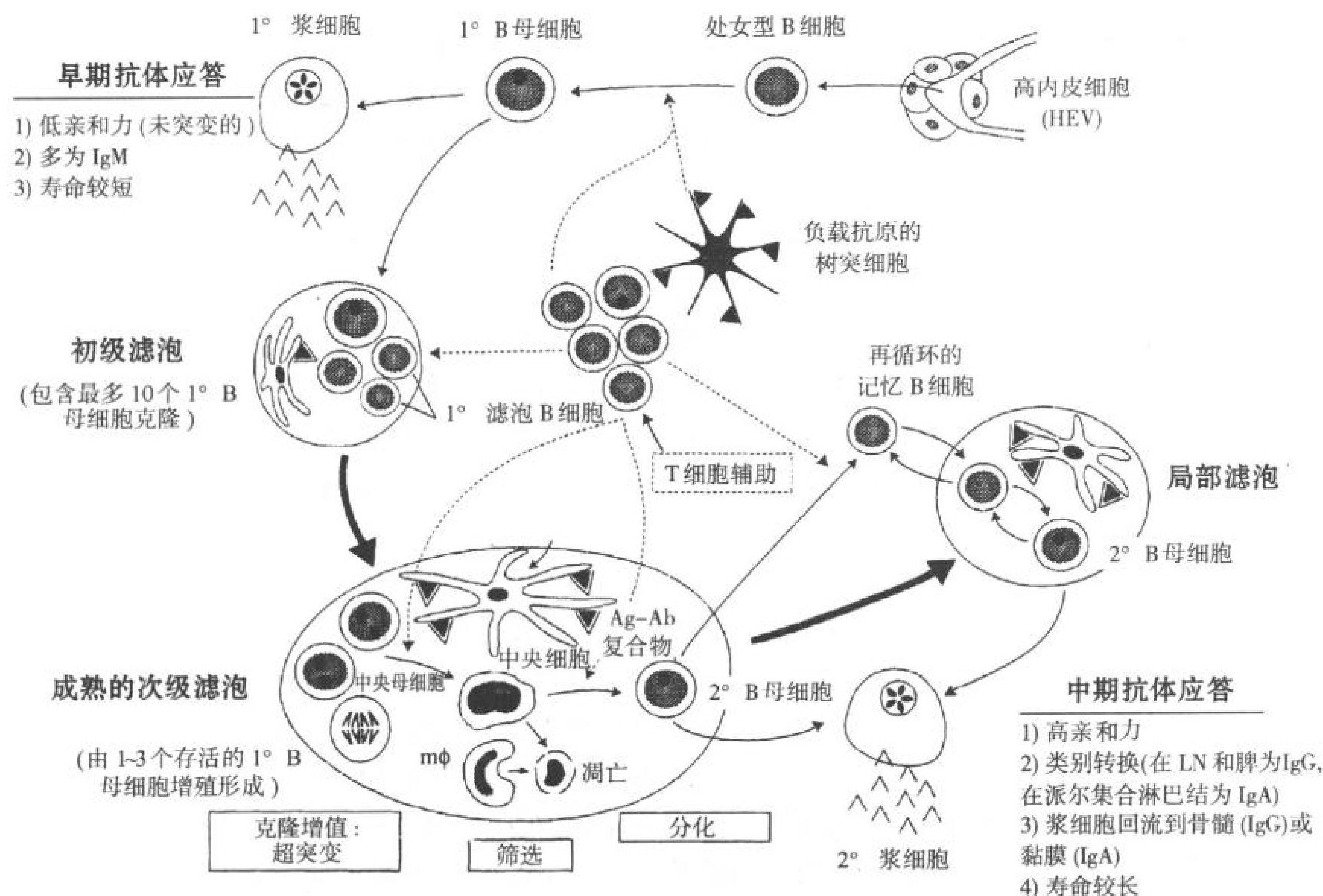


图 14.11　二级淋巴组织中 B 细胞成熟模式。本图示意了针对一个新的 T 细胞依赖性抗原的 B 细胞应答，此处以淋巴结或黏膜相关二级淋巴组织为例；在脾中大体一致，但存在一些小差异(即初始 B 细胞更多是经 HEV，而非边缘区窦进入淋巴组织中)，相关机制详见正文。请注意这里示意的是首次接触抗原后发生的应答事件；用该模型也可以阐述再次接触同样抗原是发生的应答，再次免疫可以导致记忆 B 细胞的大量活化(见上图右下象限)，并分化成为初级浆细胞。因而，次级抗体应答在功能上等价于初次免疫应答的中晚期应答(发生了高亲和力类别转化)，但由于存在已致敏的记忆 B 细胞亚群，故反应速度要更快。

抗原的存在，无论是游离抗原还是并指状细胞表面结合的抗原(但不是抗原-抗体复合物[612])，可以中断那些具有适当抗原特异性的初始 B 细胞的再循环。这些抗原刺激后的初始 B 细胞会发生一种母细胞化反应，形成所谓的初级 B 母细胞[604,607]，这些母细胞中一些可分化形成生命周期较短的浆细胞，然后定居于淋巴结的髓索或脾的外层 PALS 和红髓中。这些滤泡外 B 淋巴母细胞虽然可发生 Ig 型别转换，但多数浆细胞仅产生低亲和力的 IgM，其可变区未发生改变[598,599,604,606~609]。这也正是前面提到的典型的初级 IgM 应答(在免疫 3～4 天后可在血清中观察到)。如前所述，并非所有初级 B 淋巴母细胞会发生这样的分化，若存在 T 细胞的辅助，其中一些会继续迁移到初级滤泡中，当遇到滤泡内网状树突细胞(DRC)表面上的抗原-抗体复合

物时，便会发生增殖[598,599,605,614,615]（见下文）。这些增殖的淋巴母细胞会将初级滤泡中的静息 B 细胞排挤开，进而形成典型的二级淋巴滤泡，其中初级 B 淋巴母细胞增殖的子代细胞形成了生发中心，而原来的初级滤泡变成了皮质区（图 14.5）。已证明单个生发中心仅含 1～3 个初级 B 淋巴母细胞子代形成的克隆[604,607,616]。这提示初级 B 淋巴母细胞仅在一个有限的时空内进入某生发中心，并参与其形成；之后，静息 B 细胞和初级 B 淋巴母细胞通过未知机制被排除。初级 B 淋巴母细胞分化点，即分化为一个初始浆细胞，还是进一步形成一个生发中心，目前尚不清楚受哪些因素影响。有研究提示，沿着上述两个方向进行分化的 B 细胞可能分别属于不同的细胞系，各自按照自己的分化程序沿着一个方向发生分化[617]。然而，有关研究表明初级 B 淋巴母细胞和邻近生发中心内的 B 细胞具有结构相近 Ig 基因，虽然这不能排除前述两个细胞系的假说，但提示初级和二级 B 淋巴细胞母细胞可能来源于某一个细胞池[604]。

在生发中心形成的初始阶段，滤泡内的 B 淋巴母细胞增殖速度极快，每 6～7 小时数量即可增加 1 倍[618]。当这些细胞填塞了滤泡内树突细胞（FDC）形成的网架时，它们会发生一种成熟性变化，可以明显改变生发中心的外观[598,605]。在成熟生发中心的一端，B 细胞持续快速增殖，仍保留淋巴母细胞的形态（图 14.5 中间两幅）。这些细胞被称为中央母细胞，它们形成了生发中心内所谓的暗区，其分布常背向淋巴结内的囊下窦和黏膜相关二级淋巴组织中黏膜表面。生发中心的另一端（即亮区），主要由中央细胞组成，这些 B 细胞的形态特点是不规则且常断裂的核质，以及较浓缩的染色质。DNA 标记实验表明中央细胞不能自身增殖，而是由持续增殖的中央母细胞群落生成的[607,619]。在亮区内，于靠近暗区的边界处，常分布有可着色的巨噬细胞，其内充满了所吞噬的发生了凋亡的中央细胞残骸。存活的中央细胞可以生成浆母细胞和浆细胞，以及记忆 B 淋巴母细胞和小记忆 B 细胞；这些后期分化的细胞群通常在生发中心内部形态不太显著，在它们发生分化的同时，它们会从生发中心迁出，并定居他处（见下文）。若不再接触抗原，这种生发中心结构会在免疫后保持约 3 周或更长时间，这决定于抗原的性质[620]；此后生发中心开始缩小，最终失去特有的极性分布形态特点。然而，滤泡 DRC（带有初始抗原形成的免疫复合物）和二级（记忆）B 淋巴母细胞可能会在免疫后持续存在较长的时间（甚至几年）。

507 利用一些表型特征，我们可以区分中央母细胞和中央细胞，以及它们的初始 B 细胞前体、记忆 B 细胞和浆细胞[621～624]。例如，在人类中央母细胞和中央细胞（而非静息的初始 B 细胞或记忆 B 细胞）都表达 CD10 和较高水平的 CD38，同时中央母细胞还表达 CD77，而中央细胞则缺少该标志。初始 B 细胞呈 IgD 阳性/IgM 阳性，而中央母细胞表面的 Ig 则明显下调。在中央细胞表面会再次表达非 IgD 表面 Ig 分子，且常转变为非 IgM 型别（IgM、IgA）。记忆 B 细胞在发育过程中会下调 CD10/CD38/CD77 等细胞标志，但缺如 IgD，借此可区别于初始 B 细胞。相反，浆细胞会进一步上调 CD38，而下调 CD20（该分子存在于所有其他细胞亚群[3]），并且从表面 Ig 转变为以胞质内 Ig 表达为主（分泌型）。

这样，成熟的生发中心呈现三个主要的分化阶段：①快速增殖的、表面 Ig^{low} 的中央母细胞；②非增殖（凋亡中）的表面 Ig^{+} 的中央细胞；③存活中央细胞的记忆和效应（浆）子代细胞。现在认为，生发中心的主要功能是产生针对抗原的高亲和力 Ig 库，其亲和力要高于那些基因组中 Ig 基因编码的 Ig，这一功能即对应于上过生发中心内的 B 细胞分化阶段。有关初始和次级（生发中心形成后）应答所产生抗体的抗原结合实验表明：在短短 2 周内，抗体的亲和力可以增强约 10 倍[599,608]。比较生发中心形成前后的 B 细胞 Ig 基因序列，发现：次级应答所产生抗体的基因在抗原结合区域发生了一些特异性点突变[599,600,609,625]。事实上，详细分析生发中心 B 细胞的 Ig 基因序列，表明：几乎在每个细胞分化周期，抗体基因的可变区都会发生一个新的突变（突变率为每代 10^{-3}bp）[599]。因为这些突变是随机的，故多数情况下对 Ig 亲和力无影响或反而降低；因此发508 生亲和力成熟（即产生高亲和力 Ig）需要生发中心中存在一种阳性选择机制，以使发生了高亲和力突变的少数细胞得以筛选，并最终诱导分化为小的记忆 B 细胞或浆细胞。

与前述三个形态表型上划分的阶段相对应，可以将生发中心的功能生理学从理论上划分为四步成熟过程，即：①克隆扩增（初级生发中心的母细胞和中央母细胞）；②Ig 基因超突变（中央母细胞）；③克隆选择以中央细胞为主（见下文）；④重分化为记忆或效应（浆）细胞。前两步提供了一个扩大了的 Ig 库，其中抗原特异

性 Ig 基因发生了改变。第三步选择那些亲和力增加的克隆，而第四步可以“重塑”这些克隆，诱导它们发挥效应和(或)记忆功能。Ig 型别转换也决定了最终的效应功能，该过程的发生与这三个阶段相平行，但又独立于它们[604,626,627]。这四个步骤可能是连续发生的，但可能有两个例外。第一个，有研究表明一些“筛选”过程实际上先于体细胞超突变，从而挑选出对抗原具有相当亲和力的初级 B 淋巴母细胞。例如，在某生发中心最初可能定居有 10 个初级 B 淋巴母细胞，经过超突变前的抗原选择过程通常只保留下 1～3 个克隆(可能是通过中央母细胞表面 Ig 明显下调来实现)[499,628,629]。第二个，中央细胞和中央母细胞可能会反复循环多次才开始最终的记忆-效应分化[499,630]，以使这些克隆经过一次以上的超突变和筛选过程才最终分化为记忆 B 细胞或浆细胞。

抗原是上述所有分化过程的主要动因，它启动了初级淋巴母细胞和中央母细胞的克隆增殖和超突变，并在中央细胞的阳性选择过程中作为主要的筛选标准，还可以刺激特异性 T 细胞为这些过程提供必要的信号[598,599,601,614,631]。值得注意的是：虽然游离抗原可诱发滤泡外的 B 细胞应答，包括使初始 B 细胞再循环入生发中心，但在生发中心内抗原是以免疫复合物的形式来发挥效应。这种差别具有非常重要的生理意义，原因有以下三点。首先，生发中心是在初次应答抗体产生一定时间后才形成和发挥效应的。如果生发中心需要游离抗原来发挥功能，那么初级 IgM 应答与游离抗原形成复合物就可终止其效应，从而阻止了记忆细胞和长寿(高亲和力)浆细胞的产生。第二，低亲和力抗体形成的免疫复合物和中央细胞上突变 Ig 之间的竞争可能是诱导亲和力成熟筛选过程的机制。如果中央细胞不能通过其表面 Ig 接受到阳性信号，它们就会发生凋亡[605,631,632]。这样，中央细胞只有具备较高亲和力的细胞表面 Ig 受体，才能竞争掉初级免疫复合物中的抗体，从而存活下来。因为在一个免疫应答发展过程中所产生抗体的亲和力会越来越高，高亲和力免疫复合物就会替代那些较低亲和力的复合物，这样就使中央细胞筛选过程起来越局限。最后，应该注意到有研究表明游离抗原实际上可诱导生发中心细胞凋亡[169,633]。这一现象可能是一种筛选机制以排除那些超突变过程所产生的自身反应性 B 细胞克隆，以阻止它们分化为记忆 B 细胞或浆细胞。

生发中心内细胞的分化过程主要依赖于 FDC 的功能。这些细胞呈现异质性表型[605,634]，其发生来源尚有争论，可能来源于各种组织中的前体干细胞或骨髓中的祖细胞[635～637]。它们与前述 T 细胞区中呈递抗原的树突细胞没有明显关系，但有趣的是它们的分化却需要功能性 T 和 B 淋巴细胞性成分[638]。FDC 绝不仅仅是一种生发中心 B 和 T 细胞的支持物。首先，也是最重要的一点，这些细胞非常适于滞留抗原-抗体复合物，后者可触发分化过程[639]。多数 FDC 表达有 Ig Fc 段和补体成分 C3 的受体，已被证明在体内这些受体包被有 IgM 和 IgG[640]，免疫复合物本身具有激活补体的活性，这使得它们常结合有 C3 成分，便于被 FDC 捕获。FDC 被认为能够以免疫原的形式长期(可能几年)来释放抗原，以不断再次刺激记忆细胞，维持血清抗体的水平[639]。已证明这些 FDC 可以使胞膜上附着的免疫复合物(称为 iccosome)颗粒脱落，然后这些颗粒可以被生发中心的 B 细胞或树突细胞捕获，并呈递给滤泡内抗原特异性的记忆-效应 Th 细胞[641,642]。DRC 可表达各种细胞黏附分子(如 ICAM-1 和 VCAM-1，分别为淋巴细胞 β2 和 α4 整合素的配体)，它们介导生发中心内不同 B 细胞亚群的黏附[615,643,644]，也可能在适当的微环境中参与维持这些细胞亚群。最后，FDC(与 T 细胞一起)可表达一些细胞表面信号分子和细胞因子，这些分子与抗原共同来维持生发中心内细胞的活性(即抑制凋亡)和调节分化过程。事实上，体外培养实验已证实：与 FDC 发生物理性接触的生发中心 B 细胞相对不易发生凋亡，而无此接触的 B 细胞则相反[645,646]。

并非仅有 FDC 来参与调节生发中心的功能，其中还包含 MHC Ⅱ类分子限制的($CD4^+$)、记忆-效应($CD45RA^-/RO^+$)T 细胞[527,647,648]，已有许多研究表明生发中心的形成关键依赖于抗原特异性 T 细胞的存在[598,605,615,644,649]。这些 T 细胞可能来源于二级淋巴组织中的 T 细胞区，后迁移入初级 B 淋巴母细胞所在的初期生发中心[650,651]。在生发中心内，B 细胞自身或另一个独特的树突细胞亚群(不同于 FDC 而类似于并指状细胞)可以呈递这些抗原，并激活局部的 T 细胞[652]。一些记忆-效应 T 细胞可以生或多种细胞因子，它们可影响生发中心的活性、增殖和分化，包括类别转换和终末分化[601]。例如，IL-4 能促进 IgG1 向 IgE 的类别转换，而 IFN-γ 则使之向 IgG2a 转换，转化生长因子 β(TGF-β)则使之转化为 IgA[653～656]。IL-5 和 IL-6 可参与诱导

浆细胞分化,从而使 Ig 分泌增加[656~660];IL-10(可能来源于 T 细胞或 B 细胞自身)已被证明可抑制生发中心

509

内 B 细胞的死亡[661]。

T 细胞表面分子也在调节生发中心细胞生存和分化过程中起着关键作用。在这些调节分子中,CD40L 可能是目前研究最为清楚的一个分子,它是一种活化诱导表达的 33kDa 糖蛋白,属于 TNF 基因家庭;其配体 CD40 是一个 40kDa 的 TNF 受体基因家庭的成员,它表达在 B 细胞(包括生发中心细胞)、树突细胞、活化的巨噬细胞和 FDC[662~665]。在 CD40L 基因缺陷的人或小鼠体内(如,人类的 X 连锁重症 IgM 免疫缺陷综合征或 $CD40L^{-/-}$ 基因敲除小鼠),常缺如生发中心及其相关的体液免疫功能,这表明生发中心的形成需要 CD40L/CD40 间的相互作用。另外,用抗 CD40L 阻断性抗体处理正常小鼠,可使生发中心突然消失。现在认为,在生发中心应答过程中,CD40L/CD40 间作用在以下几个水平发挥功能:①诱导 APC(B 细胞或 DC)表达重要的共刺激分子 CD80/CD86(CD28 配体),它们是 T 细胞活化所需要的;②刺激生发中心 B 细胞的增殖和分化;③诱导 Ig 类型转换;④使生发中心的 B 细胞免于凋亡;⑤诱导生发中心细胞分化为小的记忆 B 细胞(当 CD40L/CD40 作用被阻断时,则诱导生发中心细胞分化为浆细胞)[601,632,661~671]。

这些发现强调了生发中心微环境的复杂性,其中有无数分子间作用同时发生,从而调控着多个生理过程。而且不同组织内的生发中心又以不同方式调节着 B 细胞系向记忆-效应的分化。生发中心的这种局部微环境调节机制有一个最好的例子,即黏膜和非黏膜相关淋巴组织间的功能二分法。黏膜相关淋巴组织(派尔集合淋巴结)的特点是 Ig 向 IgA 分泌型高度转化[672~676],而且这些部位可分泌 IgA 的浆细胞可以选择性地迁移到小肠黏膜固有层等黏膜效应位点[7,546,677~679,762,763]。相反,外周淋巴结和脾主要产生分泌 IgG 的浆细胞,它们选择性迁移到骨髓中,那里是体内 IgG 的重要来源[2,4,680]。多方面证据提示局部 T 细胞和(或)DRC 参与 Ig 类型转换的分化和归巢受体表达调节[681~684],但这一分化过程的最终调节者可能是各种二级淋巴位点相关的分化上皮和(或)间充质细胞(包括淋巴组织本身或淋巴组织的淋巴管床)。这些细胞产生的、或相关的"因子"可直接影响活化的 B 细胞或参与形成一种内环境,来调节功能特异的 T 细胞或辅佐细胞亚型的再循环和/或分化。有关这些分子事件的了解尚较粗浅,但从少数参与调节生发中心功能的细胞因子和黏附分子推测,可以肯定这些特化的"局部"微环境调节着二级 B 细胞分化的速度和结果,这一点与前述次级 T 细胞分化相似。

生发中心的功能性产物是浆细胞,它们可以迁移到小肠固有层或骨髓中进而产生高亲和力 Ig。骨髓浆细胞不能存活较久[685,685a],但血清抗体水平能维持较长时间,这提示在明显的生发中心细胞反应消散后,这些浆细胞必须以某些方式更新。如上述,在原来的生发中心内,FDC 能在较长时间内排出抗原,这些抗原可能维持了一小群抗原特异性的 B 淋巴母细胞群落,它们仍可以分化出更多的浆细胞。这些次级母细胞可能与循环的小记忆 B 细胞处于平衡态,后者在遇到 FDC 上的抗原(免疫复合物)时,可以转化为增殖性次级母细胞,后分化为浆细胞或附加的小记忆 B 细胞。因此,B 细胞记忆包含三种组分:①小型循环的记忆 B 细胞;②FDC 相关的次级 B 淋巴母细胞;③寿命较长的浆细胞[4,599,686]。周期性的抗原再刺激对维持记忆 B 细胞亚群有着重要作用[687],但长寿浆细胞的存活并不需要此条件。

用抗原再次免疫动物(二次免疫)使体内短暂出现游离抗原(非免疫复合物),这可诱导小型记忆 B 细胞快速且大量地分化为次级母细胞和浆细胞[598,610]。这种二级应答产生抗体的亲和力仍较高,反映了初次生发中心应答过程中所发生的突变和筛选机制[611]。二次免疫后记忆 B 细胞是否能再次发生抗体亲和力成熟,这一问题目前尚有争论,但每次连续接种抗原后,抗体的亲和力确实发生增加[601,602,611,688~690]。因此,一方面记忆 B 细胞能再次经历进一步的几轮超突变和筛选;另一方面,新的初始 B 细胞循环到生发中心接触抗原后,必须获得比以前记忆性应答更高的 Ig 亲和力,方能经历生发中心内部的筛选而存活下来(因为它们在筛选过程中与高亲和力的抗体发生竞争)[598,602]。

总体上说,B 细胞应答的发生过程和稳态维持与前述 T 细胞系一样,存在着类似的竞争性机制。有研究表明,初始 B 细胞进入循环池是竞争性的[691,692],例如,自身抗原反应性 B 细胞会被竞争性地从初级淋巴滤泡排挤出,并最终在 T 细胞区内凋亡[692]。很明显,生发中心 B 细胞分化生育也是竞争性的,只有最合适的克

隆才能存活焉并分化为记忆-效应 B 细胞。有关记忆 B 细胞的生物学尚知之甚少,但可以推测这些细胞可能与 T 细胞类似,必须为持续存在而发生竞争。

三级淋巴组织:免疫效应机制发生的场所

机体内所有的组织都属于三级淋巴组织,它们的主要免疫学功能是捕获抗原,或实现免疫效应机制。因为机体内任何组织都可能成为微生物寄居等事件发生的部位,其中常有免疫应答的参与,虽然这样的命名适用于机体所有组织,也包括某些病理生理条件下典型的初级或次级淋巴组织,但这里为便于讨论,将"三级淋巴组织"这一概念仅限于那些通常认为属于淋巴组织外的组织,它们在正常情况下仅含有较少或不含有淋巴成分,但在存在适当的炎症刺激时,则能输入某些淋巴和辅佐性细胞群落。 510

显然,本章节不可能详细阐述众多三级淋巴组织的各自组织学特点。然而,从免疫学角度,这种复杂结构可以简单地分为两种组分:①脉管性结缔组织(含纤维母细胞、巨噬细胞、肥大细胞等组织细胞以及胞外基质内的血管和淋巴管道);②其间分布有组成器官或组织的分化型实质性细胞(如上皮细胞、肌肉细胞、神经细胞等)。前者提供了淋巴细胞循环进入组织的通路(后经淋巴管输出),常作为主要的免疫-炎症的"战场",也参与免疫效应发生后的组织修复过程[693]。后者中的分化型实质细胞不仅仅是这些应答的旁观者,而是直接参与免疫应答,共同实现积极的效应机制(详见下文)。 511

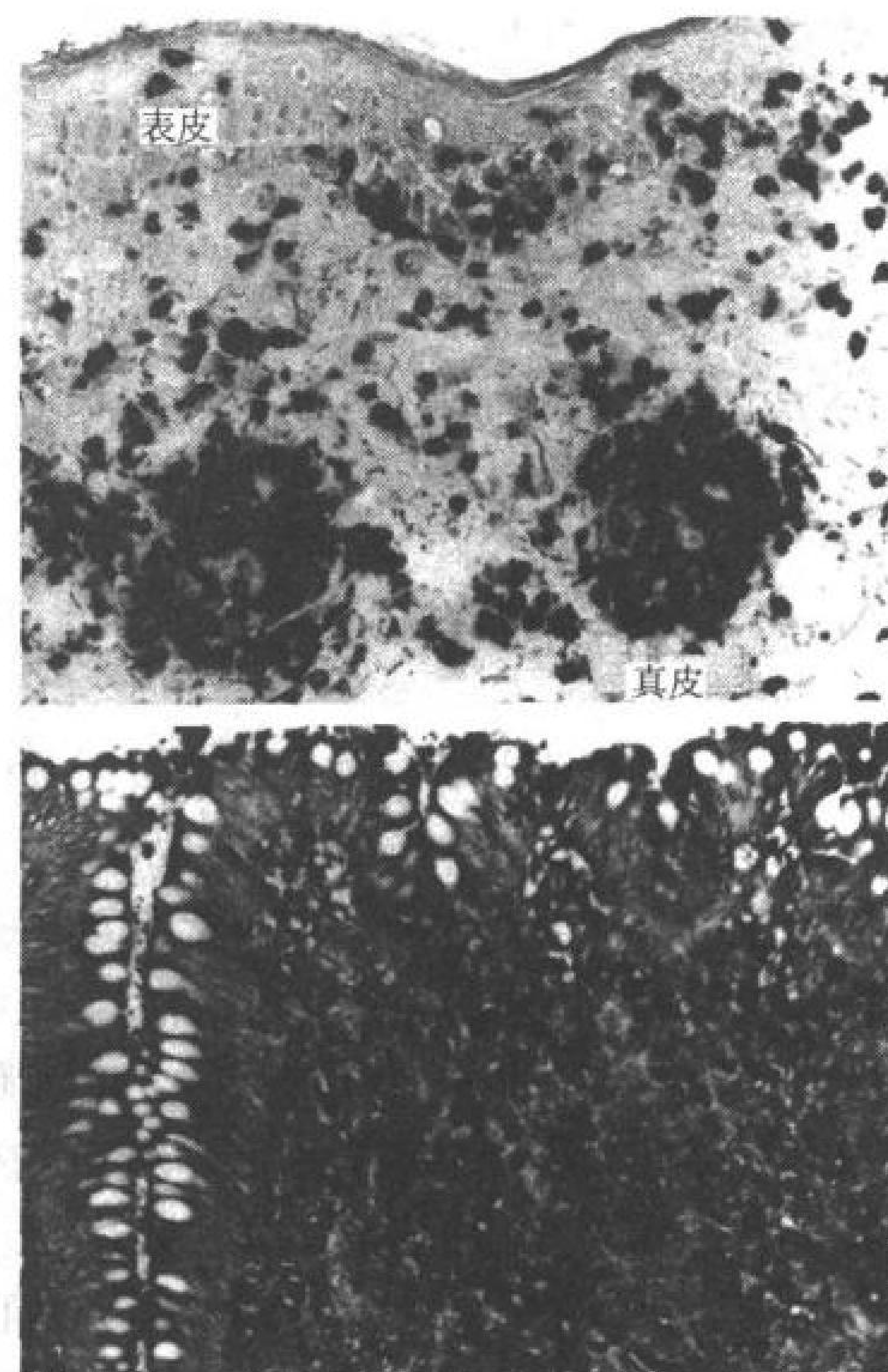


图 14.12 三级淋巴组织例举。上图:炎性皮肤(由一皮肤表面抗原诱发的迟发型超敏反应),用一个 T 细胞特异性单抗免疫组织化学染色。注意在活化的毛细血管后静脉(箭头)附近的浅层真皮内,有大量 T 细胞聚集,这些 T 细胞正是通过这些静脉渗出的。一些 T 细胞可以特异性地由这些静脉周围细胞簇迁移到表皮内。皮肤或别的三级淋巴组织中多数 T 细胞(常大于 95%)为记忆-效应 T 细胞亚群。下图:炎性结肠固有层(* 号示意表面和腺上皮细胞),用 κ 轻链的特异性单抗免疫组织化学染色。胞质深染的细胞为产生 κ 链 Ig 的浆细胞。固有层内许多浅染细胞为表达 λ 轻链的浆细胞,也存在记忆-效应 T 细胞。

那些直接与外部环境接触的组织,显然是最活跃的三级淋巴组织位点,主要包括皮肤和胃肠道,呼吸道及泌尿生殖道的各种黏膜上皮,这些部位在整体上可以视为一种三级淋巴组织。结构上,这些部位彼此高度类似,都由上皮、及其下方的脉管性结缔组织共同构成;皮肤中含有角质化分层鳞状上皮和真皮,黏膜组织则含有柱状、鳞形或过渡性上皮和固有层(或肺间质)(图 14.12)[17]。除了一些特例之外(见下文),这些三级淋巴组织在生理和炎性条件下的主要淋巴组分是记忆-效应淋巴细胞[525,527~530],包括 $CD45RA^-/RO^+$ T 细胞、NK 细胞和浆细胞(图 14.12;也常存在一些非淋巴性效应细胞群落,如单核吞噬细胞)。重要的是,仅有那些适于特定部位或病理生理过程的细胞亚群方可有效地进驻这些部位。例如,小肠固有层可选择性输入浆细胞前体(尤其分泌 IgA 者)和一个独特的记忆-效应 T 细胞亚群[7,501,674,694~696]。而另一方面,皮肤通常动员一个不同的记忆-效应 T 细胞亚群,但常只有较少的浆细胞或浆细胞前体[7,695,697~699]。(这种有区别的细胞动员过程之生理及分子机制,见下文。)

虽然三级淋巴组织中,淋巴效应细胞具有相当重要的功能,但我们对其中机制的了解却出奇的少。部分原因是因为直到最近,众多研究者才认识到这些三级组织中的非淋巴性组分,尤其是上皮细胞,可广泛地与淋巴性组分发生相互作用,而相应的作用方式常不能充分地在体外效应功能模型中重建。这一点在皮肤中已令人信服地被证实。当存在适当的刺激时,皮肤中的上皮细胞——角质细胞,及其他皮内非淋巴性细胞(朗格汉斯细胞、黑色素细胞、真皮纤维细胞和内皮细胞)可以合成并分泌很多种免疫调

节性细胞因子[700~704]。仅角质细胞已被证明可产生 IL-1(α 和 β)、-3、-6、-10;TGF-α 和-β;TNF-α、G 和 GM-CSF;以及单核细胞趋化和活化因子(MCAF),还可能有别的因子[700~704]。其中一些因子参与动员记忆-效应 T 细胞。例如,IL-1 可有效地诱导上皮细胞表达黏附分子 E 选择素[705],该分子可以选择性动员皮肤相关的记忆-效应 T 细胞亚群[706]。然而,它们也直接影响所动员 T 细胞和单核细胞的效应功能。而且,T 细胞分泌的细胞因子可直接影响角质细胞的生理,包括生长、分化、因子分泌和黏附分子表达等[702,703,707]。(记忆-效应)T 细胞因子 IFN-γ 可诱导角质细胞表达 MHC Ⅱ类分子和 ICAM-1(两者可介导 T 细胞和角质细胞间的直接接触),也可诱导角质细胞分泌 TGF-α(一种有效的角质细胞自分泌生长因子),这仅是三级组织中淋巴细胞和非淋巴细胞间复杂功能性相互作间的一个例子[707,708]。虽然我们对这些作用机制的认识尚有限,但已有的研究明显提示:①在局部针对某病理刺激,有效诱发一个免疫-炎症反应关键依赖于淋巴细胞和非淋巴细胞间的功能性协作;②某特定组织中固定的非淋巴细胞类型(如角质细胞或小肠上皮细胞)可影响动员到这些部位的血液-淋巴性细胞以及它们在局部的功能应答。

前文提供了一种免疫系统的模型,其中由淋巴细胞介导发挥效应应答,而淋巴细胞需经历至少两个分化过程,即初始淋巴细胞在初级淋巴组织中发生初级发育,成为记忆-效应细胞。此后,在二级淋巴组织中发生次级(抗原诱导的)分化,虽然有证据表明体内多数淋巴细胞(典型的淋巴细胞)的生理学符合这一路径,但至少还存在两类淋巴细胞亚群不同于该分化模式,这包括:①B-1 型 B 细胞亚群(Ly-1⁺ 或 CD5⁺ B 细胞亚群);②定居于上皮中的 TCR-γδ 型 T 细胞。虽然这些亚群也呈现为抗原受体启动的免疫功能(使它们成为真正的免疫细胞),它们的整体特征显示它们是一类进化上较为原始的免疫细胞,在功能上介于"先天"免疫系统(巨噬细胞、NK 细胞、非免疫的抗微生物性血浆蛋白等)和"获得性"免疫系统(经典的淋巴细胞)之间。这些细胞亚群在发育的较早阶段就离开了初级淋巴组织,并在不同的三级淋巴组织微环境中发育成熟和发挥功能(而省略了经典淋巴细胞在二级淋巴组织中的中间分化步骤)。

B-1 型 B 细胞亚群(在人和小鼠体内部均已发现,但在小鼠体内更为明显),起初以表达 Ig-1(CD5)抗原来判定,现在认为该亚群的某些成员可以缺少该标志[709~714]。不过,B-1 型 B 细胞亚群尚具有其他独特的表面标志,包括高水平的 IgM 和低水平的 IgD(相对于经典 B 细胞),另外该亚群还具有独特的 Ig 基因库(其多样性不如经典 B 细胞丰富)。B-1 型 B 细胞群来源于独特的祖细胞,后者存在于胚胎-胎儿的内胚层、大网膜、肝;可能还有骨髓,但成年骨髓除外。在胎儿期,脾中大多数 B 细胞亚群属于 B-1 型 B 细胞;以后随着经典 B 细胞的发育,这些细胞在脾中数目会急剧下降到不足 1% ~ 2%的成人水平。在成年小鼠的其他二级淋巴组织内未见到明显的 B-1 型 B 细胞,但正常动物的体腔内(腹腔和胸腔)出项该型 B 细胞的频率很高,在那里这些细胞构成了一个稳定的、可自我更新的群落。这些细胞在对经典 TdAg 的体液免疫应答(初次和再次)中可能不发挥主要作用,它们的功能可能是自发地产生多反应性低亲和力抗体,包括自身抗体[715]。虽然这些多反应性抗体的功能尚不清楚,但它们具有和多种微生物发生反应的"广谱"活性,并能在血浆中持续存在,这两个特点使得这些抗体在初次抗体应答产生之前就可以对抗多种感染[714,715]。因此,它们可能构成了初次感染中体液免疫系统的第一道防线。这种多反应性抗体多数为 IgM 类型,但也有报道可以发生向 IgG 和 IgA 的类别转换[716]。事实上,已证明 B-1 细胞系在小肠固有层中可产生相当数量分泌 IgA 的浆细胞[717]。

表达 γδTCR 的 T 细胞是一群异质性细胞,可能包含那些在生理上与 αβTCR 型 T 细胞亚群相似的 γδTCR 型 T 细胞。但一些 γδ 型 T 细胞亚群呈现独特的生理学特点。在小鼠体内,特异性 γδ 型 T 细胞亚群都各自表达恒定的特异性 TCR,它们在胚胎发育过程中间断地离开初级淋巴组织,进而直接定居在某特异性三级淋巴位点的上皮内(跻身于上皮细胞之间成为"上皮内"淋巴细胞[718])。例如,表达恒定 $V_γ3$-TCR 的 T 细胞数目在 17 天的胚胎胸腺中达到高峰,之后定居到皮肤中,并发育为皮内树突表皮 T 细胞亚群,表达 V-2 的 T 细胞数目在胸腺发育一天后达到高峰,以后定居到雌性生殖道中。这些亚群可能在相对不成熟的发育阶段离开胸腺,然后在三级位点中继续各自的发育[719]。事实上,小肠内的一些上皮内 γδ 型 T 细胞(主要表达 $V_γ5$ 型 TCR,其 TCR 可变性大于皮肤和生殖道上皮中 γδT 细胞)可以跨越胸腺内成熟过程,而完全在小肠黏膜内发育[720,721]。这些细胞亚群不在二级淋巴组织内出现,它们在三级淋巴组织中的发育被认为不依赖于外源性抗

512

原。尚未证明在人体内存在离散的、恒定的上皮内 γδT 细胞[722]，但人类 γδT 细胞确实包含一定比例的上皮相关 T 细胞，尤其在胃肠道[723]。γδT 细胞的确切免疫学功能尚不清楚，但可能有多种功能。在小鼠皮肤，$V_{\gamma}3$ T 细胞可以针对一种角质细胞应激诱发抗原发生应答，从而发挥“门卫”的功能，促进对组织损伤发生的一般应答[724]。在机体动员传统的抗原特异性效应机制之前，这种原位发生的非病原特异性应答可能作为机体的一种初级防御机制。其他 γδT 细胞可针对某些病原体特有的非多肽性分子发生应答。例如，人 $V_{\gamma}2/V_{\delta}2$T 细胞是一类主要的 γδT 细胞亚群，它们一律可以与异戊烯焦磷酸及相关复合物发生应答[725]（后者是分枝杆菌的天然产物），这些细胞在机体针对这些病原体的初始免疫应答中发挥关键作用。

淋巴细胞归巢与再循环

淋巴细胞归巢与再循环是淋巴细胞寻找与定位于特定组织与微环境的生理过程[7,521,546]。此机制在形成与维持这些特定淋巴微环境中起主要作用，并在记忆淋巴细胞群分布与靶向定位过程中起重要作用，以保证免疫监视功能的有效发挥。图 14.13 描述了典型的初始和记忆 T 细胞与 B 细胞之归巢行为和定位特征，详细总结了本章前述各节中的所有概念。考虑到一个典型的 T 细胞在其生命周期中的归巢事件（如一种注定要启动皮肤迟发型超敏反应的 T 细胞），淋巴细胞归巢在免疫系统功能中的作用就显得十分明显。可以假想，该 T 细胞至少需发生以下归巢事件：①发育时从骨髓再定位于胸腺；②然后从胸腺又定位于外周淋巴结以致敏；③最终从淋巴结定位于皮肤，启动迟发型超敏反应（步骤 2 与 3，图 14.10 中所示）。对于第 2、3 步骤，有效的免疫监视作用的发挥，显然需要该淋巴细胞与其他淋巴细胞持续巡逻于可能发生抗原沉积的部位。实际上，生理学证据提示许多成熟淋巴细胞亚群在不停地运动，经血管与淋巴管不停循环于这些组织中。单个淋巴细胞在一天内可进行 1～2 次“由血液到组织，再到淋巴结，再返回血液”的完整循环[726]。而且，生理学与最近的分子生物学证据提示淋巴细胞亚群的归巢行为有明显组织特异性，且特定亚群归巢行为与其生理学功能密切相关。

传统上，初始 B 细胞与 T 细胞需由一级淋巴组织迁入外周，后选择性定位于有组织的二级淋巴组织

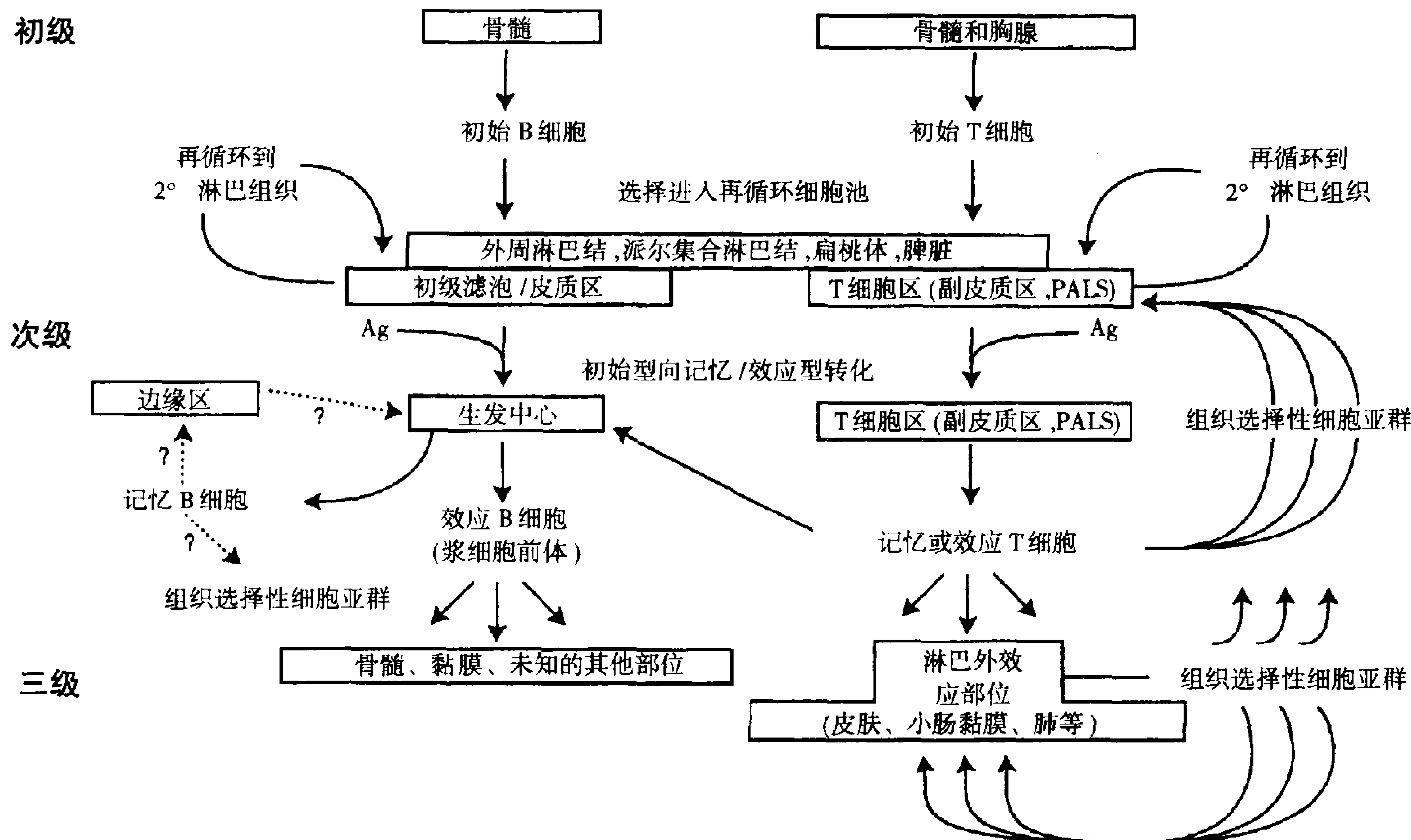


图 14.13　经典 B 和 T 细胞归巢机制示意图。（经允许选自参考文献[521]。）

中[7,521,546]，在后者中这些细胞被致敏。总体而言，这些淋巴细胞很少定位于三级淋巴组织，即使在炎症情况下。其迁移行为作为该细胞类型的一种功能特点，似由其遗传特性决定（如 T 与 B 细胞，$CD4^+$ 与 $CD8^+$ T 细胞），但在同一类型细胞亚群内，总体上倾向于迁移于大致相同的二级淋巴组织。初始型淋巴细胞可能在不同的二级淋巴器官之间持续游走，直至死亡或对其特异抗原发生应答[7,727]。［但有一些例外，如非经典的 B-1（Ly-1/$CD5^+$）B 细胞亚群与独特的 TCRγδ 亚群。］

记忆与效应淋巴细胞是在二级淋巴组织由抗原诱发产生并输出于外周循环中的，它们的迁移特性与初始淋巴细胞截然不同[7,519,521]。首先，为了维持其介导应答效应的功能，这些细胞作为一个群体，有效游走于皮肤、肠黏膜固有层等三级淋巴组织中（尤其这些组织发生炎症反应时）。其次，在它们分化为记忆-效应亚群的同时，它们会发生的异质性发育从而具备组织选择性迁移能力。换言之，记忆-效应细胞群包含众多有不同组织选择性归巢能力的细胞亚群（如有的记忆-效应 T 细胞优先归巢于皮肤，而有的则是黏膜）。实际上，已证实记忆-效应淋巴细胞优先迁返到首次被激活的区域。例如，初始 T 细胞最初在派尔集合淋巴结被激活，以后就优先归巢至黏膜的二级或三级淋巴组织；而 T 细胞如被激活于外周淋巴结中，则趋于再循环归巢于淋巴结及相关的三级组织（如皮肤）。记忆-效应细胞亚群的这种组织选择性归巢特性，可将免疫监视和效应机制定向到那些与抗原初次进入机体类似的部位，这样即可增加免疫系统的效率（例如，为保证黏膜性抗原能诱发产生分泌性 IgA 抗体应答，分泌 IgA 的免疫效应细胞通常分布于黏膜上皮中）；另外，这种组织选择性归巢特性也减少了与不相关组织成分发生自身免疫性交叉反应的机会。

淋巴细胞这种归巢-再循环的生理过程，很大程度上取决于对淋巴细胞黏附与去黏附作用的调节方式。在淋巴细胞的生命周期中，它们具有精细调节其黏附行为的特殊能力[728]，实质上，这些众多的黏附事件对某一淋巴细胞的再循环能力都有一定影响。然而，淋巴细胞与组织成分间的黏附虽然影响着一种特定淋巴细胞亚群的再循环趋向能力（通过调节该型细胞穿越某特定组织，出现于淋巴液及回到血循环的能力），但调节淋巴细胞归巢反应的关键环节是血源性淋巴细胞与毛细血管后微静脉内皮间的黏附作用[7]。淋巴细胞黏附于内皮是其外渗的首要步骤，该作用是由淋巴细胞归巢受体与其内皮细胞配体，以及活化因子与淋巴细胞上相应受体所介导（见下文），此作用大体上决定了不同组织中淋巴细胞的外渗能力。需要强调的是归巢过程的特异性与抗原无关，即淋巴细胞在特定组织中渗出的能力与该组织中是否存在相应抗原无关。实际上，绝大多数淋巴细胞再归位于特定部位（如在迟发性超敏反应中）并不特异性地决定于该部位是否存在有诱发免疫应答的抗原[729]。抗原的存在反而可影响抗原特异性淋巴细胞定位于特定部位（图 14.14）。抗原刺激可活化淋巴细胞各种黏附分子系统，而将其（暂时）滞留于局部组织，使其在输出淋巴液中出现的时间延迟[546]。

血源性淋巴细胞在其渗出部位，它与内皮的黏附作用发生于高剪切力的血流中（在后微静脉可达 30dynes/cm^2[730]）。研究表明：针对于该种特殊的生理条件，通过进化淋巴细胞（实质上所有粒细胞同样）渗出机制表现为多步骤过程，通过各自独立的特定的黏附机制，最初在血流中发生相互接触，继之实现稳固结合[731~733]。在渗出过程中已明确划分为四个步骤：①初级黏附；②淋巴细胞活化；③次级黏附；④跨膜-趋化过程（图 14.14）。

初级黏附是自由流动的淋巴细胞开始识别和接触于合适的内皮上——高内皮微静脉的特化内皮或在（炎症）三级效应部位适当活化的内皮。在此第一阶段中，持续表达的淋巴细胞功能性归巢受体在高速血流下，可与相应可调节的血管配体相互作用。初级黏附包括：淋巴细胞与血管壁较松弛的接触，使细胞可以在血管内壁上滚动，以及随后通过不同分子机制减缓滚动速度[734]。在其他情况下，该过程仅为一个短暂而迅速的滞留过程，无明显的滚动[735]。令人惊异的是，介导最初细胞接触的受体趋于高度集中，分布在淋巴细胞微绒毛部位（流动状态下最初细胞-细胞接触的部位），这样大大增加了它们在生理剪切力状态下黏附的有效性[736]。通过几百种作用或更多因素，初级黏附减弱了淋巴细胞的运动速度，使得它们有足够的时间在血管壁寻找可溶性或内皮细胞表面的前黏附性成分。重要的是，该接触是可被迅速逆转的，如果没有次级黏附机制参与，淋巴细胞会被重新释放入血液循环。

典型的初级归巢受体是 L 选择素，为一种 C 型选择素，可结合分布于特化的毛细血管后微静脉上硫酰

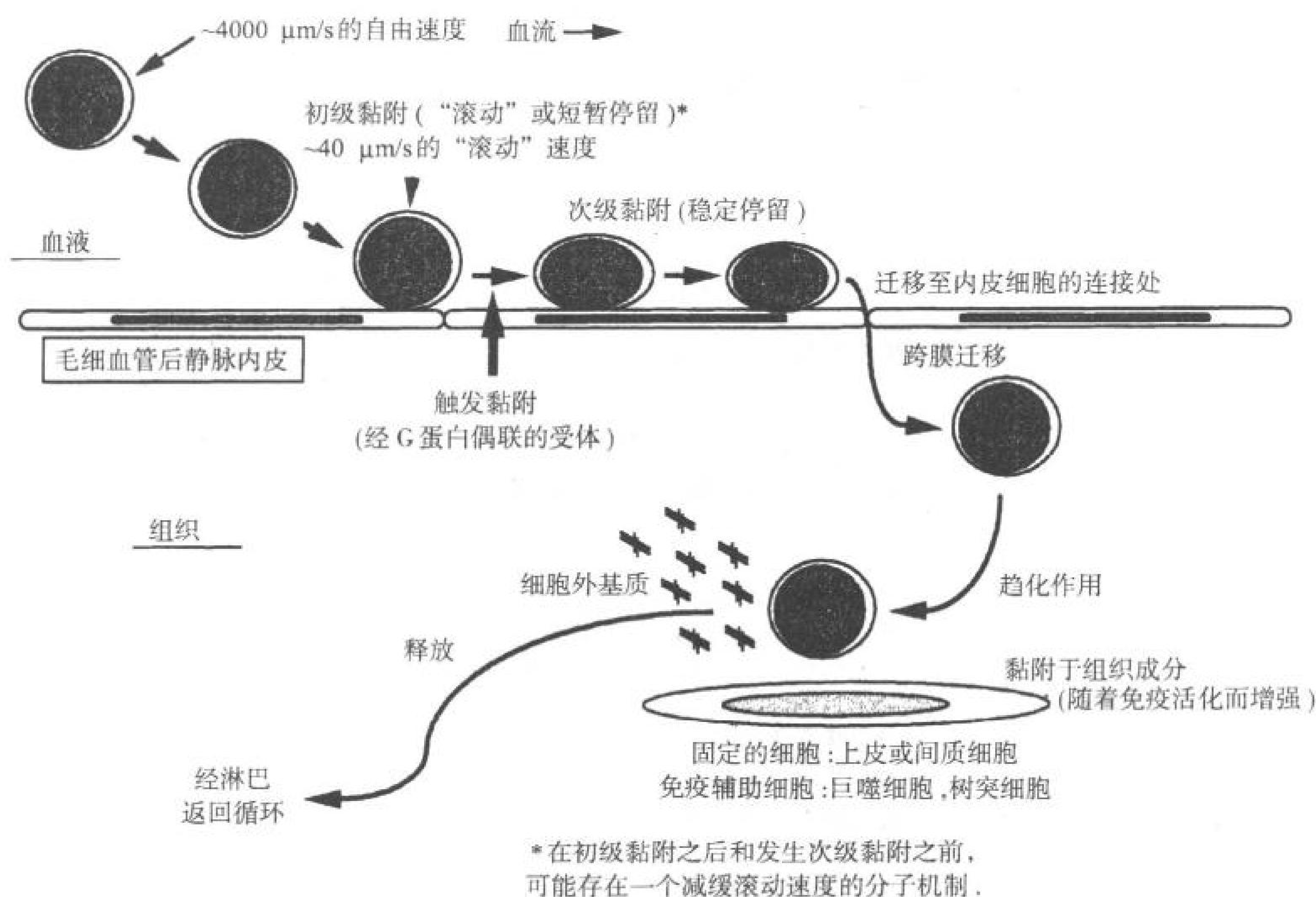


图 14.14 淋巴细胞渗出的分步模式。现在认为,血管中自由流动的淋巴细胞开始是通过非活化依赖性的初级受体与内皮上可调控的相应配体发生相互作用。如果该淋巴细胞不能接受到内皮细胞或周围组织的次级活化信号,它与内皮细胞之间的这种相互作用在血流剪切力的作用下是不稳定的,故而很短暂。活化导致次级活化依赖的黏附系统参与该过程,次级黏附在血流剪切力的作用下是稳定的,可使淋巴细胞附着于内皮细胞表面,后穿过血管壁进入组织中。在一些情况下,淋巴细胞穿入血管壁需要细胞滚动速度减慢。因此,淋巴细胞成功地渗出血管外,这一过程需要淋巴细胞和内皮细胞表达两对或更多的黏附分子受体-配体,以及存在淋巴细胞特异性的活化因素,这些因素被严格调控着,以保证渗出过程的特异性。淋巴细胞进入组织后,在一些趋化和触化成分的影响下,它们会迁移到特异性的微环境中。这一迁移和在微环境停留的过程,是通过调控组织中细胞和基质成分间黏附和去黏附作用来实现的。一个特定的淋巴细胞在组织中停留的时间长短,取决于细胞上黏附分子的表达情况和本身的活化状态,以及组织内相应配体的分布。

化、岩藻酰化的多糖决定簇[737,738];尤其是外周淋巴结的 HEV,该处多种糖蛋白表面存在多糖配基,共同组成了外周淋巴结的地址素(addressin,PNAd;表 14.1)[739]。L选择素集中分布于淋巴细胞的微绒毛,该分子可迅速发生结合反应,以实现在高切应力状态下极其有效的胞间接触;它也可以迅速发生解离,致使在生理性血流中实现松弛的,甚至滚动性细胞间接触。淋巴细胞亚群亦可通过与血管内皮上其他黏附分子发生作用来介导初级黏附反应,包括E选择素及P选择素、VCAM-1及MadCAM-1(Ig超家族血管表面配体,相应受体为淋巴细胞α4归巢受体α4β1与α4β7),还可经CD44介导机制与透明质酸结合[735,740~742]。CD44在细胞活化前处于持续非活化状态,只有细胞活化后(涉及蛋白激酶C)6小时以上,它才具有活性[742],这一点很独特。与选择素相似,α4整合素处于持续性活化状态,但其功能在淋巴细胞活化后可明显增加,这些黏附分子都可介导淋巴细胞对血管内皮的初级与次级黏附[734,735,741](见下文)。血管E与P选择素,尤其α4整合素,可以特征性地介导比L选择素更慢的滚动反应。这一区别很重要,因为在某些情况下,L选择素介导的滚动作用太松弛,常需要α4整合素或其他机制的参与,以减慢滚动速率,便于发生以后的淋巴细胞活化与次级黏附(见下文)。

516

渗出过程的第二步,即淋巴细胞“活化”,其中的分子机制最为不清楚。现在知道,在局部淋巴细胞-内皮初级黏附作用2~3秒后,即可激活二次黏附(如整合素活化,见下文),该激活过程中G蛋白偶联受体起重要作用[743]。当G蛋白信号传递受抑时(如百日咳毒素),淋巴细胞与内皮相互作用,出现一个特别的滚动表

表 14.1　参与淋巴细胞-内皮细胞识别和淋巴细胞归巢过程的分子

分子家族	淋巴细胞归巢过程中的作用
选择素	
L 选择素((LECAM-1, Mel-14, LAM-1 Ag)	为典型的初级"活化非依赖性"归巢受体。基于它在淋巴细胞归巢过程中的关键作用,称之为"外周淋巴结归巢受体";它也促进初始淋巴细胞归巢到派尔集合淋巴结,以及记忆细胞(亚群)归巢到一些三级淋巴组织中(外周 > 黏膜)。在淋巴结和三级淋巴组织中,L 选择素识别外周淋巴结静脉上地址素(addressin)的唾液酸化多聚糖集团。
E 选择素(ELAM-1)	为炎症诱发的内皮细胞黏附分子,在慢性炎症状态下可选择性地表达在皮肤(即皮肤血管的地址素,介导初级黏附);识别皮内淋巴细胞抗原 CLA。
P 选择素(GMP-140)	在体外促进 T 细胞的初级黏附;体内作用未知。可识别 PSGL-1 相连的多聚糖。
选择素的多聚糖配体	
外周淋巴结地址素(PNAd;gylcan)	选择性表达在外周淋巴结的 HEV;含唾液酸化多聚糖和多个蛋白核心(包含 CD34)。可能在多种三级淋巴组织的慢性炎症过程中被诱导表达。在派尔集合淋巴结,MAdCAM-1 本身可被糖基化成为 L 选择素的配体(见下文)。
CLA(皮内淋巴细胞相关抗原)	为皮肤选择性的淋巴细胞归巢受体。表达于皮肤相关的记忆-效应细胞亚群是 E 选择素的唾液酸化多聚糖配体(蛋白核心尚未确定)。
PSGL-1(P 选择素糖蛋白配体-1)	蛋白核心上连有多糖,为 P 选择素的配体,其在淋巴归巢机制的生理作用未知。
整合素	
β2 型(CD18)	
αLβ2(LFA-1)	为内皮细胞上 ICAM-1 和-2 的配体,是一个典型的激活依赖性的次级黏附分子。
α4 型(CD49d)	
α4β1(VLA-1)	为内皮上 VACM-1 的主要受体,也可识别纤维结合素。现在认为它参与记忆淋巴细胞向炎性部位的归巢过程,包括初级黏附、滚动速度减缓和次级黏附。
α4β7	为内皮上 MAdCAM-1 的主要受体。作为黏膜归巢受体,主要参与初始淋巴细胞向派尔集合淋巴结归巢,及记忆淋巴细胞向黏膜性三级淋巴组织(肺除外);参与初级黏附、滚动速度减缓和次级黏附。
Ig 超家族	
ICAM-1,-2(细胞间黏附分子-1,-2)	是广泛在内皮表达的 LFA-1 配体;炎症时可上调 ICAM-1,而 ICAM-2 则持续表达;参与次级黏附和渗出。
VCAM-1(血管细胞黏附分子-1)	为 α4β1 内皮上的配体,由炎症诱发表达,其体内分布尚不完全清楚,但其表达呈现异质性,表明它可能是组织或微环境的选择性标志。
MAdCAM-1(黏膜地址素)	选择性表达在黏膜 HEV 和固有层血管内皮上的黏附分子,通过识别 α4β7 来结合向黏膜归巢的淋巴细胞。在派尔集合淋巴结(而非固有层),它与 L 选择素配体共同促进初始淋巴细胞向该组织的归巢。
蛋白聚糖软骨联结蛋白	
CD44(HCAM,Pgp-1)	其主要的内皮配体为透明质酸;介导活化的(而非静息的)淋巴细胞的初级黏附,可能参与记忆-效应母细胞向炎性部位的归巢。
其他	
VAP-1(血管黏附蛋白-1)	在外周淋巴结 HEV 持续表达,并在炎性小静脉广泛上调;相应在淋巴细胞上的配体及其生理功能尚未知。

型,但(整合素介导的)与内皮稳定性接触受抑,因而未发生渗出作用。众多趋化因子的 7 跨膜受体是通过 G 蛋白传递信号的,在中性粒细胞与转染淋巴细胞,该受体可在数秒内启动整合素活化。而且这些趋化因子受体触发的黏附作用可在数分钟内自发逆转,致使滞留的淋巴细胞逆转为血流中的滚动表型(这样保证了体内黏附作用的可逆性,除非随后发生跨膜渗出)。因此,在触发淋巴细胞渗出的过程可能有众多趋化因子家族参与,这一点引起人们的极大兴趣;但以后逐渐认识到:静息淋巴细胞对已知趋化因子(生理浓度)的反应太

微弱或太缓慢，以致不能在渗出过程产生明显有效的前黏附反应[521,744,745]。然而，已证明许多发现的可溶性趋化因子(SDF-1、6-C-Kine、MIP-3α 和 MIP-3β)可滞留流动状态下滚动的淋巴细胞[746]。而且还鉴定出了一种新的膜型趋化因子——CX_3C，初步研究表明该因子可高表达在活化的人内皮细胞上，并促进牢固的白细胞(含 T 细胞)黏附[746]。

淋巴细胞渗出过程的第三步是活化依赖的稳定性滞留，参与该过程的黏附分子常处于持续非活化或低亲和力活化状态，但它们可在数秒内被触发进而介导牢固的黏附作用以抗拒血流剪切力。至今，仅确定异源二聚体整合素参与这一步，包括 α4 整合素 α4β1 与 α4β7，及 β2 整合素 LFA-1(αLβ2，CD11a/CD18)与 MAC-1(αMβ2，CD11b/CD18)[731~733]。有趣的是，与 α4 整合素不同[736]，β2 整合素多分布于白细胞胞体上，而在微绒毛上很少分布[747]。淋巴细胞是用微绒毛最先接触血管上皮的，该部位很少分布有 β2 整合素，这可部分解释：即使 β2 整合素预先活化，仍不可在血流中启动黏附效应[735]。活化依赖的稳定性滞留之后便发生淋巴细胞的跨膜渗出，即外渗过程的最终步骤。参与次级黏附作用的 β2 与 α4 整合素被认为参与穿越血管壁的迁移过程。

上述多步骤过程的重要意义在于淋巴细胞渗出的特异性，可由其中任一或多个步骤的组合决定，因为有效的再循环依赖于所有步骤的实现。这样淋巴细胞归巢过程就被一系列“是”(继续下一步骤)或“不”(返回血液)的算法所决定。既然归巢可被任一或所有决定环节所调控，那么归巢的多样性与特异性就是由每个阶段配体-受体对的组合所决定的。此过程使再循环的特异性大大超过了任一步骤的特异性[731]。结果，这一多步骤的、并独立调节的淋巴细胞游走路径中涉及到了一些高效且特异的黏附受体，如 L 选择素或 LFA-1。迄今已鉴定的相关重要黏附分子列于表 14.1 中，每一分子参与各自独特的或是部分重叠的生理性归巢过程机制。图 14.15 示意黏附性受体如何发生相互协作与顺序性作用最终导致组织特异性归巢[521]。例如，如上所述，初始淋巴细胞必须能在所有二级淋巴组织(包括派尔集合淋巴结)渗出，同时通常不能在淋巴结外(效应)部位渗出 。外置小鼠派尔集合淋巴结的原位研究显示，初始淋巴细胞归巢于此部位，该过程中涉及 L 选择素的先后参与以启动黏附，α4β7 则减缓滚动，LFA-1 与 α4β7 共同介导活化依赖的滞留作用[734]。L 选择素

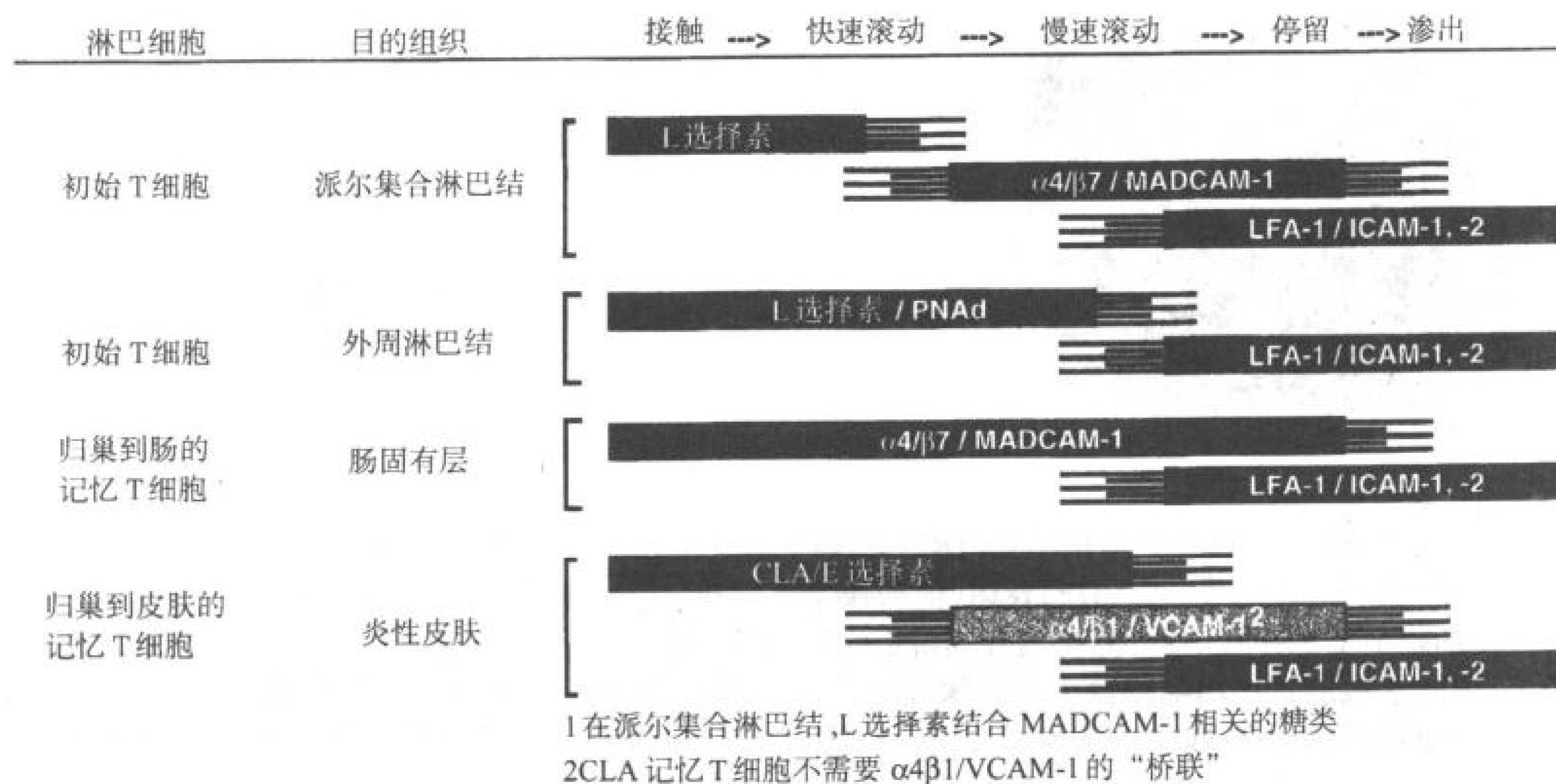


图 14.15　淋巴细胞在不同的血管床渗出的过程(接触、滚动、减速滚动、滞留和渗出)，依赖于有次序地、重复地利用不同的归巢-内皮细胞配体对。本图显示几个目前研究较为清楚的分子机制，但不同淋巴细胞亚群靶向回流到不同组织位点这一过程可能涉及更多的分子机制。应该强调的是，定性和定量的调节淋巴细胞归巢受体和内皮细胞上相应配体，对这种渗出的特异性调节起关键作用。活化因素在这种特异性调节中也发挥重要作用，但本图未显示。注意：利用这些分子机制，初始淋巴细胞可在外周淋巴结和派尔集合淋巴结(二级淋巴组织)中渗出，但不能发生在皮肤或肠固有层(三级淋巴组织)。依赖于相关归巢受体的表达，记忆细胞可在肠或皮肤内有效地渗出(通常不能两处同时发生)。(亦参见图 14.16。)

控制启动黏附，因为初始淋巴细胞表达 α4β7 的水平及活性较低。另一方面，在派尔集合淋巴结 HEV(仅表达低水平的 L 选择素配体)，由 L 选择素介导的细胞滚动速度太快，需要 LFA-1 的直接参与，这使得 α4β7 的参与成为必需。由于初始细胞 α4β7 表达水平较低，故而需要额外的 LFA-1 参与淋巴细胞滞留。α4β7 的内皮细胞配体 MAdCAM-1 在外周淋巴结 HEV 无表达，但由于外周淋巴结 HEV 总表达有较高水平的 L 选择素配体，L 选择素介导的滚动可能会减慢而转化为 LFA-1 介导的滞留作用。重要的是，初始型细胞 α4β7 的表达水平及活性不足以促使其与 MAdCAM-1 阳性、L 选择素配基阴性的肠上皮固有层(一种淋巴外效应部位)直接结合。正如前述，记忆 T 细胞归巢受体的表达存在有异质性，例如，不同亚群不表达或高水平表达 α4β7、CLA 和 L 选择素(图 14.16)。依赖于其表达归巢受体的模式，记忆细胞能或不能有效地渗出到各种组织中，这些组织的毛细血管后微静脉内皮都以不同形式表达归巢受体的配体。如图 14.15 所示，高表达 α4β7/不表达 CLA 的记忆 T 细胞将会有效地渗出到肠上皮固有层而非炎症皮肤中，而 α4β7 阴性/ CLA 阳性的记忆 T 细胞却恰好相反。总之，这些例子提示，免疫系统通过这些归巢机制，使得初始淋巴细胞可到达黏膜与外周二级淋巴组织，但非三级(效应)部位；使得记忆 T 细胞可定向游走到不同的三级淋巴组织中。这样，通过调节关键性归巢受体和相应内皮配体表达水平，以及使这些黏附系统有序地发生协作，免疫系统利用相对少量的不同分子成分，建立了许多特异性的归巢途径。

517

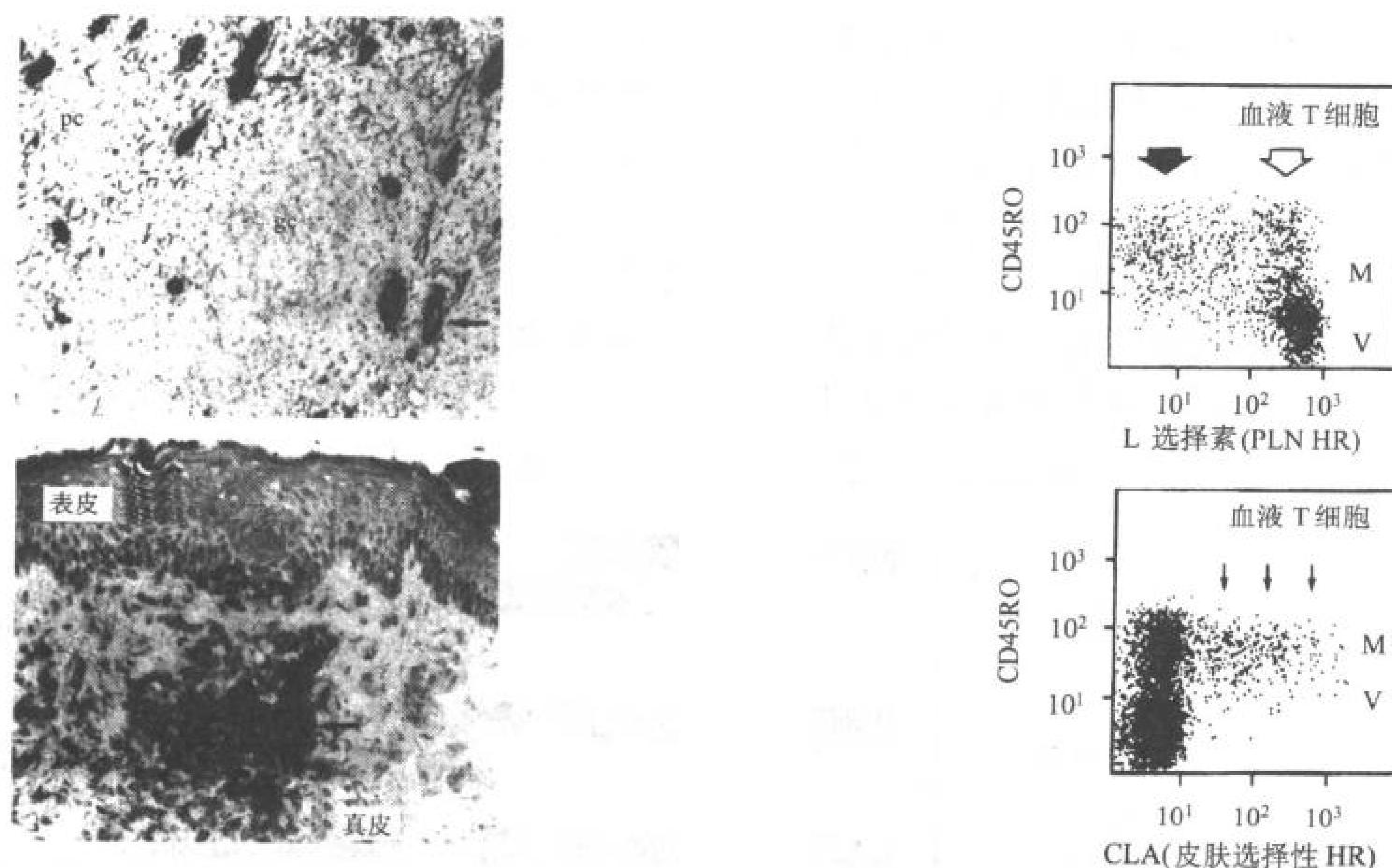


图 14.16 外周淋巴结和皮肤中，归巢受体和相应内皮上配体的分化表达。**上左图**：抗原刺激的人外周淋巴结(PLN)经免疫组化显示了 PLN 的 HEV 上 PLN 地址素(PNAd)的表达(箭头；gc，生发中心；pc，副皮质区；pc 内尚可见一些树突状结构，其功能不明)。PNAd 是内皮细胞上 L 选择素的配体，它是外周淋巴结的初级归巢受体。**下左图**：人的炎性皮肤(迟发型超敏反应)的免疫组织化学染色，显示了浅层真皮内毛细血管后静脉(箭头)上 E 选择素的集中表达。注意在所染静脉周边分布有陈旧的灰色单个核细胞，它们是渗出的记忆-效应 T 细胞。在慢性炎症状态下，E 选择素可选择性表达在皮肤内静脉上，而不表达于多数三级淋巴组织中。与此相一致，T 细胞 E 选择素配体(CLA)存在于炎性皮肤内几乎所有的记忆-效应 T 细胞上，而很少发现于皮肤以外炎性部位的那些 T 细胞上[537,677]。右侧图；外周血 T 细胞上 L 选择素和 CLA 的表达情况(用三色流式细胞仪检测)，与两分子介导的分别选择性向二级(PLN)和三级(皮肤)淋巴组织中归巢的功能相一致。如图 14.8 说明中所述，这些细胞以 CD3 为筛选标志获得纯 T 细胞(每个黑点相当于一个 T 细胞)；用 CD45RO 表达来区分初始(V：$CD45RO^-$)和记忆-效应(M：$CD45RO^+$)T 细胞亚群。**上右图**：初始 T 细胞亚群在淋巴结中可以相对均一地渗出，与此机制相一致，几乎所有外周血中的 $CD45RO^-$ T 细胞是 L 选择素阳性。相反，记忆-效应 T 细胞的归巢能力已知存在异质性，有些优先迁移到外周组织中，而其他则迁移到黏膜部位，这一异质性在图中表现为 $CD45RO^+$ T 细胞亚群中 L 选择素表达呈现双峰型(黑色和白色箭头)。**下右图**：初始 T 细胞不能渗出到炎性皮肤内，外周血中 $CD45RO^-$(初始)T 细胞缺乏向皮肤选择性归巢的受体 CLA。只有那些可有效迁移到皮肤内的 $CD45RO^+$ 记忆-效应 T 细胞亚群(箭头)可以专一地表达 CLA。

一旦进入组织，淋巴细胞分散进入特化的微环境区域，包括组织学上散布的结构，如二级淋巴组织的初始B细胞淋巴滤泡、生发中心、边缘区与T细胞区、三级淋巴组织的上皮，及三级淋巴组织中离散分布的特化的基质成分。淋巴细胞的组织选择性转运机制，使得免疫反应在系统水平分离和特化，而相应的微环境归巢机制致使局部基质-辅佐成分定位特殊化，以支持免疫应答过程中复杂的细胞间相互作用。

关于"微环境"归巢的分子机制尚知之甚少，但已有的证据提示了一些普通规律。首先，与淋巴细胞由血液中动员过程一样，它们的组织内靶向归巢作用，都可能是由交互调节、黏附与迁移事件共同来决定。每一微环境区域含有独特的组织化的黏附配基及其调节因子（无论在该区域内还是来源于微血管），这使得有次序的趋化与接触作用可引导合适的淋巴细胞迁移到该部位。其次，在外渗过程中，黏附调节为微环境归巢调控的基础。在一些情况下，微环境可上调一些新的淋巴细胞黏附因子，如TGF-β可诱导αEβ7整合素表达，从而使淋巴细胞通过与E选择素结合靶向于上皮内[748]。另外，持续性表达的黏附分子（包括许多与外渗有关的分子）也可能介入，如α4整合素介导生发中心的B细胞与VCAM-1⁺呈递抗原的滤泡状树突细胞发生结合[643,644]。重要的是，淋巴细胞整合素的黏附功能与其他黏附受体（如CD44）可被许多细胞表面受体传递的信号所调节，这不仅包括趋化因子受体，而且还有黏附分子受体本身，Fc受体及众多的Ig超家庭成员，包括T细胞与B细胞抗原受体本身及相关的辅刺激分子[749~752]。实际上，由于淋巴细胞迁移入特定区域，它们必须不断地整合由体内不同细胞表面受体介导的前黏附与可能的抗黏附信号。

一些可溶性因子及其受体对调节淋巴细胞定位亦起作用，包括一系列细胞因子及生长因子，如IL-2、IL-10、IL-15、TGF-β1、肝细胞生长因子等[753~757]。其中，趋化因子是一个结构相关性多肽组成的大家族，它们的受体为一家族同源性G蛋白偶联的七跨膜受体，由于其多样性和在组织中表达的广泛性，以及对功能不同的淋巴细胞亚群之趋化特异性，目前该分 子家族已引起特别的重视[521,744,745,758]。许多趋化因子与趋化因子受体在炎症中可被诱导或调节，这使得它们在免疫与炎症过程中可有效地调节淋巴细胞靶向分布。趋化因子亦可结合葡糖胺聚糖和被其呈递，提示对于底物或胞膜上趋化因子的趋化作用可能具有与典型趋化因子相同或更重要的效应[759~761]。而且，不同葡糖胺聚糖对不同趋化因子的结合有选择性，这就增加另一水平的调控机制。 *518*

不应把淋巴细胞归巢看作淋巴细胞的一项独立功能。归巢相关的细胞间作用完全整合于淋巴细胞与其内环境的相互作用中，因而也直接参与调节淋巴细胞的功能和寿命。例如，调节淋巴细胞靶向迁移的黏附和趋化作用，也可调节细胞活化或细胞凋亡。而且，归巢机制在克隆竞争过程中起关键作用（如前述），后者参与调节外周免疫细胞库的组成。这些机制提供了一种"动因"，使得特定淋巴细胞亚群的总库可以反复经历巢隙竞争机制的筛选。最后应再次强调的是，微环境反过来亦调节归巢作用：尤其是在细胞活化时，来自微环境的信号可调节黏附—归巢—趋化受体的表达及其活性，进而对每一淋巴细胞的迁移行为反复调节。 *519*

结论

当今对淋巴细胞功能的分子及细胞生物学研究虽然已取得了长足进展，但容易忘记我们在系统水平对免疫的理解仍处于其雏形阶段。对于体内保护性或病理性免疫反应中众多复杂的生理事件，现代免疫仍认识得很局限。在本章中，我们试图勾勒出已知的体内免疫系统的组织特征，尤其强调了该组织特征的相应功能。这里有两个基本的结论：第一，免疫是一种系统性现象，所有免疫应答都需要免疫系统中空间分布不同的各组分发生协同作用；第二，研究免疫细胞的功能，不能脱离其正常微环境中的调节因素，体内正常免疫系统的生理学总是与其自然的结构与组成相联系，包括非造血淋巴类型的细胞也对免疫功能的发挥有着重要作用。因此，面对那些快速积累的淋巴细胞相关的细胞和分子生物学研究数据，将来需要解决的问题是，把它们置于系统性免疫生理学的背景中来解释。只有在深入了解淋巴细胞与其微环境在分子水平与细胞水平的联系，我们才能真正理解免疫系统的运作机制。

致谢

我们感谢 Robin Arndt 的秘书工作及 Benita stawart 提供的绘图与照片。特别感谢 Jane Bardnell 博士在图 14.3、14.10 及 14.11 中出色的绘图工作。

（赵建平 译　王　宁 校）

参 考 文 献

1. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988;334:395.
2. Tew JG, DiLosa RM, Burton GF, et al. Germinal centers and antibody production in bone marrow. *Immunol Rev* 1992;126:99.
3. Terstappen LWMM, Johnsen S, Segers-Nolten MJ, Loken MR. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 1990;76:1739.
4. Bachmann MF, Kundig TM, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM. Free recirculation of memory B cells versus antigen-dependent differentiation to antibody-forming cells. *J Immunol* 1994;153:3386.
5. Reynolds JD, Kennedy L, Peppard J, Pabst R. Ileal Peyer's patch emigrants are predominantly B cells and travel to all lymphoid tissues in sheep. *Eur J Immunol* 1991;21:283.
6. Reynaud CA, Mackay CR, Muller RG, Weill JC. Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer's patches. *Cell* 1991;64:995.
7. Picker LJ, Butcher EC. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 1992;10:561.
8. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988;241:58.
9. Huang S, Terstappen LWMM. Formation of both hematopoietic microenvironment and hematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 1992;360:745.
10. Terstappen LWMM, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generation of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed $CD34^{+}CD38^{-}$ progenitor cells. *Blood* 1991;77:1218.
11. Terstappen LW, Huang S, Picker LJ. Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. *Blood* 1992;79:666.
12. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987;70:1316.
13. Stewart AK, Huang C, Long AA, Stollar BD, Schwartz RS. VH-gene representation in autoantibodies reflects the normal human B-cell repertoire. *Immunol Rev* 1992;128:101.
14. Gu H, Tarlinton D, Muller W, Rajewsky K, Forster I. Most peripheral B cells in mice are ligand selected. *J Exp Med* 1991;173:1357.
15. Vitetta ES, Berton MT, Burger C, Kepron M, Lee WT, Yin X-M. Memory B and T cells. *Annu Rev Immunol* 1991;9:193.
16. Cochet M, Pannetier C, Regnault A, Darche S, Leclerc C, Kourilsky P. Molecular detection and *in vivo* analysis of the specific T cell response to a protein antigen. Eur J Immunol 1992;22:2639.
17. Weiss L. *Cell and tissue biology: a textbook of histology.* Baltimore: Urban and Schwarzenberg, 1988.
18. Trentin JJ. Influence of hematopoietic organ stroma (hematopoietic inductive microenvironments) on stem cell differentiation. In: Gorden AS, ed. *Regulation of hematopoiesis.* New York: Appleton-Century, 1970:161.
19. Till JE, McCullock EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213.
20. Wolf NS, Trentin JJ. Hemopoietic colony studies. V. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells. *J Exp Med* 1968;127:205.
21. Abramson S, Miller RG, Phillips RA. The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J Exp Med* 1977;145:1567.
22. Wu AM, Till JE, Siminovitch L, McCulloch EA. Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J Exp Med* 1968;127:455.
23. Lord BI, Testa NG, Hendry JH. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood* 1975;46:65.
24. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol* 1963;62:327.
25. Worton RG, McCulloch EA, Till JE. Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. *J Cell Physiol* 1969;74:171.
26. Worton RG, McCulloch EA, Till JE. Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their capacity for self-renewal. *J Exp Med* 1969;130:91.
27. Bertoncello I, Hodgson GS, Bradley TR. Multiparameter analysis of transplantable hemopoietic stem cells: I. The separation and enrichment of stem cells homing to marrow and spleen on the basis of rhodamine-123 fluorescence. *Exp Hematol* 1985;13:999.
28. Visser JW, Bauman JG, Mulder AH, Eliason JF, de Leeuw AM. Isolation of murine pluripotent hemopoietic stem cells. *J Exp Med* 1984;159:1576.
29. Ploemacher RE, Brons NH. Isolation of hemopoietic stem cell subsets from murine bone marrow: I. Radioprotective ability of purified cell suspensions differing in the proportion of day-7 and day-12 CFU-S. *Exp Hematol* 1988;16:21.
30. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 1977;91:335.
31. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG, Krizsa F, Testa NG, Moore MAS. In vitro analysis of self-renewal and commitment of hematopoietic stem cells. In: Clarkson B, Marks PA, Till JE, eds. *Differentiation of normal and neoplastic hematopoietic cells.* Cold Spring Harbor Laboratory, NY: 1978:63.
32. Whitlock CA, Witte ON. Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:3608.
33. Zipori D, Duksin D, Tamir M, Argaman A, Toledo J, Malik Z. Cultured mouse marrow stromal cell lines. II. Distinct subtypes differing in morphology, collagen types, myelopoietic factors, and leukemic cell growth modulating activities. *J Cell Physiol* 1985;122:81.
34. Whitlock CA, Tidmarsh GF, Muller SC, Weissman IL. Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule. *Cell* 1987;48:1009.
35. Hunt P, Robertson D, Weiss D, Rennick D, Lee F, Witte ON. A single bone marrow-derived stromal cell type supports the in vitro growth of early lymphoid and myeloid cells. *Cell* 1987;48:997.
36. Dorshkind K, Johnson A, Collins L, Keller GM, Phillips RA. Generation of purified stromal cell cultures that support lymphoid and myeloid precursors. *J Immunol Methods* 1986;89:37.
37. Spangrude GJ, Johnson GR. Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7433.
38. Smith LG, Weissman IL, Heimfeld S. Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2788.
39. Kiefer F, Wagner EF, Keller G. Fractionation of mouse bone marrow by adherence separates primitive hematopoietic stem cells from in vitro colony-forming cells and spleen colony-forming cells. *Blood* 1991;78:2577.
40. Ploemacher RE, Brons RH. Separation of CFU-S from primitive cells responsible for reconstitution of the bone marrow hemopoietic stem cell compartment following irradiation: evidence for a pre-CFU-S cell. *Exp Hematol* 1989;17:263.
41. Jones RJ, Celano P, Sharkis SJ, Sensenbrenner LL. Two phases of engraftment established by serial bone marrow transplantation in mice. *Blood* 1989;73:397.
42. Jones RJ, Wagner JE, Celano P, Zicha MS, Sharkis SJ. Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells [see comments]. *Nature* 1990;347:188.
43. Spangrude GJ, Brooks DM, Tumas DB. Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells: in vivo expansion of stem cell phenotype but not function. *Blood* 1995;85:1006.
44. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 1986;67:842.
45. Strauss LC, Rowley SD, La Russa VF, Sharkis SJ, Stuart RK, Civin CI. Antigenic analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My-10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1986;14:878.
46. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Human hematopoietic precursors in long-term culture: single CD34+ cells that lack detectable T cell, B cell, and myeloid cell antigens produce multiple colony-forming cells when cultured with marrow stromal cells. *J Exp Med* 1990;172:355.
47. Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3584.
48. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM. Characteriza-

tion and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 1989;74:1563.

49. McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 1988;241:1632.
50. Peault B, Weissman IL, Baum C, McCune JM, Tsukamoto A. Lymphoid reconstitution of the human fetal thymus in SCID mice with CD34+ precursor cells. *J Exp Med* 1991;174:1283.
51. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2804.
52. Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, et al. Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* 1988;81:951.
53. Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, et al. Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* 1991;77:1717.
54. Collins RJ. CD34+ selected cells in clinical transplantation [review, 45 refs]. *Stem Cells* 1994;12:577.
55. Civin CI, Almeida PG, Lee MJ, Olweus J, Terstappen LW, Zanjani ED. Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* 1996;88:4102.
56. Hirsch E, Iglesias A, Potocnik AJ, Hartmann U, Fassler R. Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of beta1 integrins. *Nature* 1996;380:171.
57. McCulloch EA, Siminovitch L, Till JE. Spleen-colony formation in anemic mice of genotype WW^{v}. *Science* 1964;144:844.
58. McCulloch EA, Siminovitch L, Till JE, Russell ES, Bernstein SE. The cellular basis of the genetically determined hemopoietic defect in anemic mice of genotype Sl/Sld. *Blood* 1965;26:399.
59. Russell ES. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet* 1979;20:357.
60. Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, P. Besmer P, Bernstein A. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 1988;335:88.
61. Geissler EN, Ryan MA, Housman DE. The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 1988;55:185.
62. Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, et al. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 1990;63:213.
63. Williams DE, Eisenman J, Baird A, et al. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* 1990;63:167.
64. Huang E, Nocka K, Beier DR, et al. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* 1990;63:225.
65. Copeland NG, Gilbert DJ, Cho BC, et al. Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell* 1990;63:175.
66. Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, et al. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver–conditioned medium. *Cell* 1990;63:195.
67. Anderson DM, Lyman SD, Baird A, et al. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms [published erratum appears in *Cell* 1990 Nov 30;63(5):following 1112]. *Cell* 1990;63:235.
68. Martin FH, Suggs SV, Langley KE, et al. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell* 1990;63:203.
69. Andrews RG, Knitter GH, Bartelmez SH, et al. Recombinant human stem cell factor, a c-kit ligand, stimulates hematopoiesis in primates. *Blood* 1991;78:1975.
70. Ulich TR, del Castillo CJ, McNiece IK, et al. Stem cell factor in combination with granulocyte colony-stimulating factor (CSF) or granulocyte-macrophage CSF synergistically increases granulopoiesis in vivo. *Blood* 1991;78:1954.
71. Molineux G, Migdalska A, Szmitkowski M, Zsebo K, Dexter TM. The effects on hematopoiesis of recombinant stem cell factor (ligand for c-kit) administered in vivo to mice either alone or in combination with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1991;78:961.
72. Zsebo KM, Smith KA, Hartley CA, et al. Radioprotection of mice by recombinant rat stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:9464.
73. Harrison DE, Zsebo KM, Astle CM. Splenic primitive hematopoietic stem cell (PHSC) activity is enhanced by steel factor because of PHSC proliferation. *Blood* 1994;83:3146.
74. Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* 1991;65:1143.
75. Mackarehtschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* 1995;3:147.
76. Sasaki K, Yagi H, Bronson RT, et al. Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12359.
77. Castilla LH, Wijmenga C, Wang Q, et al. Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knocked-in leukemia gene CBFB-MYH11. *Cell* 1996;87:687.
78. Melchers F. Three waves of B lymphocyte development during embryonic development in the mouse. *INSERM Symp* 1979;10:281.
79. Yoshida Y, Osmond DG. Identity and proliferation of small lymphocyte precursors in cultures of lymphocyte-rich fractions of guinea pig bone marrow. *Blood* 1971;37:73.
80. Osmond DG, Nossal G. Differentiation of lymphocytes in mouse bone marrow. II. Kinetics of maturation and renewal of antiglobulin-binding cells studied by double labeling. *Cell Immunol* 1974;13:132.
81. Osmond DG. Population dynamics of bone marrow B lymphocytes. *Immunol Rev* 1986;93:103.
82. Kincade PW, Lee G, Pietrangeli CE, Hayashi S, Gimble JM. Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. *Annu Rev Immunol* 1989;7:111.
83. Cooper MD, Raymond DA, Peterson RD, South MA, Good RA. The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J Exp Med* 1966;123:75.
84. Loken MR, Shah VO, Hollander Z, Civin CI. Flow cytometric analysis of normal B lymphoid development. *Pathol Immunopathol Res* 1988;7:357.
85. Banchereau J, Rousset F. Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation. *Adv Immunol* 1992;52:125.
86. LeBien TW, Wormann B, Villablanca JG, et al. Multiparameter flow cytometric analysis of human fetal bone marrow B cells. *Leukemia* 1990;4:354.
87. Burrows PD, Cooper MD. B-cell development in man. *Curr Opin Immunol* 1993;5:201.
88. Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 1991;173:1213.
89. Li YS, K. Hayakawa K, Hardy RR. The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J Exp Med* 1993;178:951.
90. Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990;248:1517.
91. Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 1989;59:1035.
92. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575.
93. Desiderio SV, Yancopoulos GD, Paskind M, et al. Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature* 1984;311:752.
94. Tillinghast JP, Russell JH, Fields LE, Loh DY. Protein kinase C regulation of terminal deoxynucleotidyl transferase. *J Immunol* 1989;143:2378.
95. Kunkel TA, Gopinathan KP, Dube DK, Snow ET, Loeb LA. Rearrangements of DNA mediated by terminal transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1867.
96. Kudo A, Melchers F. A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes. *EMBO J* 1987;6:2267.
97. Kudo A, Pravtcheva D, Sakaguchi N, Ruddle FH, Melchers F. Localization of the murine lambda 5 gene on chromosome 16. *Genomics* 1987;1:277.
98. Pillai S, Baltimore D. Formation of disulphide-linked mu 2 omega 2 tetramers in pre-B cells by the 18K omega-immunoglobulin light chain. *Nature* 1987;329:172.
99. Sakaguchi N, Melchers F. Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Nature* 1986;324:579.
100. Rolink A, Melchers F. Molecular and cellular origins of B lymphocyte diversity. *Cell* 1991;66:1081.
101. Tsubata T, Reth M. The products of pre-B cell-specific genes (lambda 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J Exp Med* 1990;172:973.
102. Bossy D, Milili M, Zucman J, Thomas G, Fougereau M, Schiff C. Organization and expression of the lambda-like genes that contribute to the mu-psi light chain complex in human pre-B cells. *Int Immunol* 1991;3:1081.
103. Bauer SR, Kudo A, Melchers F. Structure and pre-B lymphocyte restricted expression of the VpreB in humans and conservation of its structure in other mammalian species. *EMBO J* 1988;7:111.
104. Schiff C, Bensmana M, Guglielmi P, Milili M, Lefranc MP, Fougereau M. The immunoglobulin lambda-like gene cluster (14.1, 16.1 and F lambda 1) contains gene(s) selectively expressed in pre-B cells and is the human counterpart of the mouse lambda 5 gene. *Int Immunol* 1990;2:201.
105. Kerr WG, Cooper MD, Feng L, Burrows PD, Hendershot LM. Mu heavy chains can associate with a pseudo-light chain complex (psi L) in human pre-B cell lines. *Int Immunol* 1989;1:355.
106. Nishimoto N, Kubagawa H, Ohno T, Gartland GL, Stankovic AK, Cooper MD. Normal pre-B cells express a receptor complex of mu heavy chains and surrogate light-chain proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6284.
107. Cherayil BJ, Pillai S. The omega/lambda 5 surrogate immunoglobulin light chain is expressed on the surface of transitional B lymphocytes in murine bone marrow. *J Exp Med* 1991;173:111.
108. Karasuyama H, Rolink A, Shinkai Y, Young F, Alt FW, Melchers F. The expression of Vpre-B/lambda 5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B cell-deficient mutant mice. *Cell* 1994;77:133.
109. Yancopoulos GD, Alt FW. Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* 1985;40:271.

110. Reth MG, Alt FW. Novel immunoglobulin heavy chains are produced from DJH gene segment rearrangements in lymphoid cells. *Nature* 1984;312:418.
111. Tsubata T, Tsubata R, Reth M. Cell surface expression of the short immunoglobulin mu chain (D mu protein) in murine pre-B cells is differently regulated from that of the intact mu chain. *Eur J Immunol* 1991;21:1359.
112. Karasuyama H, Rolink A, Melchers F. A complex of glycoproteins is associated with VpreB/lambda 5 surrogate light chain on the surface of mu heavy chain-negative early precursor B cell lines. *J Exp Med* 1993;178:469.
113. Hermans MH, Hartsuiker H, Opstelten D. An in situ study of B-lymphocytopoiesis in rat bone marrow. Topographical arrangement of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive cells and pre-B cells. *J Immunol* 1989;142:67.
114. Osmond DG, Kim N, Manoukian R, Phillips RA, Rico VS, Jacobsen K. Dynamics and localization of early B-lymphocyte precursor cells (pro-B cells) in the bone marrow of scid mice. *Blood* 1992;79:1695.
115. Jacobsen K, Osmond DG. Microenvironmental organization and stromal cell associations of B lymphocyte precursor cells in mouse bone marrow. *Eur J Immunol* 1990;20:2395.
116. Dorshkind K, Witte ON. Long-term murine hemopoietic cultures as model systems for analysis of B lymphocyte differentiation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1987;135:23.
117. Kincade PW. Experimental models for understanding B lymphocyte formation. *Adv Immunol* 1987;41:181.
118. Collins LS, Dorshkind K. A stromal cell line from myeloid long-term bone marrow cultures can support myelopoiesis and B lymphopoiesis. *J Immunol* 1987; 138:1082.
119. Dorshkind K. In vitro differentiation of B lymphocytes from primitive hemopoietic precursors present in long-term bone marrow cultures. *J Immunol* 1986;136: 422.
120. Pietrangeli CE, Hayashi S, Kincade PW. Stromal cell lines which support lymphocyte growth: characterization, sensitivity to radiation and responsiveness to growth factors. *Eur J Immunol* 1988;18:863.
121. Landreth KS, Dorshkind K. Pre-B cell generation potentiated by soluble factors from a bone marrow stromal cell line. *J Immunol* 1988;140:845.
122. Bernardi P, Patel VP, Lodish HF. Lymphoid precursor cells adhere to two different sites on fibronectin. *J Cell Biol* 1987;105:489.
123. Miyake K, Underhill CB, Lesley J, Kincade PW. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med* 1990;172:69.
124. Miyake K, Medina KL, Hayashi S, Ono S, Hamaoka T, Kincade PW. Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J Exp Med* 1990;171:477.
125. Miyake K, Weissman IL, Greenberger JS, Kincade PW. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med* 1991;173:599.
126. Miyake K, Medina K, Ishihara K, Kimoto M, Auerbach R, Kincade PW. A VCAM-like adhesion molecule on murine bone marrow stromal cells mediates binding of lymphocyte precursors in culture. *J Cell Biol* 1991;114:557.
127. Thomas PS, Pietrangeli CE, Hayashi S, et al. Demonstration of neural cell adhesion molecules on stromal cells that support lymphopoiesis. *Leukemia* 1988;2: 171.
128. Sanderson RD, Sneed TB, Young LA, Sullivan GL, Lander AD. Adhesion of B lymphoid (MPC-11) cells to type I collagen is mediated by integral membrane proteoglycan, syndecan. *J Immunol* 1992;148:3902.
129. Arroyo AG, Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell* 1996;85:997.
130. Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, et al. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 1988;333:571.
131. Sudo T, Ito M, Ogawa Y, et al. Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell development. *J Exp Med* 1989;170:333.
132. Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, et al. Stepwise progression of B lineage differentiation supported by interleukin 7 and other stromal cell molecules. *J Exp Med* 1990;171:1683.
133. Rolink A, Kudo A, Karasuyama H, Kikuchi Y, Melchers F. Long-term proliferating early pre B cell lines and clones with the potential to develop to surface Ig-positive, mitogen reactive B cells in vitro and in vivo. *EMBO J* 1991; 10:327.
134. Billips LG, Petitte D, Dorshkind K, Narayanan R, Chiu CP, Landreth KS. Differential roles of stromal cells, interleukin-7, and kit-ligand in the regulation of B lymphopoiesis. *Blood* 1992;79:1185.
135. Paul SR, Bennett F, Calvetti JA, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7512.
136. Landreth KS, Narayanan R, Dorshkind K. Insulin-like growth factor-I regulates pro-B cell differentiation. *Blood* 1992;80:1207.
137. Rolink A, Streb M, Nishikawa S, Melchers F. The c-kit-encoded tyrosine kinase regulates the proliferation of early pre-B cells. *Eur J Immunol* 1991;21:2609.
138. Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, et al. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1991;174:63.
139. Deenen GJ, Van Balen I, Opstelten D. In rat B lymphocyte genesis sixty percent is lost from the bone marrow at the transition of nondividing pre-B cell to sIgM+ B lymphocyte, the stage of Ig light chain gene expression. *Eur J Immunol* 1990; 20:557.
140. Park YH, Osmond DG. Dynamics of early B lymphocyte precursor cells in mouse bone marrow: proliferation of cells containing terminal deoxynucleotidyl transferase. *Eur J Immunol* 1989;19:2139.
141. Osmond DG. B cell development in the bone marrow. *Semin Immunol* 1990;2: 173.
142. Reynolds JD. Evidence of extensive lymphocyte death in sheep Peyer's patches. I. A comparison of lymphocyte production and export. *J Immunol* 1986;136: 2005.
143. Motyka B, Reynolds JD. Apoptosis is associated with the extensive B cell death in the sheep ileal Peyer's patch and the chicken bursa of Fabricius: a possible role in B cell selection. *Eur J Immunol* 1991;21:1951.
144. Brombacher F, Kohler G, Eibel H. B cell tolerance in mice transgenic for anti-CD8 immunoglobulin mu chain. *J Exp Med* 1991;174:1335.
145. Hartley SB, Crosbie J, Brink R, Kantor AB, Basten A, Goodnow CC. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* 1991;353:765.
146. Nemazee DA, Burki K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 1989;337:562.
147. Russell DM, Dembic Z, Morahan G, Miller JF, Burki K, Nemazee D. Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature* 1991;354:308.
148. Erikson J, Radic MZ, Camper SA, Hardy RR, Carmack C, Weigert M. Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice. *Nature* 1991;349:331.
149. Goodnow CC, Crosbie J, Adelstein S, et al. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 1988;334:676.
150. Goodnow CC, Crosbie J, Jorgensen H, Brink RA, Basten A. Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes [see comments]. *Nature* 1989;342:385.
151. Gu H, Zou YR, Rajewsky K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 1993;73:1155.
152. Kitamura D, Roes J, Kuhn R, Rajewsky K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 1991;350:423.
153. Kitamura D, Rajewsky K. Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature* 1992;356:154.
154. Storb U, Engler P, Manz J, et al. Expression of immunoglobulin genes in transgenic mice and transfected cells. *Ann NY Acad Sci* 1988;546:51.
155. Misener V, Downey GP, Jongstra J. The immunoglobulin light chain related protein lambda 5 is expressed on the surface of mouse pre-B cell lines and can function as a signal transducing molecule. *Int Immunol* 1991;3:1129.
156. Takemori T, Mizuguchi J, Miyazoe I, et al. Two types of mu chain complexes are expressed during differentiation from pre-B to mature B cells. *EMBO J* 1990;9: 2493.
157. Nomura J, Matsuo T, Kubota E, Kimoto M, Sakaguchi N. Signal transmission through the B cell-specific MB-1 molecule at the pre-B cell stage. *Int Immunol* 1991;3:117.
158. Kitamura D, Kudo A, Schaal S, Muller W, Melchers F, Rajewsky K. A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell* 1992;69:823.
159. Melchers F, Rolink A, Grawunder U, et al. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis [review, 119 refs.]. *Curr Opin Immunol* 1995; 7:214.
160. Sakaguchi N, Kashiwamura S, Kimoto M, Thalmann P, Melchers F. B lymphocyte lineage-restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties. *EMBO J* 1988;7:3457.
161. Hombach J, Leclercq L, Radbruch A, Rajewsky K, Reth M. A novel 34-kd protein co-isolated with the IgM molecule in surface IgM-expressing cells. *EMBO J* 1988;7:3451.
162. Kashiwamura S, Koyama T, Matsuo T, Steinmetz M, Kimoto M, Sakaguchi N. Structure of the murine mb-1 gene encoding a putative sIgM-associated molecule. *J Immunol* 1990;145:337.
163. Hombach J, Tsubata T, Leclercq L, Stappert H, Reth M. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* 1990;343:760.
164. Hombach J, Lottspeich F, Reth M. Identification of the genes encoding the IgM-alpha and Ig-beta components of the IgM antigen receptor complex by amino-terminal sequencing. *Eur J Immunol* 1990;20:2795.
165. Matsuo T, Nomura J, Kuwahara K, et al. Cross-linking of B cell receptor-related MB-1 molecule induces protein tyrosine phosphorylation in early B lineage cells. *J Immunol* 1993;150:3766.
166. Igarashi H, Kuwahara K, Nomura J, et al. B cell Ag receptor mediates different types of signals in the protein kinase activity between immature B cell and mature B cell. *J Immunol* 1994;153:2381.
167. Nemazee D, Buerki K. Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8039.
168. Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, et al. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 1993; 72:325.
169. Shokat KM, Goodnow CC. Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses. *Nature* 1995;375:334.
170. Chen C, Nagy Z, Radic MZ, et al. The site and stage of anti-DNA B-cell dele-

tion. *Nature* 1995;373:252.
171. Nossal GJ, Pike BL. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:1602.
172. Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med* 1993;177:999.
173. Radic MZ, Erikson J, Litwin S, Weigert M. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J Exp Med* 1993;177:1165.
174. Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 1993;177:1009.
175. Lang J, Jackson M, Teyton L, Brunmark A, Kane K, Nemazee D. B cells are exquisitely sensitive to central tolerance and receptor editing induced by ultralow affinity, membrane-bound antigen. *J Exp Med* 1996;184:1685.
176. Gu H, Tarlinton D, Muller W, Rajewsky K, Forster I. Most peripheral B cells in mice are ligand selected. *J Exp Med* 1991;173:1357.
177. Pospisil R, Fitts MG, Mage RG. CD5 is a potential selecting ligand for B cell surface immunoglobulin framework region sequences. *J Exp Med* 1996;184:1279.
178. Cyster JG, Healy JI, Kishihara K, Mak TW, Thomas ML, Goodnow CC. Regulation of B-lymphocyte negative and positive selection by tyrosine phosphatase CD45. *Nature* 1996;381:325.
179. Pospisil R, Young CG, Mage RG. Preferential expansion and survival of B lymphocytes based on VH framework 1 and framework 3 expression: "positive" selection in appendix of normal and VH-mutant rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6961.
180. Le Douarin NM, Dieterlen-Lièvre F, Oliver PD. Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. *Am J Anat* 1984;170:261.
181. Benveniste P, Chadwick BS, Miller RG. Development of T cells in vitro from precursors in mouse bone marrow. *Cell Immunol* 1990;127:92.
182. Slieker WA, van der Loo JC, de Rijk-de Bruijn R, et al. ER-MP12 antigen, a new cell surface marker on mouse bone marrow cells with thymus-repopulating ability: II. Thymus-homing ability and phenotypic characterization of ER-MP12-positive bone marrow cells. *Int Immunol* 1993;5:1099.
183. Golunski E, Palacios R. Fetal liver and bone marrow JORO 75+ lymphocyte progenitors are precursors of CD4+8− TCR/CD3− early thymocytes. *J Exp Med* 1994;179:721.
184. Bertho JM, Mossalayi MD, Dalloul AH, Mouterde G, Debre P. Isolation of an early T-cell precursor (CFU-TL) from human bone marrow. *Blood* 1990;75:1064.
185. Palacios R, Samaridis J, Thorpe D, Leu T. Identification and characterization of pro-T lymphocytes and lineage-uncommitted lymphocyte precursors from mice with three novel surface markers. *J Exp Med 1990;172:219.*
186. Rodewald HR, Kretzschmar K, Takeda S, Hohl C, Dessing M. Identification of pro-thymocytes in murine fetal blood: T lineage commitment can precede thymus colonization. *EMBO J* 1994;13:4229.
187. Bruno L, Res P, Dessing M, Cella M, Spits H. Identification of a committed T cell precursor population in adult human peripheral blood. *J Exp Med* 1997;185:875.
188. Spangrude GJ, Scollay R. Differentiation of hematopoietic stem cells in irradiated mouse thymic lobes. Kinetics and phenotype of progeny. *J Immunol* 1990;145:3661.
189. Kurtzberg J, Denning SM, Nycum LM, Singer KH, Haynes BF. Immature human thymocytes can be driven to differentiate into nonlymphoid lineages by cytokines from thymic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7575.
190. Marquez C, Trigueros C, Fernandez E, Toribio ML. The development of T and non-T cell lineages from CD34+ human thymic precursors can be traced by the differential expression of CD44. *J Exp Med* 1995;181:475.
191. Matsuzaki Y, Gyotoku J, Ogawa M, et al. Characterization of c-kit positive intrathymic stem cells that are restricted to lymphoid differentiation. *J Exp Med* 1993;178:1283.
192. Keller G, Paige C, Gilboa E, Wagner EF. Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoietic precursors. *Nature* 1985;318:149.
193. Fulop GM, Phillips RA. Use of scid mice to identify and quantitate lymphoid-restricted stem cells in long-term bone marrow cultures. *Blood* 1989;74:1537.
194. Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, et al. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell 1994;79:143.*
195. Zhuang Y, Soriano P, Weintraub H. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 1994;79:875.
196. Bain G, Maandag EC, Izon DJ, et al. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements [see comments]. *Cell* 1994;79:885.
197. Urbanek P, Wang ZQ, Fetka I, Wagner EF, Busslinger M. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* 1994;79:901.
198. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995;3:459.
198a. Kondo M, Weissman IL, Alaski K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;91:661.
199. Wu L, Kincade PW, Shortman K. The CD44 expressed on the earliest intrathymic precursor population functions as a thymus homing molecule but does not bind to hyaluronate. *Immunol Lett* 1993;38:69.
200. Aurrand-lions M, Galland F, Bazin H, Zakharyev VM, Imhof BA, Naquet P. Vanin-1, a novel gpi-linked perivascular molecule involved in thymus homing. *Immunity* 1996;5:391.
201. Miller JFAP. Immunological function of the thymus. *Lancet* 1961;2:748.
202. Steinmann GG. Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol* 1986;75:43.
203. Middleton G. The incidence of follicular structures in the human thymus at autopsy. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1967;45:189.
204. Levine G, Bearman R. Electron microscopy of the human thymus. In: Johannessen J, ed. *Electron microscopy in human medicine.* New York: McGraw-Hill, 1980:5.
205. Cordier AC, Haumont SM. Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *Am J Anat* 1980;157:227.
206. Bockman DE, Kirby ML. Neural crest interactions in the development of the immune system. *J Immunol* 1985;135:766.
207. Jotereau FV, Le Douarin NM. Demonstration of a cyclic renewal of the lymphocyte precursor cells in the quail thymus during embryonic and perinatal life. *J Immunol* 1982;129:1869.
208. Fontaine PJ, Calman FM, Kaplan C, Le Douarin NM. Seeding of the 10-day mouse embryo thymic rudiment by lymphocyte precursors in vitro. *J Immunol* 1981;126:2310.
209. Le Douarin N. The microenvironment of T and B lymphocyte differentiation in avian embryos. *Curr Top Dev Biol* 1986;20:291.
210. Chen CH, Sowder JT, Lahti JM, Cihak J, Losch U, Cooper MD. TCR3: a third T-cell receptor in the chicken. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2351.
211. Morin C, Jotereau F, Augustin A. Patterns of responsiveness of T-cell lines and thymocytes reveal waves of specific activity in the post-natal murine thymus. *Int Immunol* 1992;4:1091.
212. Moore MA, Owen JJ. Experimental studies on the development of the thymus. *J Exp Med* 1967;126:715.
213. Owen JJ, Ritter MA. Tissue interaction in the development of thymus lymphocytes. *J Exp Med* 1969;129:431.
214. van de Wijngaert FP, Kendall MD, Schuurman HJ, Rademakers LH, Kater L. Heterogeneity of epithelial cells in the human thymus. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 1984;237:227.
215. von Gaudecker B. Functional histology of the human thymus. *Anat Embryol* 1991;183:1.
216. Marshall AH, White RG. The immunological reactivity of the thymus. *Br J Exp Pathol* 1961;42:379.
217. Raviola E, Karnovsky MJ. Evidence for a blood-thymus barrier using electron-opaque tracers. *J Exp Med* 1972;136:466.
218. Sainte-Marie G. Antigen penetration into the thymus. *J Immunol* 1963;91:840.
219. Nieuwenhuis P, Stet RJ, Wagenaar JP, Wubbena AS, Kampinga J, Karrenbeld A. The transcapsular route: a new way for (self-) antigens to by-pass the blood-thymus barrier? *Immunol Today* 1988;9:372.
220. Stet RJ, Wagenaar HJ, Nieuwenhuis P. Thymus localization of monoclonal antibodies circumventing the blood-thymus barrier. *Scand J Immunol* 1987;25:441.
221. Eggli P, Schaffner T, Gerber HA, Hess MW, Cottier H. Accessibility of thymic cortical lymphocytes to particles translocated from the peritoneal cavity to parathymic lymph nodes. *Thymus* 1986;8:129.
222. Hess MW, Mueller C, Schaffner T, Gerber HA, Eggli P, Cottier H. Thymic lymphopoiesis: protected from, or influenced by, external stimulation? *Ann NY Acad Sci* 1985;459:14.
223. Koelsch E. Migration of macrophages carrying antigen into the thymus. *Experientia* 1968;24:951.
224. Owen JJ, Jenkinson EJ. Embryology of the lymphoid system. [review, 143 refs]. *Prog Allergy* 1981;29:1.
225. Surh CD, Gao EK, Kosaka H, et al. Two subsets of epithelial cells in the thymic medulla. *J Exp Med* 1992;176:495.
226. Farr AG, Anderson SK. Epithelial heterogeneity in the murine thymus: fucose-specific lectins bind medullary epithelial cells. *J Immunol* 1985;134:2971.
227. Shier KJ. The thymus according to Schambacher: medullary ducts and reticular epithelium of thymus and thymomas. *Cancer* 1981;48:1183.
228. Gnezditskaya EV, Beletskaya LV. Immunofluorescence study of keratin of Hassall's corpuscles and epidermis of the human skin. *Bull Exp Biol Med* 1974;77:431.
229. Takigawa M, Imamura S, Ofuji S. Demonstration of epidermis-specific heteroantigens in thymic epithelial cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1977;55:58.
230. Beletskaya LV, Gnesditskaya EV. Detection of squamous epithelial intercellular substance antigen(s) in Hassall's corpuscles of human and animal thymus. *Scand J Immunol* 1980;12:93.
231. Lobach DF, Scearce RM, Haynes BF. The human thymic microenvironment. Phenotypic characterization of Hassall's bodies with the use of monoclonal antibodies. *J Immunol* 1985;134:250.
232. Wekerle H, Ketelsen UP, Ernst M. Thymic nurse cells. Lymphoepithelial cell complexes in murine thymuses: morphological and serological characterization. *J Exp Med* 1980;151:925.
233. Ritter MA, Sauvage CA, Cotmore SF. The human thymus microenvironment: in vivo identification of thymic nurse cells and other antigenically-distinct subpopulations of epithelial cells. *Immunology* 1981;44:439.
234. Rouse RV, Ezine S, Weissman IL. Expression of major histocompatibility com-

plex antigens in the thymuses of chimeric mice. *Transplantation* 1985;40:422.
235. Zinkernagel RM, Callahan GN, Althage A, Cooper S, Klein PA, Klein J. On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition? *J Exp Med* 1978;147:882.
236. Zinkernagel RM, Althage A, Cooper S, et al. Ir-genes in H-2 regulate generation of anti-viral cytotoxic T cells. Mapping to K or D and dominance of unresponsiveness. *J Exp Med* 1978;148:592.
237. Zinkernagel RM. Thymus and lymphohemopoietic cells: their role in T cell maturation in selection of T cells' H-2-restriction-specificity and in H-2 linked Ir gene control. *Immunol Rev* 1978;42:224.
238. Zinkernagel RM, Callahan GN, Althage A, Cooper S, Streilein JW, Klein J. The lymphoreticular system in triggering virus plus self-specific cytotoxic T cells: evidence for T help. *J Exp Med* 1978;147:897.
239. Zinkernagel RM, Callahan GN, Klein J, Dennert G. Cytotoxic T cells learn specificity for self H-2 during differentiation in the thymus. *Nature* 1978;271:251.
240. Bevan MJ. In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature* 1977;269:417.
241. Haynes BF, Denning SM, Le PT, Singer KH. Human intrathymic T cell differentiation. *Semin Immunol* 1990;2:67.
242. Dalloul AH, Arock M, Fourcade C, et al. Human thymic epithelial cells produce interleukin-3. *Blood* 1991;77:69.
243. Le PT, Lazorick S, Whichard LP, et al. Human thymic epithelial cells produce IL-6, granulocyte-monocyte-CSF, and leukemia inhibitory factor. *J Immunol* 1990;145:3310.
244. Fujiwara H, Ogata M, Mizushima Y, Tatsumi Y, Takai Y, Hamaoka T. Proliferation and differentiation of immature thymocytes induced by a thymic stromal cell clone. *Thymus* 1990;16:159.
245. Carding SR, Hayday AC, Bottomly K. Cytokines in T-cell development. *Immunol Today* 1991;12:239.
246. Singer KH, Denning SM, Whichard LP, Haynes BF. Thymocyte LFA-1 and thymic epithelial cell ICAM-1 molecules mediate binding of activated human thymocytes to thymic epithelial cells. *J Immunol* 1990;144:2931.
247. Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM. CD44—a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation [published erratum appears in *Immunol Today* 1990 Mar;11(3):80]. *Immunol Today* 1989;10:423.
248. Safieh B, Kendall MD. Methods for assaying thymic hormones. *Thymus Update* 1988;1:117.
249. Dardenne M, Bach JF. Functional biology of thymic hormones. *Thymus Update* 1988;1:101.
250. Kendall MD. Functional anatomy of the thymic microenvironment. *J Anat* 1991; 177:1.
251. Kinoshita Y, Hato F. Cellular and molecular effects of thymic epithelial cells on thymocytes during differentiation and maturation. *Int Rev Cytol* 1994;156:159.
252. Dargemont C, Dunon D, Deugnier MA, et al. Thymotaxin, a chemotactic protein, is identical to beta 2-microglobulin. *Science* 1989;246:803.
253. Imhof BA, Deugnier MA, Girault JM, et al. Thymotaxin: a thymic epithelial peptide chemotactic for T-cell precursors [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 Mar;86(6):1992]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7699.
254. Wang J, Klein JR. Thymus-neuroendocrine interactions in extrathymic T cell development. *Science* 1994;265:1860.
255. Clegg CH, Rulffes JT, Wallace PM, Haugen HS. Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin. *Nature* 1996;384:261.
256. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271.
257. Wu L, Li CL, Shortman K. Thymic dendritic cell precursors—relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med* 1996;184:903.
258. Kaiserling E, Stein H, Muller HH. Interdigitating reticulum cells in the human thymus. *Cell Tissue Res* 1974;155:47.
259. Beller DI, Unanue ER. IA antigens and antigen-presenting function of thymic macrophages. *J Immunol* 1980;124:1433.
260. Nakamura H, Ayer, LeLievre C. Neural crest and thymic myoid cells. *Curr Top Dev Biol* 1986;20:111.
261. Spuler S, Marx A, Kirchner T, Hohlfeld R, Wekerle H. Myogenesis in thymic transplants in the severe combined immunodeficient mouse model of myasthenia gravis. Differentiation of thymic myoid cells into striated muscle cells. *Am J Pathol* 1994;145:766.
262. Pearse M, Gallagher P, Wilson A, et al. Molecular characterization of T-cell antigen receptor expression by subsets of CD4- CD8- murine thymocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6082.
263. Pearse M, Wu L, Egerton M, Wilson A, Shortman K, Scollay R. A murine early thymocyte developmental sequence is marked by transient expression of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:1614.
264. Scollay R, Wilson A, D'Amico A, et al. Developmental status and reconstitution potential of subpopulations of murine thymocytes. *Immunol Rev* 1988;104:81.
265. Wu L, Scollay R, Egerton M, Pearse M, Spangrude GJ, Shortman K. CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature* 1991;349:71.
266. Rahemtulla A, Fung Leung WP, Schilham MW, et al. Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 1991;353:180.
267. Campana D, Janossy G, Coustan SE, et al. The expression of T cell receptor-associated proteins during T cell ontogeny in man. *J Immunol* 1989;142:57.
268. Haynes BF, Martin ME, Kay HH, Kurtzberg J. Early events in human T cell ontogeny. Phenotypic characterization and immunohistologic localization of T cell precursors in early human fetal tissues [published erratum appears in *J Exp Med* 1989 Feb 1;169(2):603]. *J Exp Med* 1988;168:1061.
269. Ceredig R, Schreyer M. Immunohistological location of host and donor derived cells in the regenerating thymus of radiation bone marrow chimeras. *Thymus* 1984;6:15.
270. Penit C, Vasseur F. Sequential events in thymocyte differentiation and thymus regeneration revealed by a combination of bromodeoxyuridine DNA labeling and antimitotic drug treatment. *J Immunol* 1988;140:3315.
271. Sprent J, Webb SR. Function and specificity of T cell subsets in the mouse. *Adv Immunol* 1987;41:39.
272. Adkins B, Mueller C, Okada CY, Reichert RA, Weissman IL, Spangrude GJ. Early events in T-cell maturation. *Annu Rev Immunol* 1987;5:325.
273. Scollay R, Jacobs S, Jerabek L, Butcher E, Weissman I. T cell maturation: thymocyte and thymus migrant subpopulations defined with monoclonal antibodies to MHC region antigens. *J Immunol* 1980;124:2845.
274. Fowlkes BJ, Pardoll DM. Molecular and cellular events of T cell development. *Adv Immunol* 1989;44:207.
275. Crispe IN, Moore MW, Husmann LA, Smith L, Bevan MJ, Shimonkevitz RP. Differentiation potential of subsets of CD4-8- thymocytes. *Nature* 1987;329: 336.
276. Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJ. A single stem cell can recolonize an embryonic thymus, producing phenotypically distinct T-cell populations. *Nature* 1985; 317:811.
277. Civin CI, Banquerigo ML, Strauss LC, Loken MR. Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp Hematol* 1987;15:10.
278. van Dongen JJ, Hooijkaas H, Comans-Bitter M, et al. Human bone marrow cells positive for terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), HLA-DR, and a T cell marker may represent prothymocytes. *J Immunol* 1985;135:3144.
279. Lobach DF, Hensley LL, Ho W, Haynes BF. Human T cell antigen expression during the early stages of fetal thymic maturation. *J Immunol* 1985;135:1752.
280. Godfrey DI, Zlotnik A. Control points in early T-cell development [review, 69 refs]. *Immunol Today* 1993;14:547.
281. van Dongen JJ, Comans-Bitter WM, Wolvers TI, Borst J. Development of human T lymphocytes and their thymus-dependency. *Thymus* 1990;16:207.
282. Winoto A, Baltimore D. Separate lineages of T cells expressing the alpha beta and gamma delta receptors. *Nature* 1989;338:430.
283. MacDonald HR, Budd RC, Howe RC. A CD3- subset of CD4-8+ thymocytes: a rapidly cycling intermediate in the generation of CD4+8+ cells. *Eur J Immunol* 1988;18:519.
284. Paterson DJ, Williams AF. An intermediate cell in thymocyte differentiation that expresses CD8 but not CD4 antigen. *J Exp Med* 1987;166:1603.
285. Nikolic-Zugic J, Bevan MJ. Thymocytes expressing CD8 differentiate into CD4+ cells following intrathymic injection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:8633.
286. Guidos CJ, Weissman IL, Adkins B. Intrathymic maturation of murine T lymphocytes from CD8+ precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7542.
287. Hugo P, Waanders GA, Scollay R, Shortman K, Boyd RL. Ontogeny of a novel CD4+CD8-CD3- thymocyte subpopulation: a comparison with CD4- CD8+ CD3- thymocytes. *Int Immunol* 1990;2:209.
288. Matsumoto K, Yoshikai Y, Moroi Y, Asano T, Ando T, Nomoto K. Two differential pathways from double-negative to double-positive thymocytes. *Immunology* 1991;72:20.
289. Hugo P, Waanders GA, Scollay R, Petrie HT, Boyd RL. Characterization of immature CD4+CD8-CD3- thymocytes. *Eur J Immunol* 1991;21:835.
290. Shinkai Y, Koyasu S, Nakayama K, et al. Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* 1993;259:822.
291. Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, et al. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages [published erratum appears in *Nature* 1992 Dec 3;360(6403):491]. *Nature* 1992;360:225.
292. Kishi H, Borgulya P, Scott B, et al. Surface expression of the beta T cell receptor (TCR) chain in the absence of other TCR or CD3 proteins on immature T cells. *EMBO J* 1991;10:93.
293. Groettru M, Ungewiss K, Azogu O, et al. A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor beta chain and a 33 kd glycoprotein. *Cell* 1993;75:283.
294. Groettrup M, von Boehmer H. A role for a pre-T-cell receptor in T-cell development [review, 46 refs]. *Immunol Today* 1993;14:610.
295. Saint Ruf C, Ungewiss K, Groettrup M, Bruno L, Fehling HJ, von Boehmer H. Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 1994;266: 1208.
296. Alam SM, Crispe IN, Gascoigne NRJ. Allelic exclusion of mouse T cell receptor alpha chains occurs at the time of thymocyte TCR up-regulation. *Immunity* 1995;3:449.
297. Borum K. Cell kinetics in mouse thymus studied by simultaneous use of 3H-thymidine and colchicine. *Cell Tissue Kinet* 1973;6:545.
298. Bryant B. Renewal and fate in the mammalian thymus: mechanisms and inferences of thymocytokinetics. *Eur J Immunol* 1972;2:38.

299. Egerton M, Scollay R, Shortman K. Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2579.
300. Huesmann M, Scott B, Kisielow P, von Boehmer H. Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell* 1991;66:533.
301. Rothenberg EV, McGuire KL, Boyer PD. Molecular indices of functional competence in developing T cells. *Immunol Rev* 1988;104:29.
302. Scollay R, Bartlett P, Shortman K. T cell development in the adult murine thymus: changes in the expression of the surface antigens Ly2, L3T4 and B2A2 during development from early precursor cells to emigrants. *Immunol Rev* 1984;82:79.
303. Metcalf D. The nature and regulation of lymphopoiesis in normal and neoplastic thymus. In: Wolstenholme GWE, Porter R, eds. *The thymus: experimental and clinical studies, CIBA Foundation Symposium.* London: Churchill, 1966:242.
304. Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ, Scollay R. The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol* 1990;2:3.
305. Poste ME, Olson IA. An investigation of the sites of mitotic activity in the guinea-pig thymus using autoradiography and colcemid-induced mitotic arrest. *Immunology* 1973;24:691.
306. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239.
307. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251.
308. Nakayama T, Ueda Y, Yamada H, Shores EW, Singer A, June CH. In vivo calcium elevations in thymocytes with T cell receptors that are specific for self ligands. *Science* 1992;257:96.
309. Kendall MD. The cell biology of cell death in the thymus. *Thymus Update* 1990; 3:47.
310. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994;372:100.
311. Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJ. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 1989;337:181.
312. Jenkinson EJ, Kingston R, Smith CA, Williams GT, Owen JJ. Antigen-induced apoptosis in developing T cells: a mechanism for negative selection of the T cell receptor repertoire. *Eur J Immunol* 1989;19:2175.
313. Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science* 1990;250:1720.
314. Strasser A, Harris AW, Cory S. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 1991;67:889.
315. Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991;67:879.
316. Linette GP, Grusby MJ, Hedrick SM, Hansen TH, Glimcher LH, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is upregulated at the CD4(+)CD8(+) stage during positive selection and promotes thymocyte differentiation at several control points. *Immunity* 1994;1: 197.
317. Ogasawara J, Suda T, Nagata S. Selective apoptosis of CD4(+)CD8(+) thymocytes by the anti-Fas antibody. *J Exp Med* 1995;181:485.
318. Castro JE, Listman JA, Jacobson BA, et al. Fas modulation of apoptosis during negative selection of thymocytes. *Immunity* 1996;5:617.
319. Watanabe FR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992;356:314.
320. Sidman CL, Marshall JD, Von Boehmer H. Transgenic T cell receptor interactions in the lymphoproliferative and autoimmune syndromes of lpr and gld mutant mice. *Eur J Immunol* 1992;22:499.
321. Joel DD, Chanana AD, Cottier H, Cronkite EP, Laissue JA. Fate of thymocytes: studies with 125I-iododeoxyuridine and 3H-thymidine in mice. *Cell Tissue Kinet* 1977;10:57.
322. Crisa L, Cirulli V, Ellisman MH, Ishii JK, Elices MJ, Salomon DR. Cell adhesion and migration are regulated at distinct stages of thymic T cell development: the roles of fibronectin, VLA4, and VLA5. *J Exp Med* 1996;184:215.
323. Lucas B, Vasseur F, Penit C. Production, selection, and maturation of thymocytes with high surface density of TCR. *J Immunol* 1994;153:53.
324. Fischer M, MacNeil I, Suda T, Cupp JE, Shortman K, Zlotnik A. Cytokine production by mature and immature thymocytes. *J Immunol* 1991;146:3452.
325. Bendelac A, Schwartz RH. CD4+ and CD8+ T cells acquire specific lymphokine secretion potentials during thymic maturation. *Nature* 1991;353:68.
326. Nikolic-Zugic J. Phenotypic and functional stages in the intrathymic development of alpha beta T cells. *Immunol Today* 1991;12:65.
327. Scollay R. Thymus cell migration: cells migrating from thymus to peripheral lymphoid organs have a "mature" phenotype. *J Immunol* 1982;128:1566.
328. Kelly KA, Scollay R. Analysis of recent thymic emigrants with subset- and maturity-related markers. *Int Immunol* 1990;2:419.
329. Tough DF, Sprent J. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med* 1994;179:1127.
330. Scollay R, Godfrey DI. Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips? *Immunol Today* 1995;16:268.
331. Lo D, Reilly CR, Burkly LC, Dekoning J, Laufer TM, Glimcher LH. Thymic stromal cell specialization and the T-cell receptor repertoire. *Immunol Res* 1997; 16:3.
332. Clark SL. The thymus in mice of strain 129/J studied with the electron microscope. *Am J Anat* 1961;112:1.
333. Kato S. Intralobular lymphatic vessels and their relationship to blood vessels in the mouse thymus. Light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 1988; 253:181.
334. Kendall MD. The morphology of perivascular spaces in the thymus. *Thymus* 1989;13:157.
335. Naparstek Y, Holoshitz J, Eisenstein S, et al. Effector T lymphocyte line cells migrate to the thymus and persist there. *Nature* 1982:300:262.
336. Michie SA, Rouse RV. Traffic of mature lymphocytes into the mouse thymus. *Thymus* 1989;13:141.
337. Surh CD, Sprent J, Webb SR. Exclusion of circulating T cells from the thymus does not apply in the neonatal period. *J Exp Med* 1993;177:379.
338. Agus DB, Surh CD, Sprent J. Reentry of T cells to the adult thymus is restricted to activated T cells. *J Exp Med* 1991;173:1039.
339. Philpott KL, Viney JL, Kay G, et al. Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor alpha beta-expressing cells. *Science* 1992;256:1448.
340. Custer RP, Bosma GC, Bosma MJ. Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms. *Am J Pathol* 1985;120:464.
341. Shores EW, Van Ewijk W, Singer A. Disorganization and restoration of thymic medullary epithelial cells in T cell receptor-negative scid mice: evidence that receptor-bearing lymphocytes influence maturation of the thymic microenvironment. *Eur J Immunol* 1991;21:1657.
342. Shores EW, Vanewijk W, Singer A. Maturation of medullary thymic epithelium requires thymocytes expressing fully assembled CD3-TCR complexes. *Int Immunol* 1994;6:1393.
343. Candeias S, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. The V beta 17+ T cell repertoire: skewed J beta usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4+ versus CD8+ cells. *J Exp Med* 1991;174:989.
344. Roth ME, Holman PO, Kranz DM. Nonrandom use of J alpha gene segments. Influence of V alpha and J alpha gene location. *J Immunol* 1991;147:1075.
345. Thompson SD, Pelkonen J, Hurwitz JL. First T cell receptor alpha gene rearrangements during T cell ontogeny skew to the 5′ region of the J alpha locus. *J Immunol* 1990;145:2347.
346. Hurwitz JL, Samaridis J, Pelkonen J. Immature and advanced patterns of T cell receptor gene rearrangement among lymphocytes in splenic culture. *J Immunol* 1989;142:2533.
347. Roth ME, Lacy MJ, McNeil LK, Kranz DM. Selection of variable-joining region combinations in the alpha chain of the T cell receptor [published erratum appears in *Science* 1989 Sep 8;245(4922):245]. *Science* 1988;241:1354.
348. Patten P, Yokota T, Rothbard J, Chien Y, Arai K, Davis MM. Structure, expression and divergence of T-cell receptor beta-chain variable regions. *Nature* 1984;312:40.
349. Behlke MA, Spinella DG, Chou HS, Sha W, Hartl DL, Loh DY. T-cell receptor beta-chain expression: dependence on relatively few variable region genes. *Science* 1985;229:566.
350. Fink PJ, Matis LA, McElligott DL, Bookman M, Hedrick SM. Correlations between T-cell specificity and the structure of the antigen receptor. *Nature* 1986; 321:219.
351. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987;329:506.
352. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987;329:512.
353. Hunig T, Wallny HJ, Hartley JK, Lawetsky A, Tiefenthaler G. A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes. *J Exp Med* 1989;169:73.
354. Kinnon C, Diamond RA, Rothenberg EV. Activation of T cell antigen receptor alpha- and beta-chain genes in the thymus: implications for the lineages of developing cortical thymocytes. *J Immunol* 1986;137:4010.
355. Jenkinson EJ, Kingston R, Owen JJ. Importance of IL-2 receptors in intra-thymic generation of cells expressing T-cell receptors. *Nature* 1987;329:160.
356. Ewing T, Egerton M, Wilson A, Scollay R, Shortman K. Subpopulations of CD4-CD8- murine thymocytes: differences in proliferation rate in vivo and proliferative responses in vitro. *Eur J Immunol* 1988;18:261.
357. Kishimoto H, Sprent J. Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med* 1997;185:263.
358. Fink PJ, Bevan MJ. H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity. *J Exp Med* 1978;148:766.
359. Kruisbeek AM, Fultz MJ, Sharrow SO, Singer A, Mond JJ. Early development of the T cell repertoire. In vivo treatment of neonatal mice with anti-Ia antibodies interferes with differentiation of I-restricted T cells but not K/D-restricted T cells. *J Exp Med* 1983;157:1932.
360. McDuffie M. Born W, Marrack P, Kappler J. The role of the T-cell receptor in thymocyte maturation: effects in vivo of anti-receptor antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986:83:8728.
361. Marusic-Galesic S, Stephany DA, Longo DL, Kruisbeek AM. Development of CD4-CD8+ cytotoxic T cells requires interactions with class I MHC determinants. *Nature* 1988;333:180.
362. Teh HS, Kisielow P, Scott B, et al. Thymic major histocompatibility complex

antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 1988;335:229.

363. Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, Loh DY. Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 1988;335:271.
364. Kisielow P, Teh HS, Bluthmann H, von Boehmer H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 1988;335:730.
365. Berg LJ, Pullen AM, Fazekas DS, et al. Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand. *Cell* 1989;58:1035.
366. Bill J, Palmer E. Positive selection of CD4+ T cells mediated by MHC class II-bearing stromal cell in the thymic cortex. *Nature* 1989;341:649.
367. Van Ewijk W, Rouse RV, Weissman IL. Distribution of H-2 microenvironments in the mouse thymus. Immunoelectron microscopic identification of I-A and H-2K bearing cells. *J Histochem Cytochem* 1980;28:1089.
368. Farr AG, Anderson SK, Marrack P, Kappler J. Expression of antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted receptors by cortical and medullary thymocytes in situ. *Cell* 1985;43:543.
369. Ron Y, Lo D, Sprent J. T cell specificity in twice-irradiated F1–parent bone marrow chimeras: failure to detect a role for immigrant marrow-derived cells in imprinting intrathymic H-2 restriction. *J Immunol* 1986;137:1764.
370. Lo D, Sprent J. Identity of cells that imprint H-2-restricted T-cell specificity in the thymus. *Nature* 1986;319:672.
371. Widera G, Burkly LC, Pinkert CA, et al. Transgenic mice selectively lacking MHC class II (I-E) antigen expression on B cells: an in vivo approach to investigate Ia gene function. *Cell* 1987;51:175.
372. van Ewijk W, Ron Y, Monaco J, et al. Compartmentalization of MHC class II gene expression in transgenic mice. *Cell* 1988;53:357.
373. Benoist C, Mathis D. Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell* 1989;58:1027.
374. Vukmanovic S, Grandea AG III, Faas SJ, Knowles BB, Bevan MJ. Positive selection of T-lymphocytes induced by intrathymic injection of a thymic epithelial cell line. *Nature* 1992;359:729.
375. Dekoning J, Dimolfetto L, Reilly C, Wei Q, Havran WL, Lo D. Thymic cortical epithelium is sufficient for the development of mature T cells in relb-deficient mice. *J Immunol* 1997;158:2558.
376. Kyewski BA, Rouse RV, Kaplan HS. Thymocyte rosettes: multicellular complexes of lymphocytes and bone marrow-derived stromal cells in the mouse thymus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:5646.
377. Longo DL, Schwartz RH. T-cell specificity for H-2 and Ir gene phenotype correlates with the phenotype of thymic antigen-presenting cells. *Nature* 1980;287:44.
378. Bix M, Raulet D. Inefficient positive selection of T cells directed by haematopoietic cells. *Nature* 1992;359:330.
379. Pawlowski T, Elliott JD, Loh DY, Staerz UD. Positive selection of T lymphocytes on fibroblasts. *Nature* 1993;364:642.
380. Hugo P, Kappler JW, McCormack JE, Marrack P. Fibroblasts can induce thymocyte positive selection in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10335.
381. Finkel TH, Cambier JC, Kubo RT, Born WK, Marrack P, Kappler JW. The thymus has two functionally distinct populations of immature alpha beta + T cells: one population is deleted by ligation of alpha beta TCR. *Cell* 1989;58:1047.
382. Finkel TH, Kubo RT, Cambier JC. T-cell development and transmembrane signaling: changing biological responses through an unchanging receptor. *Immunol Today* 1991;12:79.
383. Marrack P, Kappler J. T cells can distinguish between allogeneic major histocompatibility complex products on different cell types. *Nature* 1988;332:840.
384. Jameson SC, Hogquist KA, Bevan MJ. Positive selection of thymocytes. *Annu Rev Immunol* 1995;13:93.
385. Scott B, Bluthmann H, Teh HS, von Boehmer H. The generation of mature T cells requires interaction of the alpha beta T-cell receptor with major histocompatibility antigens. *Nature* 1989;338:591.
386. Kaye J, Hsu ML, Sauron ME, Jameson SC, Gascoigne NR, Hedrick SM. Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature* 1989;341:746.
387. Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R. Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells [see comments]. *Nature* 1990;344:742.
388. Koller BH, Marrack P, Kappler JW, Smithies O. Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science* 1990;248:1227.
389. Cosgrove D, Gray D, Dierich A, et al. Mice lacking MHC class II molecules. *Cell* 1991;66:1051.
390. Grusby MJ, Johnson RS, Papaioannou VE, Glimcher LH. Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Science* 1991; 253:1417.
391. Viville S, Neefjes J, Lotteau V, et al. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 1993;72:635.
392. Van Kaer L, Ashton RP, Ploegh HL, Tonegawa S. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell* 1992;71:1205.
393. Gilfillan S, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. More efficient positive selection of thymocytes in mice lacking terminal deoxynucleotidyl transferase. *Int Immunol* 1994;6:1681.
394. Gilfillan S, Dierich A, Lemeur M, Benoist C, Mathis D. Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire [published erratum appears in *Science* 1993 Dec 24;262(5142):1957]. *Science* 1993;261:1175.
395. Garrett TP, Saper MA, Bjorkman PJ, Strominger JL, Wiley DC. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 1989;342:692.
396. Nikolic-Zugic J, Carbone FR. Peptide presentation by class-I major histocompatibility complex molecules. *Immunol Res* 1991;10:54.
397. Nikolic-Zugic J, Bevan MJ. Role of self-peptides in positively selecting the T-cell repertoire [see comments]. *Nature* 1990;344:65.
398. Jacobs H, Von BH, Melief CJ, Berns A. Mutations in the major histocompatibility complex class I antigen-presenting groove affect both negative and positive selection of T cells. *Eur J Immunol* 1990;20:2333.
399. Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, et al. Positive selection of transgenic receptor-bearing thymocytes by Kb antigen is altered by Kb mutations that involve peptide binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6186.
400. Berg LJ, Frank GD, Davis MM. The effects of MHC gene dosage and allelic variation on T cell receptor selection. *Cell* 1990;60:1043.
401. Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, et al. Positive selection of transgenic receptor-bearing thymocytes by Kb antigen is altered by Kb mutations that involve peptide binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6186.
402. Hsu BL, Evavold BD, Allen PM. Modulation of T cell development by an endogenous altered peptide ligand. *J Exp Med* 1995;181:805.
403. Tourne S, Nakano N, Viville S, Benoist C, Mathis D. The influence of invariant chain on the positive selection of single T cell receptor specificities. *Eur J Immunol* 1995;25:1851.
404. Ashton-Rickardt PG, Van KL, Schumacher TN, Ploegh HL, Tonegawa S. Peptide contributes to the specificity of positive selection of CD8+ T cells in the thymus. *Cell* 1993;73:1041.
405. Hogquist KA, Gavin MA, Bevan MJ. Positive selection of CD8+ T cells induced by major histocompatibility complex binding peptides in fetal thymic organ culture. *J Exp Med* 1993;177:1469.
406. Sebzda E, Wallace VA, Mayer J, Yeung RS, Mak TW, Ohashi PS. Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science* 1994;263:1615.
407. Sebzda E, Kundig TM, Thomson CT, et al. Mature T cell reactivity altered by peptide agonist that induces positive selection. *J Exp Med* 1996;183:1093.
408. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 1994;76:17.
409. Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR, et al. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus [see comments]. *Cell* 994;76:651.
410. von Boehmer H, Teh HS, Kisielow P. The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol Today* 1989;10:57.
411. Loh DY. Molecular requirements for cell fate determination during T-lymphocyte development. *New Biologist* 1991;3:924.
412. Fung-Leung WP, Schilham MW, Rahemtulla A, et al. CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell* 1991;65:443.
413. Killeen N, Sawada S, Littman DR. Regulated expression of human CD4 rescues helper T cell development in mice lacking expression of endogenous CD4. *EMBO J* 1993;12:1547.
414. Crooks ME, Littman DR. Disruption of T lymphocyte positive and negative selection in mice lacking the CD8 beta chain. *Immunity* 1994;1:277.
415. Fung-Leung WP, Kundig TM, Ngo K, et al. Reduced thymic maturation but normal effector function of CD8+ T cells in CD8 beta gene-targeted mice. *J Exp Med* 1994;180:959.
416. Arpaia E, Shahar M, Dadi H, Cohen A, Roifman CM. Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* 1994;76:947.
417. Swan KA, Alberola IJ, Gross JA, et al. Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes. *EMBO J* 1995;14:276.
418. Wang CR, Hashimoto K, Kubo S, et al. T cell receptor-mediated signaling events in CD4+CD8+ thymocytes undergoing thymic selection: requirement of calcineurin activation for thymic positive selection but not negative selection. *J Exp Med* 1995;181:927.
419. Gelfand EW, Weinberg K, Mazer BD, Kadlecek TA, Weiss A. Absence of ZAP-70 prevents signaling through the antigen receptor on peripheral blood T cells but not on thymocytes. *J Exp Med* 1995;182:1057.
420. Anderson G, Anderson KL, Conroy LA, et al. Intracellular signaling events during positive and negative selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro. *J Immunol* 1995;154:3636.
421. Alberola-Ila J, Forbush KA, Seger R, Krebs EG, Perlmutter RM. Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* 1995;373:620.
422. Negishi I, Motoyama N, Nakayama K, et al. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 1995;376:435.
423. Elder ME, Lin D, Clever J, et al. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* 1994;264:1596.
424. Chan AC, Kadlecek TA, Elder ME, et al. ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* 1994;264:1599.
425. Fischer KD, Zmuidzinas A, Gardner S, Barbacid M, Bernstein A, Guidos C.

Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4(+) CD8(+) thymocytes. *Nature* 1995;374:474.
426. Zhang R, Alt FW, Davidson L, Orkin SH, Swat W. Defective signalling through the T and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the vav proto-oncogene. *Nature* 1995;374:470.
427. Hammerling GJ, Schonrich G, Momburg F, et al. Non-deletional mechanisms of peripheral and central tolerance: studies with transgenic mice with tissue-specific expression of a foreign MHC class I antigen. *Immunol Rev* 1991;122:47.
428. Jones LA, Chin LT, Kruisbeek AM. Acquisition of self-tolerance in T cells is achieved by different mechanisms, operating both inside and outside the thymus. *Thymus* 1990;16:195.
429. Webb S, Morris C, Sprent J. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 1990;63:1249.
430. Ramsdell F, Fowlkes BJ. Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science* 1990;248:1342.
431. Schonrich G, Kalinke U, Momburg F, et al. Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 1991;65:293.
432. Kisielow P, Bluthmann H, Staerz UD, Steinmetz M, von Boehmer H. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 1988;333:742.
433. Jameson SC, Hogquist KA, Bevan MJ. Specificity and flexibility in thymic selection. *Nature* 1994;369:750.
434. Kawai K, Ohashi PS. Immunological function of a defined T-cell population tolerized to low-affinity self antigens [published erratum appears in *Nature* 1995 Nov 23;378(6555):419]. *Nature* 1995;374:68.
435. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987;49:273.
436. Kappler JW, Staerz U, White J, Marrack PC. Self-tolerance eliminates T cells specific for Mls-modified products of the major histocompatibility complex. *Nature* 1988;332:35.
437. MacDonald HR, Schneider R, Lees RK, et al. T-cell receptor V beta use predicts reactivity and tolerance to Mlsa-encoded antigens. *Nature* 1988;332:40.
438. MacDonald HR, Pedrazzini T, Schneider R, Louis JA, Zinkernagel RM, Hengartner H. Intrathymic elimination of Mlsa-reactive (V beta 6+) cells during neonatal tolerance induction to Mlsa-encoded antigens. *J Exp Med* 1988;167:2005.
439. Gao EK, Lo D, Sprent J. Strong T cell tolerance in parent–F1 bone marrow chimeras prepared with supralethal irradiation. Evidence for clonal deletion and anergy. *J Exp Med* 1990;171:1101.
440. Bill J, Palmer E. Positive selection of CD4+ T cells mediated by MHC class II-bearing stromal cell in the thymic cortex. *Nature* 1989;341:649.
441. Berg LJ, de St Groth BF, Pullen AM, Davis MM. Phenotypic differences between alpha beta versus beta T-cell receptor transgenic mice undergoing negative selection. *Nature* 1989;340:559.
442. Pircher H, Burki K, Lang R, Hengartner H, Zinkernagel RM. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 1989;342:559.
443. Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, Loh DY. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 1988;336:73.
444. Takahama Y, Shores EW, Singer A. Negative selection of precursor thymocytes before their differentiation into CD4+CD8+ cells. *Science* 1992;258:653.
445. Ohashi PS, Pircher H, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Distinct sequence of negative or positive selection implied by thymocyte T-cell receptor densities. *Nature* 1990;346:861.
446. Guidos CJ, Danska JS, Fathman CG, Weissman IL. T cell receptor-mediated negative selection of autoreactive T lymphocyte precursors occurs after commitment to the CD4 or CD8 lineages. *J Exp Med* 1990;172:835.
447. Fowlkes BJ, Schwartz RH, Pardoll DM. Deletion of self-reactive thymocytes occurs at a CD4+8+ precursor stage. *Nature* 1988;334:620.
448. MacDonald HR, Hengartner H, Pedrazzini T. Intrathymic deletion of self-reactive cells prevented by neonatal anti-CD4 antibody treatment. *Nature* 1988;335:174.
449. Swat W, Ignatowicz L, von Boehmer H, Kisielow P. Clonal deletion of immature CD4+8+ thymocytes in suspension culture by extrathymic antigen-presenting cells. *Nature* 1991;351:150.
450. Swat W, Ignatowicz L, Kisielow P. Detection of apoptosis of immature CD4+8+ thymocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991;137:79.
451. Schuurman HJ, Vaessen LM, Vos JG, et al. Implantation of cultured thymic fragments in congenitally athymic nude rats: ignorance of thymic epithelial haplotype in generation of alloreactivity. *J Immunol* 1986;137:2440.
452. Von Boehmer H, Schubiger K. Thymocytes appear to ignore class I major histocompatibility complex antigens expressed on thymus epithelial cells. *Eur J Immunol* 1984;14:1048.
453. von Boehmer H, Hafen K. Minor but not major histocompatibility antigens of thymus epithelium tolerize precursors of cytolytic T cells. *Nature* 1986;320:626.
454. Jenkinson EJ, Jhittay P, Kingston R, Owen JJ. Studies of the role of the thymic environment in the induction of tolerance to MHC antigens. *Transplantation* 1985;39:331.
455. Morrissey PJ, Sharrow SO, Kohno Y, Berzofsky JA, Singer A. Correlation of intrathymic tolerance with intrathymic chimerism in neonatally tolerized mice. *Transplantation* 1985;40:68.
456. Speiser DE, Lees RK, Hengartner H, Zinkernagel RM, MacDonald HR. Positive and negative selection of T cell receptor V beta domains controlled by distinct cell populations in the thymus. *J Exp Med* 1989;170:2165.
457. Speiser DE, Schneider R, Hengartner H, MacDonald HR, Zinkernagel RM. Clonal deletion of self-reactive T cells in irradiation bone marrow chimeras and neonatally tolerant mice. Evidence for intercellular transfer of Mlsa. *J Exp Med* 1989;170:595.
458. Roberts JL, Sharrow SO, Singer A. Clonal deletion and clonal anergy in the thymus induced by cellular elements with different radiation sensitivities. *J Exp Med* 1990;171:935.
459. Matzinger P, Guerder S. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* 1989;338:74.
460. Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 1997;185:541.
461. Robey E, Fowlkes BJ. Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol* 1994;12:675.
462. Marrack P, Kappler J. The T-cell repertoire for antigen and MHC. *Immunol Today* 1988;9:308.
463. Kishimoto H, Cai Z, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Sprent J. Differing roles for B7 and intercellular adhesion molecule-1 in negative selection of thymocytes [see comments]. *J Exp Med* 1996;184:531.
464. Nelson AJ, Hosier S, Brady W, Linsley PS, Farr AG. Medullary thymic epithelium expresses a ligand for CTLA4 in situ and in vitro. *J Immunol* 1993;151:2453.
465. Degermann S, Surh CD, Glimcher LH, Sprent J, Lo D. B7 expression on thymic medullary epithelium correlates with epithelium-mediated deletion of V beta 5+ thymocytes. *J Immunol* 1994;152:3254.
466. Prieto J, Takei F, Gendelman R, Christenson B, Biberfeld P, Patarroyo M. MALA-2, mouse homologue of human adhesion molecule ICAM-1 (CD54). *Eur J Immunol* 1989;19:1551.
467. Marrack P, Lo D, Brinster R, et al. The effect of thymus environment on T cell development and tolerance. *Cell* 1988;53:627.
468. Hoffmann MW, Allison J, Miller JF. Tolerance induction by thymic medullary epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2526.
469. Salaun J, Bandeira A, Khazaal I, et al. Thymic epithelium tolerizes for histocompatibility antigens. *Science* 1990
470. Laufer TM, Dekoning J, Markowitz JS, Lo D, Glimcher LH. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 1996;383:81.
471. Burkly L, Hession C, Ogata L, et al. Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 1995;373:531.
472. Burkly LC, Degermann S, Longley J, et al. Clonal deletion of V beta 5+ T cells by transgenic I-E restricted to thymic medullary epithelium. *J Immunol* 1993;151:3954.
473. Bonomo A, Matzinger P. Thymus epithelium induces tissue-specific tolerance. *J Exp Med* 1993;177:1153.
474. Carlow DA, Teh SJ, Teh HS. Altered thymocyte development resulting from expressing a deleting ligand on selecting thymic epithelium. *J Immunol* 1992;148:2988.
475. Douek DC, Corley K, Zal T, Mellor A, Dyson PJ, Altmann DM. Negative selection by endogenous antigen and superantigen occurs at multiple thymic sites. *Int Immunol* 1996;8:1413.
476. Kosaka H, Ogata M, Hikita I, et al. Model for clonal elimination in the thymus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3773.
477. Vukmanovic S, Jameson SC, Bevan MJ. A thymic epithelial cell line induces both positive and negative selection in the thymus. *Int Immunol* 1994;6:239.
478. Hugo P, Kappler JW, Godfrey DI, Marrack PC. Thymic epithelial cell lines that mediate positive selection can also induce thymocyte clonal deletion. *J Immunol* 1994;152:1022.
479. Vukmanovic S, Grandea AG, Faas SJ, Knowles BB, Bevan MJ. Positive selection of T-lymphocytes induced by intrathymic injection of a thymic epithelial cell line. *Nature* 1992;359:729.
480. Wright DH, Isaacson PG. The normal lymph node and spleen. In: *Biopsy pathology of the lymphoreticular system*. Gottleib LS, Neville AM, Walker F, eds. Baltimore: Williams & Wilkins, 1983.
481. Rouse RV, Reichert RA, Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. Localization of lymphocyte subpopulations in peripheral lymphoid organs: directed lymphocyte migration and segregation into specific microenvironments. *Am J Anat* 1984;170:391.
482. Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol* 1996;14:155.
483. Davies AJ, Carter RL, Leuchars E, Wallis V. The morphology of immune reactions in normal, thymectomized and reconstituted mice. II. The response to oxazolone. *Immunology* 1969;17:111.
484. Sminia T, van der Brugge-Gamelkoorn GJ, Jeurissen SH. Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *Crit Rev Immunol* 1989;9:119.
485. Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Duijvestijn AM, van Breda PJC,

Sminia T. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today* 1992:13: 219.

486. Owen RL, Ermak TH. Structural specializations for antigen uptake and processing in the digestive tract. *Springer Semin Immunopathol* 1990;12:139.
487. Pabst R. Is BALT a major component of the human lung immune system? *Immunol Today* 1992;13:119.
488. Brown AR. Immunological functions of splenic B-lymphocytes. *Crit Rev Immunol* 1992:11:395.
489. Koyama K. Hemodynamics of the spleen in Banti's syndrome. *Tohoku J Exp Med* 1967;93:199.
490. Pabst R. The role of the spleen in lymphocyte migration. In: Husband AJ, ed. *Migration and homing of lymphoid cells*. Boca Raton: CRC Press, 1988:63.
491. Wolf BC, Neiman RS. *Major problems in pathology*. Bennington JL, ed. Philadelphia: WB Saunders, 1989.
492. Van Rooijen N. The humoral immune response in the spleen. *Res Immunol* 1991; 142:328.
493. Van den Eertwegh AJM, Boersma WJA, Claassen E. Immunological functions and *in vivo* cell-cell interactions of T cells in the spleen. *Crit Rev Immunol* 1992; 11:337.
494. Timens W. The human spleen and the immune system: not just another lymphoid organ. *Res Immunol* 1991;142:316.
495. Y. J. Liu YJ. S. Oldfield S. I. C. MacLennan IC. Memory B cells in T cell-dependent antibody responses colonize the splenic marginal zones. *Eur J Immunol* 1988;18:355.
496. Dunn-Walters DK, Isaacson PG, Spencer J. Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. *J Exp Med* 1995;182:559.
497. van den Oord JJ, de Wolf-Peeters C, Desmet VJ. The marginal zone in the human reactive lymph node. *Am J Clin Pathol* 1986;86:475.
498. Spencer J, Finn T, Pulford KA, Mason DY, Isaacson PG. The human gut contains a novel population of B lymphocytes which resemble marginal zone cells. *Clin Exp Immunol* 1985;62:607.
499. Kelsoe G. Life and death in germinal centers (redux). *Immunity* 1996;4:107.
500. McHeyzer-Williams MG, Davis MM. Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo. *Science* 1995;268:106.
501. Picker LJ, Terstappen LWMM, Rott LS, Streeter PR, Stein H, Butcher EC. Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T-cell subsets in man. *J Immunol* 1990;145:3247.
502. Sanders ME, Makagoba MW, Sharrow SO, et al. Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2, and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29, and Pgp-1) and have enhanced IFN-g production. *J Immunol* 1988;140:1401.
503. Vanhecke D, Leclercq G, Plum J, Vandekerckhove B. Characterization of distinct stages during the differentiation of human CD69+CD3+ thymocytes and identification of thymic emigrants. *J Immunol* 1995;155:1862.
504. Plebanski M, Sauders M, Burtles SS, Crowe S, Hooper DC. Primary and secondary human *in vitro* T-cell responses to soluble antigens are mediated by subsets bearing different CD45 isoforms. *Immunology* 1992;75:86.
505. Merkenschlager M, Terry L, Edwards R, Beverly PCL. Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte populations defined by the monoclonal antibody UCHL1:Implications for differential CD45 expression in T cell memory formation. *Eur J Immunol* 1988;18:1653.
506. Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ. Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ cell frequencies by flow cytometry. *J Clin Invest* 1997;99:1739.
507. Salmon M, Kitas GD, Bacon PA. Production of lymphokine mRNA by $CD45R^+$ and $CD45R^-$ helper T cells from human peripheral blood and by human $CD4^+$ T cell clones. *J Immunol* 1989;143:907.
508. Kasahara Y, Miyawaki T, Kato K, et al. Role of interleukin 6 for differential responsiveness of naive and memory $CD4^+$T cells in CD2-mediated activation. *J Exp Med* 1990;172:1419.
509. Kristensson K, Borrebaeck CAK, Carlsson R. Human $CD4^+$T cells expressing CD45RA acquire the lymphokine gene expression of $CD45RO^+$T-helper cells after activation *in vitro*. *Immunology* 1992;76:103.
510. Holter W, Majdic O, Kalthoff FS, Knapp W. Regulation of interleukin-4 production in human mononuclear cells. *Eur J Immunol* 1992;22:2765.
511. Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood* 1995;86:1408.
512. Constant S, Zain M, West J, Pasqualini T, Ranney P, Bottomly K. Are primed CD4+ T lymphocytes different from unprimed cells? *Eur J Immunol* 1994;24: 1073.
513. Damle NK, Klussman K, Linsley PS, Aruffo A. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+T lymphocytes. *J Immunol* 1992;148:1985.
514. Schwinzer R, Siefken R, Franklin RA, Saloga J, Wonigeit K, Gelfand EW. Human CD45RA+ and CD45R0+ T cells exhibit similar CD3/T cell receptor-mediated transmembrane signaling capacities but differ in response to co-stimulatory signals. *Eur J Immunol* 1994;24:1391.
515. Luqman M, Bottomly K. Activation requirements for CD4+ T cells differing in CD45R expression. *J Immunol* 1992;149:2300.
516. de Jong R, Brouwer M, Miedema F, van Lier RAW. Human $CD8^+$ T lymphocytes can be divided into $CD45RA^+$ and $CD45RO^+$ cells with different requirements for activation and differentiation. *J Immunol* 1991;146:2088.
517. Schlunck T, Schraut W, Riethmüller G, Ziegler-Heitbrock HWL. Inverse relationship of CA^{2+} mobilization and cell proliferation in $CD8^+$ memory and virgin T cells. *Eur J Immunol* 1990;20:1957.
518. Picker LJ, Butcher EC. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 1992;10:561.
519. C. R. Mackay . Migration pathways and immunologic memory among T lymphocytes. *Semin Immunol* 1992;4:51.
520. Picker LJ. Control of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 1994;6:394.
521. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272: 60.
522. Akbar AN, Borthwick N, Salmon M, et al. The significance of low bcl-2 expression by CD45RO T cells in normal individuals and patients with acute viral infections. The role of apoptosis in T cell memory. *J Exp Med* 1993;178:427.
523. Salmon M, Pilling D, Borthwick NJ, et al. The progressive differentiation of primed T cells is associated with an increasing susceptibility to apoptosis. *Eur J Immunol* 1994;24:892.
524. Pitzalis C, Kingsley G, Haskard D, Panayi G. The preferential accumulation of helper-inducer T lymphocytes in inflammatory lesions: evidence for regulation by selective endothelial and homotypic adhesion. *Eur J Immunol* 1988;18:1397.
525. Pitzalis C, Kingsley GH, Covelli M, Meliconi AM, Panayi GS. Selective migration of the human helper-inducer memory T cell subset: confirmation by *in vivo* cellular kinetic studies. *Eur J Immunol* 1991;21:369.
526. Picker L, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Buck D, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selection on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol* 1993;150:1105.
527. Janossy G, Bofill M, Rowe D, Muir J, Beverley PC. The tissue distribution of T lymphocytes expressing different CD45 polypeptides. *Immunology* 1989;66:517.
528. Marathias KP, Preffer FI, Pinto C, Kradin RL. Most human pulmonary infiltrating lymphocytes display the surface immune phenotype and functional responses of sensitized T cell. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;5:470.
529. Zeitz M, Schieferdecker HL, James SP, Riecken EO. Special functional features of T-lymphocyte subpopulations in the effector compartment of the intestinal mucosa and their relation to mucosal transformation. *Digestion* 1990;46:280.
530. Volpes R, van den Oord JJ, Desmet VJ. Memory T cells represent the predominant lymphocyte subset in acute and chronic liver inflammation. *Hepatology* 1991;13:826.
531. Collins RH, Sackler RH, Pitcher CJ, et al. Immune reconstitution with donor-derived memory/effector T cells after orthotopic liver transplantation. *Exp Hematol* 1997:25:147.
532. Shimizu Y, Van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. Regulated expression and binding of three VLA (b1) integrin receptors on T cells. *Nature* 1990;345:250.
533. Shimizu Y, Newman W, Gopal TV, et al. Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J Cell Biol* 1991;113: 1203.
534. Buckle AM, Hogg N. Human memory T cells express intercellular adhesion molecule-1 which can be increased by interleukin 2 and interferon-g. *Eur J Immunol* 1990;20:337.
535. Hintzen RQ, de Jong R, Lens SM, Brouwer M, Baars P. Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes. *J Immunol* 1993;151:2426.
536. Baars PA, Maurice MM, Rep M, Hooibrink R, van Lier A. Heterogeneity of the circulating human CD4+ T cell population. Further evidence that the CD4+CD45RA-CD27- T cell subset contains specialized primed T cells. *J Immunol* 1995;154:17.
537. Picker LJ, Martin RJ, Trumble A, et al. Differential expression of lymphocyte homing receptors by human memory/effector T cells in pulmonary versus cutaneous immune effector sites. *Eur J Immunol* 1994;24:1269.
538. Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverly PCL, Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* 1988;140:2171.
539. Zheng B, Xue W, Kelsoe G. Locus-specific somatic hypermutation in germinal centre T cells. *Nature* 1994;372:556.
540. Sprent J, Tough DF. Lymphocyte life-span and memory. *Science* 1994;265:1395.
541. Rogers PR, Pilapil S, Hayakawa K, Romain PL, Parker DC. CD45 alternative exon expression in murine and human CD4+ T cell subsets. *J Immunol* 1992; 148:4054.
542. Sparshott SM, Bell EB, Sarawar SR. CD45R CD4 T cell subset-reconsitituted nude rats: subset-dependent survival of recipients and bi-directional isoform switching. *Eur J Immunol* 1991;21:993.
543. Rabin RL, Roederer M, Maldonado Y, Petru A, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Altered representation of naive and memory CD8 T cell subsets in HIV-infected children. *J Clin Invest* 1995;95:2054.
544. Roederer M, Dubs JG, Anderson MT, Raju PA, Herzenberg LA. CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *J Clin Invest* 1995;95: 2061.
545. Okumura M, Fujii Y, Inada K, Nakahara K, Matsuda H. Both CD45RA+ and CD45RA- subpopulations of CD8+ T cells contain cells with high levels of lym-

phocyte function-associated antigen-1 expression, a phenotype of primed T cells. *J Immunol* 1993;150:429.
546. Butcher EC. The regulation of lymphocyte traffic. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986;128:85.
547. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241.
548. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145.
549. Street NE, Mosmann TR. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J* 1991;5:171.
550. Sher A, Coffman RL. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines [review, 133 refs]. *Annu Rev Immunol* 1992;10:385.
551. Locksley RM. Th2 cells: help for helminths. *J Exp Med* 1994;179:1405.
552. Romagnant S, Del Prete G, Maggi E, et al. Human Th1 and Th2 Subsets. *Int Arch Allergy Immunol* 1992;99:242.
553. Romagnani S. Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr Opin Immunol* 1994;6:838.
554. King CL, Mahanty S, Kumaraswami V, et al. Cytokine control of parasite-specific anergy in human lymphatic filariasis. Preferential induction of a regulatory T helper type 2 lymphocyte subset. *J Clin Invest* 1993;92:1667.
555. Orme IM, Roberts AD, Griffin JP, Abrams JS. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 1993;151:518.
556. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis [see comments]. *J Clin Invest* 1993;91:1390.
557. elGhazali GE, Paulie S, Andersson G, et al. Number of interleukin-4- and interferon-gamma-secreting human T cells reactive with tetanus toxoid and the mycobacterial antigen PPD or phytohemagglutinin: distinct response profiles depending on the type of antigen used for activation. *Eur J Immunol* 1993;23: 2740.
558. Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest* 1994;94:870.
559. Kelso A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol Today* 1995;16:374.
560. Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure: options in host defense against viral infection [review, 58 refs]. *Curr Opin Immunol* 1996;8:478.
561. Kagi D, Hengartner H. Different roles for cytotoxic T cells in the control of infections with cytopathic versus noncytopathic viruses. *Curr Opin Immunol* 1996;8:472.
562. Seder RA, Boulay JL, Finkelman F, et al. CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. *J Immunol* 1992;148:1652.
563. Kelso A, Troutt AB, Maraskovsky E, et al. Heterogeneity in lymphokine profiles of CD4+ and CD8+ T cells and clones activated in vivo and in vitro. *Immunol Rev* 1991;123:85.
564. Croft M, Carter L, Swain SL, Dutton RW. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med* 1994;180:1715.
565. Rogers WO, Weaver CT, Kraus LA, Li JM, Li LF, Bucy RP. Visualization of antigen-specific T cell activation and cytokine expression in vivo. *J Immunol* 1997; 158:649.
566. Catalina MD, Carroll MC, Arizpe H, Takashima A, Estess P, Siegelman MH. The route of antigen entry determines the requirement for l-selectin during immune responses. *J Exp Med* 1996;184:2341.
567. Sprent J, Schaefer M, Hurd M, Surh CD, Ron Y. Mature murine B and T cells transferred to SCID mice can survive indefinitely and many maintain a virgin phenotype. *J Exp Med* 1991;174:717.
568. Openshaw P, Murphy EE, Hosken NA, et al. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *J Exp Med* 1995;182:1357.
569. Sornasse T, Larenas PV, Davis KA, de Vries JE, Yssel H. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *J Exp Med* 1996;184:473.
570. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 1996;184:695.
571. Freudenthal PS, Steinman RM. The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7698.
572. Crowley M, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *J Exp Med* 1990;172:383.
573. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ [published erratum appears in *J Exp Med* 1990 Oct 1;172(4):1275]. *J Exp Med* 1990;172:631.
574. Boog CJ, Boes J, Melief CJ. Role of dendritic cells in the regulation of class I restricted cytotoxic T lymphocyte responses. *J Immunol* 1988;140:3331.
575. Sprent J, Schaefer M. Antigen-presenting cells for unprimed T cells. *Immunol Today* 1989;10:17.
576. Cassell DJ, Schwartz RH. A quantitative analysis of antigen-presenting cell function: activated B cells stimulate naive CD4 T cells but are inferior to dendritic cells in providing costimulation. *J Exp Med* 1994;180:1829.
577. Larsen CP, Ritchie SC, Pearson TC, Linsley PS, Lowry RP. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *J Exp Med* 1992;176:1215.
578. Teunissen MB, Rongen HA, Bos JD. Function of adhesion molecules lymphocyte function-associated antigen-3 and intercellular adhesion molecule-1 on human epidermal Langerhans cells in antigen-specific T cell activation. *J Immunol* 1994;152:3400.
579. Cumberbatch M, Kimber I. Phenotypic characteristics of antigen-bearing cells in the draining lymph nodes of contact sensitized mice. *Immunology* 1990;71:404.
580. Bujdoso R, Hopkins J, Dutia BM, Young P, McConnell I. Characterization of sheep afferent lymph dendritic cells and their role in antigen carriage. *J Exp Med* 1989;170:1285.
581. Macatonia SE, Knight SC, Edwards AJ, Griffiths S, Fryer P. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J Exp Med* 1987; 166:1654.
582. Dai R, Grammer SF, Streilein JW. Fresh and cultured Langerhans cells display differential capacities to activate hapten-specific T cells. *J Immunol* 1993;150:59.
583. Streilein JW, Grammer SF. *In vitro* evidence that Langerhans cells can adopt two functionally distinct forms capable of antigen presentation to T lymphocytes. *J Immunol* 1989;143:3925.
584. Bergstresser PR. Sensitization and elicitation of inflammation in contact dermatitis. In: Norns D, ed. *Immunologic mechanisms in cutaneous disease.* New York: Marcel Dekker Inc, 1988:220.
585. Xia W, Pinto CE, Kradin RL. The antigen-presenting activities of Ia+ dendritic cells shift dynamically from lung to lymph node after an airway challenge with soluble antigen. *J Exp Med* 1995;181:1275.
586. Liu LM, MacPherson GG. Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo. *J Exp Med* 1993;177:1299.
587. Austyn JM, Kupiec WJ, Hankins DF, Morris PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T cell-dependent areas of spleen, and binding within marginal zone. *J Exp Med* 1988;167:646.
588. Kudo S, Matsuno K, Ezaki T, Ogawa M. A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med* 1997;185:777.
589. Akbar AN, Salmon M, Savill J, Janossy G. A possible role for bcl-2 in regulating T-cell memory—a 'balancing act' between cell death and survival. *Immunol Today* 1993;14:526.
590. Osborne BA. Apoptosis and the maintenance of homoeostasis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 1996;8:245.
591. Doherty PC, Topham DJ, Tripp RA. Establishment and persistence of virus-specific CD4(+) and CD8(+) T cell memory. *Immunol Rev* 1996;150:23.
592. Kabelitz D, Pohl T, Pechhold K. Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol Today* 1993;14:338.
593. Russell JH. Activation-induced death of mature T cells in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol* 1995;7:382.
594. Freitas AA, Agenes F, Coutinho GC. Cellular competition modulates survival and selection of CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* 1996;26:2640.
595. Selin LK, Vergilis K, Welsh RM, Nahill SR. Reduction of otherwise remarkably stable virus-specific cytotoxic T lymphocyte memory by heterologous viral infections. *J Exp Med* 1996;183:2489.
596. Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians [see comments]. *Immunol Today* 1995;16: 12.
597. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994;12:991.
598. MacLennan IC, Liu YJ, Johnson GD. Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses. *Immunol Rev* 1992;126:143.
599. Berek C. The development of B cells and the B-cell repertoire in the microenvironment of the germinal center. *Immunol Rev* 1992;126:5.
600. Nossal GJV. The molecular and cellular basis of affinity maturation in the antibody response. *Cell* 1992;68:1.
601. Tsiagbe VK, Inghirami G, Thorbecke GJ. The physiology of germinal centers. *Crit Rev Immunol* 1996;16:381.
602. Berek C, Jarvis JM, Milstein C. Activation of memory and virgin B cell clones in hyperimmune animals. *Eur J Immunol* 1987;17:1121.
603. Coico RF, Bhogal BS, Thorbecke GJ. Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. *J Immunol* 1983;131:2254.
604. Jacob J, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med* 1992;176:679.
605. Liu YJ, Johnson GD, Gordon J, MacLennan IC. Germinal centers in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol Today* 1992;13:17.
606. Jacob J, Kassir R, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med* 1991;173:1165.
607. Liu YJ, Zhang J, Lane PJ, Chan EY, MacLennan IC. Sites of specific B cell acti-

vation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens [published erratum appears in *Eur J Immunol* 1992 Feb;22(2): 615]. *Eur J Immunol* 1991;21:2951.
608. Huchet R, Feldmann M. Studies on antibody affinity in mice. *Eur J Immunol* 1973;3:49.
609. Siekevitz M, Kocks C, Rajewsky K, Dildrop R. Analysis of somatic mutation and class switching in naive and memory B cells generating adoptive primary and secondary responses. *Cell* 1987;48:757.
610. van Rooijen N. Direct intrafollicular differentiation of memory B cells into plasma cells. *Immunol Today* 1990;11:154.
611. Weiss U, Rajewsky K. The repertoire of somatic antibody mutants accumulating in the memory compartment after primary immunization is restricted through affinity maturation and mirrors that expressed in the secondary response. *J Exp Med* 1990;172:1681.
612. Gray D. Recruitment of virgin B cells into an immune response is restricted to activation outside lymphoid follicles. *Immunology* 1988;65:73.
613. Seijen HG, Bun JC, Wubbena AS, Lohlefink KG. The germinal center precursor cell is surface mu and delta positive. *Adv Exp Med Biol* 1988;237:233.
614. Leanderson T, Kallberg E, Gray D. Expansion, selection and mutation of antigen-specific B cells in germinal centers. *Immunol Rev* 1992;126:47.
615. Kosco MH, Gray D. Signals involved in germinal center reactions. *Immunol Rev* 1992;126:63.
616. Kroese FG, Wubbena AS, Seijen HG, Nieuwenhuis P. Germinal centers develop oligoclonally. *Eur J Immunol* 1987;17:1069.
617. Linton PJ, Decker DJ, Klinman NR. Primary antibody forming cells and secondary B cells are generated from separate precursor cell subpopulations. *Cell* 1989;59:1049.
618. Zhang J, MacLennan IC, Liu YJ, Lane PJ. Is rapid proliferation in B centroblasts linked to somatic mutation in memory B cell clones? *Immunol Lett* 1988;18:297.
619. Fliedner TM, Kress M, Cronkite EP, Robertson JS. Cell proliferation in germinal centers of the rat spleen. *Ann NY Acad Sci* 1964;113:578.
620. Bachmann MF, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM. Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J Exp Med* 1996;183:2259.
621. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med* 1994; 180:329.
622. Liu Y-J, Banchereau J. The paths and molecular controls of peripheral B-cell development. *Immunologist* 1996;4:55.
623. Hardie DL, Johnson GD, Khan M, MacLennan IC. Quantitative analysis of molecules which distinguish functional compartments within germinal centers. *Eur J Immunol* 1993;23:997.
624. Klein U, Kuppers R, Rajewsky K. Human IgM+IgD+ B cells, the major B cell subset in the peripheral blood, express V kappa genes with no or little somatic mutation throughout life. *Eur J Immunol* 1993;23:3272.
625. Griffiths GM, Berek C, Kaartinen M, Milstein C. Somatic mutation and the maturation of immune response to 2-phenyl oxazolone. *Nature* 1984;312:271.
626. Shan H, Shlomchik M, Weigert M. Heavy-chain class switch does not terminate somatic mutation. *J Exp Med* 1990;172:531.
627. Manser T. Evolution of antibody structure during the immune response. The differentiative potential of a single B lymphocyte. *J Exp Med* 1989;170:1211.
628. Ziegner M, Steinhauser G, Berek C. Development of antibody diversity in single germinal centers: selective expansion of high-affinity variants. *Eur J Immunol* 1994;24:2393.
629. McHeyzer-Williams MG, McLean MJ, Lalor PA, Nossal GJ. Antigen-driven B cell differentiation in vivo. *J Exp Med* 1993;178:295.
630. Kepler TB, Perelson AS. Cyclic re-entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation [review]. *Immunol Today* 1993;14:412.
631. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 1989;342:929.
632. Liu YJ, Mason DY, Johnson GD, et al. Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur J Immunol* 1991;21:1905.
633. Pulendran B, Kannourakis G, Nouri S, Smith KG, Nossal GJ. Soluble antigen can cause enhanced apoptosis of germinal-centre B cells. *Nature* 1995;375:331.
634. Tew JG, Kosco MH, Burton GF, Szakal AK. Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol Rev* 1990;117:185.
635. Humphrey JH, Grennan D, Sundaram V. The origin of follicular dendritic cells in the mouse and the mechanism of trapping of immune complexes on them. *Eur J Immunol* 1984;14:859.
636. Kapasi ZF, Kosco-Vilbois MH, Shultz LD, Tew JG, Szakal AK. Cellular origin of follicular dendritic cells. *In Vivo Immunol* 1994 231.
637. Clark EA, Grabstein KH, Gown AM, et al. Activation of B lymphocyte maturation by a human follicular dendritic cell line, FDC-1. *J Immunol* 1995;155:545.
638. Kapasi ZF, Burton GF, Shultz LD, Tew JG, Szakal AK. Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice. Influence of B and T cells. *J Immunol* 1993;150:2648.
639. Mandel TE, Phipps RP, Abbot A, Tew JG. The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev* 1980;53:29.
640. Petrasch S, Perez-Alvarez C, Schmitz J, Kosco M, Brittinger G. Antigenic phenotyping of human follicular dendritic cells isolated from nonmalignant and malignant lymphatic tissue. *Eur J Immunol* 1990;20:1013.
641. Szakal AK, Kosco MH, Tew JG. A novel in vivo follicular dendritic cell-dependent iccosome-mediated mechanism for delivery of antigen to antigen-processing cells. *J Immunol* 1988;140:341.
642. Kosco MH, Szakal AK, Tew JG. In vivo obtained antigen presented by germinal center B cells to T cells in vitro. *J Immunol* 1988;140:354.
643. Koopman G, Parmentier HK, Schuurman HJ, Newman W, Meijer CJ, Pals ST. Adhesion of human B cells to follicular dendritic cells involves both the lymphocyte function-associated antigen 1/intercellular adhesion molecule 1 and very late antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 pathways. *J Exp Med* 1991;173:1297.
644. Kosco MH, Pflugfelder E, Gray D. Follicular dendritic cell-dependent adhesion and proliferation of B cells in vitro. *J Immunol* 1992;148:2331.
645. Koopman G, Keehnen RM, Lindhout E, et al. Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. *J Immunol* 1994;152: 3760.
646. Lindhout E, Mevissen ML, Kwekkeboom J, Tager JM, de Groot C. Direct evidence that human follicular dendritic cells (FDC) rescue germinal centre B cells from death by apoptosis. *Clin Exp Immunol* 1993;91:330.
647. Poppema S, Bhan AK, Reinherz EL, McCluskey RT, Schlossman SF. Distribution of T cell subsets in human lymph nodes. *J Exp Med* 1981;153:30.
648. Bowen MB, Butch AW, Parvin CA, Levine A, Nahm MH. Germinal center T cells are distinct helper-inducer T cells. *Hum Immunol* 1991;31:67.
649. Vonderheide RH, Hunt SV. Does the availability of either B cells or CD4+ cells limit germinal centre formation? *Immunology* 1990;69:487.
650. Zheng B, Han SH, Kelsoe G. T helper cells in murine germinal centers are antigen-specific emigrants that downregulate thy-1. *J Exp Med* 1996;184:1083.
651. Fuller KA, Kanagawa O, Nahm MH. T cells within germinal centers are specific for the immunizing antigen. *J Immunol* 1993;151:4505.
652. Grouard G, Durand I, Filgueira L, Banchereau J, Liu YJ. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature* 1996;384:364.
653. Snapper CM, Paul WE. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987;236:944.
654. Lebman DA, Lee FD, Coffman RL. Mechanism for transforming growth factor beta and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures. *J Immunol* 1990;144:952.
655. Islam KB, Nilsson L, Sideras P, Hammarstrom L, Smith CI. TGF-beta 1 induces germ-line transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes. *Int Immunol* 1991;3:1099.
656. Sonoda E, Matsumoto R, Hitoshi Y, et al. Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J Exp Med* 1989;170:1415.
657. Harriman GR, Kunimoto DY, Elliott JF, Paetkau V, Strober W. The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *J Immunol* 1988;140:3033.
658. Schoenbeck S, McKenzie DT, Kagnoff MF. Interleukin 5 is a differentiation factor for IgA B cells. *Eur J Immunol* 1989;19:965.
659. Beagley KW, Eldridge JH, Kiyono H, et al. Recombinant murine IL-5 induces high rate IgA synthesis in cycling IgA-positive Peyer's patch B cells. *J Immunol* 1988;141:2035.
660. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL6 and related molecules (IL1 and TNF). *FASEB J* 1990;4:2860.
661. Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest* 1994;93:424.
662. Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD, Noelle RJ. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol Today* 1994;15:403.
663. Stout RD, Suttles J. The many-roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol Today* 1996;17:487.
664. Grewal IS, Flavell RA. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4(+) T-cell responses. *Immunol Today* 1996;17:410.
665. Noelle RJ. CD40 and its ligand in host defense. *Immunity* 1996;4:415.
666. Liu YJ, Cairns JA, Holder MJ, et al. Recombinant 25-kDa CD23 and interleukin 1 alpha promote the survival of germinal center B cells: evidence for bifurcation in the development of centrocytes rescued from apoptosis. *Eur J Immunol* 1991; 21:1107.
667. Han S, Hathcock K, Zheng B, Kepler TB, Hodes R, Kelsoe G. Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J Immunol* 1995;155:556.
668. Lederman S, Yellin MJ, Cleary AM, et al. T-BAM/CD40-L on helper T lymphocytes augments lymphokine-induced B cell Ig isotype switch recombination and rescues B cells from programmed cell death. *J Immunol* 1994;152:2163.
669. Galibert L, Burdin N, de Saint-Vis B, et al. CD40 and B cell antigen receptor dual triggering of resting B lymphocytes turns on a partial germinal center phenotype. *J Exp Med* 1996;183:77.
670. Parry SL, Hasbold J, Holman M, Klaus GG. Hypercross-linking surface IgM or IgD receptors on mature B cells induces apoptosis that is reversed by costimulation with IL-4 and anti-CD40. *J Immunol* 1994;152:2821.
671. Arpin C, Dechanet J, Van Kooten C, et al. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 1995;268:720.
672. Craig SW, Cebra JJ. Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J Exp Med* 1971;134:188.
673. Weinstein PD, Cebra JJ. The preference for switching to IgA expression by

Peyer's patch germinal center B cells is likely due to the intrinsic influence of their microenvironment. *J Immunol* 1991;147:4126.
674. Brandtzaeg P, Bjerke K. Immunomorphological characteristics of human Peyer's patches. *Digestion* 1990;2:262.
675. Butcher EC, Rouse RV, Coffman RL, Nottenburg CN, Hardy RR, Weissman IL. Surface phenotype of Peyer's patch germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B cell differentiation. *J Immunol* 1982;129:2698.
676. Weinstein PD, Schweitzer PA, Cebra TJ, Cebra JJ. Molecular genetic features reflecting the preference for isotype switching to IgA expression by Peyer's patch germinal center B cells. *Int Immunol* 1991;3:1253.
677. Husband AJ. Kinetics of extravasation and redistribution of IgA-specific antibody-containing cells in the intestine. *J Immunol* 1982;128:1355.
678. McDermott MR, Bienenstock J. Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues. *J Immunol* 1979;122:1892.
679. Quiding-Jarbrink M, Lakew M, Nordstrom I, et al. Human circulating specific antibody-forming cells after systemic and mucosal immunizations: differential homing commitments and cell surface differentiation markers. *Eur J Immunol* 1995;25:322.
680. Dilosa RM, Maeda K, Masuda A, Szakal AK, Tew JG. Germinal center B cells and antibody production in the bone marrow. *J Immunol* 1991;146:4071.
681. Kawanishi H, Saltzman LE, Strober W. Mechanisms regulating IgA class-specific immunoglobulin production in murine gut-associated lymphoid tissues. I. T cells derived from Peyer's patches that switch sIgM B cells to sIgA B cells in vitro. *J Exp Med* 1983;157:433.
682. Benson EB, Strober W. Regulation of IgA secretion by T cell clones derived from the human gastrointestinal tract. *J Immunol* 1988;140:1874.
683. Spalding DM, Griffin JA. Different pathways of differentiation of pre-B cell lines are induced by dendritic cells and T cells from different lymphoid tissues. *Cell* 1986;44:507.
684. Mega J, McGhee JR, Kiyono H. Cytokine- and Ig-producing T cells in mucosal effector tissues: analysis of IL-5- and IFN-gamma-producing T cells, T cell receptor expression, and IgA plasma cells from mouse salivary gland-associated tissues. *J Immunol* 1992;148:2030.
685. MacLennan IC, Gray D. Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. *Immunol Rev* 1986;91:61.
685a. Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 1998;8:363.
686. Kraal G, Weissman IL, Butcher EC. Memory B cells express a phenotype consistent with migratory competence after secondary but not short-term primary immunization. *Cell Immunol* 1988;115:78.
687. Gray D, Skarvall H. B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* 1988;336:70.
688. Dell'CL, Lu YX, Claflin JL. Molecular analysis of clonal stability and longevity in B cell memory. *J Immunol* 1989;143:3364.
689. McHeyzer-Williams MG, Nossal GJ, Lalor PA. Molecular characterization of single memory B cells. *Nature* 1991;350:502.
690. Rada C, Gupta SK, Gherardi E, Milstein C. Mutation and selection during the secondary response to 2-phenyloxazolone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5508.
691. Freitas AA, Rosado MM, Viale AC, Grandien A. The role of cellular competition in B cell survival and selection of B cell repertoires. *Eur J Immunol* 1995;25:1729.
692. Cyster JG, Hartley SB, Goodnow CC. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature* 1994;371:389.
693. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflammation and repair. In: *Pathologic basis of disease*. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, eds. Philadelphia: WB Saunders, 1989.
694. Berg M, Murakawa Y, Camerini D, James SP. Lamina propria lymphoyctes are derived from circulating cells that lack the Leu-8 lymph node homing receptor. *Gastroenterology* 1991;101:90.
695. Mackay CR, Marston WL, Dudler L, Spertini O, Tedder TF, Hein WR. Tissue-specific migration pathways by phenotypically distinct subpopulations of memory T cells. *Eur J Immunol* 1992;22:887.
696. Weisz-Carrington P, Emancipator S, Kelemen PR. Specific attachment of mesenteric IgA lymphoblasts to specialized endothelium of intestinal mucosa lamina propria capillaries. *Cell Immunol* 1991;132:494.
697. Picker LJ, Michie SA, Rott LS, Butcher EC. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans: preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T-cells at cutaneous sites. *Am J Pathol* 1990;136:1053.
698. Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Buck D, Terstappen LWMM. Control of lymphocyte recirculation in man: I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol* 1993; 152:1105.
699. Smolle J. Mononuclear cell patterns in the skin. An immunohistological and morphometrical analysis. *Am J Dermatopathol* 1988;10:36.
700. Ansel J, Perry P, Brown J, et al. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol* 1990;94:101.
701. Luger TA, Schwarz T. Evidence for an epidermal cytokine network. *J Invest Dermatol* 1990;95:100.
702. McKenzie RC, Sauder DN. The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity. *J Invest Dermatol* 1990;95:105.
703. Kupper TS. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and speculations. *J Clin Invest* 1990;86:1783.
704. Enk AH, Katz SI. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol* 1992;149:92.
705. Groves RW, Ross E, Barker JNWN, Ross JS, Camp RDR, MacDonald DM. Effect of *in vivo* interleukin-1 on adhesion molecule expression in normal human skin. *J Invest Dermatol* 1992;98:384.
706. Picker LJ, Kishimoto TK, Smith CW, Warnock RA, Butcher EC. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature* 1991;349:796.
707. Nickoloff BJ, Griffiths CEM, Barker JNWN. The role of adhesion molecules, chemotactic factors, and cytokines in inflammatory and neoplastic skin disease—1990 update. *J Invest Dermatol* 1990;94:151.
708. Barker JNWN, Mitra RS, Griffiths CEM, Dixit VM, Nickoloff BJ. Hypothesis: keratinocytes as initiators of inflammation. A unifying explanation for the diverse array of environmental stimuli which produce cutaneous inflammation. *Lancet* 1991;337:211.
709. Kantor AB. The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells). *Immunol Today* 1991;12:389.
710. Hardy RR, Hayakawa K. Development and physiology of Ly-1 B and its human homolog, Leu-1 B. *Immunol Rev* 1986;93:53.
711. Herzenberg LA, Stall AM, Lalor PA, et al. The Ly-1 B cell lineage. *Immunol Rev* 1986;93:81.
712. Hayakawa K, Hardy RR. Normal, autoimmune, and malignant CD5+ B cells: the Ly-1 B lineage? *Annu Rev Immunol* 1988;6:197.
713. Kantor AB, Herzenberg LA. Origin of murine B cell lineages [review, 158 refs]. *Annu Rev Immunol* 1993;11:501.
714. Tarakhovsky A. Bar mitzvah for B-1 cells: how will they grow up? *J Exp Med* 1997;185:981.
715. Casali P, Notkins AL. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol Today* 1989;10:364.
716. Casali P, Notkins AL. Probing the human B-cell repertoire with EBV: polyreactive antibodies and CD5+ B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1989;7:513.
717. Kroese FG, Butcher EC, Stall AM, Lalor PA, Adams S, Herzenberg LA. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int Immunol* 1989;1:75.
718. Allison JP, Havran WL. The immunobiology of T cells with invariant γδ antigen receptors. *Annu Rev Immunol* 1991;9:679.
719. Elbe A, Kilgus O, Strohal R, Payer E, Schreiber S, Stingl G. Fetal skin: a site of dendritic epidermal T cell development. *J Immunol* 1992;149:1694.
720. Lefrancois L, LeCorre R, Mayo J, Bluestone JA, Goodman T. Extrathymic selection of TCR gd+ T cells by class II major histocompatibility complex molecules. *Cell* 1990;63:333.
721. Guy-Grand D, Cerf-Bensussan N, Malissen B, Malassis-Seris M, Briottet C, Vassalli P. Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med* 1991;173:471.
722. Foster CA, Yokozeki H, Rappersberger K, et al. Human epidermal T cells predominately belong to the lineage expressing α/β T cell receptor. *J Exp Med* 1990;171:997.
723. Groh V, Porcelli S, Fabbi M, et al. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* 1989;169:1277.
724. Boismenu R, Havran WL. An innate view of γδ T cells. *Curr Opin Immunol* 1997;9:57.
725. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* 1995;375:155.
726. Smith ME, Ford WL. The recirculating pool of the rat: a systematic description of the migratory behavior of recirculating lymphocytes. *Immunology* 1983;49:83.
727. Sprent J, Schaefer M, Hurd M, Surh CD, Ron Y. Mature murine B and T cells transferred to SCID mice can survive indefinitely and many maintain a virgin phenotype. *J Exp Med* 1991;174:717.
728. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:426.
729. Kalish RS, Johnson KL. Enrichment and function of urushiol (poison ivy)-specific T lymphocytes in lesions of allergic contact dermatitis to urushiol. *J Immunol* 1990;145:3706.
730. Firrell JC, Lipowsky HH. Leukocyte margination and deformation in mesenteric venules of rat. *Am J Physiol* 1989;256:H1667.
731. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67:1033.
732. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995;57:827.
733. Imhof BA, Dunon D. Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol* 1995;58:345.
734. Bargatze RF, Jutila MA, Butcher EC. Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity* 1995;3:99.
735. Jones DA, McIntire LV, Smith CW, Picker LJ. A two-step adhesion cascade for T cell/endothelial cell interactions under flow conditions. *J Clin Invest* 1994;94:

2443.
736. von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* 1995;82:989.
737. Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 1983;304:30.
738. Siegelman MH, Checn IC, Weissman IL. The mouse lymph node homing receptor is identical with the lymphocyte cell surface marker Ly-22: role of the EGF domain in endothelilal binding. *Cell* 1990;61:611.
739. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259.
740. Alon R, Rossiter H, Wang X, Springer TA, Kupper TS. Distinct cell surface ligands mediate T lymphocyte attachment and rolling on P and E selectin under physiological flow. *J Cell Biol* 1994;127:1485.
741. Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, et al. Alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 1995;80:413.
742. DeGrendele HC, Estess P, Picker LJ, Siegelman MH. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med* 1996;183:1119.
743. Bargatze RF, Butcher EC. Rapid G protein-regulated activation event involved in lymphocyte binding to high endothelial venules. *J Exp Med* 1993;178:367.
744. Mackay CR. Chemokine receptors and T cell chemotaxis. *J Exp Med* 1996;184:799.
745. Carr MW, Alon R, Springer TA. The C-C chemokine MCP-1 differentially modulates the avidity of beta 1 and beta 2 integrins on T lymphocytes. *Immunity* 1996;4:179.
746a. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane bound chemokine with CX3C motif. *Nature* 1997;385:640.
746b. Campbell JJ, Hendrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphoid under flow conditions. *Science* 1998;279:381.
747. Erlandsen SL, Hasslen SR, Nelson RD. Detection and spatial distribution of the beta 2 integrin (Mac-1) and L-selectin (LECAM-1) adherence receptors on human neutrophils by high-resolution field emission SEM. *J Histochem Cytochem* 1993;41:327.
748. Cepek KL, Parker CM, Madara JL, Brenner MB. Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol* 1993;150:3459.
749. Kansas GS, Tedder TF. Transmembrane signals generated through MHC class II, CD19, CD20, CD39, and CD40 antigens induce LFA-1-dependent and independent adhesion in human B cells through a tyrosine kinase-dependent pathway. *J Immunol* 1991;147:4094.
750. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11.
751. Tanaka Y, Shaw S. T cell adhesion cascades: general considerations and illustration with CD31. *Adv Exp Med Biol* 1992;323:157.
752. Lesley J, Howes N, Perschl A, Hyman R. Hyaluronan binding function of CD44 is transiently activated on T cells during an in vivo immune response. *J Exp Med* 1994;180:383.
753. Jinquan T, Larsen CG, Gesser B, Matsushima K, Thestrup-Pedersen K. Human IL-10 is a chemoattractant for CD8+ T lymphocytes and an inhibitor of IL-8-induced CD4+ T lymphocyte migration. *J Immunol* 1993;151:4545.
754. Jinquan T, Deleuran B, Gesser B, et al. Regulation of human T lymphocyte chemotasix in vitro by T-cell derived cytokines IL-2, IFN-g, IL-4, IL-10, and IL-13[1]. *J Immunol* 1995;154:3742.
755. Adams DH, Hathaway M, Shaw J, Burnett D, Eliase E, Strain AJ. Transforming growth factor-b induces human T lymphocyte migration in vitro. *J Immunol* 1991;147:609.
756. Adams DH, Harvath L, Bottaro DP, et al. Hepatocyte growth factor and macrophage inflammatory protein 1 beta: structurally distinct cytokines that induce rapid cytoskeletal changes and subset-preferential migration in T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7144.
757. Wikinson PC, Liew FY. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *J Exp Med* 1995;181:1255.
758. Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 1996;87:1037.
759. Gilat D, Hershkoviz R, Mekori YA, Vlodavsky I, Lider O. Regulation of adhesion of CD4+ T lymphocytes to intact or heparinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta. *J Immunol* 1994;153:4899.
760. Witt DP, Lander AD. Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr Biol* 1994;4:394.
761. Tanaka Y, Adams DH, Shaw S. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today* 1993;14:111.
762. Kantele A, Kantele JM, Savilahti E, et al. Homing potentials of circulating lymphocytes in humans depend on the site of activation—oral, but not parenteral, typhoid vaccination induces circulating antibody-secreting cells that bear homing receptors directing them to the gut. *J Immunol* 1997;158:574.
763. Quiding-Javbrink M, Nordstom I, Granstrom G, et al. Differential expression of tissue-specific adhesion molecules on human circulating antibody-forming cells after systemic, enteric, and nasal immunizations. *J Clin Invest* 1997;99:1281.

第 15 章　巨噬细胞与免疫应答

Siamon Gordon[①]

巨噬细胞为一类广泛分布于全身的单个核白细胞,存在于淋巴-造血器官内外。由于起源及所处局部微环境的不同,巨噬细胞的寿命和表型相差很大。成熟巨噬细胞具高度吞噬功能,有相对较长的寿命。在对抗原和微生物刺激物的生物合成应答中,成熟巨噬细胞适应能力强。组织中巨噬细胞的功能是自我平衡的,通过不同的血浆膜受体和不同的分泌产物调节局部和全身环境。巨噬细胞不仅能对影响其他细胞生长、分化和死亡的信号起反应,而且自身能产生这些信号,能识别和吞噬衰老细胞和异常细胞。事实上,巨噬细胞的这些活动有助于识别并防止微生物、外源颗粒及其他免疫原的侵入。通过调节 T 细胞和 B 细胞的活化,巨噬细胞的先天免疫功能有助于获得性体液和细胞免疫;巨噬细胞的这种辅助功能部分是通过其特异性衍生细胞来完成的,该衍生细胞为骨髓起源的树突细胞(dendritic cell,DC)。无论有无树突细胞,巨噬细胞都能加工和呈递抗原,产生趋化因子和细胞因子,如白细胞介素-1、白细胞介素-6、白细胞介素-12、白细胞介素-18、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)和白细胞介素-10 等,能吞噬凋亡细胞和坏死细胞。直接或在其他免疫细胞的影响下,巨噬细胞捕获细胞外和细胞内的病原体,清除入侵病原体,并将它们带入淋巴组织的适当亚区。作为特异和天然免疫应答的关键调节细胞,通过正反馈和负反馈,巨噬细胞既能增强也能限制特异性免疫应答的诱导和效应机制。 *533*

在本书 Steinman 所写章节中,树突细胞的特性和作用被详细阐述。在此,我们将着重讨论巨噬细胞系的其他成员,阐述它们的相互关系,简述其特殊的特性,这些特性是其在免疫应答执行和调节中的作用的基础。

巨噬细胞研究中的几个里程碑

我们对巨噬细胞的理解是与作为实验科学的免疫学的成长平行发展的。由于认识到巨噬细胞的吞噬作用不仅是原始生物体也是高度发展的多细胞生物体的一种基本的宿主防御机制,比较发展动物学家 Metchnikoff 受到世人的广泛信任。尽管 Metchnikoff 错误地认为抗体是吞噬细胞自身产生的,但他清楚地陈述了脾对感染性微生物的捕获与随后血液中反应物质(抗体)出现的关系。在网状内皮系统(reticuloendothelial system,RES)中,巨噬细胞,特别是肝脏库普弗细胞和其他内皮细胞,对微粒的系统清除的重要性被神圣化。尽管在该领域支持单核吞噬细胞系统的有影响的研究者对肝脏和其他组织的窦内巨噬细胞与所选内皮细胞

① S. Gordon: Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford, OX1 3RE, United Kingdom.

有共同特性这一提法持反对意见,但它仍值得保留。Florey 及其学生(包括 Gowans)的早期研究确认,循环单核细胞产生组织巨噬细胞。Van Furth 及其同事通过动力学标记方法研究了巨噬细胞的生活史;后来,膜抗原标记的发展促进了脑等组织中特定巨噬细胞亚群的更精确的定义。作为敏感的免疫细胞化学方法的结果,发育过程中巨噬细胞的出现及其潜在重要性也已清楚。Humphrey 和其他许多研究者所进行的形态学和功能研究引起人们对二级淋巴器官中类巨噬细胞显著多样性的注意,特别是在复杂微粒和多糖从循环中被捕获的脾边缘区。

534

现代细胞生物学时代冲击着 Cohn、Hirsch 及其同事的研究之后的巨噬细胞研究。Cohn、Hirsch 及其同事的研究涉及了细胞结构和功能的许多方面,包括吞噬作用(Silverstein 拉链机制)、液体和受体介导的胞吞作用、分泌和抗菌耐受。来自小鼠和人体的细胞可被分离且体外培养系统可获得,特别是在特异性生长和分化因子[如集落刺激因子(colony stimulating factor,CSF)-1(M-CSF)]鉴定后。最早知道的巨噬细胞天然敲除(KO)小鼠(op/op 小鼠)应该涉及这种分子,这样认为也许是适当的。保留了一些但不是全部成熟巨噬细胞特性的细胞系对许多生物化学研究和细胞研究是有用的。

作为能激发适当免疫应答的抗原呈递细胞(antigen-processing cell,APC),巨噬细胞的作用有过假的迹象(曾经认为涉及免疫核糖核酸),也曾包括早期的遗传策略。被选择用于诱导高的抗绵羊红细胞抗体应答的 Biozzi 小鼠,其巨噬细胞显示出增加了的退化特性;研究显示,来自几内亚猪的黏附细胞在 Ia[主要组织相容性复合物(MHC)]限制性抗胰岛素应答中扮演着重要的角色。尽管主要从事巨噬细胞细胞内加工研究的 Unanue 和发现树突细胞在将抗原呈递给初始 T 淋巴细胞过程中的特殊作用的 Steinman 进一步了揭示黏附细胞的抗原呈递细胞功能,但几年来,对其仍有很大的争议。作为效应细胞,巨噬细胞在抗胞内病原体(如结核分枝杆菌)免疫中的重要性很早就为 Lurie 和 Dannenberg 所认识。Mackaness 在实验模型中利用单核细胞增多性利斯特氏菌和卡介菌感染,提出了巨噬细胞活化概念,用于解释抗原依赖性但免疫非特异性的抗菌抵抗力的增强。后来的 T 淋巴细胞亚类描述及对巨噬细胞活化(包括 MHC Ⅱ 诱导)所涉及的主要淋巴因子 γ 干扰素(IFN-γ)的定性,与不断增加的对活性氧和后来作为细胞毒性因子的氮代谢物的作用的认识融合在一起。作为抗原特异性 $CD8^+$ 杀伤细胞的 MHC Ⅰ类限制性靶细胞,病毒感染的巨噬细胞的作用是 Zinkernagel 和 Doherty 所观察到的现象的最初定性的一部分。D'Arcy Hart 是巨噬细胞和空泡系统侵入病菌间胞内相互作用的早期研究者,特别是分枝杆菌,它通过逃避宿主抵抗力的机制在巨噬细胞内生存。几个研究小组通过小鼠繁殖研究确定了一个共同的遗传基因座,该基因座与小鼠对卡介菌、利什曼原虫和沙门氏菌的抵抗力有关。研究发现,宿主表型有赖于其在巨噬细胞中的表达。几年后,Skamene,和 Gross 及其同事通过定位克隆,鉴定了被称为天然抵抗相关膜蛋白(natural resistance-associated membrane protein,N-ramp)的基因。

巨噬细胞是人免疫缺陷病毒(HIV)感染、传播和持续存在的关键靶细胞。由于巨噬细胞表达 CD4 和趋化因子共同受体,因而人免疫缺陷病毒是亲巨噬细胞的。此简要调查结束于巨噬细胞的鉴定。尽管 Mims 等早期研究者已暗示,巨噬细胞在一般的抗病毒抵抗中是重要的,但在人免疫缺陷病毒作为一个主要的病原体出现前,它们在这方面的作用被忽视了。

许多在巨噬细胞免疫功能中起重要作用的分子已被鉴定,它们是在小鼠和人体内研究巨噬细胞特性的有价值的标记,包括在调理吞噬、杀伤、免疫调节中起重要作用的 Fc 和补体受体;非调理性外源凝结素,如甘露糖受体;分泌产物,如溶菌酶、中性蛋白酶、肿瘤坏死因子 α、趋化因子和其他许多细胞因子。一系列由人和啮齿动物单核吞噬细胞表达的膜蛋白的性质已被确定,用于进一步研究正常和疾病状态下的巨噬细胞的试剂也已可获得。最近,在巨噬细胞的差异基因表达研究中,包括 NF-κB 和 ETS (Pu-1)家族成员的 DNA 结合转录因子的作用已受到进一步的注意。尽管几乎没有使用细胞特异性敲除动物来恢复巨噬细胞在免疫加工中的作用,但基因灭活已证实了这些分子中的许多分子在完整宿主中的重要作用。人类自然发生的先天性障碍,如白细胞粘连缺乏综合征和慢性肉芽肿性疾病,已促进了宿主抗感染中重要的白细胞功能的分析,包括巨噬细胞功能。已证实,针对人类遗传缺陷的小鼠 KO 模型对研究与巨噬细胞活化有关的关键分子是有效的,如 γ 干扰素和白细胞介素-12。无庸置疑,接下来要研究的将是其他分子。

巨噬细胞的特性及其与免疫功能的关系

引言

巨噬细胞参与所有免疫效应细胞的产生、动员、活化和调节。当它们与其他细胞相互作用时，其自身性状被改变以执行特定的免疫功能。由于细胞表面、自分泌和旁分泌的相互作用，巨噬细胞在表型上呈现明显的异质性，这正是引起研究者兴趣和相当多的混淆之所在。对巨噬细胞的细胞特性和分子特性认识的增加强烈地影响着我们对它们在免疫应答中的作用的理解。我将就此进行简要的回顾，重点是它们的功能意义，并注意那些未解决的及有争议的问题。

生长和分化：生命史和更新

与T淋巴细胞和B淋巴细胞不同，来自血液的单核细胞产生终末分化的巨噬细胞，除在有限的程度上外，它们不能再循环或再次启动DNA复制；树突细胞可以代表单个核细胞的特殊的可移动的衍生细胞。与其他粒细胞不同，巨噬细胞生命周期长，在很大程度上保留着合成RNA和蛋白质的能力，甚至在作为定居细胞的相对静止阶段也能合成。这些细胞分布于全身各组织，构成了一个适当的警报应答系统，同时也参与少为人知的营养功能。炎症刺激物和免疫刺激物进入后，更多的单核细胞被募集到刺激点局部，产生表面特性、分泌特性和细胞毒特性改变了的免疫活化巨噬细胞。巨噬细胞的起源已为人们清楚认识：来自卵黄囊（和可能更早期的祖先），迁移到胎肝，然后在出生前和出生后迁移到脾和骨髓。在胎儿体内，成熟巨噬细胞在正在发育的器官的组织改型期活跃增生。在正常成人，除在特定的微环境中，如肺和垂体，组织巨噬细胞不会广泛地进行自我更新；受伤后，它们能在炎症局部大量扩增。巨噬细胞的生长和分化受特异性生长因子（如白细胞介素-3、集落刺激因子-1、粒-巨噬细胞集落刺激因子、白细胞介素-4和白细胞介素-13等）和抑制因子（如α/β干扰素、转化生长因子-β、白细胞抑制因子等）的严格调控，这些调控在潜能和选择性方面变化很大。这些过程通过巨噬细胞与邻近基质及其他细胞的相互作用（如通过c-kit配体和Flt-3配体间的相互作用）被调节。在从干细胞到定向前体细胞到成单核细胞、单核细胞和巨噬细胞的分化过程中，靶细胞对外来刺激物的生长应答进行性显著降低（从 10^8 或更多到 10^0），但即使是终末分化巨噬细胞，如微神经胶质细胞，通过局部刺激，也能被有限地再次激活。无论是在体内还是在体外，活化巨噬细胞对生长刺激的应答都比定居巨噬细胞活跃得多，但这种增强了的增殖的分子基础还不清楚。

535

作为间生态、过继转移和放射重构实验的结果，尽管弄清楚从血液单核细胞到组织巨噬细胞分化的大体情况已有一段时间，但主要问题仍未解决。所有的单核细胞都一样吗？或在循环单个核细胞库中有与其后代的最终组织定位相一致的不同成分吗？目前，我们对树突细胞和破骨细胞分化的理解是与相对简单的模型（图15.1）相一致的。在此模型中，组织中的大部分巨噬细胞都能通过选择性抗原标记如F4/80（Emr1，EGF-TM7分子新家族的一种）和CD68（一种与溶酶体相关膜蛋白家族有关的盘状巨噬细胞内体糖蛋白）来定性。髓源性树突细胞（见第16章）可被看作是来自皮肤和气管上皮等非淋巴组织中的朗格汉斯细胞，这些细胞经进一步的分化并转移到二级淋巴组织，应答抗原性刺激物。在血液单个核细胞中也存在着少量的树突细胞循环前体和再循环后代。现在可对其进行标记以研究它们作为朗格汉斯细胞在外周组织的分布。对破骨细胞循环前体的定性较少，它们在骨和软骨中分化成单个核细胞，融合形成多核的骨再吸收破骨细胞。局部基质细胞、集落刺激因子-1等生长因子、类固醇（维生素D代谢物）和激素（如降血钙素，破骨细胞表达其相应受体）都参与其成熟。最近发现，与肿瘤坏死因子受体家族成员同源的、天然存在的分泌蛋白骨质疏松素能与一种肿瘤坏死因子相关蛋白TRANCE相互作用，调节破骨细胞在体内和体外的分化和活化。

抗原标记，如原细胞上的CD34和单核细胞上的CD14，以及多通道荧光活化细胞分选（FACS）分析的使用使得分离较少的白细胞和研究其后代成为可能。血液单个核细胞可能含有其他组织细胞的前体，包括被认为是造血的但能合成胶原等基质蛋白的纤维细胞和一些内皮细胞。也许具有混合造血和间叶细胞特性的

536

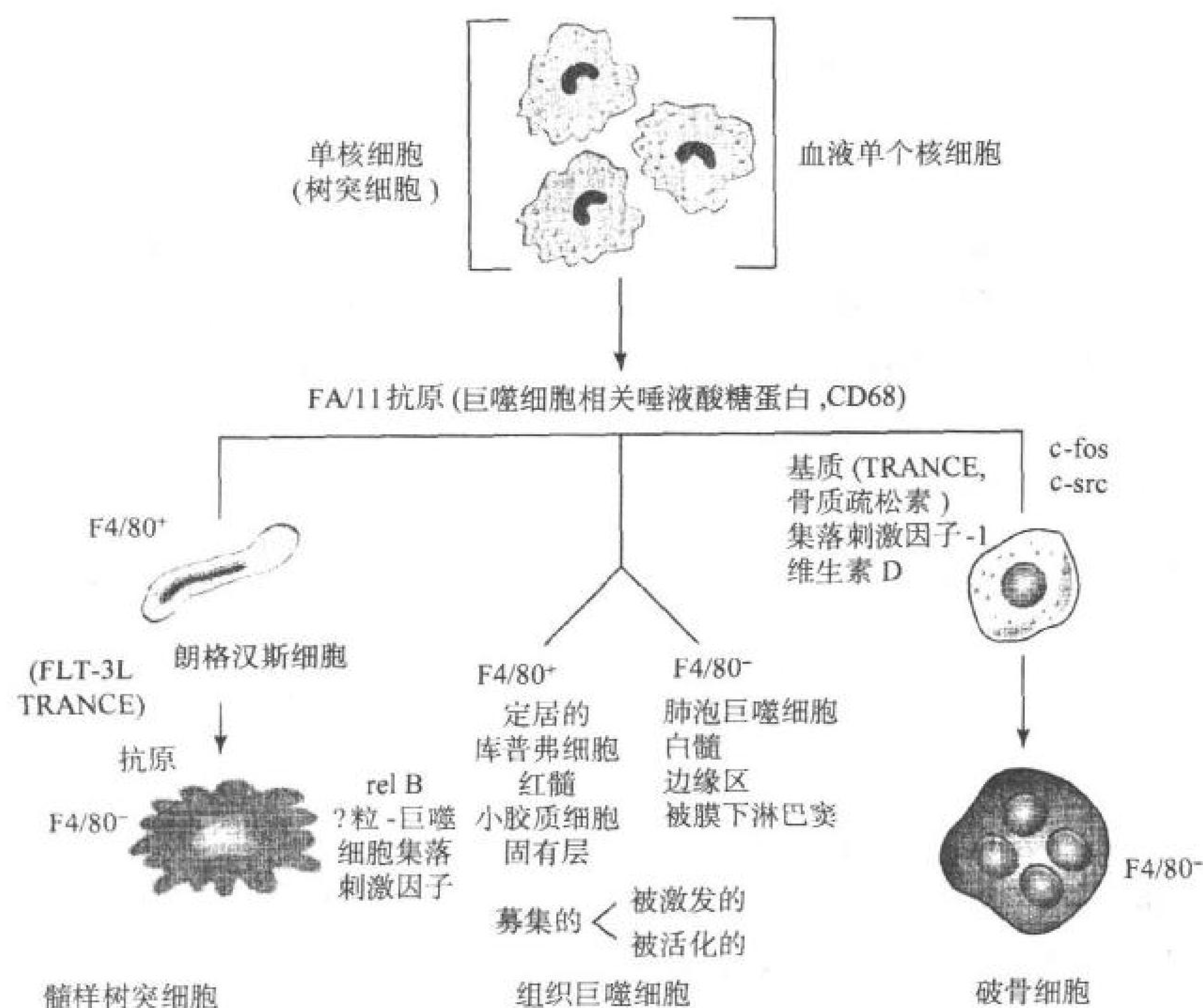


图 15.1　单个核吞噬细胞的分化。基于抗原标记 FA-11(巨噬细胞相关唾液酸糖蛋白,鼠 CD68)和 F4/80。

神秘的滤泡树突细胞(FDC)属于这一类。

在含细胞因子的培养系统(白细胞介素-4、粒-巨噬细胞集落刺激因子、肿瘤坏死因子 α)中,从大量的单核细胞大规模产生不成熟的和成熟的树突细胞样细胞已使得对这些特定的抗原呈递细胞的研究发生了革命性的变化(见第 16 章)。同样的细胞因子能单独导致巨噬细胞样细胞的产生,且在体外分化早期,细胞表型是可逆的。随后,当表达高水平 MHC Ⅱ类分子、具抗原呈递细胞功能和其他特有标记的成熟树突细胞形成时,分化便不可逆转。尽管骨髓中更早期的祖细胞和粒细胞集落刺激因子动员的血液单个核细胞能被刺激而增殖并在体外分化,但这一过程与细胞分裂无关。这些用树突细胞和破骨细胞观察到的终末分化例子也可扩展到其他特定的、更明显的巨噬细胞样细胞。Dexter 型长期骨髓培养基含基质纤维母细胞和造血成分,通过在含类固醇的此种培养基中生长和分化,可产生成熟巨噬细胞。这些巨噬细胞表达参与有核红细胞二价阳离子依赖性聚集的黏附分子。如果将终末分化的腹膜巨噬细胞放入同样的培养系统中,则不能诱导此受体的表达,这可能与血管细胞黏附分子(VCAM)有关。这与许多组织巨噬细胞形成鲜明对比。组织巨噬细胞能适应传统的细胞培养条件,且通常具有共同的、标准的表型。所以,巨噬细胞分化的不可逆阶段可能发生在体外或体内的特定微环境中。

有关巨噬细胞长寿和更新的决定因素还知之甚少。集落刺激因子-1 等生长因子能延长巨噬细胞的存活时间,防止凋亡的诱导。对巨噬细胞上 Fas 配体和 Fas 表达的研究较淋巴细胞少得多;这两种分子和肿瘤坏死因子及其受体家族的其他成员可能在决定巨噬细胞存活方面起着主要作用,特别是在被诱导的巨噬细胞中,细胞更新明显增强。组织巨噬细胞的寿命相差很大,短的只有几天,长的可达几个月。除炎症刺激物外,已经知道的能影响巨噬细胞更新的还有局部的和全身的环境因素,如盐浓度和激素(包括雌激素)等。

淋巴和非淋巴器官中定居巨噬细胞的组织分布和表型异质性

膜抗原 F4/80 的使用使得检测发育中的和成年小鼠组织中的成熟巨噬细胞及阐明它们与内皮、上皮结缔组织和神经组织中其他细胞的关系成为可能。随后,其他膜抗原(如巨噬细胞相关唾液酸糖蛋白(macrosialin)和唾

液酸黏附素)被鉴定,成为原位研究巨噬细胞的有用的标记(表 15.1)。不同组织中的巨噬细胞亚群在表达上述抗原和受体抗原[补体受体 3(CR3)和清除剂受体 A(SR-A)]方面表现出相当大的异质性,这引起我们对其归巢、迁移及其在局部对特定微环境适应机制的注意。从免疫应答观点来看,问题的一些方面值得评论。

表 15.1　用于研究鼠巨噬细胞异质性的分化抗原

抗体	抗原	结构	配体	细胞表达	功能	评论
F4/80	F4/80(EMR1)	表皮生长因子,TM7	?	成熟巨噬细胞,无 T 细胞区	?	有用的标记形成,中枢神经系统
FA-11	巨噬细胞相关唾液酸糖蛋白(CD68)	黏蛋白,Lamp	OX-LDL	盘状巨噬细胞,树突细胞	晚期内体的	炎症和吞噬作用调节的糖基化型
5C6	CR3(CD11b,CD18)	β2 整合素	IC3B,细胞间黏附分子	单核细胞,小胶质细胞,多形核细胞,自然杀伤细胞	吞噬作用,黏附	在炎症性募集中重要,多形核细胞凋亡
2F8	清除剂受体 A(Ⅰ,Ⅱ)	胶原的,Ⅱ型糖蛋白,同工型差异,富含半胱氨酸结构域	多聚阳离子,白细胞三烯 A,脂多糖,修饰后蛋白,β淀粉样蛋白	巨噬细胞,窦状小管内皮	黏附,胞吞作用,凋亡细胞和细菌的吞噬作用	保护宿主抗脂多糖诱导的休克,促进动脉硬化
SER-4	唾液酸黏附素	免疫球蛋白超家族	多涎复合糖(如 CD43)	亚类,组织巨噬细胞		在脾和淋巴结被膜下淋巴窦的边缘区、嗜金属细胞强烈表达
3D6	唾液酸结合免疫球蛋白超家族外源凝集素-1				凝集素	

胎肝和骨髓

成熟巨噬细胞构成了造血微环境的一个完整部分,在所有造血细胞的产生、分化和破坏中起着关键作用。从妊娠中期起,胎肝成为红细胞最终生成的主要场所。在出生前不久,骨髓开始活跃产生造血细胞。巨噬细胞是成人一生中造血基质的主要成分。胎肝和成人骨髓中成熟的基质巨噬细胞表达非吞噬细胞黏附分子,如唾液酸黏附素和上述提到的 EbR 。唾液酸黏附素是一种免疫球蛋白超家族唾液酸结合外源凝集素(表 15.1),EbR 也参与发育中的髓样细胞的 黏附,可能也参与发育中的淋巴样细胞的黏附(图 15.2)。迟现抗原-4(VLA-4)可能是 EbR 的配体。唾液酸黏附素的配体包括发育中的粒细胞和淋巴细胞亚群上的 CD43。唾液酸黏附素簇集于基质巨噬细胞和髓样细胞间的接触点,而非基质巨噬细胞和红细胞样细胞间的接触点。趋化因子能诱导白细胞细胞间黏附分子(ICAM)和 CD43 等的极化表达,但配体分布的改变对巨噬细胞和造血细胞间相互作用的意义还不得而知。尽管基质中的纤维母细胞与血细胞更早期的祖先及巨噬细胞相伴随,但在细胞进入血流前,未成熟细胞与基质巨噬细胞的黏附在其发育中间阶段的调节中可能起着一定的作用。哺乳动物红细胞丢弃的细胞核很快便被基质巨噬细胞吞噬,参与结合和吞噬的受体未知。巨噬细胞也吞噬骨髓中产生的凋亡造血细胞,包括大量的髓样细胞和 B 细胞。我们对在这种复杂环境中运作的胞膜分子和细胞因子信号知之甚少,但基质巨噬细胞明显是造血微环境中被忽视了的成分。

537

胸腺

除了能去除凋亡胸腺细胞这一显著的能力外,巨噬细胞在胸腺细胞阳性和阴性选择中的可能作用几乎已被完全忽视了;更多的则是对局部树突细胞的注意,树突细胞可能来自淋巴样前体而非髓样前体。具有特定特性的成熟巨噬细胞存在于皮质和髓质中。具有增殖能力的胸腺细胞和巨噬细胞群可通过胶原酶消化和附着于基底层的方法从年幼动物的胸腺分离获得(图 15.2)。负责簇形成的非吞噬细胞性黏附受体在胸腺巨噬细胞的表达比在其他吞噬细胞的表达高得多,但它们的性质还不清楚(N. Platt,未发表的观测结果)。这些巨噬细胞也表达 MHC Ⅱ类抗原和其他受体,如参与凋亡胸腺细胞吞噬的清除剂受体 A。F4/80 抗原等

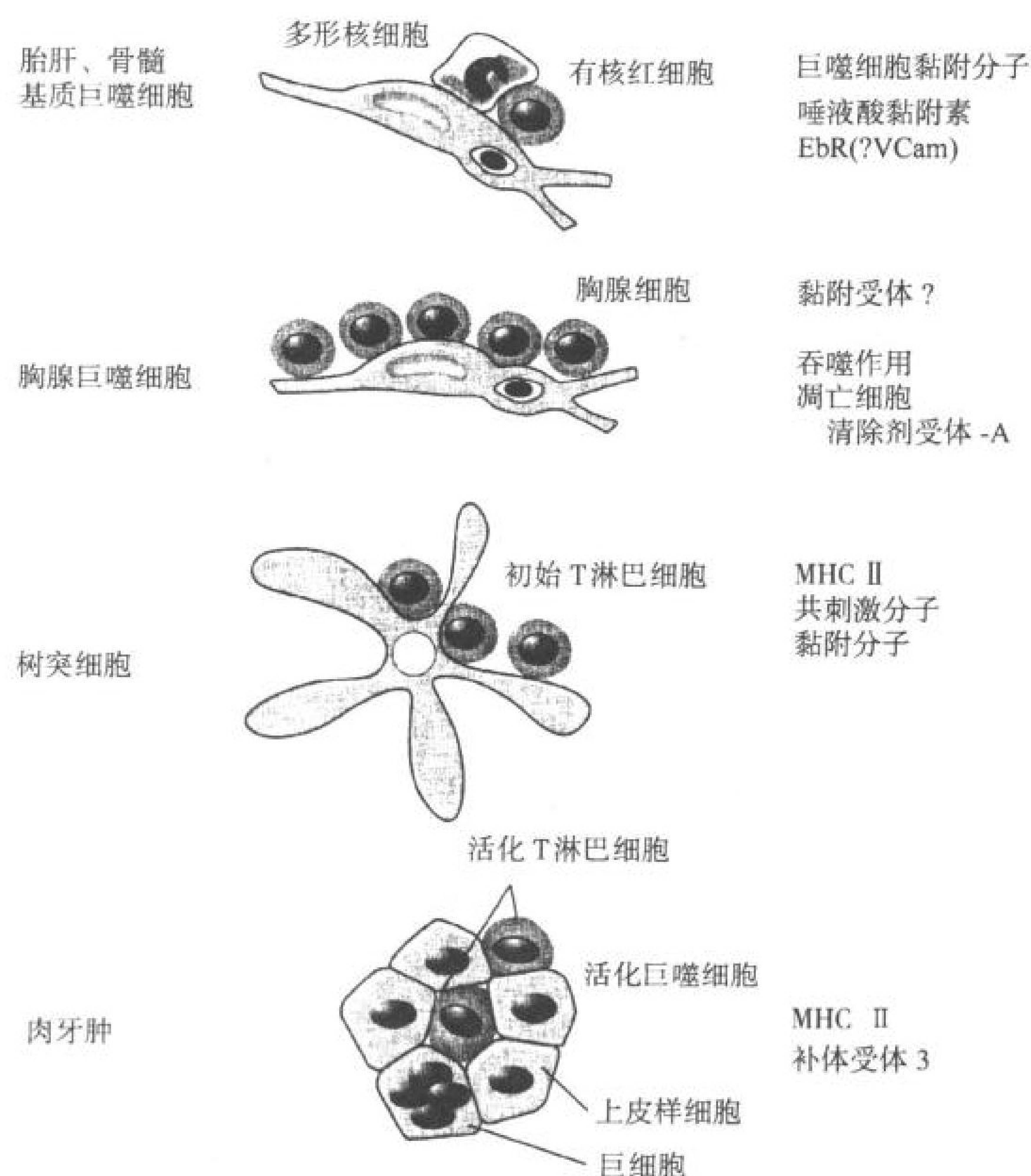


图 15.2　组织巨噬细胞和其他造血细胞的联系，以共同的变化为例。

其他标记在原位极少被表达，但细胞分离后却容易被检测到。胸腺巨噬细胞与其他一些组织巨噬细胞亚群的显著不同是其对集落刺激因子-1的不依赖；集落刺激因子-1缺陷的op/op小鼠缺乏破骨细胞和某些巨噬细胞群(包括单核细胞、腹膜细胞和库普弗细胞)，但有正常数量的胸腺巨噬细胞以及树突细胞和存在于其他部位的特定的巨噬细胞。与胸腺巨噬细胞结构性募集有关的因数还不清楚。电离辐射或糖皮质激素诱导胸腺细胞死亡后，具强烈吞噬功能的巨噬细胞大量出现；但以什么比例局部出现、以什么比例通过募集出现尚未得知。

538

脾

就巨噬细胞而言，脾可能是全身最复杂的器官。脾参与造血作用。在某些物种中，脾的造血作用在其出生后持续存在或由于需求的增加而被诱导，在它们自然生命的最后阶段，脾参与所有血液成分的更新。另外，脾能过滤大部分心脏总输出，从血流中捕获微粒和其他抗原性物质，在先天和获得性体液和细胞免疫中起着重要的作用。脾富含组织学定位、表型、寿命和功能各不相同的巨噬细胞亚群(图15.3)。巨噬细胞在抗原捕获、降解、运输及呈递给T淋巴细胞和B淋巴细胞中处于中心地位，实际上是促进抗菌抵抗。由于免疫系统成熟后，其他造血和二级淋巴器官能替代上述许多功能，因此脾的这些独特特性首先是在未成熟机体和对复杂多糖的免疫应答中被认识的。成人脾切除使机体容易被肺炎球菌等病原菌感染，病原菌含富含糖类的荚膜抗原；特别是脾的边缘区可能在此方面起着重要的作用。

根据巨噬细胞在红髓或白髓及在边缘区的定位，它们在未受刺激的成年小鼠脾中的特性极为不同。巨噬细胞与特定的管道系统密切相关。种间脾解剖学差异已为人们清楚认识，但人类和已研究的啮齿动物的巨噬细胞有着广泛的共性。巨噬细胞亚群、树突细胞(髓样和淋巴起源的)和混合表型细胞已通过原位分析

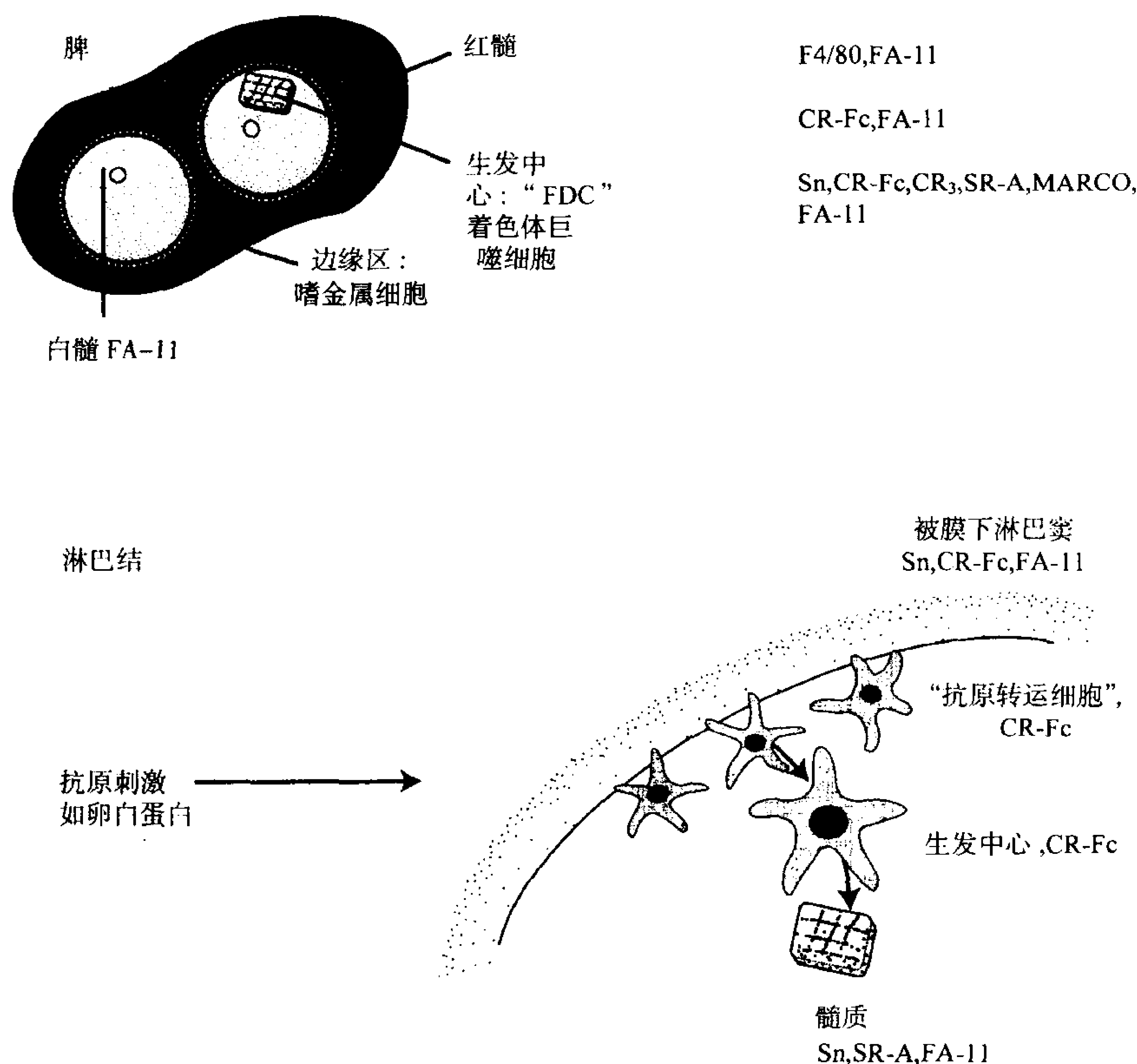


图 15.3　脾、静止的和抗原刺激后淋巴结中的巨噬细胞微管蛋白。见标记和详细内容正文。

抗原标记、毒性脂质体消耗研究、多种多样的免疫和感染方案及最近的细胞因子和受体基因 KO 小鼠模型而被定性。研究结果提出了有关细 胞产生、募集、分化、迁移及在不同的脾微环境中死亡的动力学和分子基础的问题。在研究巨噬细胞亚群的体外特性与体内特性的关系中，细胞分离方法仍是原始的，对将来提出了重要的挑战。脾结构、树突细胞来源和功能、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的诱导及分化的详细情况在本书的其他章节描述。我将特别讲述正常免疫反应器官中的巨噬细胞的一些性质。

539

边缘区巨噬细胞

脾边缘区是由定居细胞(网状和其他纤维母细胞，内皮)、巨噬细胞、树突细胞和淋巴样细胞所构成的复杂混合物所组成，包括 B 淋巴细胞亚群。它构成了脾与循环间的重要交界面。循环直接将细胞、微粒或可溶性分子带到边缘窦，或通过红髓进入边缘窦。定居巨噬细胞作为特定的嗜金属性细胞存在于内边缘区，其他巨噬细胞则在外边缘区，后者可能具有更强的吞噬功能。与红髓的弱表达及白髓的完全缺失相比，唾液酸黏附素被边缘区嗜金属细胞强效表达(表 15.1)。小鼠出生后 2～4 周，随着白髓的形成，唾液酸黏附素阳性细胞出现于脾边缘区。含细胞毒性药物氯屈膦的脂质体能被运输到全身，使唾液酸黏附素阳性细胞和其他巨噬细胞耗竭；脾中不同巨噬细胞亚群的恢复发生在不同的时间，这已被用于将它们的再现与不同的免疫功能联系起来。边缘区巨噬细胞缺乏 F4/80，但表达红髓巨噬细胞上不存在的 CR3。边缘区巨噬细胞表达其他吞噬细胞性受体，如更广泛地存在于组织巨噬细胞的 SR-AM 和巨噬细胞受体胶原(macrophage receptor collagenous，MARCO)结构域，MARCO 是一种几乎只存在于边缘区巨噬细胞的独特的胶原清除剂受体。这些模式识别受体的结构及在微生物摄取中的可能作用将在后文讨论。最近的研究显示，还未在原位定位的巨噬细胞凝集素可能参与运送甘露糖化配体到白髓免疫应答位点。MR 含一高度保守的、富含半胱氨酸的结构域，该结构域不直接参与甘露糖酰识别，能与边缘区嗜金属性巨噬细胞上的一个配体强烈作用，其本身可能就是

唾液酸黏附素；用MR的富含半胱氨酸结构域与人Fc(CR-Fc)的嵌合探针，通过组织切片和脾配体的免疫化学分析已证实了这一点。免疫后，探针又标记胚芽中心FDC网络中的未知细胞及着色体巨噬细胞。可能边缘区巨噬细胞能被诱导而迁移进白髓；也可能它们能将可溶性MR-糖蛋白配体复合物脱落、传递给$CR\text{-}Fc^+$细胞，$CR\text{-}Fc^+$细胞可能是其他的定居或新近募集的单个核细胞。用op/op小鼠和实验产生的KO小鼠所作的实验显示，边缘区嗜金属性巨噬细胞群的出现依赖克隆刺激因子-1和肿瘤坏死因子受体家族成员。

白髓巨噬细胞

F4/80抗原在表达FA-11(巨噬细胞相关唾液酸糖蛋白，CD68的小鼠同源物)的小鼠白髓巨噬细胞上明显缺失。与树突细胞相比，具活跃吞噬功能的巨噬细胞大量表达这种胞内糖蛋白。尽管还不知道是否有细胞迁移到白髓或被吞噬物的传递及以前的定居巨噬细胞的再活化，但摄取外源颗粒(如绵羊红细胞)或感染因子(如卡介菌、约氏疟原虫)后，白髓巨噬细胞变得更加突出。着色体巨噬细胞好像参与了凋亡B淋巴细胞的摄取和消化。

红髓巨噬细胞

红髓巨噬细胞大量表达F4/80抗原。在小鼠，红髓巨噬细胞还包括参与造血的基质型巨噬细胞。衰老红细胞的大量吞噬导致胆色素和铁蛋白的堆积。各种吞噬细胞性受体在红髓巨噬细胞清除宿主细胞和病原体中所起的作用有待进一步的研究。

除趾状突树突细胞外，还没有巨噬细胞与$CD4^+$ T淋巴细胞在正常脾脏中直接联系的证据。例如，在被卡介菌或沙门氏菌等其他微生物感染后，巨噬细胞大量募集并在局部产生，其中有许多与T淋巴细胞发生联系。新形成的肉芽肿通常首先出现在边缘区，感染扩散进白髓和红髓后，肉芽肿开始融合，脾的底层结构变得模糊或发生分裂。活化巨噬细胞在脾T细胞凋亡和清除中的可能作用还不清楚。

淋巴结

如图15.3所示，在淋巴结中，F4/80抗原的表达相对较弱，但存在巨噬细胞相关唾液酸糖蛋白(CD68)阳性细胞。被膜下淋巴窦与边缘区相似，含有唾液酸黏附素强阳性细胞；这是传入淋巴进入淋巴结的地方，含有来自朗格汉斯细胞的抗原和迁移树突细胞。淋巴结的髓质含有唾液酸黏附素阳性、$CD68^+$巨噬细胞，该细胞也表达高水平的清除剂受体A。与脾边缘区一样，被膜下巨噬细胞能被CR-Fc探针强标记。初次或再次免疫后，染色进一步深入皮质，最终在生发中心浓集。此过程的动力学强烈提示，有与前述抗原运输细胞相似的巨噬细胞相关细胞的运输过程的存在。$CR\text{-}Fc^+$细胞可通过淋巴结消化分离，并能与$CR\text{-}Fc^-$细胞一起形成细胞丛。过继转移显示，FACS分离的$CR\text{-}Fc^+$细胞在归巢到T细胞区的能力方面与树突细胞相似；在此条件下，它们不归巢到生发中心(M. Kosco-Vilbois &L. Martinez-Pomares，未发表的观察资料)。总之，在参与抗原捕获、运输及向T细胞和B细胞传递的迁移抗原呈递细胞群中有着相当大的异质性，这可证明：在对免疫刺激物(特别是颗粒状免疫刺激物)的应答中，特定的组织巨噬细胞及髓样树突细胞能发生迁移。

540

派尔集合淋巴结

尽管未研究透彻，但派尔集合淋巴结中的巨噬细胞与脾、白髓及其他富含T细胞区中所描述的$CD68^+$ $F4/80^-$细胞相似。它们被恰当放置以便与通过穹隆中特定上皮巨噬细胞摄取的肠源抗原和病原体相互作用，并将抗原转移到输入淋巴管。这些巨噬细胞与胃肠道中所发现的大量的$F4/80^+$细胞明显不同，可能参与黏膜免疫的诱导。

非淋巴样器官

局部$F4/80^+$ $CD68^+$巨噬细胞在肝(库普弗细胞)、真皮、神经内分泌和再生器官中已被详细描述，在这些器官中，它们能对全身和局部刺激物起反应。在肺脏，肺泡巨噬细胞呈CD68强阳性，但F4/80却为弱阳性，它们与间质巨噬细胞和上皮内树突细胞明显不同。另外，在整个结缔组织及心脏、肾和胰腺等器官的间质中都发现了定居巨噬细胞。由于所在的局部微环境不同，这些细胞变化很大(如在中枢神经系统中，神经毡中

的小胶质细胞与脑膜或脉络丛中的巨噬细胞显著不同)。在脑中,由于血管周围的巨噬细胞表达内吞受体(如清除剂受体 A)及 MHC Ⅰ类抗原和Ⅱ类抗原,因而有别于定居小胶质细胞。小胶质细胞是单核细胞起源的、高度分支的终末分化细胞,它们的许多巨噬细胞标记都下调;其表型受血-脑屏障影响,在室周器中通常缺乏,且炎症刺激可破坏它们。小胶质细胞能被局部的脂多糖和神经毒素再次活化,从而很难与新募集的单核细胞区别。新募集的单核细胞一旦进入脑实质便获得小胶质细胞特性。许多组织巨噬细胞中的静止小胶质细胞与众不同,它们表达高水平的 CR3,通过诱导 DNA 合成和凋亡对单克隆抗体等 CR3 配体作出应答。在中枢神经系统中, CR3 的天然配体还不清楚。

炎症刺激物和免疫刺激物引起的增强的单核细胞募集:体内活化

对局部组织和血管变化的应答,部分是由定居巨噬细胞在被炎症刺激物和免疫刺激物活化或再次活化过程中引起的。在此应答中,单核细胞以更大的数量从骨髓和血液被募集到应答局部;它们渗出血管,分化成巨噬细胞。当它们进入组织时,其效应功能发生了改变。根据产生条件的不同(一种是在缺乏 γ 干扰素的情况下,另一种是暴露给 γ 干扰素后的免疫活化),可将这些巨噬细胞进行分类。募集的增强也涉及其他髓样或淋巴样细胞;细胞应答的选择性有赖于引起免疫应答的刺激物的性质(有免疫原性或无免疫原性)、所产生的趋化因子和不同的白细胞表达的受体。巨噬细胞和其他细胞产生一系列不同的趋化因子,表达 G 蛋白偶联趋化因子受体。趋化因子,特别是在被锚定到基质和黏多糖时,也在骨髓腔隙中起作用,并可表现出其他生长调节功能。固定于局部的趋化因子或可溶性趋化因子既诱导循环白细胞上黏附分子的表面表达和活性,也引导循环白细胞穿过内皮到内皮外的迁移。从外周到中枢及骨髓基质内的反馈机制也许依赖于巨噬细胞炎性蛋白 1a(MIP1a)和粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等细胞因子和生长因子,它们分别抑制或增强单核细胞的产生。最初通过研究有先天性缺陷的人及在实验动物模型中使用抑制性抗体所确定的黏附分子参与单核细胞募集,与多形核细胞(PMN)和淋巴细胞的黏附分子重叠,这些黏附分子包括 L 选择素、β2 整合素、特别是 CR3 及 CD31(一种免疫球蛋白超家族分子);其他结合活化内皮的单核黏附分子包括 CD44、血管细胞黏附分子、β1 整合素和新近描述的受体。单核细胞在无炎症刺激物存在情况下进入正在发育的和成熟组织中并成为其组成成分的机制还不清楚。

新近募集的单核细胞一旦离开循环,其迁移和分化就少为人知。它们能进入所有组织,在细胞因子及与内皮细胞、白细胞和其他局部细胞表面相互作用的影响下,其膜分子和分泌潜能会发生改变。下面将提及的表型改变已被一系列体外和体内研究所定性。研究清楚的例子包括鼠腹膜巨噬细胞:巯基盐酸酯肉汤或生物凝胶聚丙烯酰胺珠激发的定居巨噬细胞和卡介菌感染引起的免疫活化巨噬细胞。后者提供了实体器官中肉芽肿形成的一个有用的模型,但不能完全模拟与肺结核杆菌感染有关的人肉芽肿的形成。肉芽肿巨噬细胞的更新和免疫效应功能各异,并呈现相当大的异质性;病灶含有新募集的单核细胞、成熟上皮巨噬细胞(被描述为分泌细胞)和朗格汉斯巨细胞。当肉芽肿发展、痊愈和分解(图 15.2)时,巨噬细胞与 T 淋巴细胞、其他髓样细胞、树突细胞、纤维母细胞和微生物的相互作用形成细胞的动态组合。巨噬细胞和其他细胞的凋亡、坏死促进后续募集与局部增殖的平衡。尽管巨噬细胞的移入已清楚,如腹膜腔中激发的巨噬细胞活跃地移入引流淋巴结,但其从炎症部位的移出还不明显。

KO 基因模型已证实了前述分子在募集、活化和肉芽肿形成中的作用。包括上面所列黏附分子、黏附分子配体(如细胞间黏附分子-1)、关键细胞因子(如 γ 干扰素、白细胞介素-2 和肿瘤坏死因子-α)及其受体。由活性氧、氮代谢物的产生所引起的抗微生物抵抗和巨噬细胞细胞毒性,可通过吞噬细胞氧化酶和可诱导的氧化氮合酶(i-NOS)的敲除来研究。巨噬细胞和其他细胞所表达的免疫上重要的膜分子的敲除包括 MHC Ⅰ类和Ⅱ类分子、CD4 和 CD4 配体、其他辅助分子(如 B7-1 和 B7-2)和巨噬细胞限制性胞内分子 N-ramp。

541

体外已被证实而下文将讨论的巨噬细胞 Th1 和 Th2 型调节潜能可导致原位巨噬细胞表型的异质性,这种异质性是高度复杂的且通常是同时存在的(图 15.4)。尽管几乎所有的肉芽肿巨噬细胞都表达溶菌酶,但仅有少数表达细胞因子,如白细胞介素-1β、白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子-α。通过产生白细胞介素-12、γ 干

扰素诱导因子(白细胞介素-18)、白细胞介素-10和转化生长因子-β,巨噬细胞和其他来源的细胞可完成巨噬细胞活化与灭活的体内平衡。

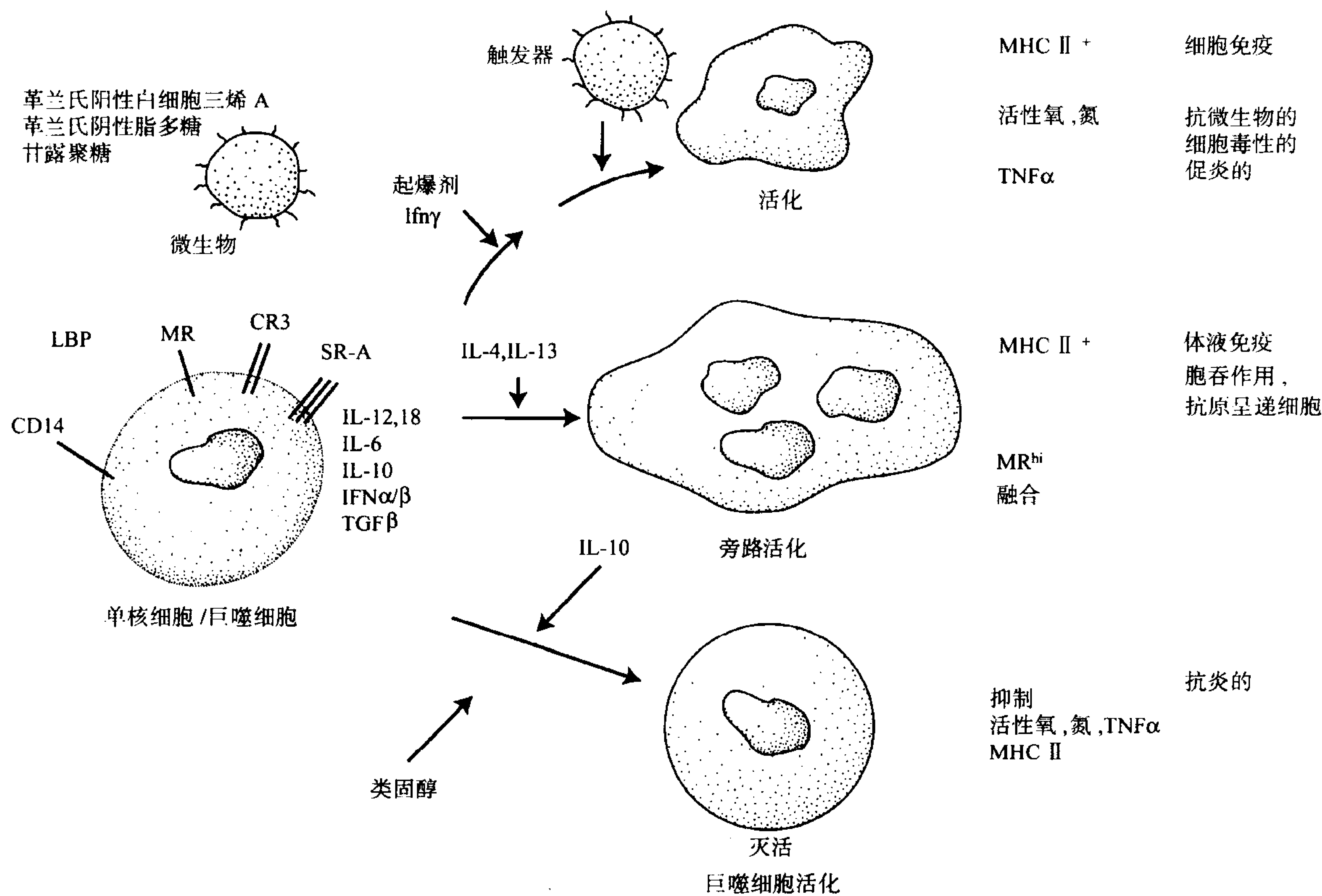


图15.4 巨噬细胞活化。微生物刺激物和细胞因子的作用。

除前文简述的局部相互作用外,巨噬细胞还通过产生循环细胞因子,如白细胞介素-6,以及花生四烯酸和其他来自脂质的代谢物来调节宿主对免疫刺激物和感染性刺激物的全身反应。这些物质穿过血-脑屏障,作用于神经和内分泌中心,或由反应性小胶质细胞和巨噬细胞局部产生。糖皮质激素是强效免疫调节剂,构成调节网络的一部分,该网络可能通过循环介质,如转移抑制因子,影响巨噬细胞。巨噬细胞也含有与类固醇生物合成和分解有关的强效酶。

尽管巨噬细胞所诱导应答的免疫学相关性似乎是明显的,但许多方面仍不清楚。如,巨噬细胞是积极破坏活化T淋巴细胞来参与免疫应答和外周耐受的调节呢,还是消极清除即将死亡的细胞?巨噬细胞是在移入二级淋巴器官前参与炎症部位树突细胞的募集、分化和死亡吗?佐剂刺激后巨噬细胞与B淋巴细胞相互作用、引导它们移入生发中心吗?活化巨噬细胞通过不同的Fc受体、补体受体与抗体、补体的相互作用参与精细调节体液应答吗?活化巨噬细胞本身能杀伤被感染的宿主细胞吗?它们为自然杀伤细胞和细胞毒性T细胞的攻击提供靶分子的程度又如何呢?一系列实验模型和疾病过程的体内研究即将产生新的见解,并扩展和证实体外已确定的机制。

吞噬识别与细胞内感染

免疫应答的启动和局限有赖于巨噬细胞和其他细胞对外源或自身改变了的颗粒因子或可溶性蛋白的识别。巨噬细胞和树突细胞的吞噬和胞吞识别依赖于与一系列相关配体相互作用的调理性(主要是抗体和补体)和非调理性识别受体。先天性应答和获得性应答由此被联系起来。不同的Fc受体参与目标物质的摄取

和破坏及效应功能的阴性调节。补体受体也是异质的。补体受体3(CR3)与经典或旁路途径活化形成的、来自C3的配体相互作用,调节吞噬作用、细胞转移和活化。其他配体包括细胞间黏附分子。通过整合素、其他黏附分子和炎症刺激物,CR3的功能 为纤连蛋白所调节。Fc受体的结合和交联激活吞噬作用所必需的酪氨酸激酶,如syk。与Fc受体不同,对CR3的信号传导了解较少,CR3信号传导不能触发呼吸爆发或花生四烯酸释放,因此有利于病原体进入。尽管感染的增强也能在巨噬细胞中发生,但抗体介导的摄取将微生物或可溶性抗原靶向不同的降解部位,通常导致对它们的中和和破坏。例如,在有特异性抗体存在时,黄病毒感染能引起登革热出血性休克综合征。无论有无补体,免疫复合物都局限抗原到FDC和其他FcR^{+} CR^{+}细胞。巨噬细胞自身能在局部产生相当数量的补体级联的所有成分,它们可能较少受肝细胞所生成的循环蛋白的影响。

直接与微生物上配体作用的非调理性受体包括CR3、凝集素(特别是MR)、清除剂受体SR-A和MARCO(图15.4)。MR存在于巨噬细胞、树突细胞和窦状隙内皮上。它们介导吞噬作用和包括巨噬吞饮作用的胞吞作用,在结构上与存在于树突细胞、组织巨噬细胞和胸腺上皮细胞上的另一种多凝素(Dec 205)相似;后者的糖识别还未证实。MR有8个与甘露糖结合蛋白(MBP,一种循环的、来自肝细胞的急性期反应物)同源的C型凝集素结构域。甘露糖结合蛋白的每个多肽都含一个单独的外源凝集素结构域,和其他集合素一样,它们寡聚化,完成多价相互作用,通过相关丝氨酸蛋白酶激活补体。MR在巨噬细胞上的表达分别选择性受γ干扰素和白细胞介素-4/13的下调和上调。在二级淋巴器官中,富含半胱氨酸的结构域在免疫原性糖肽的转运中的可能作用还未被注意。

清除剂受体A介导修饰后蛋白(如乙酰化脂蛋白)和所选多聚阴离子(如脂多糖和脂磷壁质酸)的胞吞作用。此外,它能起黏附分子作用,促进凋亡胸腺细胞和革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌的吞噬清除。CD36(血小板反应蛋白受体)、玻连蛋白素受体和CD44也已参与巨噬细胞对衰老多形核细胞的摄取。尽管巨噬细胞清除剂受体A在免疫诱导中的作用还未得到证实,但在清除剂受体A KO小鼠中所作的研究已揭示了清除剂受体A在免疫活化巨噬细胞限制肿瘤坏死因子α产生中的重要抑制作用。卡介菌预处理后的野生型小鼠产生富含清除剂受体A^{+}巨噬细胞的肉芽瘤;清除剂受体A KO小鼠限制这种组织的生长,形成含MHC $Ⅱ^{+}$活化巨噬细胞的正常肉芽瘤;当另外施以脂多糖时,KO小鼠的死亡大约是野生型小鼠的10倍。由于通过CD14的无拮抗触发,循环中的肿瘤坏死因子α水平明显增加。CD14是脂多糖结合蛋白的受体,由于阻断了抗肿瘤坏死因子单克隆抗体对这些小鼠的保护,从而促进感染性休克。

这些非调理性受体的天然微生物配体仍为确定;尽管每种受体只参与总结合的部分结合,但各自都能介导对微生物的结合和摄取。颗粒摄取涉及细胞骨架、大量的胞膜流动、重塑和多种浆膜受体。吞噬体的形成和成熟与胞吞摄取相似:启动巨噬细胞泡囊运行和再循环、与溶酶体融合、酸化、离子流动和消化。GTP结合蛋白和复合物信号传导级联在这些动力学事件中起着重要的作用。需要解决的关键问题是细胞和受体功能是如何被调节的,从而使得对微生物的吞噬或微生物入侵与凋亡细胞的摄取不同,能诱导炎症应答。肽抗原在抗原呈递细胞空泡囊和胞质囊中的MHCⅡ生物合成、亚细胞定位和蛋白分解加工在本书的其他地方讨论(见第9章)。细胞因子,特别是白细胞介素-4/13、白细胞介素-10和γ干扰素,通过MR依赖性和非依赖性途径影响胞吞作用,并选择性改变泡囊动力学。

病原体在利用巨噬细胞质膜分子进入细胞及修饰由此而产生的吞噬体膜成分方面各不相同。例如,分枝杆菌利用一系列机制来逃避巨噬细胞的杀伤,包括吞噬体的延迟成熟、吞噬体与溶酶体融合的抑制和酸化的抑制。单核细胞增多性利斯特氏菌通过破坏吞噬体膜逃入细胞液,而利什曼原虫在吞噬溶酶体中繁殖。体液(抗体和补体)和细胞(γ干扰素)机制通过转移到溶酶体克服巨噬细胞的寄生虫感染或通过氧/氮依赖性机制和其他机制诱导杀伤。

关于吞噬作用、胞内感染和免疫应答的主要的未解决的问题依然存在。颗粒抗原和微生物因子如何诱导T细胞应答？巨噬细胞、树突细胞、高效和最低效吞噬细胞对这一过程的相对贡献是什么？什么决定总抗原降解和MHC分子装载间的平衡？发生在胞内病原体和宿主巨噬细胞间的相互作用是什么,特别是微生物

的营养需求量？病原体分泌产物在空泡周围、细胞器(如内质网和线粒体)募集及在对宿主细胞生物合成影响中的作用是什么？巨噬细胞的胞内杀伤机制是什么？微生物如何能在巨噬细胞内存活或潜伏？最后，诱导巨噬细胞分子(如指导后续特异性免疫应答的白细胞介素-12)分泌的特异性受体介导的信号是什么？

基因表达与分泌

表面和细胞内刺激后，成熟巨噬细胞能分泌多种多样的高、低分子质量产物。这些产物包括与抗微生物抵抗有关的酶(溶菌酶)、中性蛋白酶、促成炎症和组织修复的花生四烯酸代谢物、调节其他白细胞和内皮活性的白细胞介素-1 和 α 干扰素等细胞因子、与宿主防御有关的活性氧和氮中间物。促炎细胞因子解释了免疫佐剂在促进、扩大和维持体液应答中的部分效应。刺激后巨噬细胞释放这些产物的能力有赖于巨噬细胞的先前史；无论是常驻的、募集的或活化的巨噬细胞，它们都会遇到其附近环境中的微生物细胞壁产物(包括脂多糖)，并暴露给细胞因子和其他免疫调节分子。特异性受体结合诱导各种各样的信号传导通路，并能选择性改变巨噬细胞的基因表达。转录因子，如 NF-κB 和 Pu-1 家族，在基因表达中参与巨噬细胞限制性转变或活化依赖性转变。此外，产物表达还有赖于翻译调节、蛋白水解加工等翻译后修饰和抑制剂的共表达，如白细胞介素-10。由于特异性 3′端不稳定序列的存在或缺失，不同产物的信使 RNA 变化很大。许多巨噬细胞产物是不稳定的，在细胞附近起作用；生产过剩导致组织分解及与广泛感染或慢性炎症有关的全身效应，这些全身效应通常是由免疫性疾病过程所致。

543

尽管大部分生物活性已在体外被详细说明，但有证据表明，巨噬细胞的原位分泌活性可能是完全不同的；溶菌酶产物是所有培养巨噬细胞所特有的，但在体内，该物质在大部分定居细胞上却被下调并有赖于免疫刺激物或吞噬细胞刺激物的诱导。人溶菌酶转基因 5′端启动子序列已被用于研究报告分子的组织特异性和巨噬细胞活化特异性体内表达。在适当的时候，其他巨噬细胞限制性分子的启动子可使精确指导巨噬细胞生物合成活性成为可能，以增强或抑制免疫应答。

巨噬细胞活化的体外调节

我们对巨噬细胞活化的理解来自 MHCⅡ类抗原的诱导研究；来自蛋白酶、肿瘤坏死因子 α、活性氧中间物和活性氮中间物释放等效应功能的诱导研究；来自 MR 等膜受体表达的诱导研究；及对感染性因子(如分枝杆菌、利斯特氏杆菌、假丝酵母和人免疫缺陷病毒)的抵抗的诱导研究。可推而广之，但必须记住，微生物逃避或幸免于巨噬细胞限制机制以及以各自的方式与巨噬细胞相互作用的能力颇为不同。

图 15.4 列举了由微生物、细胞和细胞因子相互作用引起巨噬细胞活化的各种不同途径。知识主要基于体外实验和所选动物模型的体内接种。各细胞因子(γ 干扰素、白细胞介素-10 和白细胞介素-4/13)对特定巨噬细胞(鼠腹膜巨噬细胞和人单核细胞起源的巨噬细胞)所起作用的分析显示三种特异的、不同的、与活化谱交叉的体外表型。γ 干扰素、γ 干扰素自身产物和通过白细胞介素-12 或 IGIF (白细胞介素-18) 的扩增在 MHCⅡ诱导、增强的抗微生物抵抗及 Th1 型应答所特有的促炎细胞因子产生中起着中心作用。相反，白细胞介素-10 在诱导其他巨噬细胞基因的选择性表达的同时，抑制活化标记。巨噬细胞/抗原呈递细胞与 Th2 型应答间关系的鉴定已证明是令人难以理解的。白细胞介素-4 和白细胞介素-13 间有紧密重叠的功能，二者能在巨噬细胞中诱导与增强了的抗原呈递功能和体液应答相一致的另一种活化表型。在本章中，尽管我将不讨论极化后 Th1 和 Th2 型应答，但可能通过使用所述标记将其分为相似的 M1 和 M2 型巨噬细胞表型。将白细胞介素-4 和白细胞介素-13 对巨噬细胞免疫特性的调节与白细胞介素-10 对促炎和细胞毒性功能的灭活和抑制区分开来也是重要的。来自巨噬细胞自身、活化 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞及其他细胞(自然杀伤细胞和内皮细胞)的细胞因子间的相互影响导致相应的阳性或阴性相互作用，导致活化和抑制信号中的时间依赖性改变。由体外研究所得到的一些预测可扩展到整个宿主。例如，在动物模型和人体中，γ 干扰素和白细胞介素-12 缺乏导致对条件致病菌限制的无能；i-NOS 对抵抗一系列感染因子是重要的。另一方面，白细胞介素-10 缺乏导致过度的 Th1 依赖性炎症(如在消化道中)。由于白细胞介素-13 模拟白细胞介素-4 的许

多作用,因此白细胞介素-4缺乏在体内对巨噬细胞表型的影响很小。这些细胞因子有共同的受体亚单位,研究对白细胞介素-4和白细胞介素-13缺乏应答能力的KO小鼠巨噬细胞将是有趣的。

上述分析过于简单。与细胞因子单独对巨噬细胞的影响的总和相比,细胞因子的联合对巨噬细胞有不同的影响。例如,白细胞介素-4和粒-巨噬细胞集落刺激因子的联合诱导人单核细胞分化为未成熟的树突细胞,而各自单独使用却诱导有不同巨噬细胞特性的细胞。此外,一种特殊的Th2型细胞因子,如白细胞介素-10,对于抗微生物(i-NOS依赖的)杀伤和巨噬细胞抗HIV活性能显示出完全不同的影响,抗微生物杀伤被明显抑制,而巨噬细胞抗HIV活性则被增强。虽然γ干扰素和白细胞介素-4对MR表达和酵母的吞噬起相反作用,但它们联合时能协同作用,明显增强摄取。细胞因子的其他组合,如αβ干扰素和γ干扰素联合,能彼此对抗,推测它们的对抗可能是通过竞争信号传导通路。虽然在有些情况中,可用预测值推断体内复杂免疫环境中的巨噬细胞行为,但巨噬细胞的许多行为仍有待发现。

结论及一些遗留问题

巨噬细胞影响输入和输出支中参与免疫的所有其他细胞,并对它们作出应答。许多介导特定功能的分子现在已被确定,但它们在巨噬细胞内及在细胞相互作用中的作用通常却很少被了解。在多细胞生物进化过程中,巨噬细胞在B淋巴细胞和T淋巴细胞的免疫特异性、克隆型应答出现前就发育形成了。与辅助性T淋巴细胞平行,巨噬细胞自身多样化,产生树突细胞作为初始T淋巴细胞的特定抗原呈递细胞,并对不同的$CD4^+$ $CD8^+$活性T细胞应答,产生一系列的效应细胞表型。巨噬细胞及其衍生细胞与胎肝和骨髓中正在分化的造血细胞、正在发育的胸腺细胞、免疫诱导过程中的初始$CD4^+$ T淋巴细胞和抗原、肉芽肿形成中的活化T细胞及微生物病原体集结在一起(表15.2)。另外,在抗原刺激后B淋巴细胞的扩增、多样化和凋亡过程中,巨噬细胞常与它们在一起。主要的挑战将是确定巨噬细胞用于区分活细胞和即将死亡的细胞的特异性和辅助性表面分子的作用,及揭示在不同的免疫细胞相互作用中控制巨噬细胞活性的内因和外因。

随着我们对巨噬细胞的特化和适应的更充分的理解,我们对巨噬细胞和树突细胞在免疫调节中的多种作用的了解也将发展。巨噬细胞免疫学中的主要问题仍是模糊不清和有趣的,需进一步调查。

① 除宿主防御和免疫外,巨噬细胞在内环境稳定中显示广泛的作用,这可能是在保持宿主完整性中的一个更普遍作用的一个特例,可与中枢神经系统和内分泌系统相比。它们的差异、可塑性和应答为生物学家提出了明显的问题。特别是,它们在发育及在不同器官内营养性相互作用中的作用是什么?

544

② 巨噬细胞位于改变了的或非己的,特别是颗粒性抗原识别这一经典免疫学问题的中心。被不同的质膜受体(可直接区分的)识别的真正配体是什么?决定靶抗原的摄取是免疫沉默还是产生免疫的是什么?这些信息如何用于疫苗发展?

③ 一旦被活化,巨噬细胞就改变其能力来识别靶细胞,并直接或与抗体、补体及其他较少定性的调理素协同破坏靶细胞。巨噬细胞能直接杀死病毒感染的细胞及其他免疫活化细胞吗?如果是这样,它们利用MHC匹配吗,即使在有限的程度上,它们促进耐受吗?它们通过执行抑制功能的失败暗中促进自身免疫吗?

④ 巨噬细胞大量出现于不能进行免疫应答部位的一个特例是胎儿胎盘单位。集落刺激因子-1在局部被高水平产生;这使巨噬细胞灭活或使它们转换而执行营养作用吗?富含巨噬细胞的肿瘤采用相似的策略吗?

⑤ 尽管巨噬细胞表达大量的与持家功能有关的基因,并和有限的细胞类型共同表达其他基因,但它们也表达担负独特功能的高度受限的分子。这些能被用来在预定时间将巨噬细胞特异性基因靶向选定的组织学部位以传递功能明确的信号吗?技术正逐渐可用于至少实现其中的一部分,将对巨噬细胞在免疫中的多种作用提供新的理解。

致谢

我感谢我的实验室成员的讨论，感谢 Christine Holt 准备手稿。在作者实验室的研究受到联合王国医学研究委员会、Wellcome 信托、关节炎和风湿病研究委员会、英国心脏基金、美国组织细胞增多病协会和 GlaxoWellcome plc 的资助。

（贾正才 译）

参 考 文 献

Books

Beelen RHJ. The macrophage: Basic and clinical aspects. *Immunobiology* 1996;195: 401–664.

Gordon S. The myeloid system. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C, eds. *Weir's Handbook of Experimental Immunology,* 5th ed. Vol. IV. The Integrated Immune System. Boston: Blackwell Scientific, 1997:153–175.

Karnovsky MC, Bolis L, eds. *Phagocytosis—Past and Future.* New York: Academic, 1982.

Lewis C, McGee JOD, eds. *The Macrophage.* Oxford, England: IRL Press, 1992.

Metchnikoff E. *Immunity in Infective Disease.* Translated by Binnie FG. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1905.

Mims CA. *The Pathogenesis of Infectious Disease,* 2nd ed. London: Academic, 1982.

Phagocytosis. *Trends Cell Biol* 1995;15:85–142.

Tauber AI, Chernyak L. *Metchnikoff and the Origins of Immunology. From Metaphor to Theory.* Oxford, England: Oxford University Press, 1991.

Van Furth R, ed. *Mononuclear Phagocytes. Biology of Monocytes and Macrophages.* Dordrect, The Netherlands: Kluwer, 1992. (Also see earlier volumes of Leiden Conferences).

Zembala M, Asherson GL, eds. *Human Monocytes.* London: Academic, 1989.

Zwilling BS, Eisenstein, eds. *Macrophage-Pathogen Interactions.* New York: Marcel Dekker, 1994.

Selected Reviews

Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFNγ receptor: A paradigm for cytokine receptor signalling. *Ann Rev Imunol* 1997;15:563–591.

Bacon KB, Schall TJ. Chemokines as mediators of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;109:97–109.

Clarke S, Gordon S. Myeloid-specific gene expression. *J Leukoc Biol* 1998; 63:153–168.

Crocker PR, Hartnell A, Munday J, Nath D. The potential role of sialoadhesin as a macrophage recognition molecule in health and disease. *Glycoconjugate J* 1997;14: 601–609.

Daeron M. Fc receptor biology. *Ann Rev Immunol* 1997;15:203–234.

Gordon S. Mononuclear phagocyte system and tissue homeostasis. In: *Oxford Textbook of Medicine.* Oxford, England: Oxford University Press, 1995:84–95.

Gordon S. My favourite cell: The macrophage. *Bioessays* 1995;17:977–986.

Gordon S. Overview: The myeloid system. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C, eds. *Weir's Handbook of Experimental Immunology,* 5th ed. Vol. IV. The Integrated Immune System. Chapter 153. Cambridge, MA: Blackwell Science, 1997:1–9.

Gordon S. Macrophage activation. In: *Encyclopaedia of Immunology,* 2nd ed. San Diego: Academic, 1998 (in press).

Gordon S, Clarke S, Greaves D, Doyle A. Molecular immunobiology of macrophages: Recent progress. *Curr Opin Immunol* 1995;7:24–33.

Gordon S, Hughes DA. Macrophages and their origins: Heterogeneity in relation to tissue microenvironment. In: Lipscomb M, Russell S, eds. *Lung Macrophages and Dendritic Cells.* New York: Marcel Dekker, 1997:3–31.

Gordon S, Keshav S, Stein M. BCG-induced granuloma formation in murine tissues. *Immunobiology* 1994;191:369–377.

Gordon S, Lawson L, Rabinowitz S, Crocker PR, Morris L, Perry VH. Antigen markers of macrophage differentiation in murine tissues. In: Russell S, Gordon S, eds. *Macrophage Biology and Activation (Current Topics in Microbiology and Immunology).* Vol. 181. Berlin: Springer-Verlag, 1992:1–37.

Greenberg S, Silverstein SC. Phagocytosis. In: Paul W, ed. *Fundamental Immunology,* 3rd ed. New York: Raven, 1993:941–964.

Kraal G. Cells in the marginal zone of the spleen. *Int Rev Cytol* 1992;132:31–74.

MacMicking J, Xie Q-w, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol* 1997;15:323–350.

Mahoney JA, Gordon S. Macrophage receptors and innate immunity. *Biochemist* 1998;20:12–16.

McKnight AJ, Gordon S. EGF-TM7: A novel subfamily of seven-transmembrane-region leukocyte cell-surface molecules. *Immunol Today* 1996;17:283–287.

McKnight AJ, Gordon S. Membrane molecules as markers of murine macrophage differentiation. *Adv Immunol* 1998;68:271–314.

Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9:4–9.

Pearson AM. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8: 20–28.

Perry VH, Andersson P-B, Gordon S. Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends Neurosci* 1993;16:268–273.

Pontow SE, Kery V, Stahl PD. Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 1992;137B:221–244.

Ravetch JV. Fc receptors. *Curr Opin Immunol* 1997;9:121–125.

Rollins B. Chemokines. *Blood* 1997;90:909–928.

Steinman RM, Moberg CL. Zanvil Alexander Cohn 1926–1993. An appreciation of the physician-scientist. The macrophage in cell biology and resistance to infectious disease. *J Exp Med* 1994;179:1–30.

Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by MØ during intracelullar infection (IL-10, IL-12, IFNγ). *Curr Opin Immunol* 1997;9:17–23.

Wiktor-Jedrzejczak W, Gordon S. Cytokine regulation of the MØ system using the colony stimulating factor-1 deficient op/op mouse. *Physiol Rev* 1996;76:927–947.

Selected Papers

Andersson P-B, Perry VH, Gordon S. The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues. *Neuroscience* 1992;48:169–186.

Bell MD, Lopez-Gonzalez R, Lawson LJ, et al. Upregulation of the macrophage scavenger receptor in response to different forms of injury in the CNS. *J Neurocytol* 1994;23:605–613.

Clarke S, Greaves DR, Chung L-P, Tree P, Gordon S. The human lysozyme promoter directs reporter gene expression to activated myelomonocytic cells in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:1434–1438.

Crocker PR, Mucklow S, Bouckson V, et al. Sialoadhesin, a macrophage-specific adhesion molecule for haemopoietic cells with 17 immunoglobulin-like domains. *EMBO J* 1994;13:4490–4503.

Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, et al. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcg receptors on macrophages. *J Exp Med* 1997;186:1027–1039.

Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bardley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-γ genes. *Science* 1993;259:1739–1742.

Doyle AG, Herbein G, Montaner LJ, et al. Interleukin 13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: Comparison with interleukin-4 and interferon γ. *Eur J Immunol* 1994;24:1441–1445.

Fraser IP, Hughes DA, Gordon S. Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor. *Nature* 1993;364: 343–346.

Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: The Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* 1997;185:717–730.

Havell EA. Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis. *J Immunol* 1987;139:4225–4231.

Haworth R, Platt N, Keshav S, et al. *The macrophage scavenger receptor type A (SR-A)* is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endo-

toxic shock. *J Exp Med* 1997;186:1431–1439.
Haziot A, Ferrero E, Kontgen F, et al. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 1996;4: 407–414.
Holness CL, da Silva RP, Fawcett J, Gordon S, Simmons DL. Macrosialin, a mouse macrophage restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family. *J Biol Chem* 1993;268:9661–9666.
Hutchings P, Rosen H, O'Reilly L, Simpson E, Gordon S, Cooke A. Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages. *Nature* 1990;348:639–642.
Keshav S, Chung L-P, Milon G, Gordon S. Lysozyme is an inducible marker of macrophage activation in murine tissues as demonstrated by in situ hybridization. *J Exp Med* 1991;174:1049–1058.
Kindler V, Sappino A-P, Grau GE, Piguet P-F, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 1989;56:731–740.
Lee S-H, Starkey P, Gordon S. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. *J Exp Med* 1985;161:475–489.
Martinez-Pomares L, Kosco-Vilbois M, Darley E, Tree P, Herren S, Bonnefoy J-Y, Gordon S. Fc chimeric protein containing the cysteine-rich domain of the murine mannose receptor binds to macrophages from splenic marginal zone and lymph node subcapsular sinus, and to germinal centres. *J Exp Med 1996;184:1927–1937.*
McWilliam A, Tree P, Gordon S. Interleukin-4 regulates induction of sialoadhesin, the macrophage sialic acid specific receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89: 10522–10526.
Morris L, Crocker PR, Gordon S. Murine foetal liver macrophages bind developing erythroblasts by a divalent cation-dependent haemagglutinin. *J Cell Biol* 1988;106: 649–656.
Morris L, Graham CF, Gordon S. Macrophages in haemopoietic and other tissues of the developing mouse detected by monoclonal antibody F4/80. *Development* 1991; 112:517–526.
Platt N, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S. Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:12456–12460.
Rabinowitz S, Gordon S. Macrosialin, a macrophage-restricted membrane sialoprotein differentially glycosylated in response to inflammatory stimuli. *J Exp Med* 1991; 174:827–836.
Reid DM, Perry VH, Andersson P-B, Gordon S. Mitosis and apoptosis of microglia in vivo induced by an anti-CR3 monoclonal antibody which crossed the blood-brain barrier. *Neuroscience* 1994;56:529–533.
Ren Y, Silverstein RL, Allen J, Savill J. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* 1995;181:1857–1862.
Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. IL-4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immune macrophage activation. *J Exp Med* 1992;176:287–293.
Witmer-Pack MD, Hughes D, Schuler G, et al. Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic [op/op] mouse. *J Cell Sci* 1993;104:1021–1029.

第16章 树突细胞

Ralph M. Steinman[①]

辅助细胞或专职抗原呈递细胞的重要性

547 多年来,主要组织相容性复合体(MHC)和抗原呈递一直是免疫学研究的中心课题。最初的研究发现,MHC是编码主要移植抗原的基因复合体,它们参与T细胞介导的移植排斥反应。随后发现,外源性蛋白抗原或自身蛋白抗原被处理成多肽后,与MHC分子结合,形成MHC-多肽复合物,呈递给T细胞受体(TCR)克

① R.M.Steinman: Laboratory of Cellular Physiology and Immunology, Rockefeller University, New York, New York 10021-6399.

隆或者被其识别,从而启动免疫应答或免疫耐受。

本章将从另一个角度来探讨抗原呈递的问题,或许最好将该角度称之为免疫应答性(immune responsiveness)。免疫系统中存在着一组独特的抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC),称为树突细胞(dendritic cell, DC)。其特点在于捕获抗原、启动T细胞免疫。不过,越来越多的文献提示,DC也可诱导T细胞耐受。

DC是当初为了理解什么是辅助细胞(accessory cell)时被发现的。在认识到T细胞识别呈递在MHC分子上的抗原片段之前,免疫学家试图在组织培养物中产生免疫应答。由于克隆选择学说认为抗原应该单单只是进行选择和扩增反应性淋巴细胞,因此认为这是异常困难的。然而实验中将纯化的淋巴细胞用抗原和有丝分裂原进行刺激后,获得了另外一些辅助细胞。研究辅助细胞所采用的主要研究系统是用小鼠脾脏淋巴细胞产生初次抗体应答(antibody response)[1]以及豚鼠[2,3]或者人[4,5]的细胞对蛋白抗原进行的再次应答(recall response)。 548

从几个不同的方面进行了辅助细胞的研究(表16.1)。辅助细胞除了将抗原加工成MHC分子上呈递的多肽外(第一信号),还表达多种可介导T细胞结合和共刺激的第二信号。它们大多是膜型糖蛋白,例如胞内的粘附分子(ICAM; CD50, CD54, CD102)、淋巴细胞功能相关抗原(LFA)(CD2, CD11a, CD58)和B7(CD80, CD86)。目前使用的"专职性APC"是指具有抗原呈递和辅助(共刺激)功能的细胞。

表16.1 辅助细胞的研究领域

抗原呈递的机制:摄取、处理、MHC-多肽复合物的形成
诱发免疫的黏附分子和共刺激分子
辅助细胞的不同类型
体内和病理状态下的抗原呈递
免疫耐受的途径

辅助细胞有多种类型,它们决定了免疫应答的质量和数量。DC在启动T细胞应答方面是非常强大的。T细胞一旦被激活后,与其他APC进行有效的相互作用。B细胞是惟一能产生抗体并呈递给T细胞的APC。巨噬细胞能增强抗微生物活性。虽然所有这些细胞都能呈递抗原,但免疫应答的特征依赖于APC的类型。

以前对辅助细胞的研究一直在组织培养物中进行,目前已经将研究重点转移到它在动物或人体内的功能研究上。功能研究包括以下几个方面:一个传入支,在机体不同部位沉积的抗原被破坏、扫除或者处理后呈递给淋巴细胞;一个中枢支,淋巴细胞,通常是淋巴器官中的淋巴细胞,在这里进行选择、克隆扩增和分化(产生抗体、淋巴因子和细胞溶解素)以及一个传出支,活化的淋巴细胞和APC在这里共同作用,发挥效应功能,消灭进入的抗原。辅助细胞的研究对疾病状态的研究以及体内免疫耐受和诱导的差异研究都影响极大。

我们将使用术语"抗原呈递"(antigen presentation)来描述在细胞表面表达MHC-多肽复合物的所有事件。另外,DC表达大量的额外分子或辅助分子以增强整个机体的T细胞反应。本章主要介绍DC的组织分布、发育、功能方面的主要概念以及这些概念是如何形成的。

淋巴细胞悬液中的树突细胞:初步鉴定

在小鼠脾细胞悬液中富集和消除辅助细胞的方法

早期研究辅助细胞的功能模型是小鼠脾细胞培养物中的初次抗体应答(primary antibody response)[1]。实验中采用的抗原是绵羊红细胞或半抗原-载体结合物。一些实验方法提示,产生抗体-分泌型细胞不仅需要B细胞和T细胞,还需要另外一群细胞,称为辅助细胞(accessory cell)。第一种方法是基于细胞是否具有黏附玻璃和塑料的特性:辅助细胞有黏附性而淋巴细胞没有[6]。第二种方法是关于细胞在牛血清白蛋白(BSA)等致密介质中的悬浮情况:辅助细胞具有低浮力密度(buoyant density),而反应性淋巴细胞则是高浮力密度[7]。第三种方法使用柱子,其介质用可黏附辅助细胞的物质填充。葡聚糖凝胶G10允许B细胞和T细胞通过[8],而尼龙棉允许T细胞通过[9]。经G10或尼龙棉过柱的细胞再用塑料黏附辅助细胞。

以上这些方法都必须通过功能实验才能决定是否富集或去除了辅助细胞,因此都是经验性的。由于黏附特性,曾推测辅助细胞为巨噬细胞。然而,黏附性并不是巨噬细胞所特有的特性,其他许多细胞类型,包括纤维母细胞、内皮细胞,甚至 B 细胞也具有此特性。虽然从腹膜腔获取小鼠巨噬细胞是标准来源,但不管用何种方法,即使使用适当的剂量,在抗体应答中都是典型的不活跃的,而且经常处于抑制状态。因此,辅助细胞的最佳来源是小鼠脾细胞中具有黏附性的细胞。

DC 作为辅助细胞的一个独特的活跃的细胞类型被鉴定

从腹膜腔获取的巨噬细胞用作抗体应答的辅助细胞,其功能微弱甚至缺乏;而且细胞生物学研究显示抗原在巨噬细胞中彻底降解[10,11],于是开展了黏附小鼠脾细胞的实验。结果发现它们不是单纯的一种细胞,其中只有一部分是吞噬细胞。鉴定吞噬细胞所采用的标准主要为:①是否积极地摄取颗粒,特别是免疫复合物和包被在红细胞上的抗体;②产生溶酶体和酯酶的丰度。

其他大部分黏附塑料的细胞是以前从未认识过的细胞,称作“树突细胞”(dendritic cell,DC)[12,13]。DC 及其细胞核具有不寻常的形状,DC 有不断形成和回缩的突起。DC 与巨噬细胞不同(图 16.1),溶酶体极少,Fc 受体缺乏,体内和体外的内吞作用都很弱[13,14]。DC 是髓源性非 T 细胞依赖(出现在裸鼠体内)的,不与 B 细胞或 T 细胞有丝分裂原发生反应,在组织培养中存活能力有限[15]。另外,小鼠脾中还有与 DC 相似外形的非吞噬细胞,主要存在于淋巴细胞富集的白髓而非巨噬细胞富集的红髓[12]。DC 在脾细胞的含量小于 1%,但是它们能通过致密 BSA 悬浮法浓缩至 10~20 倍[13,14,16]。

549

高度富集巨噬细胞和 DC 的方法有三种(图 16.1)。每一种方法中,DC 都是抗体应答积极的辅助细胞[17~20],而巨噬细胞则是非活动的或者呈抑制状态[21]。细胞培养过夜,根据 Fc 受体阴性或者非黏附成分特性从巨噬细胞中分离 DC[14](图 16.1),并制备 DC 特异性的单抗 33D1[22]。用 33D1 和补体选择性消除新鲜脾细胞中的 DC 成分,抗体应答便迅速下降[18];加入经 33D1 单抗以外其他方法纯化的少量 DC,则应答能力恢复①。

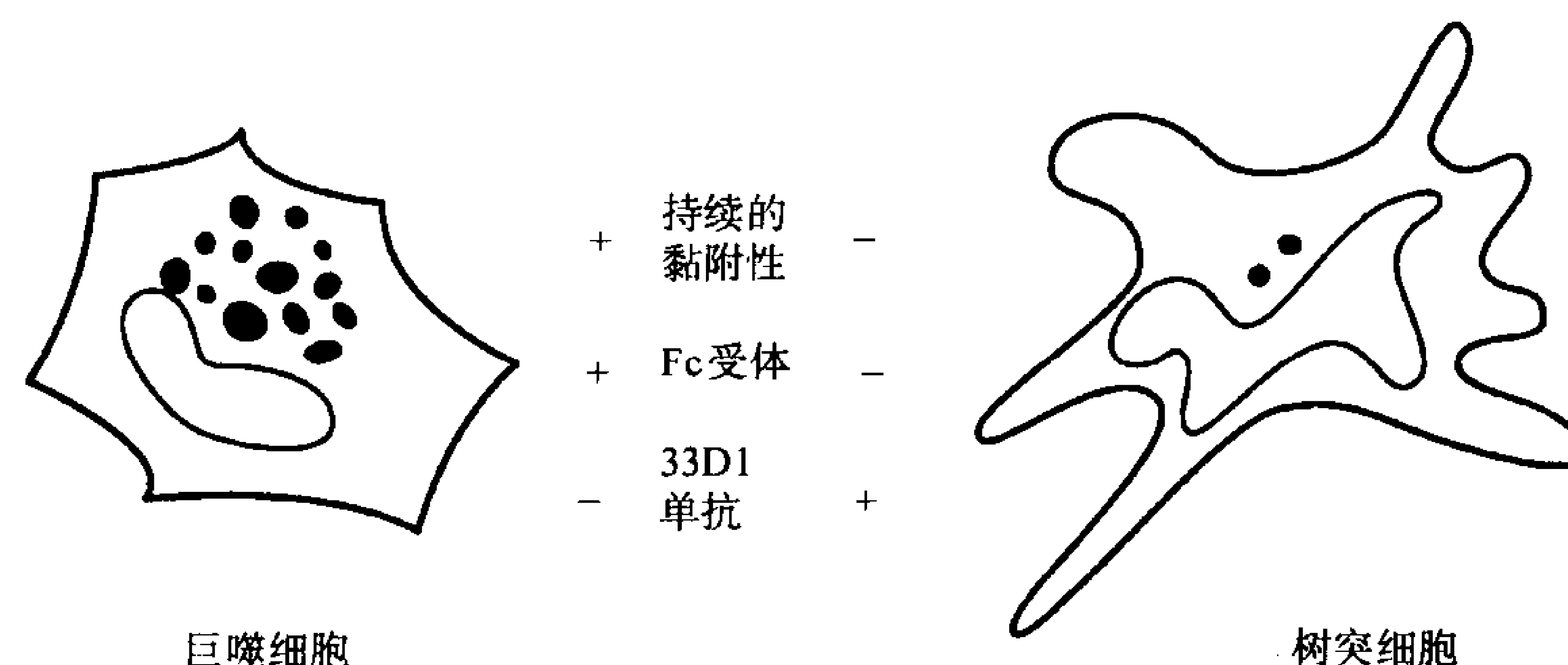


图 16.1 最初区分小鼠脾巨噬细胞与 DC 细胞所用的特性。

早期富集和去除辅助细胞的方法都是在 DC 含量水平上的。由于有些 DC 并不表现短暂的黏附性(例如大鼠许多器官中的 DC[23] 以及各种动物淋巴输入管中的 DC[24,25]),有些也没有低浮力密度(例如一些不成熟的 DC[26,27]),因此最适宜的方法应该是直接鉴定 DC。其中一个便是培养前后检测 DC 数量。细胞离心沉淀于载玻片上,干后形成一个斑点,置显微镜下观察,寻找体积较大、形状不规则、具有大量 MHC Ⅱ 分子及其他 DC 性状的细胞(图 16.2)。

---

① 33D1 具有可实用性,但也有缺点。33D1 识别的抗原已被鉴定,单抗与来自小鼠脾的主要 DC 亚类反应,而不与其他来源的 DC 反应。抗原的表达很少,因此 33D1 在荧光激活细胞分选法(FACS)以及 33D1 结合的组织切片都无法给予较强的信号。



图 16.2 Cytospin 制备 MHC 分子染色的 DC。图中显示通过低浮力密度富集的淋巴结细胞。Cytospin 上的 DC(箭头所示)具有独特的形状,其表面有染色的 MHCⅡ分子。

DC 上高表达 Ia 抗原和 MHC Ⅱ类分子

一些功能实验中,免疫学家用抗 MHCⅡ单抗和补体来消除辅助细胞(通常称为对“MHCⅠ区域相关的”的“抗-Ia”,这里“I”编码免疫应答或者 Ir 基因)。虽然抗-MHCⅡ单抗在这些实验中不能定义细胞类型,但是能定义 APC 呈递抗原给 $CD4^+$ T 细胞所必需的 MHC 分子。依据 DC 独特的形态以及细胞表面的分子特性富集 DC,发现它对异型抗原和新的抗 MHCⅡ单抗反应强烈(免疫荧光和补体细胞毒性实验)[14,28]。在定量结合实验中,DC 上的 MHCⅡ分子非常丰富,远多于 MHCⅡ-阳性细胞类型和 B 细胞[28]。多数腹膜腔中的巨噬细胞和小鼠脾细胞都是 MHCⅡ阴性细胞[14]。这些细胞仅在体外暴露于淋巴因子时[大多是 γ 干扰素(IFN)][29,30]或者在体内细胞介导免疫应答中被消除时,例如施加分枝杆菌 Calmette-Guerin 杆菌(BCG)[31],才变为 MHC 阳性。

MLR 中 DC 的 MHCⅡ类分子功能:抗原呈递细胞和辅助细胞或共刺激细胞之间的差异

虽然 DC 表达高水平的 MHCⅡ类分子,但还需要进一步证实这些 MHCⅡ类分子是具有功能的。已知 MHCⅡ类分子可以在初次混合白细胞反应(primary mixed leukocyte reaction)或混合淋巴细胞反应(MLR①)中作为主要的抗原刺激 T 细胞增殖。人们最初认定,任何表达 MHCⅡ类分子的细胞(例如 B 细胞)都可以刺激 MLR。但是,当把 DC 作为 MLR 的刺激因子时,结果十分令人惊讶。首先,DC 是一个非同寻常的高效刺激因子,其用量可以远小于白细胞数量的 100 倍。其次,其他 MHCⅡ阳性细胞,包括 B 细胞和巨噬细胞,作用都很微弱或者无反应[29,32,33]。到目前为止,MLR 仍然是证明成熟 DC 功能最简便的实验。在 MLR 中,成熟 DC 既可以诱导 $CD4^+$ 辅助细胞应答,也可以诱导 $CD8^+$ 杀伤细胞[34,35]。

上述 MLR 的实验结果为揭示 DC 在启动 T 细胞免疫应答方面的生理作用提供了第一个线索。在体外启动静止 T 细胞的免疫应答中,抗原呈递是必需的,但仅有抗原呈递是不够的。B 细胞和巨噬细胞可以表达同种异体 MHC(这可以通过同种异体抗体或活化的 T 细胞来证明),但是它们不能像 DC 那样表达辅助分子或共刺激分子来启动初次 MLR。

树突细胞的功能:天然佐剂的早期研究

长期以来,多种人造材料(俗称佐剂)被用来增强对抗原的免疫应答。其中,完全佐剂中的油和胶体铝盐 550

---

① MLR 最初用在鉴定移植组织类型中移植物供者或刺激因子与移植物受者或回应者之间不相容性。当供者和受者的 MHC 不同,供者的刺激细胞诱导受者 T 细胞增殖和细胞溶解。MLR 最初表示“混合淋巴细胞反应”,但后来发现淋巴细胞是较弱的 MLR 刺激因子,因此改名叫“混合白细胞反应”。

(明矾)应用较为广泛。从淋巴细胞悬液富集而来的少量 DC 在没有任何佐剂的情况下便能激活 T 细胞。最初的功能研究显示出三个新的特点(表16.2),提示 DC 可作为天然佐剂。

表 16.2 树突细胞的功能特点

潜能
少量的 DC 加上低剂量抗原便能刺激很强的 T 细胞应答
初次应答
初始 T 细胞和静止 T 细胞能被 DC 上的抗原激活
生理作用
体内可激活 $CD4^+$ 辅助性 T 细胞和 $CD8^+$ 杀伤性 T 细胞

潜能

从脾获取的 DC 在许多 MHC 限制性 T 细胞刺激实验中表现出非同寻常的潜能。这些实验包括 MLR[29,32,33]、MHC Ⅰ限制性杀伤细胞对半抗原修饰细胞的应答[31]、MHC Ⅱ限制性同源 MLR[36]、MHC Ⅱ介导的蛋白抗原呈递,包括 Ir 基因控制的蛋白抗原呈递[37,38]。通常将照射处理的大量脾细胞用作辅助细胞,而 DC 远比这些脾细胞的效率还高出 30~300 倍。

从许多哺乳动物中已鉴定出具有同等高效力的 DC。早期一个实验便是从人血中分离与塑料具有黏附性的部分。这包含少量的、积极刺激 MLR 和增殖的 DC 亚群[24,39,1]。DC 也从人扁桃体中分离出来[42]。在 MLR 以及被称为氧化的有丝分裂(oxidative mitogenesis)的 T 细胞有丝分裂实验中,从大鼠淋巴样组织富集的 DC 可以作为很强的辅助细胞。在这个实验中,无论是 DC 还是 T 细胞都被高碘酸钠或者半乳糖氧化酶和神经氨酸苷酶所氧化。醛基形成带有赖氨酸 ε-NH_2 基团的希夫碱,导致交联的发生和 T 细胞的活化。当氧化的 DC 或者氧化的 T 细胞与其他类型细胞混合时,便会发生广泛增殖,哪怕仅用 1%甚至更少的 DC[23,24]。由于大鼠 DC 与小鼠 DC(与有氧有丝分裂的 APC 一样[44])不同,它没有短暂的塑料黏附性,因此很容易与巨噬细胞区分开。

致敏

最初 DC 研究证实,这些 APC 能够活化初始 T 细胞。T 细胞一旦被 DC 激活,无论抗体反应还是 MLR[20,45],都能有效地与其他 APC 相互作用。抗体反应中,DC 激活特异性针对载体蛋白的辅助性 T 细胞,例如锁眼形血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)和人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)载体蛋白。活化的辅助性 T 细胞在没有 DC 的情况下能与半抗原特异的 B 细胞相互作用,刺激抗体应答[20]。这种相互作用是抗体依赖的,并且是受 MHC 限制的(图 16.3)。

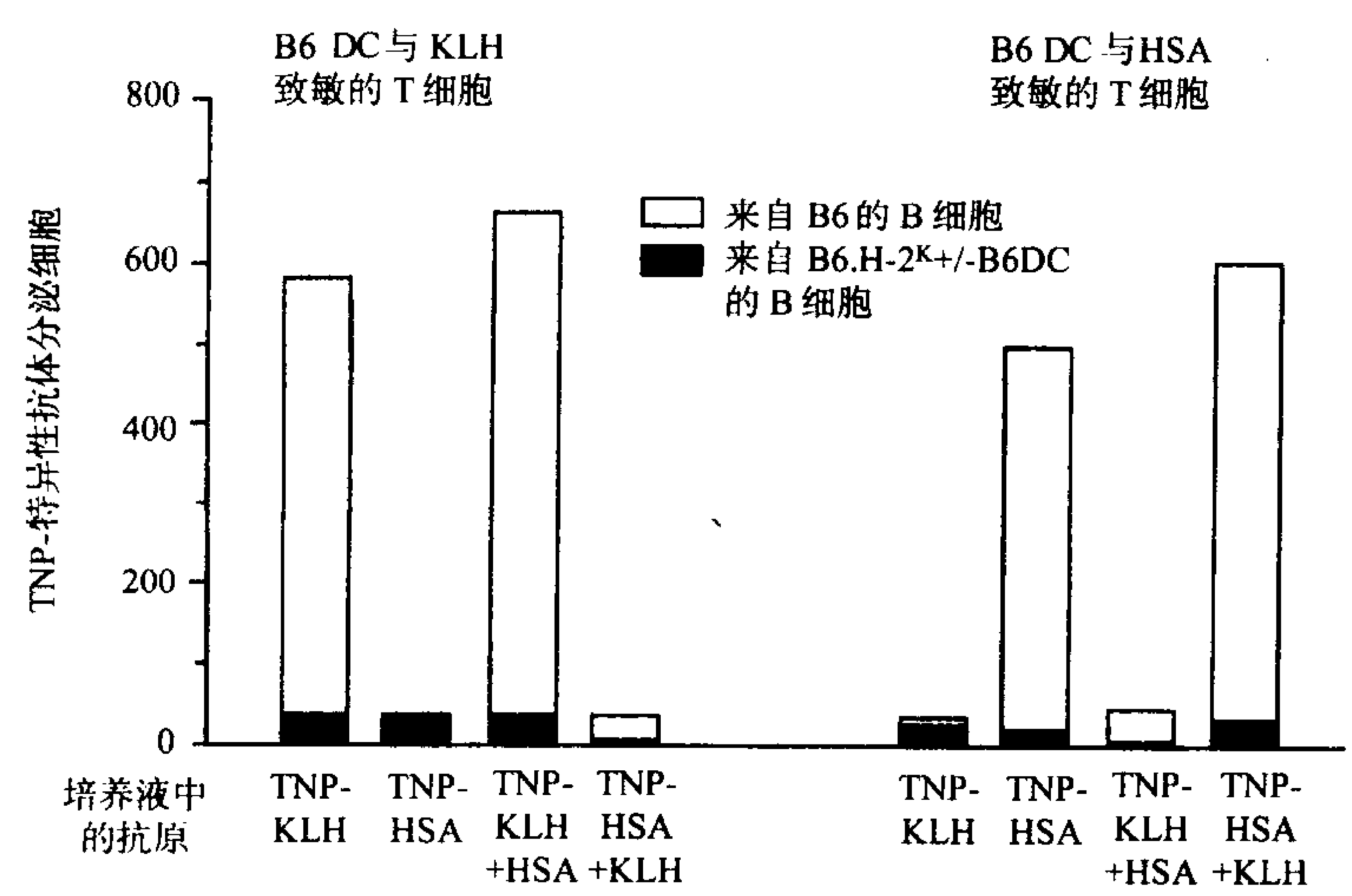


图 16.3 在体外 DC 致敏的载体特异性辅助细胞与半抗原特异性 B 细胞以抗原依赖和 MHC 限制方式相互作用[20]实验分两个阶段进行:(针对 HAS 或 KLH)的载体特异性辅助细胞首先被相应蛋白和 DC 致敏。然后致敏的辅助性 T 细胞与 B 细胞混合(无 DC 细胞)以诱导半抗原特异的抗体分泌细胞形成。注意:辅助性 T 细胞仅当半抗原与载体连在一起时,辅助具有适当 MHC 的 B 细胞(这里是 H-2^b)。

因此，虽然在抗体应答中DC和B细胞都作为APC将蛋白以MHC限制性方式递呈给T细胞，但DC仍是启动应答所必不可少的。这在MLR中也是一样。T细胞对没有经过刺激的B细胞不应答，但是经DC表面的同种异体MHC分子激活后，发生扩增，对B细胞产生强烈应答，引起B细胞增殖并产生抗体[45]。因此，T细胞应答的发展过程可以分为两个阶段：一个由DC诱导启动的输入肢和一个辅助细胞依赖的，需要抗体形成的B细胞作为APC的输出肢。

初次抗体应答[19]、MLR[34,36,39,45~47]以及对蛋白抗原[48]和超抗原[49]的应答中分离出的细胞团含有对淋巴细胞发生应答的DC。这些离散的细胞团可在体外致敏T细胞。早期DC实验时，曾认为可溶性巨噬细胞产物白细胞介素1(IL-1)是淋巴细胞激活的一个必不可少的因子。但是，抗体中和IL-1后，并不能阻断培养的细胞团中DC致敏淋巴细胞[50]，说明外源性IL-1在DC水平上放大该应答，而不是在T细胞水平上[51,52]。然而，IL-1是巨噬细胞与致敏T细胞在第二次相互作用时产生的，而不在初次应答时产生[50,53]。

实际上，这些早期实验中DC致敏的T细胞可能并不是真正的初始细胞，因为细胞可能已经被环境中相互作用的抗原所致敏了。近来，越来越多的研究发现，细胞从初始状态到致敏状态表现为高水平的CD62L、较少的CD44或者较少的CD45[54~56]。TCR转基因小鼠的T细胞仅识别一个MHC-多肽复合物，这使得以上实验变得更容易了。

体内生理学作用

DC在体内也可以作为有效的APC来发挥作用。在早期抑制物排斥反应模型中，少量的同种异体DC便可触发肾脏[57]和内分泌[58,59]移植物的排斥反应。然而，事先去除先前认为的过客白细胞，实际上清除的大多是所在部位的DC，抑制物便能被接受。若将不含B细胞和巨噬细胞的移植物供者DC进行再灌注，便会引发排斥反应[57]。

551

DC与蛋白抗原以一种遗传限制性方式致敏小鼠[60]。如果DC在体外和蛋白抗原一同混合，于足底部给药，输入淋巴结中的$CD4^+$ T细胞被激活。腹膜腔内许多的巨噬细胞和B细胞是非活化的。注射的DC直接致敏T细胞，并不是单纯地传送抗原以供宿主APC呈递。这个事实表明，致敏作用受限于免疫的DC上的同种异体MHC(图16.4)。在此实验中，F_1小鼠($H\text{-}2^d$ $H\text{-}2^k$)被亲代DC致敏。从F_1小鼠分离出来的T细胞受$H\text{-}2^d$或者$H\text{-}2^k$呈递的抗原限制。如果$H\text{-}2^d$的DC直接致敏F_1的T细胞，则只有$H\text{-}2^d$限制性克隆能被致敏，如果$H\text{-}2^k$的DC作为免疫原的话，致敏的T细胞只对$H\text{-}2^k$的APC应答。这些现象确实在实验中观察到了，因此DC介导体内初次免疫应答具有遗传限制性。

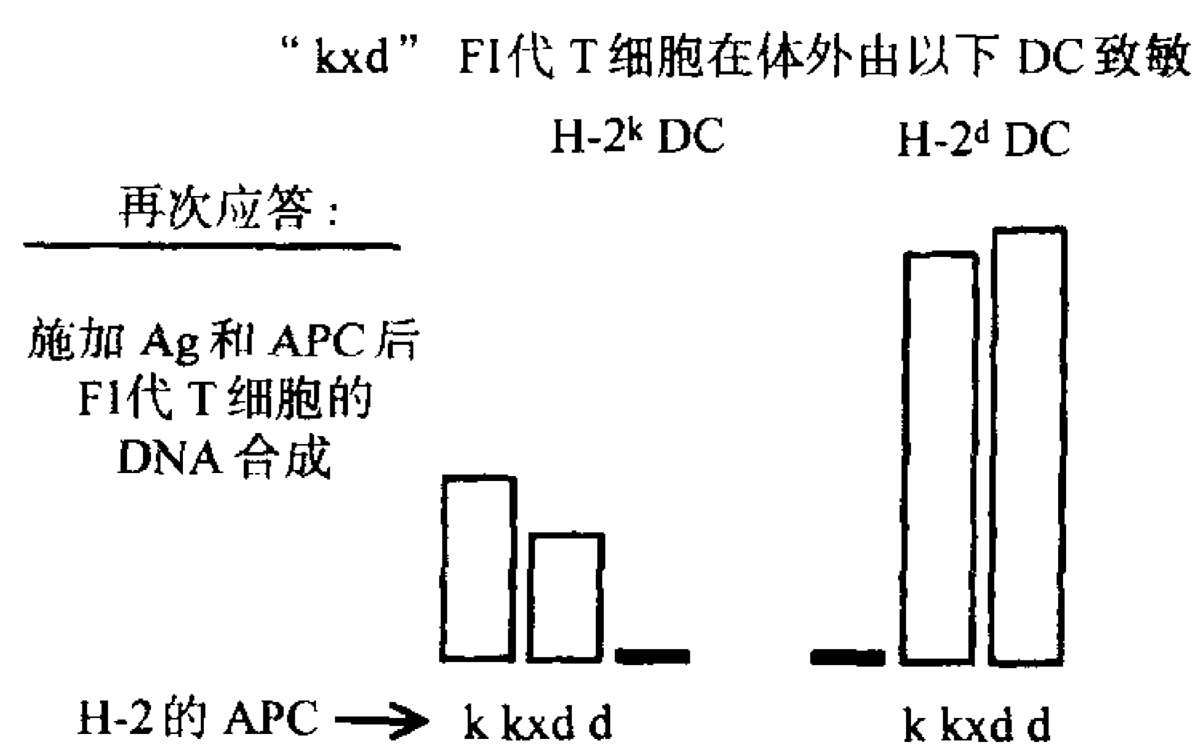


图16.4 DC在体内以遗传限制性方式致敏$CD4^+$ T细胞。F_1 T细胞被来自父亲或母亲的抗原激活的DC致敏，再在体外用F^1和双亲的DC刺激。致敏DC的MHC控制着被致敏F^1T细胞的遗传限制。

DC体内致敏作用在啮齿动物和人的一些$CD4^+$[61~64]和$CD8^+$[65~70]的T细胞应答中也有记载[71]。因此，DC在体内可以不需要其他佐剂而发挥作用。有人怀疑，标准佐剂增强免疫应答是通过增加与DC接触的抗原量或者增加DC的数量以及增强其功能来实现的。

体内树突细胞的分布(并指状细胞、朗格汉斯细胞、隐蔽细胞、间质性树突细胞)：一个独特的抗原呈递细胞系统

体内，DC具有许多天然佐剂的特性。其分布是以一种最大量摄取抗原、与之结合并激活特异性T细胞的方式来进行的。

外周淋巴器官是产生免疫应答的部位

淋巴器官,包括外周淋巴器官和黏膜淋巴器官,是发生初次免疫应答的部位,也是辅助细胞、杀伤细胞和抗体形成细胞的激活部位。激活的淋巴器官是皮肤、肺、肠和血液等抗原沉积部位所引流的淋巴器官。淋巴器官的解剖结构使其得以三种方式启动免疫应答(图 16.5)。

首先,存在着抗原进入器官的途径。如图 16.5 的顶部,进入脾是通过血液,进入外周淋巴结是通过输入淋巴液,进入黏膜淋巴器官是通过特殊的抗原运输 M 细胞[72~74]。

552

其次,B 细胞和 T 细胞通过淋巴器官不断地流动,有利于接近抗原。淋巴细胞被分隔为单独的区域,B 细胞区(或滤泡)和 T 细胞区。T 细胞区在脾被称为动脉周围淋巴鞘,在淋巴结被称为深皮质区或副皮质区,在黏膜相关淋巴组织(MALT)中,例如派尔集合淋巴结,则称为滤泡间区域(图 16.5)。

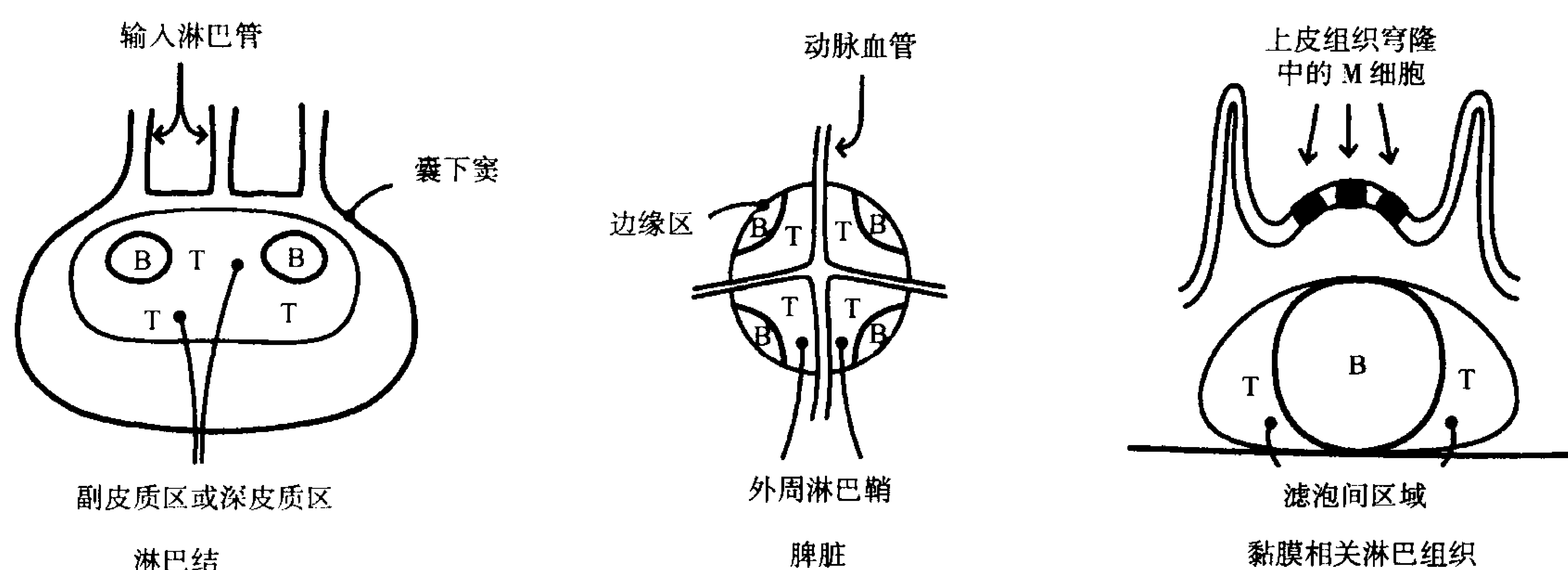


图 16.5 抗原(顶部)进入三类主要外周淋巴器官的途径:淋巴结、脾脏和黏膜相关淋巴组织或 MALT。这些器官具有离散的 B 细胞区或滤泡以及离散的 T 细胞区,它们在每种器官都有不同的名字(底部)。

最后,淋巴器官是特异性 APC 丰富的来源。特异性 APC 能选择 B 细胞区和 T 细胞区中流动的淋巴细胞。处理抗原的 DC 在 T 细胞区非常丰富,在这里它们又被称为并指状细胞(interdigitating cell, IDC)。B 细胞区富集另一类型的细胞,称作滤泡树突细胞(follicular dendritc cell, FDC)[75,76]。由于 FDC 不表达所有白细胞都有的 CD45 分子[77],在培养液中它们又具有纤维母细胞的形状特点[78],因此很像基质细胞和纤维母细胞。FDC 保留有原始抗原,作为免疫复合物呈递给 B 细胞[79~81]。因此,有别于命名上的一致性,FDC 与 DC 仅有很少的联系,FDC 仅是呈递处理过的抗原给 T 细胞的髓源性白细胞。

外周淋巴器官 T 细胞区域中的并指状细胞

并指状细胞,最早在一篇博士论文[82]中被描述到,是 T 细胞之间伸出许多突起的体积巨大的细胞[83]。IDC 的细胞学特性与 DC 相似[84],但是许多对 IDC 的描述都把它们比作巨噬细胞[85~90]。与 DC 一样,IDC 没有很多吞噬小体和溶酶体,只是在细胞核周围有一个细胞化学产生的溶酶体酸性磷酸酶斑点,而且在体内并不能积极地内吞细胞内吞性视踪剂[85,91~93]。而巨噬细胞则含有大量的吞噬小体和酸性磷酸酶,并在体内具有积极的内吞作用。

T 细胞区的 IDC 和分离的成熟 DC 有许多相似的抗原标记[94],后者可用抗体检测(图 16.6)[95]。人淋巴器官的一些高水平表达的标记有:一个免疫球蛋白(Ig)基因家族成员、CD83 和两个胞内蛋白 p55 和 S-100[98~100]。小鼠淋巴器官有一组还没有在分子水平上被鉴定出来的标记。它们是胞内颗粒中的抗原,分别被单抗 MIDC-8[101]、M342[102]和 2A1[103]所识别。CD68 是一种核内体的标记蛋白,用抗 CD68 抗体染色可观察到大量的染色的巨噬细胞,而在 IDC 中则仅有核周斑点部位和分离的成熟 DC[104]。此外,IDC 还表达一些分子,它们是整合素 CD11c[105,106]和促进抗原摄取的凝集素类似受体,曾被称作 NLDC-145[107],现在称为 DEC-

205[108]。

正如将要在“耐受”部分中所讨论的，越来越多的资料表明T细胞区的IDC不只有一个来源。其中一个便是被称为髓源性的或者非淋巴源性的，包括DC迁移到带有外周抗原的T细胞区，启动免疫。其他更多的定居淋巴DC细胞群可能专门在免疫调节和外周耐受中起作用。

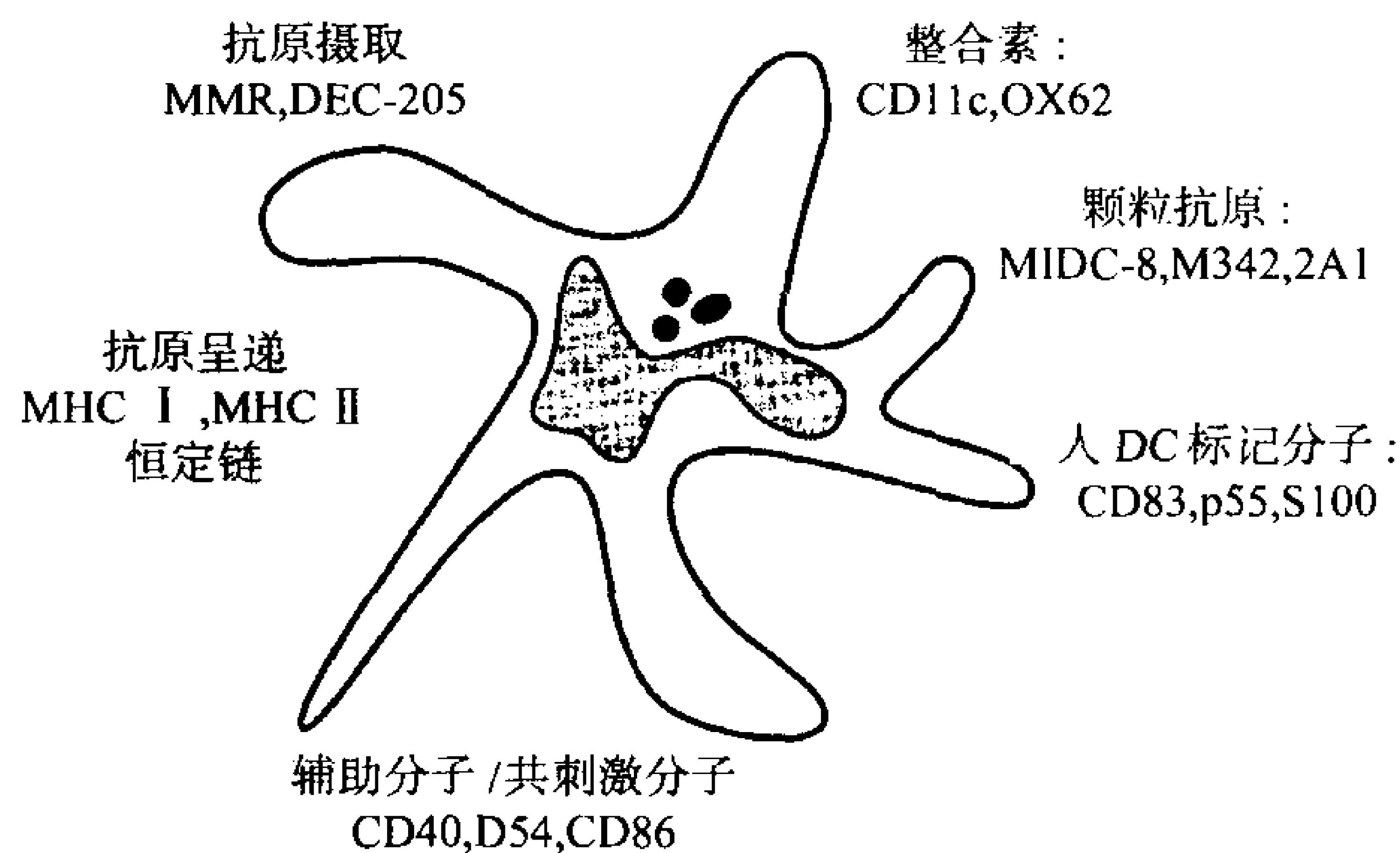


图16.6 淋巴器官切片中成熟DC与IDC所共有的标记分子。

输入淋巴管中的隐蔽细胞

感染因子和其他抗原通过输入淋巴管进入引流的淋巴结中(图16.5)①。典型的DC发现也在输入淋巴管中，例如兔[24,109]、豚鼠[110]、绵羊[111]和人[112,113]的输入淋巴管。这些体积巨大的细胞具有能动突起，由于外形像床单，也称为隐蔽细胞。大鼠的隐蔽细胞在人造输入淋巴管中被鉴定[25,114,115]。由于大鼠的淋巴管太狭窄，插不进导管，于是在胸导管插入导管，并使胸导管含有输入的淋巴。就这样，用外科手术的方法将肠系膜淋巴结和腹腔淋巴结进行转移。将引流肠和肝的输入淋巴管通过再吻合术连接到输出淋巴管，输入淋巴液便会流向胸导管(图16.7)。

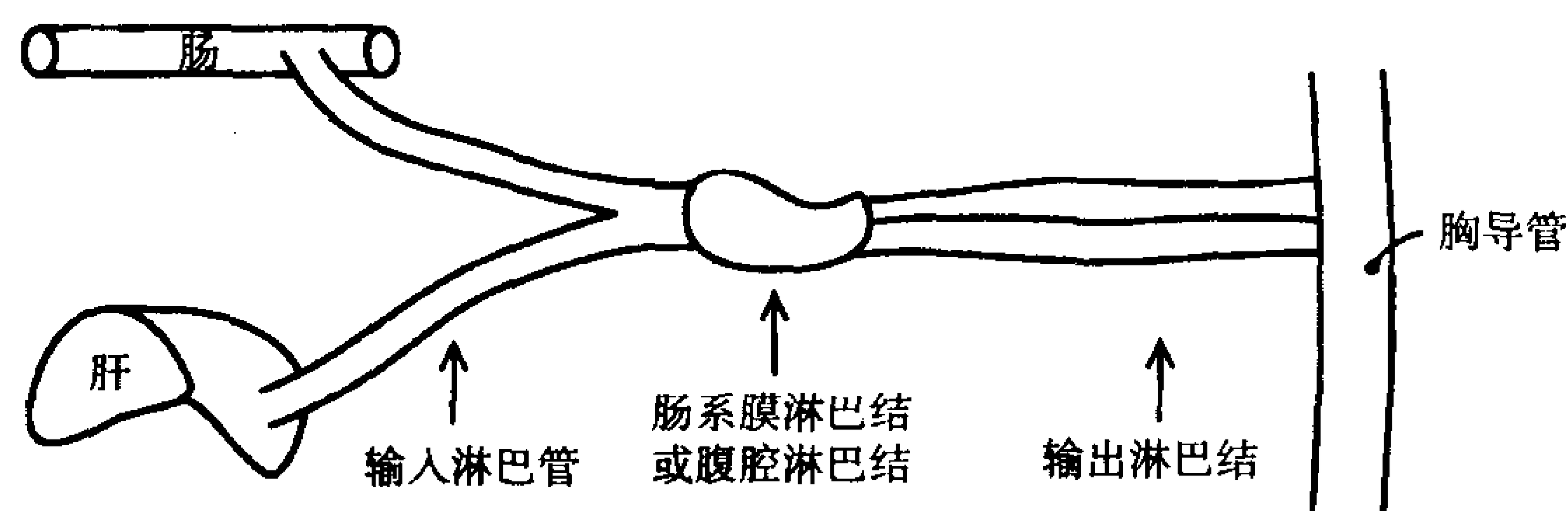


图16.7 使DC进入假输入淋巴管的方法。淋巴结切除后，通过吻合术将输入淋巴管与输出淋巴管相连，后者直接连入胸导管。在小型动物，例如大鼠，可进行胸导管插管，获得输入淋巴管的DC或隐蔽细胞。

所有的这些部位，隐蔽细胞呈现出典型的DC功能特点[24,25,109,110,115]。无论是与抗体包被的红细胞结合，还是内吞颗粒，在分离状态和培养的时候都是非黏附性的。当给动物施加抗原时，引流注射部位的淋巴DC以T细胞免疫原性的方式运载抗原[61,111]。隐蔽细胞是MLR和有丝分裂应答中的辅助细胞[25,109]。

输入淋巴管和输出淋巴管中的细胞是不同的。输出淋巴管缺乏DC和T细胞，包括许多由血液到输出淋巴管等淋巴组织中不断再循环的初始淋巴细胞。输入淋巴管则含有一定数量的DC和记忆T细胞[116]。一些DC在淋巴液中与T细胞形成紧密的结合物[110,113,117,118]，但这些结合物的生理作用还不清楚。有一种可能是，这些结合物被选择性运输到B细胞区。因为最近有资料显示DC进入生发中心，可能在那里刺激辅助性T细胞[119]。

上皮中的朗格汉斯细胞

保罗·朗格汉斯(Paul Langerhans)还是一名医学院学生时，描述了皮肤中一类特殊的细胞亚群，并以他的姓来命名该类细胞[120,121]。起初，这些朗格汉斯细胞(LC)的特性并不清楚，后来发现，它们是骨髓来源的，表现一些白细胞或淋巴细胞的特性，例如表达Fc受体[123]和MHCⅡ分子[124~126]。LC是上皮组织中积极呈递抗原给致敏T细胞的细胞[127]。

① 输入淋巴管对于回收淋巴液是很重要的，淋巴液总是逃逸毛细血管成为富含蛋白的漏出液。如果输入淋巴管没有回收这些漏出液，没有将它们通过淋巴结、输出淋巴管和胸导管返回血液，组织便会肿胀。实际上，当淋巴管被割断或者阻断了，例如肿瘤外科手术后可能会发生，机体的相应部分便会肿胀或者发生淋巴水肿。

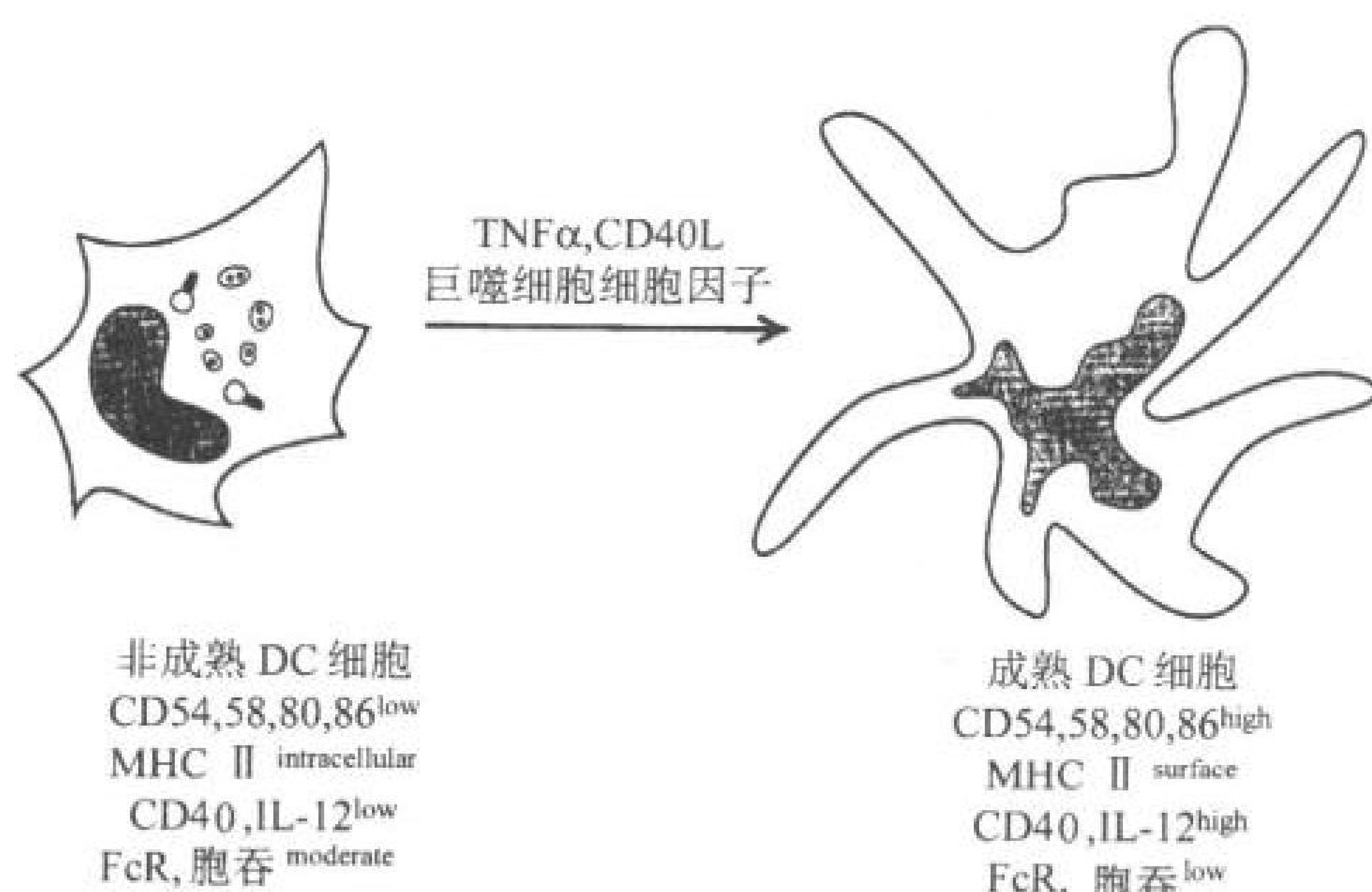


图 16.8 上皮 LC 在成熟过程中的变化。这里没有显示 T 细胞刺激功能增强了至少 10 到 30 倍。

当研究小鼠上皮细胞培养悬液中的 LC 时，发现它们具有 DC 的所有特性[128,129]。在新鲜的悬液中，LC 与成熟的 DC 不同，表面 MHC Ⅱ 分子和一些例如 Fc 受体、非特异性酯酶和 F4/80 抗原的表达都很低。经过 1 ~ 3 天的培养后，MHC Ⅱ 的表达升高到一个很高的水平，其他的性状则降低或者消失(图 16.8)。这些细胞变得很大，形态上具有更多的树枝状突起，始终是非黏附性的。即使加入巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)，它们也不会发育成巨噬细胞[130]。培养液中，MLR 的刺激活性增加了 10 ~ 30 倍，说明 LC 在激活 T 细胞方面比脾脏的 DC 作用还强。因此，新鲜分离的 LC 是不成熟的，但是可以发育成熟而成为 DC。这种成熟过程，正如以下将要讨论的，也发生在人的 LC[131,132] 上以及人体内。

朗格汉斯细胞、隐蔽细胞和并指状细胞之间的关系

554

在接触变态反应的形态学研究中，LC 与隐蔽细胞之间的联系更明显了。接触变态原后，皮肤的输入淋巴管中含有许多 LC[133,134]。用伯贝克颗粒(Birbeck granule)作为标记物，电镜下可鉴定出 LC。这些颗粒像一个网球拍，球拍是一个膜包绕着的空泡，球拍柄则是一个由膜致密包裹的坚硬条纹结构而构成(图 16.9)[135]。目前对伯贝克颗粒的功能了解不多，仅知道它们表达一种可被 Lag-1 单抗识别的抗原[136]，摄取了内吞性视踪剂[137]，呈酸性[138]。

进入淋巴液后，LC 的目的地便是 T 细胞区中形态上类似 IDC 的区域[139~141]。但是，过敏淋巴腺炎等过敏状态中淋巴结肿大时[142,143]，仅有大鼠的 IDC 含有伯贝克颗粒。同样地，IDC 少有上皮非成熟 LC 的 CD1a 抗原。LC 很可能迁移到 T 细胞区时成熟，其表型正如它在体外一样发生了很大变化。然而，与 LC 相比，IDC 可能还有其他的来源途径，因为在所有外周淋巴器官和黏膜淋巴器官的 T 细胞区都发现有 IDC，而不仅仅是在皮肤淋巴液引流的部位。

有一个实验可以证实皮肤中 DC 和淋巴器官中 DC 的联系。实验采用荧光标记的接触型变态反应原，例如用异硫氰酸荧光素(FITC)来标记。在 8 ~ 24 小时内将 FITC 施加给皮肤，在引流的淋巴结细胞悬液中发现有 FITC 标记的 DC[144~147]。FITC 修饰的 DC 继承性转移了接触敏感性给初始的受者[148]。

在细胞介导免疫应答中对输入淋巴管重要性的认识有助于了解皮肤移植物[149]和接触性变态反应原[150]的激活可以通过淋巴管的切除而阻断。从皮肤来的免疫原性 DC 通过输入淋巴管的运输途径便能解释这些发现。

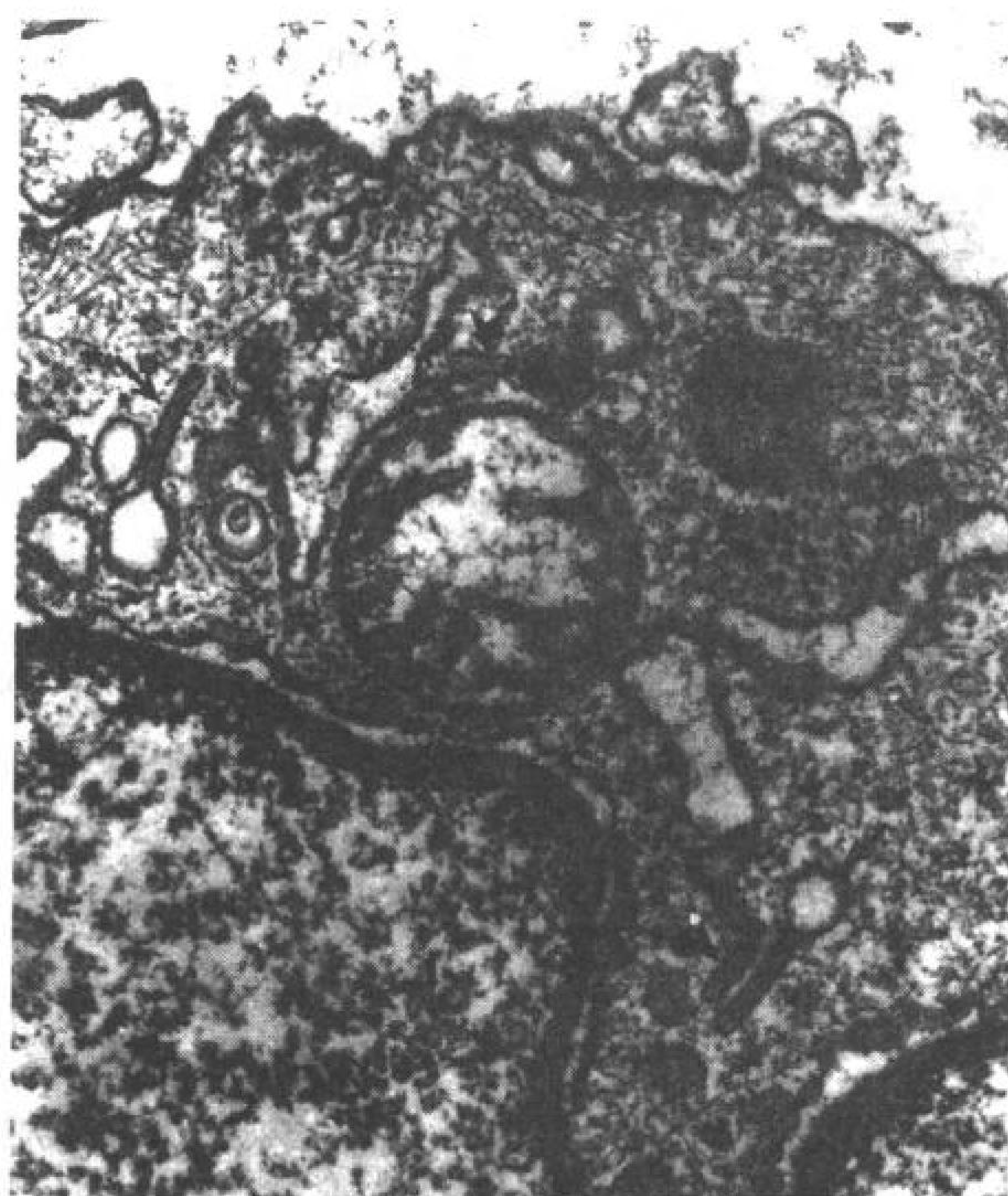


图 16.9 LC 的电镜照片(经 G. Schuler 和 N. Romani 博士允许使用)。LC 除了 Birbeck 颗粒外，与 DC 很相似。图中清楚显示了完全(完整箭头所示)和部分(箭头所示)的网球拍形状的颗粒。Birbeck 颗粒在新鲜表皮悬液中非常丰富，而培养的表皮悬液中则较少。

机体表面其他部位的树突细胞

所有鳞状上皮组织中都有与上皮 LC 相似的细胞，例如阴道、子宫颈、肛门、咽和食道。其他上皮组织中，例如肺的气管、肠、虹膜和睫毛体[158,159]，DC 虽在上皮组织中，但仍与上皮下部分保持接触。为了观察到这一点，最近将上皮组织切片用 MHCⅡ分子标记物染色，并在肠上皮组织中鉴定到 DC[157]，而先前的研究认为它们存在于固有层中[160~162]。 555

黏膜淋巴样组织是除了皮肤以外机体绝大部分表面的淋巴器官，特别是内脏部分。在小肠中，它们称作派尔集合淋巴结，在鼻咽部，它们包括扁桃体和沃尔德艾尔环(Wald eyer ring)的腭扁桃体。在这些黏膜淋巴器官的上皮组织下有无数的 DC[163~165]。由于这些上皮组织也含有特异性运输的 M 细胞[72~74]，因此抗原和感染因子从肠腔或者咽部直接运送到 DC 网络中。这些 DC 可能比机体其他表面的 DC 还要成熟，因为它们接受了肠道微生物上脂多糖(LPS)等 DC 激活因子的流入。

关于这些不同部位 DC 的寿命或者周转率，还了解很少。上皮组织中 LC 的寿命很长(半周期至少 1 个月[122])，但是气管中 DC 的寿命则很短(半周期为 2~3 天[166])。

间质性 DC

除了脑以外，大多数器官的间质中都有输入淋巴管引流来的高表达 MHCⅡ的 DC[167~169]。例如心脏肌纤维之间便有 DC 和巨噬细胞[167,170]。与巨噬细胞相比，DC 含有更多的 MHCⅡ分子、较少的溶酶体水解酶，对环磷酰胺和离子辐射等处理敏感。在心脏移植排斥反应中，观察到 T 细胞与 DC 相互接触[171]。虽然对分离操作要求较高，但已经成功地从心脏和肾脏分离出了 DC。随后，经过短时间的培养，DC 成熟，成为具有强烈刺激作用的 DC[172]。间质性 DC 的另一个较容易获得的储存处是真皮组织[173,174]。

DC 进出非淋巴器官的迁移

皮肤中 DC 的移动，特别是接触变态反应时 DC 的移动，已经在前面概述过了。许多非淋巴组织的 DC 都会迁移到 T 细胞区。心脏移植时，移植物来源的 DC 通过血液进入受者脾脏[175]。肠的 DC 进入肠系膜淋巴[25,176]。肝的 DC 位于肝门三管系统[106]和窦状部位[177,178]，表达库普弗细胞(Kupffer cell，亦称肝巨噬细胞)所没有的 OX62 DC 标记分子[179]。肝脏中 DC 迁移到肝脏淋巴中，再进入腹腔淋巴结[115]。为了描述这种迁移能力，将肠系膜[176]和肝脏[178]淋巴以及脾脏[180,181]中的 DC 再灌注给动物。一天之内，这些 DC 便归巢到引流淋巴结的 T 细胞区中。归巢使得 DC 能够从再循环液中选择抗原反应性 T 细胞，再循环也是初次免疫应答所必需的[182]。

DC 从血液进入非淋巴组织的过程也曾概述过。DC 将巨噬细胞或者库普弗细胞作为路标，从血液进入肝脏[178]。当多种炎症刺激物喷雾到大鼠的肺中时，DC 像中性粒细胞一样反应迅速，表现出惊人的短期动员[154]。与肺泡巨噬细胞不同，这些 DC 并不进入气管，而是在气管的上皮组织中巡视抗原，随后再进入纵隔淋巴结。

抗原呈递细胞的 DC 系统

正如上一节所讲，各种不同组织的成熟 DC 都有各种不同的名字(图 16.10)，但是它们也具有一些共性。这些共性包括：①不寻常的形状和运动能力；②缺乏巨噬细胞和淋巴细胞的一些标记分子(包括 Fc 受体和塑料黏附性)；③表面高表达 MHCⅡ分子和共刺激分子；④强大的 T 细胞刺激活性。在多数情况下，DC 经过短时间成熟期的培养便会表现出一些 DC 典型特性。

成熟 DC 是分化过程中最后的阶段，并不转化成巨噬细胞或者淋巴细胞。根据 DC 的特性和一些共性，以及许多它们从一个区域迁移到另一个区域的距离，我们可以认为图 16.10 中的 DC 是一个不同的细胞谱系和系统[140,141,183,184]。 556

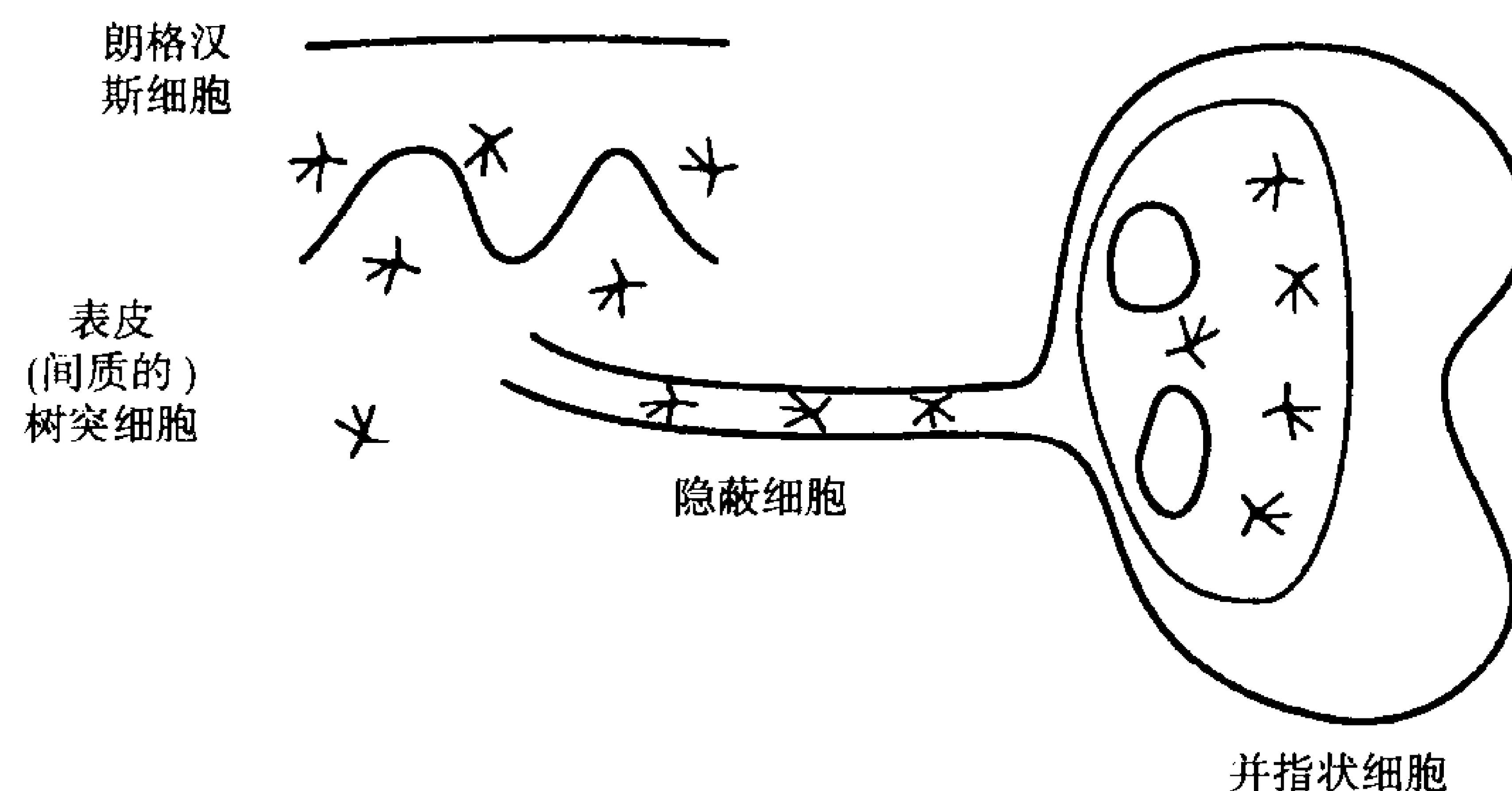


图 16.10 星形抗原呈递的 DC 系统，不同部位的细胞具有不同的名称，但在形态、表型、来源和功能方面都具有相同的基本特性。

体内树突细胞对抗原的捕获

体内 DC 与 T 细胞之间的相互作用

免疫学家已经鉴定了一些方法用来观察免疫应答早期 T 细胞的反应。如果用原位杂交的方法检测细胞因子的信使 RNA(mRNA)，那么在 B 细胞区和 T 细胞区的结合部位便可以检测到产生 IL-2 和 IFN-γmRNA 的细胞[185]。超抗原应答中，T 细胞区含有 TCR 可变区(V)的 T 细胞紧靠着 DC 而聚集[186]。同种异体 DC 所产生的免疫应答早期，增殖的 T 细胞也直接与注射的 DC 相接触[178]。当 TCR 转基因 T 细胞输入到初始受者体内时，受者便向佐剂中相应抗原发起攻击，抗原特异性 T 细胞聚集在 T 细胞区中，随后其中一些 T 细胞转移到 B 细胞滤泡中[187]。近来，更多地将抗原和 DC 以及 TCR 转基因 T 细胞标记上各种不同的荧光染料，不加任何佐剂，注射给从未接触过该抗原的小鼠。这些实验结果显示，DC 使 T 细胞区大量抗原特异性 T 细胞成群聚集在一起[188]。

体内 DC 有效处理抗原的证据

另一个证明体内抗原处理过程的方法是将抗原注射给动物(小鼠、大鼠或者绵羊)，再分离其 APC 的不同亚类。抗原免疫后，使用 DC 刺激 T 细胞，发现 DC 是以免疫原形式运输抗原给 T 细胞的主要细胞类型[61,111,189~193]。T 细胞对 APC 抗原的应答反映了此功能性解读器中存在着 MHC-多肽复合物和共刺激分子。最近一项研究中，IDC 成功地从淋巴结中分离出来，发现其高水平表达第一信号和第二信号[194]。Y-Ae 抗体识别呈现在 I-A 上的自身多肽复合物，用此抗体定量第一信号[195,196]。体内，虽然 B 细胞对第 1 信号和第二信号起正调节作用，但 DC 表达最高水平的 Y-Ae 表位和 CD40/54/86 共刺激因子[194]。

DC 上高水平的第一信号，MHC-多肽复合物的功能

DC 高水平表达 MHC-多肽复合物，因此通常认为 DC 能更好地激活初始 T 细胞。然而高水平的第一信号并不是 DC 致敏 T 细胞所必需的。呈递在 DC MHCⅡ分子上微量的超抗原[56]以及 DC Fc 受体上少量的抗 CD3 分子[197]也能促使 DC 致敏 T 细胞。每一个 DC 表面上几百个 TCR 配体分子已足以激活一个 T 细胞。由于非复制病毒颗粒通过 DC 可以很好地呈递给 $CD8^+$ T 细胞，因此可能存在着多肽呈递在 MHCⅠ分子上的这种情况[198]。

如果 DC 上这些高水平表达的 MHC 分子对于 T 细胞活化并不是必需的话，还有什么功能是通过它们来介导的？首先，高水平的 MHCⅡ分子促进 DC 在低蛋白浓度的情况下捕捉多肽[199]。其次，高水平的 MHC 分子可以使 DC 长时间保留免疫原性，有助于产生记忆。

既然高水平表达MHC分子的DC可以从不同组织中分离出来,因此首先假设在体内这些APC是组成性地启动免疫应答。通过进一步的实验,发现DC通常处于非成熟状态:捕捉抗原、处理抗原,然后发育出刺激T细胞所需的辅助功能。DC的成熟可以由抗原自身来驱使,也可以由细胞因子或者与T细胞的相互作用来驱使。

DC成熟过程中所发生的变化

辅助细胞刺激T细胞必须执行两个功能:一是处理抗原并呈递在MHC分子上,另一个则是表达大量的固定在膜上的糖蛋白分子来介导T细胞的结合与激活。这些功能在DC成熟的过程中相继发育出来[200~205]。非成熟DC虽然缺乏最佳的辅助功能,但是它能捕捉和处理完整的抗原,并高水平合成MHCⅡ分子。而成熟的DC则下调抗原捕捉和MHC生物合成的功能,成为静止T细胞强有力的刺激因子。

在成熟过程中,DC产生细胞因子的能力及其对后者的反应能力也有所变化。例如,成熟DC分泌高水平的IL-12[206,207],后者可以增强Th1型辅助细胞和杀伤细胞的形成。成熟DC对IL-10的抑制作用也具有抵抗能力[208]。IL-10能阻止T细胞增殖以及IFN-γ的产生,后者很可能是因为IL-10减弱了IL-12的产生[208~212]。IL-10也能诱导发育中的DC发生凋亡,加入肿瘤坏死因子(TNF)-α或者CD40L可以阻止这一过程的发生[213]。

定居在非淋巴组织中的DC是非成熟的,还不能完全致敏T细胞。此时,细胞表面MHC分子的表达水平比成熟DC低10倍多,一些辅助性分子,例如CD40、CD54和CD86,其表达水平很低甚至没有表达[103,214~217]。人的非成熟DC缺乏CD83[96]和p55[97]标记分子,小鼠非成熟DC缺少可被MIDC-8[101]、M342[102]和2A1[103]识别的颗粒抗原。但是,经过短时间的培养或者在体内施加适当的刺激,DC便会产生T细胞刺激活性以及如图16.6和图16.8显示的大多数特性。由于DC能够致敏T细胞,因此DC从非成熟前体细胞的发育成熟成为启动免疫应答的一个重要调控点。

这里有一些DC培养成熟的实例。最先了解的是培养的上皮LC[128]。粒细胞-巨噬细胞(GM)-CSF是促进LC生存和成熟的一个重要细胞因子[130,218]。同样含有非成熟DC的组织还包括大鼠的肺[219]、小鼠的脾脏[220]和人的血液[27,221,222]。非成熟的DC经过培养会成为成熟的DC,而不是其他类型的细胞,即使用M-CSF刺激也不会成为巨噬细胞[130,220]。

体内DC成熟的调控

已知DC成熟的两个最佳刺激是CD40配体和TNF-α[223~227]。TNF-α对骨髓前体细胞和单核前体细胞来源的成熟DC具有重要影响[199,204,228]。当非成熟DC与T细胞相互作用时,非成熟DC也能进行终末的成熟过程[229,230]。这种相互作用主要通过表达在活化的T细胞上CD40L进行的[216,223]。因此,目前关于DC成熟调控最简单的观点是它需要TNF类型受体的信号或者需要相关信号转导途径。

557

信号通过TNF受体和CD40激活NF-κB/rel家族转录因子。NF-κB调控许多免疫和炎症基因的活性[231]。NF-κB/rel蛋白在DC中特别丰富(rel A或者p65、rel B、rel C、p50、p52)。利用共有寡聚核苷酸序列进行凝胶迁移率变动分析(electromobility shift assay),发现NF-κB与rel B或与p50的活性最大[232]。证实DC内的NF-κB是活跃的证据来自遗传改变的小鼠。RelB基因敲除小鼠的胸腺DC缺陷[233,234]。将启动疱疹胸腺嘧啶激酶基因的人免疫缺陷病毒(HIV)-1启动子构建入小鼠基因,获得转基因小鼠。HIV-1启动子含有在DC内可活化的重要NF-κB位点,而胸腺嘧啶激酶使细胞对毒性胸腺嘧啶核苷类似物9-1;3-二羟-2-丙氧甲基鸟嘌呤敏感,因此当给这些转基因小鼠施加药物时,DC可以被选择性地杀死[235]。此外,鸡的v-rel癌基因使骨髓发育朝DC方向进行[236]。

另一个是通过 TNF 受体来激活的途径，涉及到由神经鞘脂产生神经酰胺的代谢。神经酰胺可以介导 DC 的成熟，特别是下调抗原摄取机制[237]。

成熟 DC 是终末分化的细胞，寿命特别短。例如，在输入淋巴管中，成熟 DC 和隐蔽细胞一样丰富，但是在输出淋巴管中便消失了。大概进入淋巴结的 DC 都死了，除非 DC 遭遇到同源的 T 细胞。DC 的寿命可以通过转染 CD40L 的成纤维细胞来延长[216]。成熟 DC 表达高水平的 CD40 分子，而活化的 T 细胞表达 CD40L。因此，淋巴结中 T 细胞与 DC 的相互作用可以通过 CD40 分子延长 DC 的存活。

体内 DC 的成熟伴随着迁移

体内 DC 的成熟已经描述过了，此外，很明显地，与其同时也开始了 DC 的迁移，去识别合适的特异性 T 细胞。移植皮肤时，即使是同基因受体，上皮 LC 可在几小时内增加 MHCⅡ[238]和 CD86[239]的表达。同时，正在成熟的 LC 开始进入淋巴管，在皮肤淋巴管中形成 DC 索[238,239]。相同的情况也发生在皮肤培养物的移植中[238,240~242]。DC 从淋巴管迁移到培养基中，在那儿表达高水平 MHCⅡ和 CD86，以及 DC 限制性标记分子 p55 和 CD83。当施加接触变态原时，皮肤 DC 也开始体积变大，上调 MHCⅡ分子的表达，并开始迁移[243]。如果施加的化学物质是非敏感性的，例如并不导致 T 细胞免疫或者接触变态反应，那么 DC 的成熟和迁移并不会发生[244]。由此可见，刺激细胞免疫的两个最强有力的刺激因素——皮肤移植和接触变态反应原，都与携带抗原的 DC 的成熟与迁移相关。

体内迁移的调控还不是很清楚。静脉注射 LPS 可诱导小鼠皮肤 LC[245]以及大鼠肠 DC[246]成熟和迁移。小鼠脾脏 T 细胞区周围的 DC 是非成熟的细胞[220]，注射 LPS 可引起它们的成熟，并使其迁移到 T 细胞区[247]。对于许多类型的细胞而言，LPS 是产生化学因子和细胞因子的一个强有力的刺激因素，例如它刺激产生的 TNF-α 是体内 DC 成熟的一种重要因子[246]。DC 成熟所需的细胞因子可能很复杂，从血液单核细胞发育为终末阶段的 DC 需要多种细胞因子[248~250]。现在可以通过免疫复合物刺激单核细胞，收集条件培养液来获得细胞因子混合物。

除细胞因子外，应该还考虑到体内其他调控 DC 成熟和迁移的多肽。有两组候选多肽与 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体相互作用。一组是化学因子。研究发现，DC 所含的化学因子受体与趋化作用[251]和 HIV-1 感染[252]有关。化学因子 MIP-3α 的受体(CCR6)主要在 DC 上表达[253]。DC 也产生化学因子，其中一些是 DC 限制性的或者是吸引初始 T 细胞的树突细胞因子[254]。第二组与 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体相互作用的多肽，通常与内分泌和代谢功能相关。多肽，例如降钙素基因相关肽，可以影响 DC 的功能，并在神经末梢中与上皮的 LC 接触[255]。

由增殖的 $CD34^+$ 祖细胞成熟而来

由于体内非成熟 DC 数量太少，因此限制了对它们的研究。最近有方法可以获得较多的处于发育中的 DC，包括增殖的和非增殖的祖细胞。

已经介绍过在小鼠血[256]和骨髓[103,257]以及通过人 $CD34^+$ 细胞在血液[224,258~260]和骨髓[226]中广泛增殖 DC 祖细胞的方法。GM-CSF 和 TNF-α 是目前 DC 发育的重要细胞因子。在一些培养条件下，这些细胞因子不能驱动 DC 完全成熟，最后一步还需要抗原呈递后 T 细胞自身的介导[229]，例如通过 CD40 和 CD40L 的相互作用[216,223]。其他一些因子，例如 c-kit 配体和 flt3 配体能够在体外维持更多的原始 DC 祖细胞，因而通过祖细胞培养所获得的 DC 产量可以增加几倍[261,262]。

M-CSF 维持单核细胞/巨噬细胞的发育，但是对成熟 DC 并没有多大的影响[103,130,227]。成熟 DC 表面缺乏 M-CSF 受体[249,263]。骨硬化病小鼠的 M-CSF 基因缺陷，其体内缺少单核细胞，但仍含有许多 DC[264,265]。

培养悬液中正在成熟的 DC 正在增殖，形成聚集体，其独特的形态与巨噬细胞和粒细胞类似(图 16.11)。粒细胞在聚集体中呈圆形生长，不与培养容器接触。巨噬细胞在分散的，但黏附牢固的克隆中呈平坦状生长。DC 在聚集体中生长，与下面的基质相接触，并被隐藏的和树枝状的突起所掩盖。

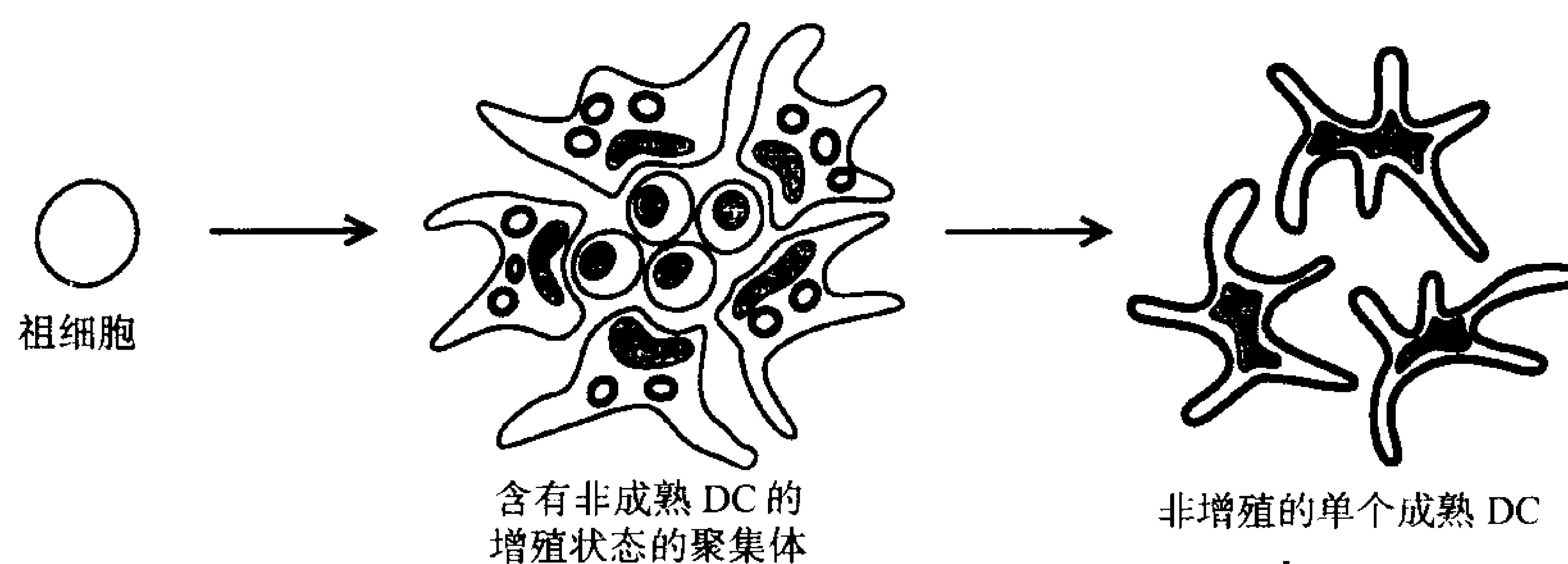


图 16.11 从增殖的祖细胞发育成熟为 DC。增殖(高 ^{3}H-胸腺嘧啶脱氧核苷标记指数)发生在含有非成熟表型 DC 的聚集体中。其中一个现象是:胞内有大量的 MHC Ⅱ $^+$ 空泡或 MⅡC。非增殖的成熟 DC 具有高水平的表面 MHCⅡ分子,成熟 DC 从聚集体中释放出来。

558

在增殖的 DC 聚集体中,细胞是非成熟的,表面表达的 MHCⅡ和 CD86 分子很少,但是从聚集体脱离的非增殖 DC 表面这两种分子都很丰富。此外,DC 的表型也在成熟过程中发生了变化[266]。微管束变得明显,而肌动蛋白束或者紧张纤维则消失了[267]。在小鼠体内表达被单克隆 MIDC-8、M342 和 2A1 识别的抗原。内吞作用和 MHCⅡ分子的更新明显地改变了[268]。

正如"耐受"一节将要讨论的,从增殖的祖细胞发育而来的 DC 不止有一条途径。它们被称为髓源性途径和淋巴源性途径。在体外,髓源性 DC 的发育需要 GM-CSF,其子代细胞表达与巨噬细胞一样的标记分子,例如 CD11b 和 CD33。淋巴源性 DC 的发育则需要 IL-3 而不是 GM-CSF[269],其子代细胞缺乏 CD11 b 和 CD33。在体内,细胞因子 flt-3L 对淋巴源性 DC 和髓源性 DC 都有增殖作用[270]。

DC 系

由增殖的祖细胞产生 DC,不同的实验系统 DC 需要生长的时间各不相同:小鼠骨髓来源的细胞,需要几个星期,而小鼠脾来源的细胞,则需要一年多[267]。这些系统可能在不同发育阶段改变 DC,并提供所报道的相应细胞系[271~274]。

由非增殖的单核祖细胞成熟而来

大多数组织中,非成熟的、处于非增殖状态的 DC 很少,但血液中单核细胞量多,且非常丰富,是许多关于 DC 成熟实验的材料来源。目前的方法需要加入一组复杂的细胞因子来延长培养时间以诱导单核细胞成为 DC(图 16.12)。单核细胞先用 GM-CSF 和 IL-4 或 IL-13 的混合物培养一周时间[199,275]。此时细胞比单核细胞更具有免疫刺激性,但其表面仍没有成熟 DC 特有的高水平 MHCⅡ分子和 CD86。用 GM-CSF/IL-4 刺激培养的细胞有丰富的巨噬细胞典型分子 CD68,但缺少一些血液和皮肤中成熟 DC 的标记分子(CD83[96]、p55[97]和 CD25[248])。撤除所施加的细胞因子,细胞则恢复为巨噬细胞[248,249]。

为了获得稳定的分化完全的 DC,用 GM-CSF 和 IL-4 处理非成熟 DC,再暴露于单核细胞刺激后产生的许多细胞因子之中(图 16.12)。通过 Fc 受体刺激单核细胞,后者释放大量的细胞因子,例如 IL-1、IL-6、TNF-α、IFN-α、IL-12。没有一个细胞因子可以单独负责 DC 成熟,诱导出许多不同的 DC 特性需要多种细胞因子的组合[250]。

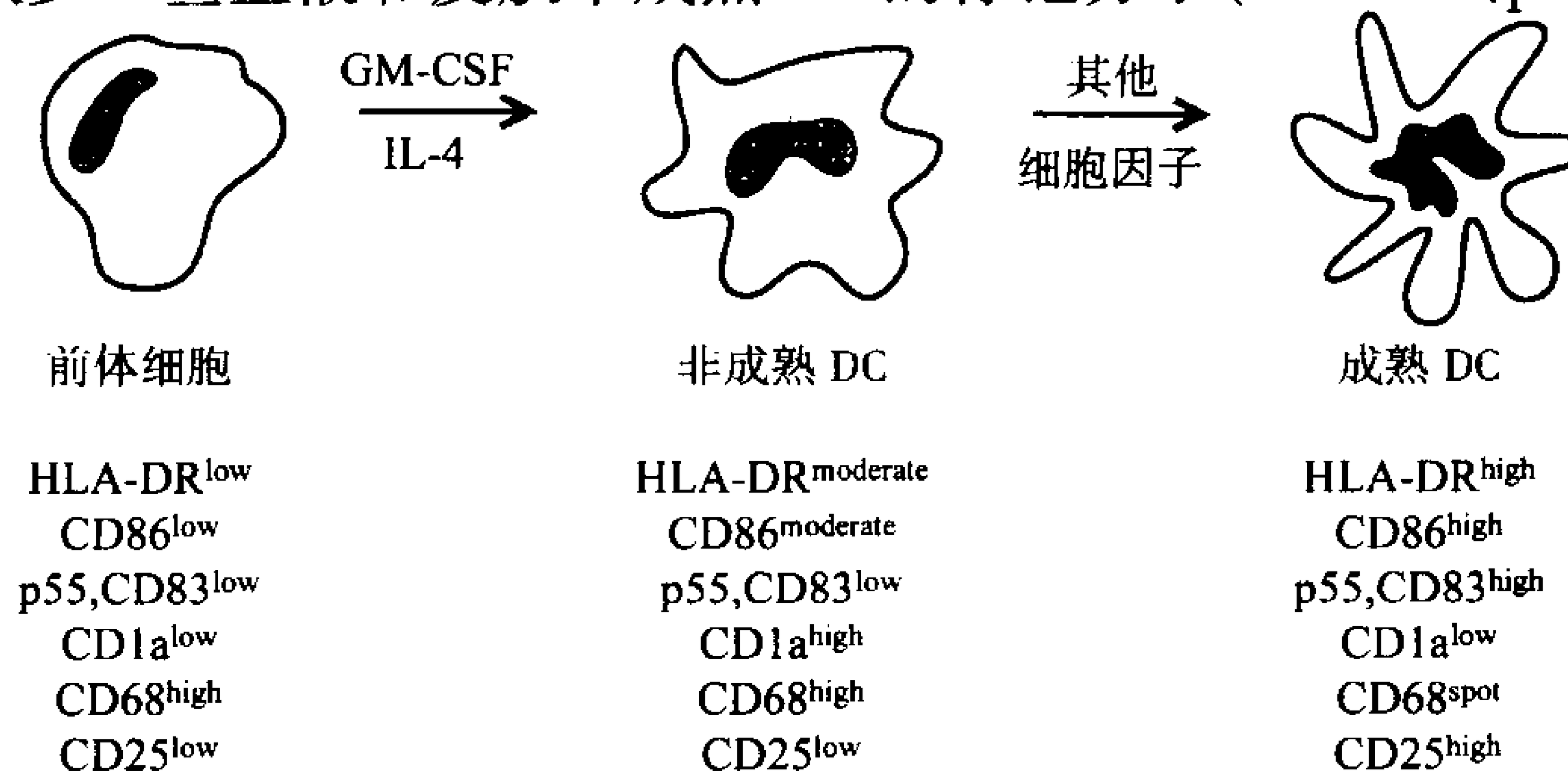


图 16.12 细胞因子诱导人单核细胞分化为成熟 DC。

"单核细胞"术语和"巨噬细胞"术语经常在使用中互换,但已经不再适当了。体外,在不同细胞因子作用下,单核细胞可以变成巨噬细胞或者 DC。骨髓[227]和脐带血[225]的 $CD34^+$ 细胞发展成一个类似的双电位媒介。

559 由于体外单核细胞发育成熟为 DC 需要单核细胞条件培养基和 IL-4(或者 IL-13),因此,体内是否存在着类似于体外的这种情况,还不清楚。可能正是用这个途径产生 DC,并源源不断地进入脾脏和输入淋巴管。

树突细胞的功能:抗原摄取、处理和呈递

很多年来人们一直困惑的一个问题是:DC 是如此高效的 T 细胞应答刺激因子,然而却表现出如此低的内吞作用,而内吞作用是 MHCⅡ分子呈递所必需的[276]。这是因为从 DC 生物学方面来讲,抗原的摄取和 T 细胞的刺激在时间上是分离的。非成熟的 DC 专门对抗原进行摄取和加工处理,而成熟的 DC 则保留 MHC-多肽复合物。

颗粒摄取

成熟 DC 的一个显著特性是它们不能内吞颗粒。非成熟 DC 却不是这样。酵母等颗粒被新鲜分离的 LC 摄取[277],而 BCG 有机体被骨髓聚集体中正在增殖的 DC 所吞噬[278]。髓源性 DC 能够将细菌多肽呈现在 MHCⅠ和 MHCⅡ分子上[279]。

体内 DC 摄取颗粒的最好例子涉及到前体细胞在肝脏淋巴管中变成隐蔽细胞。隐蔽细胞在体外并不内在化颗粒[24,25,115]。但是,如果静脉注射乳胶,排列在肝血窦的 DC 在进入淋巴之前会吞噬一些珠粒[210]。含有这些颗粒的 DC 再迁移到腹腔淋巴结的 T 细胞区[178]。因此,非成熟 DC 适合摄取颗粒,包括摄取一些感染因子,再迁移到淋巴或者血液中。非成熟 DC 吞噬的范围并不大,因为大块物质的摄取并不需要呈递合适的多肽给 T 细胞识别。以清除和抗微生物功能为目的的广泛吞噬仍是巨噬细胞的主要特点。

另一个体内的例子是利什曼原虫在皮肤 DC 中和引流淋巴结 T 细胞区的 DC 中[280]。含有寄生虫的 DC 从真皮迁移到淋巴结中,导致对利什曼原虫抗原的 T 细胞免疫。但利什曼原虫和其他生物体在 DC 的寿命并不清楚。是 DC 支持利什曼原虫的生长?还是 DC 具有抗微生物的机制?一些 DC 缺乏可诱导的氧化氮合成酶,而后者在许多生物体的杀伤中起重要作用[281]。

多凝集素受体

以前一直认为,类如 DC 的抗原非特异性细胞内吞可溶性抗原或者颗粒状抗原是通过非特异性机制来进行的。现在认识到,摄取是通过更加有效的机制来进行。例如,DC 表达摄取所需的各种多凝集素受体。术语上这些受体称为巨噬细胞甘露糖受体(MMR)[204]和 DEC-205[282,283],分别含有 8 个或者 10 个邻近的 C 型凝集素结构域。C 型凝集素结构域识别聚糖。MMR 结合甘露糖相连的 BSA[284],但配体还没有被 DEC-205 鉴定。

MMR[284]和 DEC-205[283]通过内陷小窝介导吸附性内吞作用。约束型配体(DEC-205,针对受体的单抗,用作人造配体)对 T 细胞的活性比非约束型配体强 100 倍[204,283]。换句话说,DC 上的多凝集素受体增强抗原呈递作用,其作用类似于 B 细胞表面的 Ig[285]。FITC 标记的右旋糖酐是常用的示踪剂,可作为液相或者有大量胞饮作用的物质。实验显示,DC 通过 MMR 内吞 FITC 标记的右旋糖酐[204]。

Fc 受体

FcγR 在呈递免疫复合物中发挥作用。非成熟 DC,例如新鲜分离的上皮 LC 以及 GM-CSF 和 IL-4 处理的血单核细胞,表达低水平的 FcγR[199]。DC 成熟过程中,此受体的表达水平下调。从皮肤[286,287]和血液[288]来的 DC 也有 FcγR 1,因此在 IgE 抗体存在的情况下,FcγR 1 能增强呈递作用[288]。

巨吞饮作用

用生长因子刺激的细胞,例如用M-CSF处理的巨噬细胞和上皮生长因子处理的成纤维细胞,可以吞饮巨大的直径0.25~1.0 μm的囊泡。用GM-CSF和IL-4处理的DC不断地高度积极地进行着巨吞饮作用[204]。这样,DC从胞外液进行大体积的取样,可以从非常低浓度的蛋白溶液中有效呈递蛋白分子[204,276]。

MHCⅡ区域(MⅡC和CⅡV)

MHCⅡ分子定位在APC的胞内空泡中[289]。皮肤、脾和血液中[222,290,291]的DC含有非常丰富的MⅡC。用HLA-DM、组织蛋白酶和溶酶体相关膜蛋白(CD107a,b)进行免疫标记,在电子显微镜下观察,MⅡC具有多泡结构或者多层结构[289,292]。MⅡC是核内体腔隙,来自外源抗原的多肽在这里与新合成的MHCⅡ以及粗面内质网(RER)和高尔基体产生的溶酶体产物相接。MHCⅡ-多肽复合物再被运送到细胞表面,呈递给T细胞。

新鲜脾悬液和原位表皮中,发现正在增殖的髓源性聚集体内非成熟DC中存在MⅡC[268]。MⅡC在非成熟DC的含量比其他细胞类型都丰富。一旦DC成熟,MHCⅡ分子便被运送到细胞表面。而这一事件在CⅡV中发生[268],后者是富含MHCⅡ的非溶酶体空泡[293,294]。12小时内,含有许多MⅡC的非成熟DC转变为成熟DC,细胞表面具有了高水平的MHCⅡ,核周区域几乎没有了溶酶体。上皮组织原位DC成熟过程中,也发生着相同的事件。例如,溶酶体的MIIC引起非溶酶体的CⅡV和细胞表面高水平的MHCⅡ等变化[268]。类似地,MHCⅡ的降解率或更新率也在发生变化:非成熟的DC中其降解率很高而成熟细胞中则很低[268]。

MHCⅡ-多肽复合物在成熟DC中很稳定。直接测定一种MHCⅡ-破伤风毒素多肽,发现MHCⅡ-多肽复合物的半衰期超过100个小时[295]。而且,将非成熟DC与某种蛋白混合施加,可以等上几天再加入针对抗原特异性T细胞的DC[201,268]。当培养的其他APC施加抗原刺激后,抗原呈递活性没有减弱,反而还有所增加,但是T细胞刺激活性却衰减得很快[296]。 *560*

GM-CSF和IL-4处理的非成熟人血DC含有大量MⅡC[204]。这些细胞因子处理的细胞似乎冻结在一个高抗原摄取和丰富MⅡC的稳定状态。施加LPS、TNF-α或者CD40L等刺激后,细胞开始成熟,失去MⅡC,但是高水平表达表面MHCⅡ类分子[204]。

从血细胞生成过程的细胞系分化中,我们有趣地发现,GM-CSF刺激的小鼠骨髓培养物中存在着两个不同的单核细胞系并行生长的情况。一些克隆对巨噬细胞黏附性很强,几乎没有MHCⅡ,但是富含溶酶体,而另外的DC聚集体则黏附性较弱,但在MⅡC中有非常高水平的MHCⅡ。换句话说,在相同的培养物中产生具有内吞作用系统的细胞,它们专门具有长期的清扫、广泛的降解和抗微生物的功能(巨噬细胞中含MHCⅡ低的终级溶酶体)或者长期保持多肽呈递能力的细胞(DC中的核内体循环间隔,MⅡC和CⅡV)。

在MHCⅠ上呈递病毒

DC是$CD8^+$ T细胞对半抗原修饰的细胞[31]、同种异体MHC分子[34,35,297]、病毒[298~301]和肿瘤[65~69]发生应答的强大刺激因子。对于人$CD8^+$ T细胞,流感病毒的呈递已经研究得很详细了[198,302,303](表16.3)。绝大多数人都患过流感,有致敏的$CD8^+$ T细胞。当自体同源的T细胞受到流感激活的DC刺激后,T细胞在一周内便会发生强烈的增殖和细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)反应。由于没有富集的DC,因此想要增加记忆性$CD8^+$ T细胞并产生良好的CTL反应必须反复刺激T细胞或者加入IL-2。

呈递病毒抗原的标准途径是蛋白水解酶从新合成的蛋白中裂解产生多肽,再由抗原加工相关转运子(transporter associated with antigen processing, TAP)介导的易位进入内质网。感染细胞能被针对病毒基因产物的单抗染色,例如像针对核蛋白、红细胞凝集素和非结构性蛋白NS1的单抗,说明流感病毒感染DC伴随着新病毒蛋白的合成[302]。流感病毒也感染单核细胞,但后者在感染后5小时内很快发生凋亡[304]。

令人注意的是,DC也能将非复制的病毒同正在复制的病毒一样呈递给自体同源的$CD8^+$ T细胞[198]。

56℃加热30分钟或者紫外线照射可以使病毒失活。但这些处理不能使病毒的红血球凝集活性或者溶血活性丧失。结果,在早期阶段,病毒可能是被完整地摄取。病毒外壳的红血球凝集素介导表面唾液酸残基的结合,有膜小泡的内在化,传送到酸性核内体中,与核内体膜融合,递送核糖核蛋白进入胞质。当红血球凝集素的梭形遗传因子活性经pH5酸处理后失活,抗原呈递作用也明显受到抑制。

因此,DC可能是有效的APC,它能在非复制感染期传送病毒蛋白,或者合成小量相关病毒蛋白,充分负责MHCⅠ和多肽。在体内,可能无法检测出活性病毒感染的DC,但是该细胞仍能将非感染病毒呈递给$CD8^+$ T细胞。这个发现对于将来使用DC的免疫治疗是有意义的,例如在体内使用基因或蛋白修饰的DC来产生杀伤细胞反应。这些方法的成功实施并不需要DC高水平表达基因产物。

在MHCⅠ上呈递的外源性途径和交叉途径

有证据表明,即使细胞和蛋白抗原没有明显的可进入胞质加工和传输机械(蛋白酶体和TAP)的机制,它们仍能呈递在MHCⅠ分子上。这种呈递被称为外源性途径。在交叉现象中,发现次要组织相容性抗原[305]和后来的肿瘤抗原[306]被呈递在宿主APC上,而不是感染的细胞。这些非感染的细胞抗原是如何进入胞质并被加工处理的?卵清蛋白被呈递在APC的MHCⅠ分子上[307],特别是当其作为蛋白颗粒共轭结合物被递送时[308]。术语"外源性途径"意味着抗原(蛋白分子、与颗粒结合的蛋白分子、其他细胞上的次要组织相容性蛋白和肿瘤抗原)并不一定要进入胞质。然而,近来越来越多的研究显示,蛋白酶体[272]和传统的TAP转运子[309]是需要的,至少在一些交叉途径例子中是这样。

有一些DC,例如小鼠脾脏的细胞,没有在MHCⅠ上呈递外源性蛋白的活性[310,311]。最近更多的研究表明,DC的交叉途径可以加工处理来自凋亡细胞的抗原[312]。这个发现很关键,因为它允许DC捕捉和呈递来自病毒感染的、恶性和转移细胞的抗原,而这些抗原在体内特别缺乏刺激免疫的辅助功能。

树突细胞的功能机制:辅助分子或共刺激分子

561 值得关注的是,有多少已经被鉴定的介导APC与T细胞相互作用的分子对?最熟知的一些分子对是与LFA-1相互作用的ICAM分子、与CD2相互作用的LFA-3以及与CD28和CTLA-4相互作用的B7分子。ICAM分子、LFA分子和B7分子高水平表达在DC上[215,217,313~315]。这些分子对都有助于DC与T细胞的相互作用。例如,分别阻断CD2、CD11a或者CD28,可降低DC与T细胞之间的混合淋巴细胞反应50%~70%;阻断其中两个,可降低混合淋巴细胞反应90%以上[217,315]。正如上面所提到的,高水平的第一信号并不是DC激活T细胞所必需的。因为在有共刺激因子的情况下,刺激T细胞所需的MHC-多肽与TCR的相互作用量降低了,这反映出DC上含有大量的辅助分子[316]。

与其他APC不同,DC上表达膜结合辅助分子的水平非常高,特别是ICAM-1/CD54和B7-2/CD86。它们的调控也不同。非成熟DC在一天的培养中快速上调一些分子的表达(CD40、CD54、CD58、CD80和CD86)。巨噬细胞和B细胞则需要施加其他刺激,例如LPS或者抗Ig。但尽管这样,其上调作用也远没有DC强。

T细胞具有如此多的辅助分子有什么后果呢?更多的信息来自这些分子基因缺陷动物的细胞行为分析和相关的信号转导途径。例如,CD80或者CD86基因缺陷的APC能够致敏T细胞产生IFN-γ和IL-4,但是当细胞数量或者抗原剂量降低时,致敏作用便很弱了[317]。

与体外标准模型不同的原位免疫中,辅助分子可能非常关键。在使用抗CD3抗体的实验中,生理性免疫涉及低水平的MHC-多肽和第一信号。体内T细胞是初始的或者静止的,而在体外经常使用活化的T-T杂交瘤和克隆。在体内,T细胞和APC最初是在机体的不同部位的,然后再迁移,而不是并列在一起培养。

表面上看,T细胞活化的显著特点是抗原特异性信号(例如APC上的MHC-多肽复合物)非常微弱[318~320]。当配体(MHC-多肽):①非常少,每个细胞只有几百个分子或者更少;②膜型分子,而不是可溶性的;③低亲和力识别时,T细胞是如何发现APC并产生应答的?我们知道,成熟DC是以抗原非依赖的宽松

方式结合 T 细胞的。这提供了少量 MHC-多肽可被识别的机会[321,322]。需要阐释早期 DC-T 细胞相互作用的分子机制。最近一个提议是,T 细胞的 CD2 与 DC 的 LFA-3/CD58 或者 CD48 分子相互作用,随后 T 细胞的 CD43 与 DC 的 MHC Ⅰ 分子相互作用[323]。

最近认为 DC-T 细胞相互作用的步骤如下:先是 CD2 和 CD43 分子帮助 T 细胞较松地与 DC 结合;抗原被识别;TCR 开始发信号;整合素被激活,与 ICAM 分子结合,强化了细胞与细胞之间的相互作用[324];其他共刺激分子,例如 B7-CD28 和 CD40-CD40L,也成功地发挥着作用。换句话说,许多分子对以级联方式发挥着作用,使 APC-T 细胞的相互作用更加完善。分子间的对话有两个方面:不仅被 T 细胞激活产生淋巴因子和溶细胞素,而且通过 CD40 分子对 DC 发出信号[216]。

树突细胞和 T 细胞介导的免疫

这里我们不考虑总称上的 T 细胞,而是 DC 功能所涉及的几种不同类型的 T 细胞反应。T 细胞致敏是重点,但是应该记住 DC 表面长期具有高水平的 MHC-多肽复合物(见“DC 成熟”一节)。这对于 T 细胞记忆的产生和维持非常重要。

辅助性 T 细胞反应和 IL-12 的产生

IL-12 是一个重要细胞因子,它能使辅助性 T 细胞成为 Th1 细胞,并使 NK 细胞产生 IFN-γ。在体外,IL-12 与携带抗原成分的 DC 一起增强抗原特异性 CTL 反应[303]。巨噬细胞和 DC 能激活 IL-12 的异二聚体,而 B 细胞则不能。巨噬细胞与微生物或者 LPS 的相互作用能诱导产生 IL-12[325],而对于 DC,T 细胞似乎是主要的刺激因素[326,327]。DC 主要通过 CD40 产生 IL-12,所分泌的 IL-12 产量非常高[206,207]。

DC 产生 IL-12 有两个重要的特点。首先,成熟 DC 是最活跃的,部分因为成熟 DC 表达高水平的 CD40 分子。其次,DC 并不是必须呈递抗原给 T 细胞。T 细胞无论在活化状态还是在记忆状态都表达 CD40L,在没有与 T 细胞同源的抗原情况下能直接刺激 DC 产生 IL-12[207]。当记忆 T 细胞通过组织和淋巴结运输时,可长期诱导所遇到的 DC 产生 IL-12。DC-记忆 T 细胞的结合很容易被证实[240,328]。

当初始 T 细胞与 DC 上的抗原反应时,CD40L 表达,并通过 CD40 发送信号给 DC 产生 IL-12。反过来,又导致 T 细胞表型转变为 Th1,产生高水平的 IFN-γ[206,207,326,327,329]。当 DC 呈递抗原时,Th1 的产生似乎是内定途径。而 B 细胞并不产生 IL-12,因此 B 细胞并不能向 Th1 方向倾斜反应。

但是,如果当 DC 发挥功能时有 IL-4 存在,那么 T 细胞将偏斜向 Th2 途径[54]。IL-4 可能来自 T 细胞,后者被 APC 分泌的 IL-6 所激活,例如 B 细胞或者巨噬细胞[330](DC 不产生明显数量的 IL-6)、NK1.1$^+$ T 细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞。

CD8$^+$ 毒性细胞或杀伤细胞反应

前面几节的内容概述了体内 DC 诱导 CD8$^+$ T 细胞反应,以及在 MHC Ⅰ 分子上呈递病毒抗原。DC 是非同寻常的 APC,它能有效呈递抗原到 MHC Ⅰ 和 Ⅱ 分子上,并在相同的微环境中使辅助性 T 细胞或者杀伤性 T 细胞成簇,因此有助于 CTL 反应[331]。

目前一个重要问题还不清楚:在体内,病原体和肿瘤是否能够接近 DC 的 MHC Ⅰ 类分子。在 DC 中仅有一组病毒可以合成病毒蛋白,它们是流感病毒[302,332]、麻疹病毒[333,334]、蜱传脑炎病毒[335]和 HIV-1/猴免疫缺陷病毒(SIV)[328,336,337]。但是,有许多细菌和包装病毒具有进入 DC 的能力,虽然不复制,但能使 MHC Ⅰ 类分子担负呈递所需的足够多肽。DC 也能通过外源途径从凋亡细胞获取多肽(如病毒感染细胞和肿瘤细胞)[312]。

562

接触变态反应

接触性变应原的免疫应答强度可以描述成这些化学性物质与 DC 结合并诱导它们成熟以及迁移入输入

淋巴管的能力。而T细胞的反应则很复杂。主要的效应细胞是CD8⁺ Th1细胞[338,339]。一种CD4⁺ Th2类型的调节细胞也被诱导。这是令人惊讶的,因为LC能产生IL-12,可以使反应向Th1类型倾斜。当少量的接触性变应原用来诱导耐受时[340],耐受是由Th2类型的CD8⁺细胞介导的。T细胞对接触性变态原反应的这种复杂性是由于角质细胞能产生一系列的细胞因子。

T细胞依赖性抗体的形成

对DC功能的认识,一般认为,这些细胞激活CD4⁺辅助性T细胞,后者再直接与B细胞相互作用提供帮助。然而,最近发现,DC通过CD40-CD40L分子对被激活后,直接与B细胞相互作用。体外转染CD40L或抗CD40抗体的成纤维细胞来提供信号给DC上的CD40分子。DC激活后可提高IgM产量[341],并使初始IgD⁺细胞转变为分泌IgA的细胞[342]。

在组织中直接研究了T细胞依赖的B细胞应答。在抗体应答早期,抗体分泌细胞出现在T细胞与B细胞的细胞连接处的滤泡外[343]。此发现与体外实验结果相一致:DC先激活辅助性T细胞,再促使这三类细胞的分泌聚集体产生初次B细胞应答[19,20]。在这些聚集体中,DC协同T细胞的CD40L和IL-2信号,增强B细胞应答[341,344]。在抗体应答后期,生发中心发育,B细胞在此进行体细胞变异和亲和力成熟。生发中心的反馈由T细胞驱使。B细胞曾被认为是主要的APC,但是现在发现,生发中心的DC具有比B细胞还强的T细胞刺激功能[119]。

黏膜表面的T细胞

黏膜免疫在疫苗、炎症和口服免疫耐受方面非常重要。在这些内容中,必须结合解剖学部位考虑DC。在黏膜表面,例如肺和肠等涉及运输和外界交换的主要黏膜表面和黏膜相关性淋巴样组织,DC存在于两种类型的组织中。

肺和肠等黏膜表面分离出来的大量DC都是非成熟细胞。这是否意味着DC在这些组织中被有效地抑制住了?在肺[219,345]和肠[346]组织,巨噬细胞可抑制DC的功能,而且在这些机体表面巨噬细胞都非常丰富[347,348]。此外,几种巨噬细胞和上皮细胞的产物也有抑制作用,例如IL-10、前列腺素和氧化氮。这些抑制作用被认为是有价值的,因为气管和肠腔中蛋白是恒定呈现的,成熟DC可使这些重要的黏膜表面引起慢性炎症和变态反应。

黏膜相关性淋巴样组织的DC在抗原运输M细胞[163~165]和滤泡中心区域(T细胞区)[349,350]下的上皮下区域或者淋巴上皮区域中。关于这些DC在机体内或分离后的表型和功能都研究得较少。但这些DC的功能似乎是摄取进入肠道的抗原,再迁移入肠系膜淋巴中[61]。有趣的是,即使肠系膜淋巴中的DC能致敏未经肠源相关性抗原致敏的小鼠,但对于体内通常发生的对肠道和气管蛋白的致敏却不明显。当淋巴液分离的DC注射入非黏膜部位时[61],DC便丧失了一些在黏膜表面所具有的重要调节功能。

树突细胞和T细胞耐受

DC在免疫调节和诱导耐受方面的研究工作正不断增多。正如上面所论述的,黏膜免疫是其中一个方面。下面将从许多方面进行讨论,而这些方面也反映了研究工作的另一些途径。

中枢耐受或者胸腺耐受

胸腺髓质含有许多骨髓来源的DC[351,352]。它们最初在电镜下被认为是IDC。后来,DC从胸腺中分离出来,显示出与其他DC在形态、表性和功能上的相似[189,353~355]。目前与DC结合的单抗以及将胸腺髓质染色的单抗(图16.13)是针对小鼠CD11c的N418单抗[102,105]和两株显示DC内空泡中的抗原成分的单抗(M342和2A1)[102,103]。MHC分子和共刺激分子在髓质DC上非常丰富[215](图16.13)。

骨髓来源的细胞介导胸腺的阴性选择或者克隆清除，特别是表达有自身抗原的克隆。DC是活跃的APCs。如果将外源性或者同种异体的脾DC加入胎儿胸腺器官培养物中，胸腺中发育的T细胞便会选择性对加入的DC上的MHC分子耐受[356]。如果携带有超抗原的DC注射入一个成年体内的胸腺中，它们会介导表达超抗原反应性V片段的T细胞克隆消除或者无反应性[357,358]。在胸腺聚集体培养物中，DC远比皮质上皮细胞更有效地消除超抗原反应性T细胞[359]。DC是呈递自身血清蛋白和补体成分C5的最有效的细胞，可消除反应性胸腺细胞[360]。髓质和皮质的上皮细胞也参与介导了阴性选择[361]。

563

一种评价DC在自身耐受方面作用的新方法是将靶抗原转基因入DC。在小鼠体内，CD11c在DC上的表达水平很高。最近，将主要针对I-E表达的CD11c启动子转基因入DC[362]。接着便发生了针对I-E的耐受，提示DC在体内已足够介导有效的阴性选择。与此相反的是，如果将转基因小鼠构建成只有上皮细胞表达MHCⅡ分子而髓源性APC不表达，则发生自身免疫性疾病[363]。

在体内，胸腺DC专门负责有效的阴性选择：①位于髓质中(图16.13)，在这里阳性选择的胸腺细胞离开皮质；②含有外源凝集素，可以在微量的情况下捕捉自身抗原；③表达类如B7-2[215]、CD40[216]和fas-L[364]等增强阴性选择效率的分子。

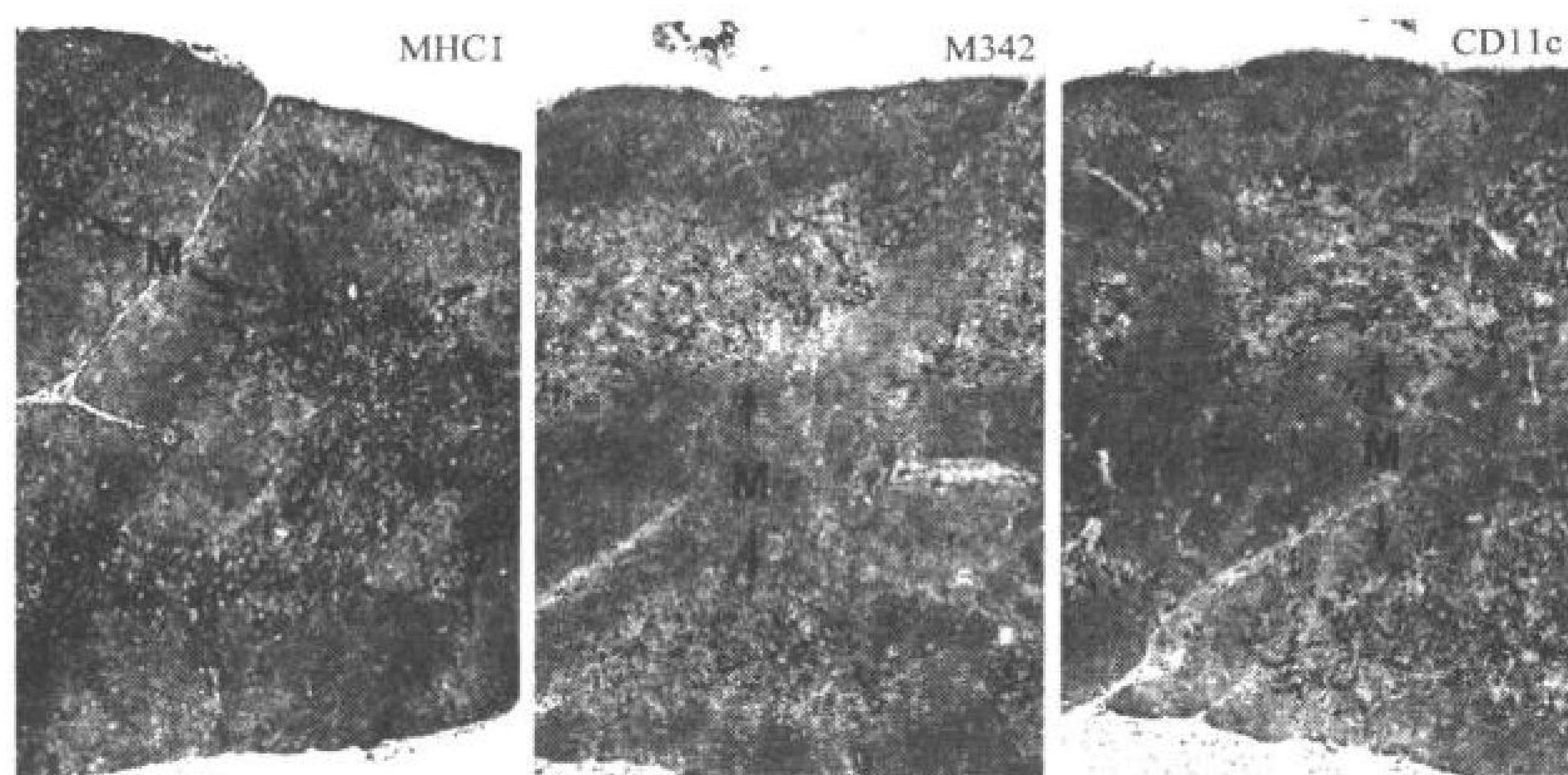


图16.13　小鼠胸腺染色切片显示CD11c整合素(右)、M342核内体抗原(中)和MHCⅠ类分子(左)。DC限制标记分子CD11c和M342主要在髓质表达(M，箭头所示)，而此处的MHC分子(Ⅰ类和Ⅱ类)都非常丰富。

外周耐受

由于许多自身抗原无法进入胸腺，因此胸腺中通过阴性选择的自身耐受便不会发生。外周对这些自身抗原有没有耐受呢？是通过DC吗？线索来自于所观察到的现象：DC是雄性或者H-Y移植抗原的有效APC[365]，但是当注射到雄性小鼠体内时，H-Y反应性T细胞并不引起炎症反应或者排斥反应[366]。同样地，在体内，超抗原由DC呈递[186]，但是将超抗原注射入小鼠则引起免疫应答，随后便是耐受。

外周耐受可能由不同的途径发生。一个重要的途径，特别是关于$CD4^+$ T细胞[367]，涉及到对抗原反应并表达fas的淋巴细胞凋亡[368,369]。这证实一些DC表达有活性的fas-L，它们在免疫调节中扮演着角色[364]。

功能实验提示，来自淋巴器官的DC能刺激针对自身抗原、β_2微球蛋白的T细胞[191]。最近发现，T细胞区的IDC表达一种很高水平的特殊MHC-自身多肽复合物，后者可被Y-Ae单抗检测[194]。来自外周组织的自身抗原，例如朗格汉斯(Langerhans)胰岛的胰岛素分泌细胞，由引流胰脏淋巴结中的APC呈递[370]。因此，DC在体内呈递自身抗原，而淋巴结中的APC则负责自身抗原的耐受[371]。

DC发育中是否存在独立的两条途径—髓源性途径和淋巴源性途径？它们在免疫和耐受中的作用分别如何？

有多种途径产生成熟DC。各种途径所产生的后代细胞都是体积较大的细胞，其特性概括在图16.6中，但是每一种途径在起源、表型和功能方面都有很大不同。最近，出现这种可能，即DC亚类的选择是用来诱导耐受的，而不是免疫应答。

DC 的两种免疫类型近来被认为是髓源性的。也就是,这些细胞对 GM-CSF 有反应,其后代细胞表达一些与吞噬细胞(巨噬细胞和粒细胞)相同的表面标记,特别是 CD11b 和 CD33。从人脐带血液的 CD34⁺ 祖细胞开始[225],一条途径产生上皮 LC。它们表达伯贝克颗粒、LAG-1[136]、CD1a 抗原和 E-钙黏着素[372]。E-钙黏着素可能对 LC 定位在上皮组织很重要。其他髓源途径,产生表皮和其他间质 DC,经过 CD14⁺ 中间体,后代细胞表达 CD2、CD9、CD36 等标记和ⅩⅢ因子谷氨酰胺转移酶[225]。在这条途径中,CD14⁺ 是个双向性中间体,它在 M-CSF 细胞因子的作用下发育成巨噬细胞,在 GM-CSF 的作用下则生长为 DC[225,227]。这个 CD14⁺ 双向性中间体在人血中是非增殖单核细胞的祖细胞。这些细胞随后还需要 IL-4 的作用才能发育成 DC,而没有加入这些细胞因子的 CD34⁺ 细胞培养物产生髓源性 DC。

564

两种髓源性途径在功能上的差异也值得注意。LC 途径表现出很低的巨噬细胞甘露糖受体的内吞活性。CD14⁺ 细胞途径则有较强和更持久的内吞作用,表达更多的非特异性酯酶。有趣的是,CD14⁺ 细胞专门结合免疫复合物,与 IL-2 和 CD40L 一起增强初次 B 细胞反应[344]。这提示了 CD14⁺ 来源的 DC 在体内 T 细胞依赖性抗体应答中扮演着选择的角色,或推动滤泡外初次抗体应答,或运输免疫复合物到生发中心。

这两种髓源性途径在集落实验中分别来自不同的 CD34⁺ 祖细胞群体[262]。CD34⁺ 细胞也根据皮肤淋巴细胞抗原(CLA)分为两部分。CLA⁺ 祖细胞是表皮 LC 的来源,而 CLA-细胞产生的 DC 缺乏伯贝克颗粒和 LAG-1[373]。由于 TGF-β1 基因敲除小鼠的 LC 缺乏选择作用[375],因而 LC 发育途径严格依赖 TGF-β[374]。

DC 发育的另一条途径是淋巴源性途径。这个术语反映了两个特点:这些 DC 与 T 细胞共享一个祖先[376,377],这些细胞缺乏髓源性标记,但表达类如 CD8 等淋巴标记[378]。最近发现,淋巴源性途径的 DC 表面表达高水平的 fas-L,并诱导抗原特异的 CD4⁺ T 细胞发生凋亡[364]。

现在可以由表达低水平 CD4 的胸腺前体细胞产生 DC[269]。细胞发育并不受 GM-CSF 的影响,但需要使用 IL-3、IL-1 和 TNF-α。在人扁桃腺和血液中鉴定到了 CD4⁺ 中间体[379]。这个细胞具有罕见的形态,类似血浆细胞,在 IL-3 作用下分化为表达极少量甚至不表达 CD13 和 CD33 的淋巴源性 DC。

这些途径在功能上有什么意义呢? DC 系统可能有两个水平,髓源性途径产生的子代细胞负责免疫应答,而淋巴源性途径所产生的 DC 则负责耐受。参与免疫应答的 DC 大多数在非淋巴器官和循环系统(血液、淋巴和脾脏边缘区)。它们被 TNF-α、LPS 和 CD40L 激活后,摄取外源抗原、产生 T 细胞刺激活性(发育成熟)并迁移至淋巴器官,选择循环中的抗原特异性 T 细胞克隆。而参与中枢耐受和外周耐受的 DC 表达高水平膜型 fas-L 和其他 TNF 家族成员分子,导致反应性 T 细胞被消除。

临床免疫中的树突细胞

以下讨论的几个临床方面都涉及到 T 细胞。然而这些领域的研究通常都强调抗原和 T 细胞,而排除了对免疫应答性质和数量方面都起关键作用的特异性辅助细胞。以下几个例子是目前正在进行的 DC 研究以及所取得的成果。

移植

最初强调消除移植物中的 DC,以排除受者 T 细胞的强效刺激因素。一小块小鼠内分泌移植物经抗 DC 抗体和补体处理后,可以使生存者跨越 MHC 障碍[58,59]。这对于较大的移植物是有疑问的,因为移植物多肽可被宿主 DC 通过异种识别的间接或交互激活途径来呈递[57]。当宿主 DC 进入移植物中,移植物多肽将被呈递,并引起慢性炎症反应(迟发型超敏反应)。

如果 DC 能诱导外周耐受,例如通过表达 fas-L,那么将受者移植物和致耐受的供者 DC 嵌合在一起是有用的。一个移植物,特别是具有造血功能的移植物(例如肝移植物),可以是来自供者微嵌合体的来源。这已经被提议来诱导移植物的长期耐受[380~382]。

接触变态反应

由于DC成熟和迁移发生在接触过敏原之后，因此研究这些变态反应的一个方法是设法阻断皮肤中DC的功能[243,244,383]。提高局部IL-10的产量可以阻断免疫刺激因子DC的成熟[208,209]。有人报道IL-10处理的DC可在体内产生对接触性过敏原的耐受[384]。IL-10也可直接对T细胞施加耐受效应[385]，阻断皮肤的炎症反应[386]。

自身免疫

几种人类疾病，例如青少年糖尿病、牛皮癣、一些关节炎和多发性硬化症，主要都是自身免疫的结果。在类风湿关节炎滑膜渗出液中大量存在DC[387,388]。来自牛皮癣真皮组织的DC刺激自体同源的T细胞[389]。但是还并没有获得关节的或者皮肤的反应性T细胞的直接证据。例如，在青少年糖尿病的非肥胖糖尿病小鼠模型中，谷氨酸脱羧酶(GAD)是一个关键性的自身抗原[390,391]，但是仍没有一个系统可以表明GAD对来自糖尿病的大量T细胞具有反应性。可能在这些实验中使用了太丰富的有效DC，消除了自身反应性T细胞。

疫苗

发展非感染的亚单位疫苗以引起强烈的T细胞介导的免疫应答是很重要的。疫苗设计强调靶向性和对特异性细胞的控制，例如DC和FDC。针对DC的疫苗是很有利的，它能使这些APC分泌大量的IL-12并作为CTL和T细胞依赖性抗体产生的天然佐剂。成熟DC不仅摄取抗原，并且是强烈的免疫刺激细胞，因此也可成为疫苗的靶物。

其中，有一个方法利用了GM-CSF对DC具有的多种增强效应，包括生存活力的维持、细胞成熟[130,218]、迁移至各种组织[392]以及介导祖细胞的增殖[103,224,256]。GM-CSF可增强对蛋白质和肿瘤细胞的免疫应答[393~395]。

565

使用裸DNA或者质粒DNA的遗传免疫法，即所谓的DNA疫苗，可激活B细胞、T辅助细胞和CTL，即使DNA主要表达在非专职APC上，例如肌细胞。现在知道，骨髓来源的APC能呈递所注射的DNA产物[396~398]，最近有资料证实，DC特别能携带注射的DNA分子，从肌细胞中摄取蛋白质并呈递DNA编码的多肽给T细胞[399,400]。

肿瘤免疫治疗

在黑色素瘤研究中，免疫学家努力鉴定肿瘤反应性T细胞。然而，获取的T细胞都是许多克隆或者是多个细胞系，在培养过程中会发生扩增。但在患者体内没有迹象表明存在着T细胞扩增和激活，例如，没有检测到针对黑色素瘤或其他肿瘤抗原的扩增CTL先驱细胞频率。免疫原性的一个关键性障碍是肿瘤抗原无法进入效应APC，即使有一些DC内吞外源性细胞的报道[312,401]。必须设计使肿瘤抗原更容易接近DC表面MHC分子的方法，特别是MHCⅠ分子。另一个有前途的提议是，肿瘤细胞分泌的细胞因子，例如血管内皮生长因子，可以阻断肿瘤中DC的成熟[402]。

由于无法检测到人类肿瘤特异性免疫应答，因此在主动免疫治疗方面强烈推荐使用自体同源的DC。DC可以在体外由祖细胞扩增而来，携带肿瘤抗原，再回输给患者[403,404]。目前许多研究小组正在用病毒和非病毒载体编码的抗原遗传修饰DC[273,405~407]。当原发性肿瘤被切除后，DC也可用作预防接种。这样，当原发性肿瘤还没有被鉴定出来，便能对转移产生免疫应答。

病毒的发病机制：麻疹和HIV-1

很久以来就知道麻疹感染与减弱的T细胞反应相关。最近研究发现，麻疹感染DC，诱导产生类似黏膜上皮多核巨细胞(Warthin-Finkeldey giant cell)的合胞体，以及抑制IL-12的产生以及刺激T细胞等功能[333,334]。

HIV-1研究中，DC也一直受到人们的关注。DC表达HIV-1的CD4受体[27,408]和病毒进入所需的趋化因

子共受体[252]。DC 与抗原和超抗原反应的 $CD4^+$ T 细胞相互作用,并长达几天[39,47,48,409]。这些活化的 $CD4^+$ T 细胞是感染 HIV-1 引发细胞病变的主要场所[410,411]。因此,对于细胞感染引起的病变,DC 提供了摄取 HIV-1,并传送病毒给 T 细胞的途径[412~414]。

然而,在 DC 与 T 细胞相互作用的淋巴组织 T 细胞区域鉴定感染的细胞很困难[415,416],因此人们将注意力转移到机体表面通过性传播途径而使 HIV 进入的部位。一些证据表明,男性生殖器黏膜中的 DC 是 HIV-1[417~420]和 SIV[420,421]传播的最早部位。在这些表面和引流的输入淋巴液中,成熟 DC 的数量相对于 T 细胞是很大的。最近的研究提示,DC 和 T 细胞一旦从机体表面分离出来,便提供了 HIV-1 和 SIV 复制的天然环境[328,336]。换句话说,黏膜淋巴细胞维持 HIV-1 和 SIV 的复制并不需要一些刺激因素,例如有丝分裂原、胎牛血清和 IL-2。

在黏膜淋巴组织中,抗原进入淋巴器官的部位相对来讲有大量的 DC 和淋巴细胞。由于淋巴细胞(和 DC)在这些上皮中或以下部位如此之多,因此常使用术语“淋巴上皮瘤”来形容。有证据表明,淋巴上皮瘤,特别是口腔的淋巴器官,是 DC 感染 HIV-1 的部位[164,165]。

HIV-1 感染的一个关键方面是,DC 是 HIV-1-特异性的、$CD8^+$ T 细胞的有效 APC,可杀死感染的细胞或者分泌趋化因子来阻断感染[422~424]。由于 HIV-1 的复制持续多年,血浆病毒血症水平可以一直保持稳定,患者长时间没有临床症状表现,因此患者体内一定存在着战场[425,426]。患者体内有大量的非感染病毒和凋亡的、感染的细胞。DC 可能将它们呈递给 $CD8^+$ T 细胞,这可以解释临床观察到的抵抗性。因此,HIV-1 感染的战场可能在 DC 中,特别是黏膜表面的 DC,它们控制了两个战争:通过 $CD4^+$ T 细胞的复制和通过 $CD8^+$ T 细胞的抵抗。

结论

树突细胞,T 淋巴细胞的专职 APC,在体内启动 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 反应。通过淋巴组织、血液和输入淋巴液制备富集的细胞群体,各种实验研究逐渐显示出它们与众不同的特性和功能。DC 是体内初次抗体应答和初次 MLR 的有效辅助细胞。T 细胞被 DC 致敏后,致敏 T 细胞再与其他 APC 相互作用。

由非成熟细胞而来的 DC 一般在非淋巴组织捕捉抗原。捕捉抗原的非成熟 DC 以上皮 LC 为代表,具有丰富的 MHCⅡ分子、胞内间隔区域或者 MⅡC。DC 由 TNF-α 和 CD40 配体触发 DC 成熟,溶酶体的 MⅡC 移动到细胞表面,共刺激分子的表达上调(CD40、CD54、CD58、CD80 和 CD86)。具有 T 细胞刺激活性的成熟 DC 稳定表达很高水平的细胞表面 MHC 分子。这些能动的非黏附细胞具有高水平的所有 NF-κB/rel 转录控制蛋白家族成员,产生大量的 IL-12 并能抵抗 IL-10 的抑制作用。

DC 包含了一个 APC 系统,它能在抗原进入的部位捕捉抗原,再迁移,识别同源 T 细胞,特别是外周淋巴器官 T 细胞区中的同源 T 细胞。DC 系统的成员包括上皮和其他层鳞状上皮的 LC、黏膜表面的 DC、呼吸道和肠腔内层以及上皮下区域的黏膜淋巴组织、心脏和肾脏的间质 DC,但不包括大脑实质、输入淋巴液和血液中的隐蔽细胞、胸腺髓质和淋巴组织 T 细胞区的 IDC。它们除了共享许多特性外,还具有一些不同的特性:不同的 DC 由不同的祖细胞发育而来,并具有不同的功能。以下将总结这些不同特性。

566

目前可以通过细胞因子刺激前体细胞来获得大量的 DC,这使得细胞功能和分子研究变得容易了。近来有一些实例,包括对抗原呈递所需的凝集素 C 型受体、DC-限制的趋化因子和趋化因子受体的鉴定工作。

DC 的生理学功能有许多地方让我们感到惊讶。对于 B 细胞应答,DC 一直在生发中心。体外,DC 的一个亚类能直接与 CD40 激活的 B 细胞相互作用,推动 B 细胞的同型转换和 IgG/IgA 的分泌。对于 MHCⅠ限制的 $CD8^+$ T 应答,DC 呈递来自非复制病毒、细菌和凋亡细胞的多肽。对于辅助细胞,DC 激活 Th1 或者在外源 IL-4 存在的情况下激活 Th2 应答。在胸腺中,DC 是阴性选择过程中的主要角色,其中一个亚类还牵涉到外周耐受。DC 也是临床研究的课题,包括针对感染因子和肿瘤的疫苗研究、类如麻疹和 HIV-1 病毒感染的发病机制等。

(李　华译)

参考文献

1. Mishell RI, Dutton RW. Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *J Exp Med* 1967;126:423–442.
2. Rosenthal AS, Shevach EM. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirements for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J Exp Med* 1973;138:1194–1212.
3. Shevach EM, Rosenthal AS. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. II. Role of the macrophage in the regulation of genetic control of the immune response. *J Exp Med* 1973;138:1213–1229.
4. Seeger RC, Oppenheim JJ. Synergistic interaction of macrophages and lymphocytes in antigen-induced transformation of lymphocytes. *J Exp Med* 1970;132: 44–62.
5. Cline MJ, Swett VC. The interaction of human monocytes and lymphocytes. *J Exp Med* 1968;128:1309–1325.
6. Mosier DE. A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. *Science* 1967;158:1573–1575.
7. Shortman K, Diener E, Russell P, Armstrong WD. The role of non-lymphoid accessory cells in the immune response to different antigens. *J Exp Med* 1970;131:461–482.
8. Ly IA, Mishell RI. Separation of mouse spleen cells by passage through columns of sephadex G-10. *J Immunol Methods* 1974;5:239–247.
9. Julius MH, Simpson E, Herzenberg LA. A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes. *Eur J Immunol* 1973;3:645–649.
10. Steinman RM, Cohn ZA. The interaction of soluble horseradish peroxidase with mouse peritoneal macrophages in vitro. *J Cell Biol* 1972;55:186–204.
11. Steinman RM, Cohn ZA. The interaction of particulate horseradish peroxidase (HRP)-anti HRP immune complexes with mouse peritoneal macrophages *in vitro*. *J Cell Biol* 1972;55:616–634.
12. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973;137:1142–1162.
13. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 1974;139:380–397.
14. Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med* 1979;149:1–16.
15. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties in vivo. *J Exp Med* 1974;139:1431–1445.
16. Swiggard WJ, Nonacs RM, Witmer-Pack MD, Inaba K, Steinman RM. Enrichment of dendritic cells by plastic adherence and EA rosetting. In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, eds. *Current Protocols in Immunology*, 2nd ed. New York: Greene and Wiley-Interscience, 1992: 3.7.1–3.7.11.
17. Inaba K, Nakano K, Muramatsu S. Cellular synergy in the manifestation of accessory cell activity for in vitro antibody response. *J Immunol* 1981;127: 453–461.
18. Inaba K, Steinman RM, Van Voorhis WC, Muramatsu S. Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983:80:6041–6045.
19. Inaba K, Witmer MD, Steinman RM. Clustering of dendritic cells, helper T lymphocytes, and histocompatible B cells, during primary antibody responses in vitro. *J Exp Med* 1984;160:858–876.
20. Inaba K, Steinman RM. Protein-specific helper T lymphocyte formation initiated by dendritic cells. *Science* 1985;229:475–479.
21. Komatsubara S, Hirayama Y, Inaba K, et al. Role of macrophages as modulators but not as autonomous accessory cells in primary antibody response. *Cell Immunol* 1985;95:288–296.
22. Nussenzweig MC, Steinman RM, Witmer MD, Gutchinov B. A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79: 161–165.
23. Klinkert WEF, Labadie JH, Bowers WE. Accessory and stimulating properties of dendritic cells and macrophages isolated from various rat tissues. *J Exp Med* 1982;156:1–19.
24. Kelly RH, Balfour BM, Armstrong JA, Griffiths S. Functional anatomy of lymph nodes. II. Peripheral lymph-borne mononuclear cells. *Anat Rec* 1978;190:5–21.
25. Pugh CW, MacPherson GG, Steer HW. Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J Exp Med* 1983;157:1758–1779.
26. Young JW, Steinman RM. Accessory cell requirements for the mixed leukocyte reaction and polyclonal mitogens, as studied with a new technique for enriching blood dendritic cells. *Cell Immunol* 1988;111:167–182.
27. O'Doherty U, Steinman RM, Peng M, et al. Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J Exp Med* 1993;178: 1067–1078.
28. Nussenzweig MC, Steinman RM, Unkeless JC, Witmer MD, Gutchinov B, Cohn ZA. Studies of the cell surface of mouse dendritic cells and other leukocytes. *J Exp Med* 1981;154:168–187.
29. Steinman RM, Nogueira N, Witmer MD, Tydings JD, Mellman IS. Lymphokine enhances the expression and synthesis of Ia antigen on cultured mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* 1980;152:1248–1261.
30. Steeg PS, Moore RN, Oppenheim JJ. Regulation of murine macrophage Ia-antigen expression by products of activated spleen cells. *J Exp Med* 1980;152: 1734–1744.
31. Nussenzweig MC, Steinman RM, Gutchinov B, Cohn ZA. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1980;152:1070–1084.
32. Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75:5132–5136.
33. Steinman RM, Gutchinov B, Witmer MD, Nussenzweig MC. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med* 1983;157:613–627.
34. Inaba K, Young JW, Steinman RM. Direct activation of $CD8^-$ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. *J Exp Med* 1987;166:182–194.
35. Boog CJP, Boes J, Melief CJM. Stimulation with dendritic cells decreases or obviates the $CD4^+$ helper cell requirement in cytotoxic T lymphocyte responses. *Eur J Immunol* 1988;18:219–223.
36. Nussenzweig MC, Steinman RM. Contributions of dendritic cells to stimulation of the murine syngeneic mixed leukocyte reaction. *J Exp Med* 1980;151: 1196–1212.
37. Sunshine GH, Gold DP, Wortis HH, Marrack P, Kappler JW. Mouse spleen dendritic cells present soluble antigens to antigen-specific T cell hybridomas. *J Exp Med* 1983;158:1745–1750.
38. Sunshine GH, Katz DR, Feldmann M. Dendritic cells induce T cell proliferation to synthetic antigens under Ir gene control. *J Exp Med* 1980;152:1817–1822.
39. Flechner ER, Freudenthal PS, Kaplan G, Steinman RM. Antigen-specific T lymphocytes efficiently cluster with dendritic cells in the human primary mixed-leukocyte reaction. *Cell Immunol* 1988;111:183–195.
40. Kuntz-Crow M, Kunkel HG. Human dendritic cells: Major stimulators of the autologous and allogeneic mixed leukocyte reactions. *Clin Exp Immunol* 1982; 49:338–346.
41. Van Voorhis WC, Valinsky J, Hoffman E, Luban J, Hair LS, Steinman RM. Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication. *J Exp Med* 1983;158:174–191.
42. Hart DN, McKenzie JL. Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. *J Exp Med* 1988;168:157–170.
43. Klinkert WEF, Labadie JH, O'Brien JP, Beyer CF, Bowers WE. Rat dendritic cells function as accessory cells and control the production of a soluble factor required for mitogen responses of T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;77:5414–5418.
44. Austyn JM, Steinman RM, Weinstein DE, Granelli-Piperno A, Palladino MA. Dendritic cells initiate a two-stage mechanism for T lymphocyte proliferation. *J Exp Med* 1983;157:1101–1115.
45. Inaba K, Steinman RM. Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. *J Exp Med* 1984;160:1717–1735.
46. Green J, Jotte R. Interactions between T helper cells and dendritic cells during the rat mixed leukocyte reaction. *J Exp Med* 1985;162:1546–1560.
47. Pancholi P, Steinman RM, Bhardwaj N. An approach to isolating T cell lines that react to antigens presented on the surface of dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 1991;85:349–356.
48. Pancholi P, Steinman RM, Bhardwaj N. Dendritic cells efficiently immunoselect mycobacterial-reactive T cells in human blood, including clonable antigen-reactive precursors. *Immunology* 1992;76:217–224.
49. Bhardwaj N, Hodtsev AS, Nisanian A, et al. Human T cell responses to *Mycoplasma arthritidis* derived superantigen (MAM). *Infect Immun* 1994;62: 135–144.
50. Bhardwaj N, Lau LL, Friedman SM, Crow MK, Steinman RM. Interleukin 1 production during accessory cell–dependent mitogenesis of T lymphocytes. *J Exp Med* 1989;169:1121–1136.
51. Koide SL, Inaba K, Steinman RM. Interleukin-1 enhances T-dependent immune responses by amplifying the function of dendritic cells. *J Exp Med* 1987;165: 515–530.
52. Inaba K, Witmer-Pack MD, Inaba M, Muramatsu S, Steinman RM. The function of Ia^+ dendritic cells, and Ia^- dendritic cell precursors, in thymocyte mitogenesis to lectin and lectin plus IL-1. *J Exp Med* 1988;167:149–162.
53. Koide S, Steinman RM. Induction of interleukin-1α mRNA during the antigen-dependent interaction of sensitized T lymphoblasts with macrophages. *J Exp Med* 1988;168:409–416.
54. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St. Groth B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of $CD4^+$ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992;176: 1091–1098.
55. Croft M, Duncan DD, Swain SL. Response of naive antigen-specific $CD4^+$ T

cells in vitro: Characteristics and antigen-presenting cell requirements. *J Exp Med* 1992;176:1431–1437.
56. Bhardwaj N, Young JW, Nisanian AJ, Baggers J, Steinman RM. Small amounts of superantigen, when presented on dendritic cells, are sufficient to initiate T cell responses. *J Exp Med* 1993;178:633–642.
57. Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell–depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med* 1982;155:31–41.
58. Faustman DL, Steinman RM, Gebel HM, Hauptfeld V, Davie JM, Lacy PE. Prevention of rejection of murine islet allografts by pretreatment with anti-dendritic cell antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:3864–3868.
59. Iwai H, Kuma S-I, Inaba MM, et al. Acceptance of murine thyroid allografts by pretreatment of anti-Ia antibody or anti-dendritic cell antibody in vitro. *Transplantation* 1989;47:45–49.
60. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med* 1990;172:631–640.
61. Liu LM, MacPherson GG. Antigen acquisition by dendritic cells: Intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo. *J Exp Med* 1993;177:1299–1307.
62. Sornasse T, Flamand V, DeBecker G, et al. Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response in vivo. *J Exp Med* 1992;175:15–21.
63. Havenith CEG, Breedijk AJ, Betjes MGH, Calame W, Beelen RHJ, Hoefsmit ECM. T cell priming in situ by intratracheally instilled antigen-pulsed dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8:319–324.
64. Flamand V, Sornasse T, Thielemans K, et al. Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo. *Eur J Immunol* 1994; 24:605–610.
65. Porgador A, Gilboa E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I–restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1995;182:255–260.
66. Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, et al. Therapy of murine tumors with tumor peptide pulsed dendritic cells: Dependence on T-cells, B7 costimulation, and Th1-associated cytokines. *J Exp Med* 1996;183:87–97.
67. Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific, CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 1996;183:283–287.
68. Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP. Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime CTL against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 1996;183:317–322.
69. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, et al. Bone marrow–derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nature Med* 1995;1:1297–1302.
70. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1996;184:465–472.
71. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Med* 1996;2:52–58.
72. Frey A, Giannasca KT, Weltzin R, et al. Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: Implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med* 1996;184:1045–1059.
73. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl J-P. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Ann Rev Immunol* 1996; 14:275–300.
74. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuh J-P. Epithelial M cells: Gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 1996;86:345–348.
75. Mandel TE, Phipps RP, Abbot A, Tew JG. The follicular dendritic cell: Long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev* 1980;53:29–59.
76. Liu Y-J, Grouard G, de Bouteiller O, Banchereau J. Follicular dendritic cells and germinal centers. *Int Rev Cytol* 1996;166:139–179.
77. Schriever F, Freedman AS, Freeman G, Messner E, Daley J, Nadler LM. Isolated human follicular dendritic cells display a unique antigenic phenotype. *J Exp Med* 1989;169:2043–2058.
78. Lindhout E, Lakeman A, Mevissen MLCM, de Groot C. Functionally active Epstein-Barr Virus-transformed follicular dendritic cell-like cell lines. *J Exp Med* 1994;179:1173–1184.
79. Nossal GJV, Abbot A, Mitchell J, Lummus Z. Antigen in immunity. XV. Ultrastructural features of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles. *J Exp Med* 1968;127:277–296.
80. Chen LL, Frank AM, Adams JC, Steinman RM. Distribution of horseradish peroxidase (HRP)-anti HRP immune complexes in mouse spleen, with special reference to follicular dendritic cells. *J Cell Biol* 1978;79:184–199.
81. Szakal AK, Kosco MH, Tew JG. Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses: Structure function relationships. *Annu Rev Immunol* 1989;7:91–109.
82. Veldman JE. Histophysiology and electron microscopy of the immune response. Groningen, 1970, PhD thesis.
83. Veldman JE, Kaiserling E. Interdigitating cells. In: Carr I, Daems WT, eds. *The Reticuloendothelial System: Morphology.* New York: Plenum, 1980:381–416.
84. Steinman RM, Adams JC, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med* 1975;141:804–820.
85. Veerman AJP. On the interdigitating cells in the thymus-dependent area of the rat spleen: A relation between the mononuclear phagocyte system and T-lymphocytes. *Cell Tissue Res* 1974;148:247–257.
86. Veerman AJP, Van Ewijk W. White pulp compartments in the spleen of rats and mice. A light and electron microscopical study of lymphoid and non-lymphoid cell types in T- and B-areas. *Cell Tissue Res* 1974;156:417–441.
87. Kaiserling E, Lennert K. Interdigitating reticulum cell in the human lymph node. A specific cell of the thymus dependent region. *Virchows Arch [B]* 1974; 16:51–61.
88. Van Ewijk W, Verzijden JHM, Kwast TM, Van Der Luijex-Meijer SWM. Reconstruction of the thymus dependent area in the spleen of lethally irradiated mice. A light and electron microscopic study of the T-cell microenvironment. *Cell Tissue Res* 1974;149:43–60.
89. Hoefsmit EC. Mononuclear phagocytes, retriculum cells and dendritic cells in lymphoid tissues. In: van Furth R, ed. *Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection and Pathology.* Oxford: Blackwell Scientific, 1975:129–146.
90. Fossum S. The architecture of rat lymph nodes. I. Combined light and electron microscopy of lymph node cell types. *Anat Embryol* 1983;167:229
91. Eikelenboom P. Characterization of non-lymphoid cells in the white pulp of the mouse spleen: An in vivo and in vitro study. *Cell Tissue Res* 1978;195:445–460.
92. Dijkstra CD. Characterization of nonlymphoid cells in rat spleen, with special reference to strongly Ia-positive branched cells in T-cell areas. *J Reticuloendothel Soc* 1982;32:167–178.
93. Fossum S. The architecture of rat lymph nodes. IV. Distribution of ferritin and colloidal carbon in the draining lymph nodes after foot-pad injection. *Scand J Immunol* 1980;12:433–441.
94. Witmer MD, Steinman RM. The anatomy of peripheral lymphoid organs with emphasis on accessory cells: Light microscopic, immunocytochemical studies of mouse spleen, lymph node and Peyer's patch. *Am J Anat* 1984;170:465–481.
95. Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev* 1997;156:25–37.
96. Zhou L-J, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995;154:3821–3835.
97. Mosialos G, Birkenbach M, Ayehunie S, et al. Circulating human dendritic cells differentially express high levels of a 55-kd actin-bundling protein. *Am J Pathol* 1996;148:593–600.
98. Takahashi K, Isobe T, Ohtsuki Y, Sonobe H, Takeda I, Akagi T. Immunohistochemical localization and distribution of S-100 proteins in the human lymphoreticular system. *Am J Pathol* 1984;116:497–503.
99. Takahashi K, Yamaguchi H, Ishizeki J, Nakajima T, Nakazata Y. Immunohistochemical and immunoelectron microscopic localization of S-100 protein in the interdigitating reticulum cells of the human lymph node. *Virchows Arch [B]* 1981;37:125–135.
100. Shiro BC, Siegal GP. The use of monoclonal antibodies to S100 protein in diagnostic immunochemistry. In: Wick MR, Siegal GP, eds. *Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunohistochemistry.* New York: Marcel Dekker, 1990:455–503.
101. Breel M, Mebius RE, Kraal G. Dendritic cells of the mouse recognized by two monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1987;17:1555–1559.
102. Agger R, Witmer-Pack M, Romani N, et al. Two populations of splenic dendritic cells detected with M342, a new monoclonal to an intracellular antigen of interdigitating dendritic cells and some B lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1992;52: 34–42.
103. Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992;176:1693–1702.
104. Rabinowitz SS, Gordon S. Macrosialin, a macrophage-restricted membrane sialoprotein differentially glycosylated in response to inflammatory stimuli. *J Exp Med* 1991;174:827–836.
105. Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1990;171:1753–1771.
106. Witmer-Pack MD, Crowley MT, Inaba K, Steinman RM. Macrophages, but not dendritic cells, accumulate colloidal carbon following administration in situ. *J Cell Sci* 1993;105:965–973.
107. Kraal G, Breel M, Janse M, Bruin G. Langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1986;163:981–997.
108. Witmer-Pack MD, Swiggard WJ, Mirza A, Steinman RM. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Cell Immunol* 1995; 163:157–162.
109. Knight SC, Balfour BM, O'Brien J, Buttifant L, Sumerska T, Clark J. Role of veiled cells in lymphocyte activation. *Eur J Immunol* 1982;12:1057–1060.
110. Drexhage HA, Mullink H, de Groot J, Clarke J, Balfour BM. A study of cells present in peripheral lymph of pigs with special reference to a type of cell resembling the Langerhans cells. *Cell Tissue Res* 1979;202:407–430.
111. Bujdoso R, Hopkins J, Dutia BM, Young P, McConnell I. Characterization of sheep afferent lymph dendritic cells and their role in antigen carriage. *J Exp Med* 1989;170:1285–1302.
112. Spry CJF, Pflug AJ, Janossy G, Humphrey JH. Large mononuclear (veiled) cells

with "Ia-like" membrane antigens in human afferent lymph. *Clin Exp Immunol* 1980;39:750

113. Brand CU, Hunziker T, Gerber HA, Schaffner T, Limat A, Braathen LR. Rosettes of Langerhans cells and activated T cells in human skin lymph derived from irritant contact dermatitis. In: Banchereau J, Schmitt D, eds. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* New York: Plenum, 1995:527–529.
114. Mayrhofer G, Holt PG, Papadimitriou JM. Functional characteristics of the veiled cells in afferent lymph from the rat intestine. *Immunology* 1986;58: 379–387.
115. Matsuno K, Kudo S, Ezaki T, Miyakawa K. Isolation of dendritic cells in the rat liver lymph. *Transplantation* 1995;60:765–768.
116. Mackay CR, Marston WL, Dudler L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med* 1990;171:801–818.
117. Mackay CR, Hein WR, Brown MH, Matzinger P. Unusual expression of CD2 in sheep: Implications for T cell interactions. *Eur J Immunol* 1989;18:1681–1688.
118. Galkowska H, Olszewski WL. Spontaneous cluster formation of dendritic (veiled) cells and lymphocytes from skin lymph obtained from dogs with chronic lymphedema. *Lymphology* 1992;25:106–113.
119. Grouard G, Durand I, Filgueira L, Banchereau J, Liu Y-J. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature* 1996;384:364–367.
120. Wolff K. The fascinating story that began in 1868. In: Schuler G, ed. *Epidermal Langerhans Cells.* Boca Raton, FL: CRC Press, 1991:1–21.
121. Wolff K. The Langerhans cell. *Curr Prob Dermatol* 1972;4:79–145.
122. Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 1979;282:324–326.
123. Stingl G, Wolff-Schreiner EC, Pichler WJ, Gschnait F, Knapp W. Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* 1977;268:245–246.
124. Tamaki K, Stingl G, Gullino M, Sachs DH, Katz SI. Ia antigens in mouse skin are predominantly expressed on Langerhans cells. *J Immunol* 1979;123: 784–787.
125. Rowden G, Lewis MG, Sullivan AK. Ia antigen expression on human epidermal Langerhans cells. *Nature* 1977;268:247–248.
126. Klareskog L, Malmnas-Tjernlund U, Forsum U, Peterson PA. Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* 1977;268:248–250.
127. Stingl G, Katz SI, Clements L, Green I, Shevach EM. Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 1978;121:2005–2013.
128. Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 1985;161:526–546.
129. Inaba K, Schuler G, Witmer MD, Valinsky J, Atassi B, Steinman RM. The immunologic properties of purified Langerhans cells: Distinct requirements for the stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. *J Exp Med* 1986;164:605–613.
130. Witmer-Pack MD, Olivier W, Valinsky J, Schuler G, Steinman RM. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1987;166: 1484–1498.
131. Teunissen MBM, Wormmeester J, Krieg SR, et al. Human epidermal Langerhans cells undergo profound morphologic and phenotypical changes during in vitro culture. *J Invest Dermatol* 1990;94:166–173.
132. Romani N, Lenz A, Glassel H, et al. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol* 1989;93: 600–609.
133. Silberberg-Sinakin I, Thorbecke GJ, Baer RL, Rosenthal SA, Berezowsky V. Antigen-bearing Langerhans cells in skin, dermal lymphatics and in lymph nodes. *Cell Immunol* 1976;25:137–151.
134. Lens JW, Drexhage HA, Benson W, Balfour BM. A study of cells present in lymph draining from a contact allergic reaction in pigs sensitized to DNFB. *Immunology* 1983;49:415–422.
135. Steinman RM, Schuler G, Romani N, Kaplan G. Dendritic cells. In: Zucker-Franklin D, Greaves MF, Grossi CE, Marmont AM, eds. *Atlas of Blood Cells: Function and Pathology,* 2nd ed. Philadelphia, PA: Lea & Febiger, 1988: 359–377.
136. Kashihara M, Ueda M, Horiguchi Y, Furukawa F, Hanaoka M, Imamura S. A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 1986;87:602–607.
137. Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, et al. Human epidermal Langerhans cells internalize by receptor-mediated endocytosis T6 (CD1"NA1/34) surface antigen. Birbeck granules are involved in the intracellular traffic of the T6 antigen. *J Invest Dermatol* 1987;89:172–177.
138. Stossel H, Koch F, Kampgen E, et al. Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1990;172: 1471–1482.
139. Hoefsmit ECM, Duijvestijn AM, Kamperdijk WA. Relation between Langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells. *Immunobiology* 1982;161:255–265.
140. Steinman RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells: Features and functions. *Immunol Rev* 1980;53:127–147.
141. Tew JG, Thorbecke J, Steinman RM. Dendritic cells in the immune response: Characteristics and recommended nomenclature. *J Reticuloendothel Soc* 1982; 31:371–380.
142. van den Oord JJ, De Wolf-Peeters C, de Vos R, Desmet VJ. The paracortical area in dermatopathic lymphadenitis and other reactive conditions of the lymph node. *Virchows Arch [B]* 1984;45:289–299.
143. Rausch E, Kaiserling E, Goos M. Langerhans cells and interdigitating reticulum cells in the thymus-dependent region in human dermatopathic lymphadenitis. *Virchows Arch [B]* 1977;25:327–343.
144. Macatonia SE, Knight SC, Edwards AJ, Griffiths S, Fryer P. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. *J Exp Med* 1987;166:1654–1667.
145. Kripke ML, Munn CG, Jeevan A, Tang J-M, Bucana C. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol* 1990;145:2833–2838.
146. van Wilsem EJG, Breve J, Kleijmeer M, Kraal G. Antigen-bearing Langerhans cells in skin draining lymph nodes: Phenotype and kinetics of migration. *J Invest Dermatol* 1994;103:217–220.
147. Cumberbatch M, Kimber I. Phenotypic characteristics of antigen-bearing cells in the draining lymph nodes of contact sensitized mice. *Immunology* 1990;71: 404–410.
148. Macatonia SE, Edwards AJ, Knight SC. Dendritic cells and the initiation of contact sensitivity to fluorescein isothiocyanate. *Immunology* 1986;59:509–514.
149. Barker CF, Billingham RE. The role of afferent lymphatics in the rejection of skin homografts. *J Exp Med* 1968;128:197–221.
150. Frey JR, Wenk P. Experimental studies on the pathogenesis of contact eczema in the guinea pig. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1957;11:81–100.
151. Schon-Hegrad MA, Oliver J, McMenamin PG, Holt PG. Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatability complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways. *J Exp Med* 1991;173:1345–1356.
152. Holt PG, Schon-Hegrad MA, Oliver J. MHC class II antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. Regulation of antigen presentation activity by endogenous macrophage populations. *J Exp Med* 1987;167:262–274.
153. Holt PG, Schon-Hegrad MA, Oliver J, Holt BJ, McMenamin PG. A contiguous network of dendritic antigen presenting cells within the respiratory epithelium. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;91:155–159.
154. McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA, Holt PG. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med* 1994;179:1331–1336.
155. Sertl K, Takemura T, Tschachler E, Ferrans VJ, Kaliner MA, Shevach EM. Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *J Exp Med* 1986;163:436–451.
156. Pollard AM, Lipscomb MF. Characterization of murine lung dendritic cells: Similarities to Langerhans cells and thymic dendritic cells. *J Exp Med* 1990;172: 159–168.
157. Maric I, Holt PG, Perdue MH, Bienenstock J. Class II MHC antigen (Ia)-bearing dendritic cells in the epithelium of the rat intestine. *J Immunol* 1996;156: 1408–1414.
158. McMenamin PG, Holthouse I, Holt PG. Class II major histocompatibility complex (Ia) antigen-bearing dendritic cells within the iris and ciliary body of the rat eye: Distribution, phenotype and relation to retinal microglia. *Immunology* 1992;77:385–393.
159. Steptoe RJ, Holt PG, McMenamin PG. Functional studies of major histocompatibility class II-positive dendritic cells and resident tissue macrophages isolated from the rat iris. *Immunology* 1995;85:630–637.
160. Pavli P, Hume DA, Van de Pol E, Doe WF. Dendritic cells, the main antigen-presenting cells of the human colonic lamina propria. *Immunology* 1993;78: 132–141.
161. Mayrhofer G, Pugh CW, Barclay AN. The distribution, ontogeny and origin in the rat of Ia-positive cells with dendritic morphology and of Ia antigen in epithelia, with special reference to the intestine. *Eur J Immunol* 1983;13:112–122.
162. Pavli P, Mawell L, Van de Pol E, Doe WF. Distribution of human colonic dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol* 1996;104:124–132.
163. Kelsall BL, Strober W. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med* 1996;183:237–247.
164. Frankel SS, Wenig BM, Burke AP, Mannan P, Thompson LDR, Abbondanzo SL, et al. Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* 1996;272:115–117.
165. Frankel SS, Tenner-Racz K, Racz P, et al. Active replication of HIV-1 in the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am J Pathol* 1997;151:89–96.
166. Holt PG, Haining S, Nelson DJ, Sedgwick JD. Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *J Immunol* 1994;153:256–261.
167. Hart DNJ, Fabre JW. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* 1981;154:347–361.
168. Prickett TCR, McKenzie JL, Hart DNJ. Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation* 1988;46:754–761.
169. Daar A, Fuggle S, Hart DNJ, et al. Demonstration and phenotypic characterization of HLA-DR positive interstitial dendritic cells widely distributed in human connective tissues. *Transplantation* 1983;15:311–315.
170. Spencer SC, Fabre JW. *Characterization of the tissue macrophage and the interstitial dendritic cell as distinct leukocytes normally resident in the connective tis-*

sue of rat heart. *J Exp Med* 1990;171:1841–1851.

171. Forbes RDC, Parfrey NA, Gomersall M, Darden AG, Guttmann RD. Dendritic cell–lymphoid cell aggregation and major histocompatibility antigen expression during rat cardiac allograft rejection. *J Exp Med* 1986;164:1239–1258.
172. Austyn JM, Hankins DF, Larsen CP, Morris PJ, Rao AS, Roake JA. Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. *J Immunol* 1994;152:2401–2410.
173. Lenz A, Heine M, Schuler G, Romani N. Human and murine dermis contain dendritic cells: Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J Clin Invest* 1993;92:2587–2596.
174. Nestle FO, Zheng X-G, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol* 1993;151:6535–6545.
175. Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens: A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med* 1990;171:307–314.
176. Fossum S. Lymph-borne dendritic leucocytes do not recirculate, but enter the lymph node paracortex to become interdigitating cells. *Scand J Immunol* 1989;27:97–105.
177. Matsuno K, Ezaki T, Kudo S, Uehara Y. A life stage of particle-laden rat dendritic cells .n vivo: Their terminal division, active phagocytosis and translocation from the liver to hepatic lymph. *J Exp Med* 1996;183:1865–1878.
178. Kudo S, Matsuno K, Ezaki T, Ogawa M. A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: Hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med* 1997;185:777–784.
179. Brenan M, Puklavec M. The MRC OX-62 antigen: A useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin. *J Exp Med* 1992;175:1457–1465.
180. Kupiec-Weglinski JW, Austyn JM, Morris PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from the blood, and T cell-dependent and -independent entry to lymphoid tissues. *J Exp Med* 1988;167:632–645.
181. Austyn JM, Kupiec-Weglinski JW, Hankins DF, Morris PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T cell-dependent areas of spleen, and binding within marginal zone. *J Exp Med* 1988;167:646–651.
182. Bradley LM, Watson SR, Swain SL. Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin. *J Exp Med* 1994;180:2401–2406.
183. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271–296.
184. Young JW, Steinman RM. The hematopoietic development of dendritic cells: A distinct pathway for myeloid differentiation. *Stem Cells* 1996;14:376–387.
185. Rogers WO, Weaver CT, Kraus LA, Li J, Li L, Bucy RP. Visualization of antigen-specific T cell activation and cytokine expression in vivo. *J Immunol* 1997;158: 649–657.
186. Luther SA, Gulbranson-Judge A, Acha-Orbea H, Maclennan ICM. Viral superantigen drives extrafollicular and follicular B differentiation leading to virus-specific antibody production. *J Exp Med* 1997;185:551–562.
187. Kearney ER, Pape KA, Loh DY, Jenkins MK. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunology* 1994;1:327–339.
188. Ingulli E, Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1997;185:2133 2141.
189. Kyewski BA, Fathman CG, Rouse RV. Intrathymic presentation of circulating non-MHC antigens by medullary dendritic cells. An antigen-dependent microenviroment for T cell differentiation. *J Exp Med* 1986;163:231–246.
190. Crowley M, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *J Exp Med* 1990;172:383–386.
191. Guery J-C, Adorini L. Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells. *J Immunol* 1995;154:536–544.
192. Xia W, Pinto CE, Kradin RL. The antigen-presenting activities of Ia⁺ dendritic cells shift dynamically from lung to lymph node after an airway challenge with soluble antigen. *J Exp Med* 1995;181:1275–1283.
193. Guery J-C, Ria F, Adorini L. Dendritic cells but not B cells present antigenic complexes to class II-restricted T cells after administration of protein in adjuvant. *J Exp Med* 1996;183:751–757.
194. Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM. High levels of an MHC II- self peptide complex on dendritic cells from lymph node. 1997; *J Exp Med* 1997;186:665–672.
195. Murphy DB, Rath S, Pizzo E, Rudensky AY, George A, Larson JK, et al. Monoclonal antibody detection of a major self peptide. *J Immunol* 1992;148: 3483–3491.
196. Rudensky AY, Rath S, Preston-Hurlburt P, Murphy DB, Janeway CA Jr. On the complexity of self. *Nature* 1991;353:660–662.
197. Romani N, Inaba K, Pure E, Crowley M, Witmer-Pack M, Steinman RM. A small number of anti-CD3 molecules on dendritic cells stimulate DNA synthesis in mouse T lymphocytes. *J Exp Med* 1989;169:1153–1168.
198. Bender A, Bui LK, Feldman MAV, Larsson M, Bhardwaj N. Inactivated influenza virus, when presented on dendritic cells, elicits human CD8⁺ cytolytic T cell responses. *J Exp Med* 1995;182:1663–1671.
199. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α. *J Exp Med* 1994;179:1109–1118.
200. Romani N, Koide S, Crowley M, et al. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones: Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1989;169:1169–1178.
201. Pure E, Inaba K, Crowley MT, et al. Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *J Exp Med* 1990;172:1459–1469.
202. Kampgen E, Koch N, Koch F, et al. Class II major histocompatibility complex molecules of murine dendritic cells: Synthesis, sialylation of invariant chain, and antigen processing capacity are down-regulated upon culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3014–3018.
203. Koch F, Trockenbacher B, Kampgen E, et al. Antigen processing in populations of mature murine dendritic cells is caused by subsets of incompletely matured cells. *J Immunol* 1995;155:93–100.
204. Sallusto F, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen in the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182:389–400.
205. Streilein JW, Grammer SF. In vitro evidence that Langerhans cells can adopt two functionally distinct forms capable of antigen presentation to T lymphocytes. *J Immunol* 1989;143:3925–3933.
206. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996;184:747–752.
207. Koch F, Stanzl U, Jennewien P, et al. High level IL-12 production by murine dendritic cells: Upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* 1996;184:741–747.
208. Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. *J Immunol* 1993;151:2390–2398.
209. Peguet-Navarro J, Moulon C, Caux C, Dalbiez-Gauthier C, Banchereau J, Schmitt D. Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells. *Eur J Immunol* 1994;24:884 891.
210. Macatonia SE, Doherty TM, Knight SC, O'Garra A. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol* 1993;150:3755–3765.
211. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Barthelemy C, Liu Y-J, Banchereau J. Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *Int Immunol* 1994;6:1177–1185.
212. Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F. IL-10 prevents the generation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells cultured with interlukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor. *Eur J Immunol* 1997;27:756–762.
213. Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, Becker Y, Kroczek RA, Pauli G. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-α, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol* 1995; 25:1943–1950.
214. Larsen CP, Ritchie SC, Pearson TC, Linsley PS, Lowry RP. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *J Exp Med* 1992;176:1215–1220.
215. Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, et al. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: Abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 1994;180:1849–1860.
216. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994;180:1263–1272.
217. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, et al. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 1994;180:1841–1847.
218. Heufler C, Koch F, Schuler G. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 1988;167:700–705.
219. Bilyk N, Holt PG. Inhibition of the immunosuppressive activity of resident pulmonary alveolar macrophages by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1993;177:1773–1777.
220. Crowley MT, Inaba K, Witmer-Pack MD, Gezelter S, Steinman RM. Use of the fluorescence activated cell sorter to enrich dendritic cells from mouse spleen. *J Immunol Methods* 1990;133:55–66.
221. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature, and the other immature. *Immunology* 1994;82:487–493.
222. Nijman HW, Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, et al. Antigen capture and MHC class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J Exp Med* 1995;182:163–174.
223. Flores-Romo L, Bjorck P, Duvert V, Van Kooten C, Saeland S, Banchereau J. CD40 ligation on human CD34- hematopoietic progenitors induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells. *J Exp Med* 1997;185: 341–349.
224. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992;360: 258–261.

225. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, et al. CD34⁻ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF⁻ TNF α. *J Exp Med* 1996;184:695–706.
226. Szabolcs P, Moore MAS, Young JW. Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34⁺ bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF-α. *J Immunol* 1995;154:5851–5861.
227. Szabolcs P, Avigan D, Gezelter S, et al. Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-CFU intermediate. *Blood* 1996;87:4520–4530.
228. Yamaguchi Y, Tsumura H, Miwa M, Inaba K. Contrasting effects of TGF 1 and TNFα on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells* 1997;15:144–153.
229. Kitajima T, Caceres-Dittmar G, Tapia FJ, Jester J, Bergstresser PR, Takashima A. T cell-mediated terminal maturation of dendritic cells. *J Immunol* 1996;157: 2340–2347.
230. Kitajima T, Arizumi K, Bergstresser PR, Takashima A. A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: The inhibition of T cell–mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. *J Clin Invest* 1996;98: 142–147.
231. Baldwin AS Jr. The NF-kB and IkB proteins: New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649–681.
232. Granelli-Piperno A, Pope M, Inaba K, Steinman RM. Coexpression of REL and SP1 transcription factors in HIV-1 induced, dendritic cell–T cell syncytia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10944–10948.
233. Weih F, Carrasco D, Durham SK, et al. Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kB/Rel family. *Cell* 1995;80:331–340.
234. Burkly L, Hession C, Ogata L, et al. Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 1995;373:531–536.
235. Salomon B, Lores P, Pioche C, Racz P, Jami J, Klatzmann D. Conditional ablation of dendritic cells in transgenic mice. *J Immunol* 1994;152:537–548.
236. Boehmelt G, Madruga J, Dorfler P, et al. Dendritic cell progenitor is transformed by a conditional v-Rel estrogen receptor fusion protein v-RelER. *Cell* 1995;80: 341–352.
237. Sallusto F, Nicolo C, De Maria R, Corinti S, Testi R. Ceramide inhibits antigen uptake and presentation by dendritic cells. *J Exp Med* 1996;184:2411–2416.
238. Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 1990;172:1483–1493.
239. Larsen CP, Ritchie SC, Hendrix R, et al. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J Immunol* 1994;152:5208–5219.
240. Pope M, Betjes MGH, Hirmand H, Hoffman L, Steinman RM. Both dendritic cells and memory T lymphocytes emigrate from organ cultures of human skin and form distinctive dendritic–T cell conjugates. *J Invest Dermatol* 1995;104:11–18.
241. Richters CD, Hoekstra MJ, van Baare J, du Pont JS, Hoefsmit ECM, Kamperdijk EWA. Isolation and characterization of migratory human skin dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 1994;98:330–337.
242. Lukas M, Stoessel H, Hefel L, et al. Human cutaneous dendritic cells migrate through dermal lymphatic vessels in a skin organ culture model. *J Invest Dermatol* 1996;106:1293–1299.
243. Enk AH, Angeloni VL, Udey SI. An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 beta in the initiation of primary immune responses in skin. *J Immunol* 1993;150:3698–3704.
244. Weinlich G, Sepp N, Koch F, Schuler G, Romani N. Evidence that Langerhans cells rapidly disappear from the epidermis in response to contact sensitizers but not to tolerogens/nonsensitizers. *Arch Dermatol Res* 1989;281:556.
245. Roake JA, Rao AS, Morris PJ, Larsen CP, Hankins DF, Austyn JM. Dendritic cell loss from non-lymphoid tissues following systemic administration of lipopolysaccharide, tumour necrosis factor, and interleukin-1. *J Exp Med* 1995;181:2237–2248.
246. MacPherson GG, Jenkins CD, Stein MJ, Edwards C. Endotoxin-mediated dendritic cell release from the intestine: Characterization of released dendritic cells and TNF dependence. *J Immunol* 1995;154:1317–1322.
247. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 1996;184:1413–1424.
248. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 1996;196:121–135.
249. Romani N, Reider D, Heuer M, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood: An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996;196:137–151.
250. Reddy A, Sapp M, Feldman M, Subklewe M, Bhardwaj N. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 1997;90:3640–3646.
251. Sozzani S, Sallusto F, Luini W, et al. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J Immunol* 1995;155: 3292–3295.
252. Granelli-Piperno A, Moser B, Pope M, et al. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J Exp* Med 1996;184:2433–2438.
253. Greaves DR, Wang W, Dairaghi DJ, et al. CCR6, a CC chemokine receptor which interacts with MIP-3α and is highly expressed in human dendritic cells. 1997 (submitted for publication).
254. Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, et al. DC-CK1, a dendritic cell specific C-C chemokine highly expressed in tonsils preferentially attracts naive T cells. *Nature* 1997 (in press).
255. Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, et al. Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* 1993;363:159–162.
256. Inaba K, Steinman RM, Witmer-Pack M, Aya H, Inaba M, Sudo T, et al. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med* 1992;175:1157–1167.
257. Scheicher C, Mehlig M, Zecher R, Reske K. Dendritic cells from mouse bone marrow: In vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol Methods* 1992;154:253–264.
258. Mackensen A, Herbst B, Kohler G, et al. Delineation of the dendritic cell lineage by generating large numbers of Birbeck granule-positive Langerhans cells from human peripheral blood progenitor cells in vitro. *Blood* 1995;86:2699–2707.
259. Santiago-Schwartz F, Belilos E, Diamond B, Carsons SE. TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 1992;52:274–281.
260. Strunk D, Rappersberger K, Egger C, et al. Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34⁻ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996;87:1292–1302.
261. Rosenzwajg M, Camus S, Guigon M, Gluckman JC. The influence of interleukin (IL)-4, IL-13 and Flt3 ligand on human dendritic cell differentiation from cord blood CD34⁺ progenitors. *Exp Hematol* 1998;26:63–72.
262. Young JW, Szabolcs P, Moore MAS. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal CD34⁺ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor α. *J Exp Med* 1995;182:1111–1120.
263. Kampgen E, Koch F, Heufler C, et al. Understanding the dendritic cell lineage through a study of cytokine receptors. *J Exp Med* 1994;179:1767–1776.
264. Witmer-Pack MD, Hughes D, Schuler G, et al. Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse. *J Cell Sci* 1993;104: 1021–1029.
265. Takahashi K, Naito M, Shultz LD, Hayashi S, Nishikawa S. Differentiation of dendritic cell populations in macrophage colony-stimulating factor-deficient mice homozygous for the osteopetrosis (op) mutation. *J Leukoc Biol* 1993;53:19–28.
266. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 1997;185: 317–328.
267. Paglia P, Girolomoni G, Robbiati F, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Immortalized dendritic cell line fully competent in antigen presentation initiates primary T cell responses in vivo. *J Exp Med* 1993;178:1893–1901.
268. Pierre P, Turley SJ, Gatti E, et al. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 1997;388:787–792.
269. Saunders D, Lucas K, Ismaili J, et al. Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1996;184:2185–2196.
270. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, et al. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: Multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 1996;184:1953–1962.
271. Lutz MB, Granucci F, Winzler C, et al. Retroviral immortalization of phagocytic and dendritic cell clones as a tool to investigate functional heterogeneity. *J Immunol Methods* 1994;174:269–279.
272. Shen Z, Reznikoff G, Droanoff G, Rock KL. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 1997;158:2723–2730.
273. Brossart P, Goldrath AW, Butz EA, Martin S, Bevan MJ. Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL. *J Immunol* 1997;158:3270–3276.
274. Volkmann A, Neefjes J, Stockinger B. A conditionally immortalized dendritic cell line which differentiates in contact with T cells or T-cell derived cytokines. *Eur J Immunol* 1997;26:2565–2572.
275. Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994;180:83–93.
276. Steinman RM, Swanson J. Commentary. The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 1995;181:283–288.
277. Reis e Sousa C, Stahl PD, Austyn JM. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 1993;178:509–519.
278. Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including *Bacillus* Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 1993;178:479–488.
279. Svensson M, Stockinger B, Wick MJ. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* 1997;158:4229–4236.
280. Moll H, Fuchs H, Blank C, Rollinghoff M. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol 1993;23:1595–1601.*

281. Blank C, Bogdan C, Bauer C, Erb K, Moll H. Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthase. *Eur J Immunol* 1996;26: 792–796.
282. Swiggard WJ, Mirza A, Nussenzweig MC, Steinman RM. DEC-205, a 205 kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: Purification, characterization and N-terminal amino acid sequence. *Cell Immunol* 1995;165:302–311.
283. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995;375:151–155.
284. Stahl P, Schlesinger PH, Sigardson E, Rodman JS, Lee YC. Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: Characterization and evidence for receptor recycling. *Cell* 1980;19:207–215.
285. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 1985;314:537–539.
286. Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, et al. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fcε). *J Exp Med* 1992;175:1285–1290.
287. Wang B, Rieger A, Kilgus O, et al. Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via FcεRI. *J Exp Med* 1992;175:1353–1365.
288. Maurer D, Fiebiger E, Ebner C, et al. Peripheral blood dendritic cells express FcεR1 as a complex composed of FcεR1α- and FcεR1 gamma-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J Immunol* 1996;157: 607–616.
289. Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 1991;349:669–676.
290. Kleijmeer MJ, Oorschot VMJ, Geuze HJ. Human resident Langerhans cells display a lysosomal compartment enriched in MHC class II. *J Invest Dermatol* 1994;103:516–523.
291. Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, Van Veen CJH, et al. MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J Immunol* 1995;154:5715–5724.
292. Sanderson F, Kleijmeer MJ, Kelly A, et al. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* 1994:266: 1566–1569.
293. Amigorena S, Drake JR, Webster P, Mellman I. Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 1994;369:113–120.
294. Tulp A, Verwoerd D, Dobberstein B, Ploegh HL, Pieters J. Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature* 1994;369: 120–126.
295. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997;388:782–787.
296. Harding CV, Roof RW, Unanue ER. Turnover of Ia-peptide complexes is facilitated in viable antigen-presenting cells: Biosynthetic turnover of Ia vs. peptide exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;86:4230–4234.
297. Young JW, Steinman RM. Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4⁺ helper T cells. *J Exp Med* 1990;171:1315–1332.
298. Macatonia SE, Taylor PM, Knight SD, Askonas BA. Primary stimulation by dendritic cells induces anti-viral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro. *J Exp Med* 1989;169:1255–1264.
299. Nonacs R, Humborg C, Tam JP, Steinman RM. Mechanisms of mouse spleen dendritic cell function in the generation of influenza-specific, cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1992;176:519–529.
300. Kast WM, Boog CJP, Roep BO, Voordouw AC, Melief CJM. Failure or success in the restoration of virus-specific cytotoxic T lymphocyte response defects by dendritic cells. *J Immunol* 1988;140:3186–3193.
301. Hengel H, Lindner M, Wagner H, Heeg K. Frequency of herpes simplex virus–specific murine cytotoxic T lymphocyte precursors in mitogen- and antigen-driven primary in vitro T cell responses. *J Immunol* 1987;139:4196–4202.
302. Bhardwaj N, Bender A, Gonzalez N, Bui LK, Garrett MC, Steinman RM. Influenza virus–infected dendritic cells stimulate strong proliferative and cytolytic responses from human CD8⁺ T cells. *J Clin Invest* 1994;94:797–807.
303. Bhardwaj N, Seder RA, Reddy A, Feldman MV. IL-12 in conjunction with dendritic cells enhances anti-viral, CD8⁺ CTL responses in vitro. *J Clin Invest* 1996;98:715–722.
304. Fesq H, Bacher M, Nain M, Gemsa D. Programmed cell death (apoptosis) in human monocytes infected by influenza virus. *Immunobiology* 1994;190:175–182.
305. Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 1976;143:1283–1288.
306. Huang AYC, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 1994;264:961–965.
307. Carbone FR, Bevan MJ. Class I–restricted processing and presentation of exogenous cell–associated antigen in vivo. *J Exp Med* 1990;171:377–387.
308. Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 1995;267: 243–246.
309. Huang AYC, Bruce AT, Pardoll DM, Levitsky HI. In vivo cross-priming of MHC class I–restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunology* 1996;4: 349–355.
310. Brumeanu TD, Swiggard WJ, Steinman RM, Bona CA, Zaghouani H. Efficient loading of identical peptide onto class II molecules by antigenized immunoglobulin and PR8 virus. *J Exp Med* 1993;178:1795–1799.
311. Reis e Sousa C, Germain RN. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med* 1995;182:841–851.
312. Albert M, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigens apopotic cells and induce class I-restricted CTLS. *Nature* 1998;392:86–89.
313. Freudenthal PS, Steinman RM. The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:7698–7702.
314. Pinchuk LM, Polacino PS, Agy MB, Klaus SJ, Clark EA. The role of CD40 and CD80 accessory cell molecules in dendritic cell–dependent HIV-1 infection. *Immunology* 1994;1:317–325.
315. Young JW, Koulova L, Soergel SA, Clark EA, Steinman RM, Dupont B. The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4⁺ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest* 1992;90:229–237.
316. Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 1996;273:104–106.
317. Schweitzer AN, Borriello F, Wong RCK, Abbas AK, Sharpe AH. Role of costimulators in T cell differentiation. *J Immunol* 1997;158:2713–2722.
318. Demotz S, Grey HM, Sette A. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 1990;249:1028–1030.
319. Harding CV, Unanue ER. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 1990;346: 574–576.
320. Christinck ER, Luscher MA, Barber BH, Williams DB. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* 1991;352:67–70.
321. Inaba K, Steinman RM. Accessory cell–T lymphocyte interactions: Antigen dependent and independent clustering. *J Exp Med* 1986;163:247–261.
322. Inaba K, Romani N, Steinman RM. An antigen-independent contact mechanism as an early step in T-cell–proliferative responses to dendritic cells. *J Exp Med* 1989;170:527–542.
323. Stockl J, Majdic O, Kohl P, Pickl WF, Menzel JE, Knapp W. Leukosialin (CD43)–major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation. *J Exp Med* 1996;184:1769–1779.
324. Dustin ML, Springer TA. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 1989;341:619–624.
325. Hsieh C-S, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphys KM. Development of Thl CD4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 1993;260:547–549.
326. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Thl cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 1995;154:5071–5079.
327. Heufler C, Koch F, Stanzl U, et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996;26:659–668.
328. Pope M, Betjes MGH, Romani N, et al. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 1994;78:389–398.
329. Ohshima Y, Delespesse G. T cell–derived IL-4 and dendritic cell–derived IL-12 regulate the lymphokine-producing phenotype of alloantigen-primed naive human CD4 T cells. *J Immunol* 1997;158:629–636.
330. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4–producing CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1997;185:461–469.
331. Stuhler G, Schlossman SF. Antigen organization regulates cluster formation and induction of cytotoxic T lymphocytes by helper T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:622–627.
332. Bender A, Albert M, Reddy A, Feldman M, Sauter B, Kaplan G, Hellmann W, Bhardwaj N. The distinctive features of influenza virus infection of dendritic cells. *Immunobiology* 1997;198:64–79.
333. Grosjean I, Caux C, Bella C, et al. Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1997;186:801–812.
334. Fugier-Vivier I, Servet-Delprat C, Rivailler P, Rissoan M-C, Liu Y-J, Rabourdin-Combe C. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of DC and T cells. 1997 (submitted for publication).
335. Labuda M, Austyn JM, Zuffova E, et al. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 1996;219:357–366.
336. Pope M, Elmore D, Ho D, Marx P. Dendritic cell–T cell mixtures, isolated from the skin and mucosae of macaques, support the replication of SIV. *AIDS Res Hum Retrovir* 1997;13:819–827.
337. Pope M, Gezelter S, Gallo N, Hoffman L, Steinman RM. Low levels of HIV-1 in cutaneous dendritic cells initiate a productive infection upon binding to memory

CD4+ T cells. *J Exp Med* 1995;182:2045–2056.

338. Xu H, Dilulio NA, Fairchild RL. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: Interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10–producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996;183:1001–1012.
339. Gocinski B, Tigelaar R. Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J Immunol* 1990;144: 4121–4128.
340. Steinbrink K, Sorg C, Macher E. Low zone tolerance to contact allergens in mice: A functional role for CD8+ T helper type 2 cells. *J Exp Med* 1996;183: 759–768.
341. Dubois B, Vanbervliet B, Fayette J, et al. Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J Exp Med* 1997;185:941–951.
342. Fayette J, Dubois B, Vandenabelle S, et al. Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2. *J Exp Med* 1997;185:1909–1918.
343. Liu Y-J, Zhang J, Lane PJL, Chan EY-T, Maclennan ICM. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell–dependent and T cell–independent antigens. *Eur J Immunol* 1991;21:2951–2962.
344. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF-TNF α. II. Functional analysis. *Blood* 1997;90:1458–1470.
345. Holt PG, Oliver J, Bilyk N, et al. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med* 1993;177:397–407.
346. Pavli P, Woodhams CE, Doe WF, Hume DA. Isolation and characterization of antigen-presenting dendritic cells from the mouse intestinal lamina propria. *Immunology* 1990;70:40–47.
347. Hume DA, Robinson AP, MacPherson GG, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs. *J Exp Med* 1983;158: 1522–1536.
348. Lee S-H, Starkey PM, Gordon S. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. *J Exp Med* 1985;161:475–489.
349. Wilders MM, Sminia T, Plesch BEC, Drexhage HA, Welte-Vreden EF, Meuwissen SGM. Large mononuclear Ia-positive veiled cells in Peyer's patches. II. Localization in rat Peyer's patches. *Immunology* 1983;48:461–467.
350. Wilders MM, Drexhage HA, Weltevreden EF, Mullink H, Duijvestijn A, Meuwissen SGM. Large mononuclear Ia-positive veiled cells in Peyer's patches. I. Isolation and characterization in rat, guinea-pig and pig. *Immunology* 1983;48:453–460.
351. Barclay AN, Mayrhofer G. Bone marrow origin of Ia-positive cells in the medulla of rat thymus. *J Exp Med* 1981;153:1666–1671.
352. Guillemot FP, Oliver PD, Peault BM, LeDourain NM. Cells expressing Ia antigen in the avian thymus. *J Exp Med* 1984;160:1803–1819.
353. Wong TW, Klinkert WEF, Bowers WE. Immunological properties of thymus cell subpopulations: Rat dendritic cells are potent accessory cells and stimulators in a mixed leukocyte culture. *Immunobiology* 1982;160:413–423.
354. Crowley M, Inaba K, Witmer-Pack M, Steinman RM. The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell Immunol* 1989;118:108–125.
355. Beaulieu S, Landry D, Bergeron D, Cohen EA, Montplaisir S. An improved method for purifying human thymic dendritic cells. *J Immunol Methods* 1995; 180:225–236.
356. Matzinger P, Guerder S. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* 1989;338:74–76.
357. Inaba M, Inaba K, Hosono M, Kumamoto T, Ishida T, Muramatsu S, et al. Distinct mechanisms of neonatal tolerance induced by dendritic cells and thymic B cells. *J Exp Med* 1991;173:549–559.
358. Mazda O, Watanabe Y, Gyotoku J-I, Katsura Y. Requirement of dendritic cells and B cells in the clonal deletion of Mls-reactive T cells in the thymus. *J Exp Med* 1991;173:539–547.
359. Jenkinson EJ, Anderson G, Owen JJT. Studies on T cell maturation on defined thymic stromal cell populations in vitro. *J Exp Med* 1992;176:845–853.
360. Zal T, Volkmann A, Stockinger B. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* 1994;180:2089–2099.
361. Volkmann A, Zal T, Stockinger B. Antigen-presenting cells in thymus that can negatively select MHC class II–restricted T cells recognizing a circulating self antigen. *J Immunol* 1997;158:693–706.
362. Brocker T, Karjalainen K. Targeted expression of MHC class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but no positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 1997;185:541–550.
363. Laufer TM, DeKoning J, Markowitz JS, Lo D, Glimcher LH. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 1996;383:81–85.
364. Suss G, Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand induced apoptosis. *J Exp Med* 1996;183:1789–1796.
365. Boog CJP, Kast WM, Timmers HTM, Boes J, De Waal LP, Melief CJM. Abolition of specific immune response defect by immunization with dendritic cells. *Nature* 1985;318:59–62.
366. Rocha B, von Boehmer H. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 1991;251:1225–1228.
367. Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature* 1995;377:348–351.
368. Singer GG, Abbas AK. The Fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunology* 1996; 1:365–371.
369. Parijs LV, Ibraghimov A, Abbas AK. The roles of costimulation and fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunology* 1996;4:321–328.
370. Kurts C, Heath WR, Carbone FR, Allison J, Miller JFAP, Kosaka H. Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* 1996;184:923–930.
371. Kurts C, Kosaka H, Carbone FR, Miller JFAP, Heath WR. Class I–restricted cross-presentation of exogenous self antigens leads to deletion of autoreactive CD8+ T cells. *J Exp Med* 1997;186:239–245.
372. Tang A, Amagai M, Granger LG, Stanley JR, Udey MC. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 1993;361: 82–85.
373. Strunk D, Egger C, Leitner G, Hanau D, Stingl G. A skin homing molecule defines the Langerhans cells progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med* 1997;185:1131–1136.
374. Strobl H, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Pickl WF, Rappersberger K, et al. TGF-β1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *J Immunol* 1996;157:1499–1507.
375. Borkowski TA, Letterio JJ, Farr AG, Udey MC. A role for endogenous transforming growth factor 1 in Langerhans cell biology: The skin of transforming growth factor 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1996;184:2417–2422.
376. Ardavin C, Wu L, Li C, Shortman K. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 1993;362:761–763.
377. Wu L, Li C-L, Shortman K. Thymic dendritic cell precursors: Relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med* 1996;184:903–911.
378. Vremec D, Zorbas M, Scollay R, et al. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: Investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* 1992;176:47–58.
379. Grouard G, Rissoan M-C, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu Y-J. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with IL-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997;185:1101–1111.
380. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, et al. Chimerism and donor specific nonreactivity 27 to 29 years after kidney allotransplantation. *Transplantation* 1993;55: 1272–1277.
381. Qian S, Demetris AJ, Murase N, Rao AS, Fung JJ, Starzl TE. Murine liver allograft transplantation: Tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology* 1994;19: 916–924.
382. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Thomson AW, Trucco M, Ricordi C. Cell chimerism permitted by immunosuppressive drugs is the basis of organ transplant acceptance and tolerance. *Immunol Today* 1993;14:326–332.
383. Enk A, Katz SI. Early molecular events in the induction phase contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1398–1402.
384. Enk AH, Saloga J, Becker D, Mohamadzadeh M, Knop J. Induction of hapten-specific tolerance by interleukin-10 in vivo. *J Exp Med* 1994;179:1397–1402.
385. Growx H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo M-G. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996; 184:19–29.
386. Berg DJ, Leach MW, Kuhn R, et al. Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med* 1995;182:99–108.
387. Thomas R, Davis LS, Lipsky PE. Rheumatoid synovium is enriched in mature antigen-presenting dendritic cells. *J Immunol* 1994;152:2613–2623.
388. Zvaifler NJ, Steinman RM, Kaplan G, Lau LL, Rivelis M. Identification of immunostimulatory dendritic cells in the synovial effusions of patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1985;76:789–800.
389. Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest* 1994.
390. Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tian J, et al. Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 1993;366:69–72.
391. Tisch R, Yang X-Y, Singer SM, Libiau RS, Fugger L, McDevitt HO. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 1993;366:72–75.
392. Kaplan G, Walsh G, Guido LS, et al. Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. *J Exp Med* 1992;175:1717–1728.
393. Tao M-H, Levy R. Idiotype/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma. *Nature* 1993;362:755–758.
394. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, et al. Vaccination with irradiated tumor cells

engineered to secrete murine granulocyte-macrophate colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3539–3543.

395. Pardoll DM. Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 1995;13:399–415.
396. Doe B, Selby M, Barnett S, Baenziger J, Walker CM. Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:8578–8583.
397. Corr M, Lee DJ, Carson DA, Tighe H. Gene vaccination with naked plasmid DNA: Mechanism of CTL priming. *J Exp Med* 1996;184:1555–1560.
398. Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Donnelly JJ, Liu MA. Generation of MHC class I-restricted T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: Antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* 1996;89:59–67.
399. Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo Jr. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nature Med* 1996;2:1122–1128.
400. Casares S, Inaba K, Brumeanu T, Steinman RM, Bona CA. Antigen presentation by dendritic cells following immunization with DNA encoding a class II–restricted viral epitope. *J Exp Med* 1997;186:1481–1486.
401. Fossum S, Rolstad B. The roles of interdigitating cells and natural killer cells in the rapid rejection of allogeneic lymphocytes. *Eur J Immunol* 1986;16:440–450.
402. Gabrilovich DI, Chen HI, Girgis KR, et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Med* 1996;2:1096–1103.
403. Steinman RM. Dendritic cells and immune-based therapies. *Exp Hematol* 1996; 24:859–862.
404. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, et al. Bone marrow–derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide-based antitumor vaccines. *Stem Cells* 1997; 15:94–103.
405. Bronte V, Carroll MW, Goletz TJW, et al. Antigen expression by dendritic cells correlates with the therapeutic effectiveness of a model recombinant poxvirus tumor vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3183–3188.
406. Alijagic S, Moller P, Artuc M, Jurgovsky K, Czarnetzki BM, Schadendorf D. Dendritic cells generated from peripheral blood transfected with human tyrosinase induce specific T cell activation. *Eur J Immunol* 1995;25:3100
407. Szabolcs P, Gallardo HF, Ciocon D, Sadelain M, Young JW. Retrovirally tranduced human dendritic cells express a normal phenotype and potent T cell stimulatory capacity. *Blood* 1997;90:2160–2167.
408. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Anti-Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol* 1983;131:212–216.
409. Bhardwaj N, Friedman SM, Cole BC, Nisanian AJ. Dendritic cells are potent antigen-presenting cells for microbial superantigens. *J Exp Med* 1992;175: 267–273.
410. Leonard R, Zagury D, Desportes I, Bernard J, Zacury J-F, Gallo RC. Cytopathic effect of human immunodeficiency virus in T4 cells is linked to the last stage of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:3570–3574.
411. Klatzmann D, Barré-Sinoussi F, Nugeyre MT, et al. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science* 1984;225:59–63.
412. Cameron PU, Freudenthal PS, Barker JM, Gezelter S, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science* 1992;257:383–387.
413. Cameron PU, Pope M, Gezelter S, Steinman RM. Infection and apoptotic cell death of CD4- T cells during an immune response to HIV-1 pulsed dendritic cells. *AIDS Res Hum Retrovir* 1994;10:61–71.
414. Weissman D, Barker TD, Fauci AS. The efficiency of acute infection of CD4- T cells is markedly enhanced in the setting of antigen-specific immune activation. *J Exp Med* 1996;183:687–692.
415. Tenner Racz K, Racz P, Schmidt H, et al. Immunohistochemical, electron microscopic and in situ hybridization evidence for the involvement of lymphatics in the spread of HIV-1. *AIDS* 1988;2:299–309.
416. Cameron PU, Dawkins RL, Armstrong JA, Bonifacio E. Western blot profiles, lymph node ultrastructure and viral expression in HIV-infected patients: A correlative study. *Clin Exp Immunol* 1987;68:465–478.
417. Pomerantz RJ, de la Monte SM, Donegan SP, et al. Human immunodeficiency virus (HIV) infection of the uterine cervix. *Ann Intern Med* 1988;108:321–327.
418. Nuovo GJ, Forde A, MacConnell P, Fahrenwald R. In situ detection of PCR-amplified HIV-1 nucleic acids and tumour necrosis factor cDNA in cervical tissues. *Am J Pathol* 1993;143:40–48.
419. Miller CJ, Alexander NJ, Vogel P, Anderson J, Marx PA. Mechanism of genital transmission of SIV: A hypothesis based on transmission studies and the location of SIV in the genital tract of chronically infected female rhesus macaques. *J Med Primatol* 1992;21:64–68.
420. Spira AI, Marx PA, Patterson BK, et al. Cellular targets of infection and route of viral dissemination following an intravaginal inoculation of SIV into rhesus macaques. *J Exp Med* 1996;183:215–225.
421. Miller CJ, Alexander NJ, Sutjipto S, et al. Genital mucosal transmission of simian immunodeficiency virus: Animal model for heterosexual transmission of human immunodeficiency virus. *J Virol* 1989;63:4277–4284.
422. Koup RA, Safrit JT, Yunzhen C, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994;68:4650–4655.
423. Borrow P, Lewicki H, Hanh BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8- cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994;68:6103–6110.
424. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1996;270:1811–1816.
425. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995;373:123–126.
426. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995;373: 117–122.

第17章 自然杀伤细胞

Wayne M. Yokoyama①

575

自然杀伤(natural killer,NK)细胞属于淋巴谱系,被认为是第三群淋巴细胞。对 NK 细胞的研究最初集中在其杀伤肿瘤的能力上,但像其他淋巴细胞一样,NK 细胞现在被认为在宿主防御入侵病原体,特别是最早期的宿主免疫应答中有着重要作用。NK 细胞通过分泌细胞因子对随后的特异性免疫也起调节作用。与其在天然宿主免疫应答中的明显作用一致,系统发生的研究证明许多脊椎动物,包括鱼类,对某种靶细胞呈现自发的细胞毒作用[1]。NK 细胞的特异性对非细胞毒组织相容反应遗迹在一种海绵中得到证明[2],这个例子表明 NK 细胞系统发育早于特异性免疫系统。在这一章,对这些重要淋巴细胞的突出特征和生物学意义作了综述。对 NK 细胞的临床意义做出评价之前,我们通过比较它们与 T 细胞和 LAK 细胞的区别对 NK 细胞下了定义,概括了在理解它们的靶识别系统,特别强调其Ⅰ类主要组织相容性复合物(MHC)时所作的努力,描述了 NK 基因复合物,讨论了 NK 细胞在生物学反应中的作用并且考虑了 NK 细胞目前的发展状态。

NK 细胞的定义

NK 细胞的最初定义起源于其自发杀伤某种肿瘤靶细胞能力[3~6]。自然杀伤能力并不需要靶细胞对与靶细胞在一起的宿主的事先免疫,目前自然杀伤作用的检测由于方法简单故格外引人注意。通常是用铬酸钠对 NK 敏感的靶细胞进行标记,放射性标记嵌入到细胞内部,而游离的^{51}Cr则被洗去[7]。对与小鼠 NK 细胞,原始典型的 NK 敏感性的肿瘤靶是(YAC)-1,它是一种来源于莫洛尼病毒感染的 A 型菌株小鼠胸腺瘤。

① W. M. Yokoyanma: Hughes Medical Institute, Rheumatology Division, Department of Medicine, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri 63110.

对于人 NK 细胞，来自红白血病谱系的一个细胞系 K562 是标准的肿瘤靶细胞。在微量滴定板上，恒定数量的放射标记过的靶细胞进行单独孵育(自发)，用去污剂孵育(最大)，或用各种数量的效应细胞与其共同孵育(实验)。后者以效应细胞/靶细胞的形式表示。当比率小于 10:1 时通常通过富集的、活化的 NK 细胞产生强大的杀伤力，然而未分组分的新鲜分离的外周血或脾制备物其比率大于 100:1。尽管一小部分标记物自发释放出来，但当含有穿孔素、丝氨酸蛋白酶和其他一些酶的溶酶体颗粒通过细胞外毒性从而介导杀伤过程，导致膜的整合性遭破坏时，大部分标记物被释放入上清液中。释放的标记物不可再利用，孵育 4 天后，收集无细胞上清液，放射活性通过 γ 计数器来测定。其中分析变异包括用荧光染料标记靶细胞和通过一个荧光微孔板读数仪使染料释放入上清液来测定靶细胞的溶解。另外一种方法，颗粒酶的释放可通过其逆转一种合适底物的能力来测定，在大多数实验中依据一个标准公式，表示如下：

576

$$\text{特异性的细胞毒作用}\% = 100 \times \frac{\text{实验每分钟计数} - \text{自发每分钟计数}}{\text{最大每分钟计数} - \text{自发每分钟计数}}$$

从形态学上看，NK 细胞通常是含有嗜苯胺蓝颗粒的大淋巴细胞[8]，这种描述曾经被正式用作定义 NK 细胞和作为密度梯度分离几种细胞的基础[9]。然而，大颗粒淋巴细胞(LGL)的形态学并不总是一成不变与自然杀伤有关，因为小的，无颗粒的淋巴细胞也证明有相似的细胞裂解活性[10]。而且，此描绘并不是特异性的，因为活化的细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)能呈现出 LGL 的形态学。因而，LGL 的特征曾经是与 NK 细胞同义，但后来就不再如此。

近来的研究提供了强大的证据说明 NK 细胞属于淋巴细胞谱系(后面将详细讨论)。比起 B 细胞，NK 细胞与 T 细胞更相像，因为 NK 和 T 细胞都不表达表面免疫球蛋白(sIg)，并且它们具有许多共同表面分子和功能特性，包括效应机制(表 17.1)。事实上，在 T 细胞的分子描述之前(如表达 TCR-CD3 复合物的细胞)，NK 细胞就常与 T 细胞混淆。后来由于详尽的研究表明，T 细胞和 NK 细胞组成不同的淋巴谱系——从而首次在 NK 细胞得出定义之前比较这两个淋巴细胞种群上产生了作用。

NK 细胞与 T 细胞

由于数种细胞表面分子共同表达在 NK 细胞和 T 细胞上(表 17.1)[12,13]和其相似的溶解能力导致在区分这两个种群时存在着难度。在某些情况下，甚至克隆的 CTL 细胞系同样证明对同种异体 MHCⅠ类分子有非凡的特异性，例如，可以杀伤很大范围内的靶细胞，包括 NK 敏感的靶细胞，如 YAC-1 或 K562[11,14,15]，这种 CTL 偶然的细胞毒性(也叫 MHC 非限制性杀伤)与自然杀伤相似，并是 NK 细胞和 T 细胞之间相似性的一个指标。

577

表 17.1 NK 与 T 细胞的相似性与有关不同之处

	NK 细胞	MHCⅠ类限制性 $CD8^+$ T 细胞
一般情况		
大颗粒淋巴细胞形态	常规	+(活化的)
在非胸腺部位或重组酶缺陷啮齿类	+	-
细胞表面分子		
TCR/CD3 复合物	-	+
胞质 CD3 组分	+	+
CD2	+	+
CD3ζ(表面)	+	+
FcεRⅠγ	+	+
CD5	-	+
CD8	有时	+
CD11a(LFA-1α)	+	+
CD11b(Mac-1α)	+	+
CD11c(p150α)	+	+
CD16	+(FcγRⅢA)	-(早期胸腺细胞除外)

续表

	NK 细胞	MHC Ⅰ类限制性 $CD8^+$ T 细胞
CD18(β2 整合素)	+	+
CD28	+	+
CD45(小鼠为 B220)	+	-
CD56(人)	+(人)	-
CD57(人)	+(人)	+/-
CD69	+(活化)	+(活化)
CD94(人)	+	+/-
NKG2(人)	+	-
热激抗原(J11d)(啮齿类)	-	+(不成熟)
IL-2Rβ	+(组成型)	+(活化)
2B4(小鼠)	+	+(活化)
NKR-P1(啮齿类)	+	小亚群
Ly-49(啮齿类)	+(交叉亚群)	小亚群
Asialo-GM_1(啮齿类)	+	+/-
KIR(p58,NKAT,p140)(人)	+	-
gp49B1(小鼠)	+	-
功能		
细胞因子的产生	+	+
靶溶解(颗粒胞吐作用,Fas)	+	+
MHC Ⅰ类识别	+	+
靶细胞 MHC Ⅰ类分子在杀伤中的效应	抑制	必需

尽管 NK 细胞活化的生化途径并不清楚,NK 和 T 细胞均表现出通过相似机制杀伤靶细胞[16]。NK 细胞和 CTL 含有相似组分的细胞毒颗粒,如穿孔素,一个补体组分有关的分子和颗粒酶丝氨酸蛋白酶,两种细胞活化时均释放其颗粒组分,通过 Ca^{2+} 依赖的穿孔素发生多聚化,导致靶细胞膜穿孔,颗粒酶由此进入细胞从而介导凋亡。与这种颗粒出胞作用模型和在诱导靶细胞溶解和凋亡中需要两种分子一致,近来研究表明当小鼠穿孔素或颗粒酶 B 基因发生了靶向无效的突变后,CTL 和 NK 细胞的溶解活性消失[17~20]。虽然穿孔素是一个单分子实体,但颗粒酶由选择性地表达在 CTL 或 NK 细胞上的一个家族的几个相关分子组成,这暗示着比目前所理解的更为复杂[21]。CTL 表达 FasL,FasL 与靶上的 Fas 交联后,触发凋亡,从而可诱导穿孔素依赖的靶细胞凋亡变化[22]。近来的证据表明活化的 NK 细胞也能表达可诱导凋亡的 FasL,诱导表达 Fas 的靶细胞凋亡[23~26]。然而,对于典型的 NK 敏感靶细胞的自然杀伤,这条途径的相对作用仍不清楚。然而,NK 细胞和 T 细胞通过相似的机制诱导靶细胞的溶解。

NK 细胞也通过与 T 细胞相似的方式产生和分泌细胞因子[27]。NK 细胞是 IFN-γ、TNF-α、造血 CSF、GM-CSF 和 IL-13 主要产生者。当 NK 细胞暴露于细胞(如肿瘤靶细胞和细胞因子 IL-2,IL-12)或被细胞表面受体(如 FcγRⅢ)链接[27]时可释放这些细胞因子。而且,NK 和 T 细胞表达多重细胞因子受体,特别是可影响它们功能的 IL-2、IL-12 和 TNF-α 的受体。

尽管这些相似性容易造成混淆,但成熟 NK 细胞不是 T 细胞(表 17.1)[28]。NK 细胞发育不需胸腺,它们在无胸腺裸鼠中是正常的。NK 细胞不表达 TCR。事实上,NK 细胞不产生 TCR 链的成熟转录子;不重排 TCR 基因[29,30]。SCID 突变或靶向 RAG-1 和 RAG-2 基因突变的小鼠缺乏 TCR 基因重排和成熟 T 细胞,但具有正常功能的 NK 细胞[31-34]。TCR 全面功能的表达需要 CD3 复合物的协同表达,CD3 复合物由 CD3δ、γ、ε 和 ζ 多聚链组成[35],几种 CD3 组成成分可以在 NK 细胞,特别是不成熟的 NK 细胞的胞质中发现,但却不能呈现在细胞表面[36]。NK 细胞可以表达 CD3ζ 链,但它表达在细胞表面是与跨膜形式的 CD16(但在人体中是 FcγRⅢA)相连而不是 TCR-CD3 复合物[然而,CD16 是一种对 IgE 有高亲和力的 Fc 受体 γ 链同型二聚体(FcεRⅠ)[39]有普通关联的分子][37,38],因此,NK 细胞的发育不需正常胸腺或重组酶的机械作用,在其胞膜上也不表达 TCR-CD3,可清楚区分 NK 细胞与 T 细胞。

另外几种淋巴类细胞表面分子在 NK 细胞上也缺乏。CD5(Ly-1)分子几乎被发现在所有的 T 细胞上，NK 细胞上就不表达[13,28]。虽然胸腺细胞和成熟 T 细胞亚群可表达 CD1,CD4 和热稳定抗原(HSA,被 Jlld mAb 识别)，NK 细胞既不表达这些分子也不表达 SIg,CD19,MHC Ⅱ 类分子和其他一些表达在 B 细胞上的分子。相反，NK 细胞表达 B220,一种鼠 CD45 异构体(CD45R)，B220 经常被用作 B 细胞特异性的标志，这说明 CD19 比 B220 在作 B 细胞系的标志更可信[40]。

人 NK 细胞选择性地表达几种可作为有用细胞表面标志的分子，如 CD56。虽然，在神经组织和一些肿瘤上也发现 CD56,但它并不表达在其他造血细胞或淋巴细胞(少于 5%外周血 T 细胞)[41~43]，这种 140kDa 的分子来自编码涉及神经系统发育和细胞-细胞相互作用的神经细胞黏附分子(NCAM)基因的交替剪切作用[44,45]。CD56 由五个 Ig 类和两个纤维结合素Ⅲ型域组成，可参与黏附分子在 NK 细胞与其靶细胞之间的黏附[46]，但其功能颇具争议。难以理解的是，小鼠 CD56 作为 NK 细胞的特异性标志，并不可信赖，表明它在 NK 细胞上的功能作用上并不保守。CD57(HNK－1,Leu-7)决定簇在区分 NK 细胞与其他细胞上用处更小，尽管它最先被认为是 NK 细胞特异性的[12,13]。虽然它存在大多数 NK 细胞上，但也表达在显著数量的 T、B 细胞和单核细胞上。像 CD56 一样，CD57 表达在神经组织，但知道得很少。因而，CD56 作为人、NK 细胞的标志特别有用。

CD16(FcγRⅢ)分子是一种相对特异性的人和小鼠 NK 细胞表面分子。虽然 CD16 也表达在中性粒细胞和巨噬细胞上，但它在其他淋巴细胞上并不表达[47,48]，除非在胸腺发育的早期阶段[49]。CD16 分子参与抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)，这在后面将更详细加以讨论。

表 17.2　mAbPK136 的品系反应性

NK1.1$^+$品系	NK1.1$^-$品系
C57BL/6 和同类系	A/J
C57BL/10 和同类系	AKR/J
C57BR/cdJ	BALB/c 和同类系
C58/J	C3HeB/FeJ
CE/J	DBA/2J
NZB/B1NJ	NOD/LtJ
NZW/LacJ	129/J
ST/bJ	
BALB.B6-Cmv1^r	

在得到 Koo 和 Peppard[52] 的允许作了改动，他们的结论是建立在经抗体和补体处理后，自然杀伤被排除的基础上。表达得到证实并通过在 IL-2 活化 NK 细胞中通过 FCM 得到扩展(A.H.Idris 和 W.M.Yokoyama 未发表的观察)。SJL/J 和 C57L/J 品系 NK 细胞上的表达存在争议。mAbPK136 的反应性通常与属于被一 MusNKR-P1cDNA 探针[125]鉴别为两个组的四个不同 RELP 变体的杂交品系相应。

NK 细胞选择性或组成型地表达鼠 NK1.1,Ly-49 和 2B4 分子；人杀伤抑制受体(KIR,也叫 p58,NKB1,p70, p140,p50 和 NKAT)；以及 CD94 和 NKG2 分子。虽然这些分子在 T 细胞的小亚群上也有表达，但这些分子是相对 NK 细胞特异性的，特别当传统的 TCR-CD3$^+$ T 细胞排除掉以后。由于它们在自然杀伤中的功能活性，如后面将要详细讨论的，这些分子在 NK 细胞特异性方面发挥着重要作用。作为 C57BL 品系小鼠 NK 细胞的标志，NK1.1(NKRP1C)分子特别重要[28]。在荧光活化细胞分选仪(FACS)试验中，脾中 NK1.1$^+$部分包含所有自然杀伤活性。在体内，应用抗 NK1.1 mAb PK136(HB-191,来自 ATCC)消除了自然杀伤，但却没影响体液或 T 细胞介导的免疫反应[51]。遗憾的是，这种易得的识别 NK1.1 一个表位的 mAb PK136,仅仅限于 C57BL/6,C57BL/10 和少数其他品系(表 17.2)，而不能识别其他品系如 BALB/c 上的 NK1.1 等位基因[52]。然而 NK1.1$^+$同品系如 BALB-B6-Cmvl^r 现在存在 NK1.1C57BL/6 等位基因已经转运到 BALB/c 背景(表 17.2)。近来，制备了 mAb DX5,它识别协同表达在 CD3$^-$ NK1.1$^+$ 细胞的一个分子(JH.Phillips, L.L.Lanier,私人通信)。另外，表达于NK1.1-品系小亚群脾细胞上的抗原与所有种 NK 细胞上一致。虽然被这种 mAb 识别的分子其功能仍不清楚，但是，这种 mAb 却是 NK 细胞特异性的，可证明在鉴定 NK 细胞，特别是在不表达 NK1.1 表位的小鼠品系有用。尽管如此，NK1.1 分子是目前表达的此表位品系中 CD3$^-$ NK 细胞最特异的血清学标志。

糖脂决定簇唾液酸其缺乏-GM1 即使不是表达在所有也是表达在大部分鼠 NK 和 T 细胞的一个亚群上[53~55]。尽管这种分子功能的重要性不清楚，但是多克隆兔抗唾液酸基缺乏-GM_1 却是经常在体内外用来剔除 NK 细胞的。在最近研究中，抗 NK1.1 mAb,PK136 由于其已定义单抗的可得性和其与 NK 细胞更限制性的反应活性而优于抗唾液酸基缺乏-GM_1 单抗[28,50~52]。然而，因为 mAbPK136 仅仅使用于表面 NK1.1 抗原

等位基因形式的小鼠(表 17.2);抗唾液酸基缺乏-GM_1 在其他种中仍是剔除 NK 细胞的一种有用的介质。

最后,与 $CD8^+$ MHC Ⅰ类分子限制性 T 细胞一个重要的功能区别是 NK 细胞溶解靶细胞时不需其靶细胞表达 MHC Ⅰ类分子。事实上,当靶细胞缺乏 MHC Ⅰ类分子,NK 细胞能更有效地起杀伤作用。此现象也是很重要的,因为它是目前研究自然杀伤分子基础的焦点,这将在本章稍后部分作更详尽的描述。

NK 细胞与 LAK 细胞

NK 细胞与 T 细胞在细胞因子存在的情况下其杀伤靶细胞的作用将会加强。在体外,用 IFN-α/β 或 γ 处理细胞,其对靶细胞自然杀伤作用提高[5,6,56],相似的现象在体内也可发生,当向小鼠注射聚肌胞苷酸(polyI:C)或细菌性药剂,如热灭活的小棒头杆菌或 BCG,它们触发 IFN 的产生,后者刺激 NK 细胞的活性。另外一个相关的观察发现,在体外,NK 细胞暴露于低浓度的 IL-2 一个晚上的时间或更短,也可增强 NK 细胞的细胞溶解活性。有趣的是,有些介质也可活化克隆的 T 细胞系呈现与偶然的杀伤相似的表型[15]。这种增强的杀伤基础没有建立,虽然知道并不需要细胞的增殖。

当人或啮齿类淋巴细胞在体外暴露高浓度 IL-2(800~1000U/ml)时[57~60],可使细胞大量增殖并产生 LAK 细胞。尽管大部分是 TCR-CD3 NK 细胞,但是 TCR - $CD3^+$ T 细胞也在受刺激的种群之列,这也是 NK 与 T 细胞相似的另一个证明。为了区分这个种群中的 NK 细胞,并使混淆最小化,把这种淋巴因子活化的 $CD3^-$ NK 细胞有时更准确称之为 IL-2 活化的 NK 细胞。除了典型的 NK 敏感靶细胞,这种活化的 NK 细胞杀伤很大范围的靶细胞,包括那些通常对新鲜分离的 NK 细胞有抗性的靶细胞。如鼠 P815 肥大细胞瘤细胞系和新鲜移出体外的肿瘤,至于 IL-2 活化的 NK 细胞或 T 细胞为何有增强的杀伤潜力并不清楚,但这些活化的细胞确实表达能传递刺激信号的额外受体。包括小鼠 Ly-6 和 CD69,大鼠 gp42, 这些分子在静息细胞中是不表达的[61~62],这就有可能是这些活化分子使其有更大范围的杀伤的特异性。另外,一种可能是这种增强的杀伤可能与靶细胞上的 FasL CD80 和 CD54 (细胞间黏附分子 ICAM-1)和效应细胞上其合适的对应受体有关[63,64]。

尽管 NK 细胞和 T 细胞在对某些细胞因子的反应能力上与细胞因子受体的表达方面有相似性[27],但还有重要的不同之处,尤其是在对 IL-2 的反应方面。IL-2R 已弄清楚,它是由三条链组成,α 链与 IL-2 以低亲和力结合,β 链(p75)和 γ 链(p64)以更低亲和力与 IL-2 结合[65],这些链在每一成对结合中彼此密切相关,但只有中等亲和力受体 βγ 受体(K_d 约为 1n mol/L)和高亲和力 αβγ 受体(K_d 约为 10p mol/L)能传递信号。静息细胞组成型表达 IL-2Rβ 链和低水平的 IL-2Rγ。当活化时,α 和 γ 链表达上调[65]。由于过量的 β 链优先表达[65,66]因此静息 NK 细胞对高浓度 IL-2(1000U/ml)的增殖能力明显与中亲和力的 IL-2Rβγ 受体有关。相反,静息 T 细胞除了表达低水平的 γ 链外,不表达任何功能性 IL-2 受体,并且大多数的 T 细胞对高浓度 IL-2 没有反应。这些数据说明对于一给定细胞因子的受体,有着功能后果的分化性呈现于 NK 和 T 细胞上。

NK 细胞对于高浓度 IL-2 的反应,并不代表一个生理性的重要现象。目前不清楚这种高浓度 IL-2 能否使 NK 细胞成熟或在免疫应答中驱动其膨胀,即使只是局部作用。而且,NK 细胞参与早期的免疫反应,而 IL-2 的主要库是活化的 T 细胞稍后所产生的。因为 NK 细胞在 IL-2 基因或 IL-2Rα 链基因靶向突变小鼠中明显正常[67,68],所以 IL-2 对正常 NK 细胞的发育并不需要。

尽管存在这些的不一致,但 NK 细胞在 IL-2Rβ 或 IL-2Rα 链突变的小鼠中是缺乏的[69~71]。当考虑到 IL-2Rγ 链被其他细胞因子受体如 IL-2β,IL-7,IL-9 和 IL-15 所共用时[72],就很好理解这一点了。在这种情况中,这叫共同 γ 亚基(γc)。尽管并不知道 IL-4、IL-7 和 IL-9 能否刺激 NK 细胞增殖,但近来对 IL-15 和其受体的发现为 IL-2Rβ 和 γc 的发现提供了一个具有说服力的解释。IL-15 与 IL-2 没有同源序列,但有一相似的短链 4 个 α 螺旋束重排和两保守的链间二硫键。像 IL-2 一样,IL-15 可通过 IL-2Rαβγ 复合物结合和刺激细胞。然而,IL-15 并不结合 IL-2Rα 链,取而代之的是利用其独特的 IL-15Rα 链与 IL-2βγ 形成高亲和力复合物[74,75]。IL-15Rα 链并不直接参与 IL-15R 信号。IL-15 分布遍及各种各样细胞和组织,包括 NK 细胞。这些研究表明,NK 细胞通过 IL-2Rβγ 高剂量 IL-2 活化,然而作为 IL-15 受体信号复合物一部分,IL-2Rβγ 表达与 IL-15Rα 相关联。而且,IL-15 在 NK 细胞发育中的生理作用通过实验:当骨髓前体在体外与 IL-15 共孵育时,可发育 NK 细

胞从而得到直接支持的[76,77]。对这些结果的一个解释在 IL-2Rβ 和 γC 缺陷小鼠 NK 细胞缺乏是由于不能与 IL-15 反应,此假设很易验证。因而,IL-15 被证明在 NK 细胞的发育和 NK 细胞介导的效应中有着很重要的作用。

NK 细胞的分子学定义

NK 细胞与 T 细胞很相似且明显来自一个共同祖细胞。然而,积累的资料表明 NK 细胞的形成区别于其他细胞的淋巴细胞谱系。虽然可通过某些细胞表面分子分化表达与其他细胞分离开来,但 NK 细胞仍通过排除和其功能来定义。这些淋巴细胞自发溶解某些肿瘤细胞。不像其他淋巴细胞,NK 细胞不表达 sIg 或 TCR-CD3 复合物,且通常不需其靶细胞表达 MHC Ⅰ类分子来发挥溶解作用。因此,对于一个 NK 细胞,最好的有效定义是,能介导靶细胞(可无 MHC Ⅰ类分子表达)自然杀伤的,sIg^-,$TCR\text{-}CD3^-$的淋巴细胞。

在小鼠,CD3-NK 细胞通常通过 NK1.1(在适当品系中)和 FcγRⅡ/Ⅲ(CD16)的表面表达来鉴别,然而在人类,NK 细胞通常表达 CD16 和 CD56 分子,然而这种鉴别并不严密。NK 细胞的准确定义需要其识别系统和对自然杀伤特异性的分子基础来决定。

值得注意的是,仅仅 10 年以前[78],T 细胞曾经有一相似的尴尬功能定义(胸腺来源;介导细胞免疫的 sIg-淋巴细胞)。随着 TCR 和协同表达的 CD3 分子的分子定义,免疫学者现在将 T 细胞定义为:表达 TCR-CD3 复合物的细胞[79]。随着分子探针和针对此复合物的单抗获得,即使在病理组切片也可有一准确的定义,而不需要功能性的分析(细胞介导的免疫,胸腺依赖性)。相似地,一个分子的定义可使 NK 细胞在定义其在正常免疫反应和病理情况下的作用可允许对 NK 一个明白的鉴别。如此一个定义需要 NK 细胞功能,如在识别其靶时动用的受体,一个分子基础方面的知识。

NK 细胞对靶细胞的识别

早期由于不能区分 $TCR\text{-}CD3^-$ NK 细胞和 $TCR\text{-}CD3^+$ T 细胞,从而对 NK 细胞识别敏感靶的分子理解有些混乱。然而最初研究表明自然杀伤与靶上的 MHC 分子无关,但近来由于在理解 NK 细胞识别方面有很大进展,NK 细胞识别从确定了 MHC Ⅰ类分子在自然杀伤中的作用为开始。

靶细胞的 MHC Ⅰ类分子与 NK 细胞的敏感性:"丢失自己"假说

与 MHC Ⅰ类分子限制性的 CTL 相反,NK 细胞不需要靶细胞表达 MHC Ⅰ类分子就能起细胞毒的效应功能(图 17.1)。Kärre 和其同事证明 MHC Ⅰ类分子缺陷肿瘤对明显由 NK 细胞介导的体内注射保持敏感性[80],随后的分析表明靶细胞表达 MHC Ⅰ类分子对体外 NK 细胞介导的溶解作用有保护性[81]。用 IFN-γ 与靶细胞预培养可对自然杀伤起相对保护作用;这与增强的 MHC Ⅰ类分子的表达有关。然而,IFN-γ 介导的别的作用也不能排除,另外有实验组发现,转染的 MHC Ⅰ类分子并没有起保护作用。因此,MHC Ⅰ类分子在自然杀伤中的作用在一段时间内存在争议。

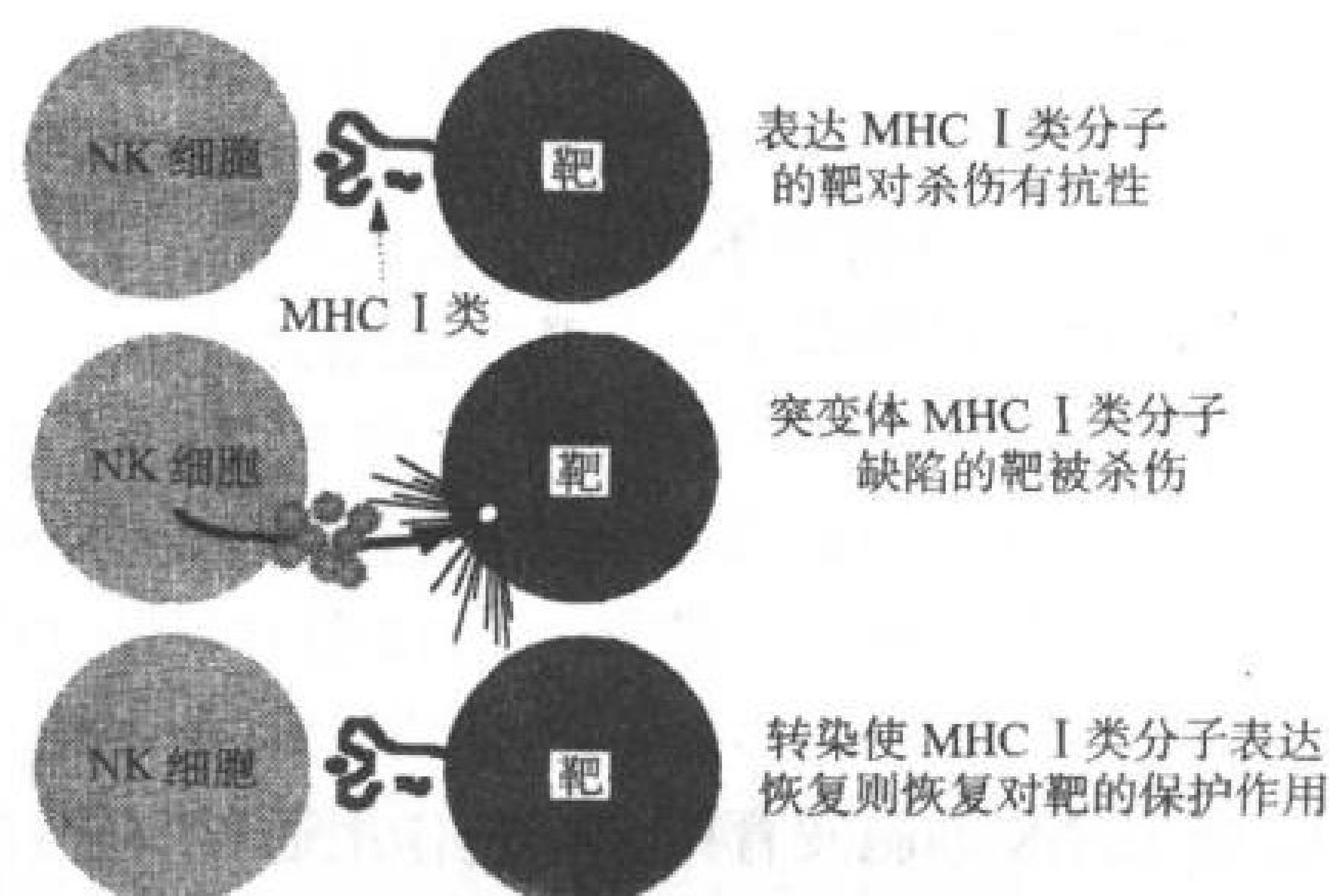


图 17.1 MHC Ⅰ类分子的表达和对自然杀伤的敏感性。表达 MHC Ⅰ类分子的母本靶通常对杀伤有抗性。MHC Ⅰ类分子表达缺陷的突变体对杀伤敏感。当此表达缺陷得到纠正时,比如转染编码 $\beta_2 m$ 的 cDNA[82],抗性恢复。

由几个实验组观察到表达 MHC Ⅰ类的亲代靶细胞对自然杀伤有抗性,而缺乏 MHC Ⅰ类表达的突变体则变得敏感(图 17.1)。亲代(抗性的)表型可通过转染表达来纠正这种缺陷,如 β_2 微球蛋白(β_2m)[82],更近的转运相关处理蛋白(TAP)[83,84],从而重建 MHC Ⅰ类分子的表达,这些研究提供了肯定的证据表明靶细胞通过表达 MHC Ⅰ类分子而对自然杀伤有抗性。

研究使用一个在 β_2m 基因靶向突度的小鼠确证了体外的发现[85,86]。因为正常 MHC Ⅰ类分子重链的表达需 β_2m 的协同表达,这些小鼠不能正常表达 MHC Ⅰ类分子。这些小鼠的淋巴母细胞对正常 NK 细胞的溶解敏感。而将这些小鼠的骨髓植入其他同系小鼠,$\beta_2m^{-/-}$ 细胞被受体所排斥[86,87]。NK 细胞介导此影响,因为注射抗 NK1.1 mAb 则排斥现象消失,这与通过辐射的 F_1 杂交小鼠骨髓移植物给亲代引起的杂交抗性相似。杂交抗性通过宿主 NK 细胞介导,由与 MHC 区域,可能是 MHC Ⅰ类区域,H-2D 有遗传上关联的亲代决定簇来调节的[89]。这个系统特异性的解释是受体 NK 细胞能检测到被移植的供体细胞缺乏表达的完整的 MHC 决定簇。因为亲代(供体)移植物不表达 F_1 杂交细胞表达的完整 MHC Ⅰ类分子库(它也可能协同表达由其他亲代遗传而来的 MHC Ⅰ类分子);亲代干细胞因此对 F_1 NK 细胞敏感而被排斥。(然而,别的解释也有可能。)因而,在几个不同的 NK 细胞识别系统中,特定 MHC Ⅰ类分子在靶细胞上的表达与自然杀伤的抗性相关。

580

尽管上述的实验表明 MHC Ⅰ类分子的明显作用,同时也注意到了存在不一致的地方。特异性的 MHC Ⅰ类分子保护靶细胞免受自然杀伤的能力有着显著的不同[90]。例如,转染 H-2K^b 到 H-2K^b 缺损的鼠肝细胞瘤中,并不能表现出对鼠 NK 细胞的自然杀伤有抗性[91]。在另一方面,几个但并非所有转染的 HLA Ⅰ类分子都能够保护 NK 敏感的和 MHC Ⅰ类分子缺乏的细胞被大多数 NK 细胞所杀伤[92]。保护性作用最后定位到了 α1 螺旋中一个残基(第 74 位氨基酸)上。虽然,有些差别是由试验系统不同而引起的,但明显的是 NK 细胞识别特异性的 MHC Ⅰ类等位基因,而且一个特异性的 MHC Ⅰ类分子只能通过这些带有适当受体的 NK 细胞来影响杀伤。另外,当 NK 细胞以一种不同于人白细胞抗原 C 等位基因的方式生长,那么 NK 细胞对某种 HLA-C 而不是别的 HLA 分子的特异性就可得到证明[93]。这说明,体外培养环境能影响 NK 细胞的特异性。事实上,通过分析大多数明显随意选择的和多克隆活化的 NK 细胞克隆表明人 NK 细胞的反应性是很复杂的。对特异性的 MHC Ⅰ类等位基因的各个特异性克隆很难轻易地对准特异性 MHC Ⅰ类等位基因[94]。最后,也许存在一种不依赖于 MHC Ⅰ类分子表达的细胞特异性的抗性(或敏感性),然而,通常概念即 MHC Ⅰ类分子抑制自然杀伤得到许多目前涉及体内外人及鼠 NK 细胞和通过使用不同的试剂信息的支持。

NK 细胞因而比 MHC Ⅰ类分子限制性的 CTL 有着与靶细胞上 MHC Ⅰ类分子不同的关联。严格地讲,NK 细胞的溶解作用是非 MHC 限制性的。至少比不上 MHC Ⅰ类分子限制那么被准确地定义:克隆的 T 细胞,需要一个涉及特异性自身 MHC 分子的呈递细胞来呈递给多肽抗原[95]。然而,经常使用"非 MHC 限制性"(和其同义语)对 MHC Ⅰ类分子在自然杀伤中所起的作用是不好的定义,因为它暗含着 MHC 在 NK 细胞溶解中不起作用。避免非 MHC 限制性杀伤可以将靶细胞 MHC Ⅰ类分子与 NK 细胞的特异性的联系的混淆最小化,并将排除关于此过程是怎样起作用的预想。

通常 NK 和 T 细胞对靶细胞 MHC Ⅰ类分子表达的不同需要有其生理学的重要性。几个病原体,包括疱疹病毒,具有阻止 MHC Ⅰ类分子在感染细胞正常表达的机制,从而逃避 MHC Ⅰ类限制性的 T 细胞[96~98]。而且,肿瘤起源经常与 MHC 分子或是结构基因突变或是降低的表达有关,然后逃离 T 细胞的监视[99~101]。但在另一例中,却又发现 MHC Ⅰ类缺陷细胞对自然杀伤更敏感。正如最初由 Kärre 观察到的和讨论过的 NK 细胞固有的功能与 T 细胞不同[102]。他推测虽然 T 细胞通过对外来表位的检测而触发的,但是 NK 细胞是来检测自身表位的缺乏。"丢失自己"(missing-self)假说表明 NK 细胞负责监督通常广泛表达且长期地抑制 NK 细胞活性的 MHC 分子的正常表达。假如 MHC Ⅰ类分子下调或突变了,NK 细胞就从这种抑制中释放出来溶解靶细胞,宿主因而赋予一个缺少安全系统的两个(T 和 NK 细胞)组分,对自身 MHC Ⅰ类多肽的表达有着相反的需要,这个系统将排除通过 MHC Ⅰ类表达(提高来避免 NK 细胞或降低来避免 T 细胞)来逃避免疫反应的病

理过程，这种"丢失自己"假说通过创造一个为理解 NK 细胞识别的框架而为 MHC Ⅰ类相关抗性提供了一个目的论的解释。

MHC Ⅰ类分子保护模型

MHC Ⅰ类分子相关的对自然杀伤的抗性为解释抗性和自然杀伤模型的建立提供了基础。一种可能性表明 MHC Ⅰ类分子通过阻止 NK 细胞的一个活化受体动员靶上其推测的配体，这种靶干预或潜伏模型表明当 NK 细胞与其推测的靶配体结合时可激活自然杀伤[102]，MHC Ⅰ类分子隐藏靶细胞上的假设配体从而阻止 NK 细胞受体对其识别。由于此假设的简单性，且当初的数据与其并不矛盾，因此最先是得到支持的，但后来由于几个原因此热情消退了。当 NK 细胞暴露于它们的敏感靶细胞时，生化事件如 Ca^{2+} 内向通量和肌醇磷酸化被触发[103]。当 NK 细胞暴露于由于 MHC Ⅰ类分子而呈抗性的靶细胞时，这些早期生化事件依然被触发[104]，表明 MHC Ⅰ类分子没有阻止靶识别的最初阶段。另外，效应抑制模型表明 NK 细胞被结合 MHC Ⅰ类分子，且传送负性信号的 NK 细胞受体所抑制作为此假设的修正，NK 细胞表达针对靶配体的两个受体[105,106]，在此两受体模型中，一个受体与靶细胞上起活化作用的配体相互作用，而另一受体结合靶细胞 MHC Ⅰ类分子通过一负性信号而抑制活化(图 17.2)，虽然最初两假设没有被反驳，但收集起来的数据却是强烈支持两受体模型的。

581

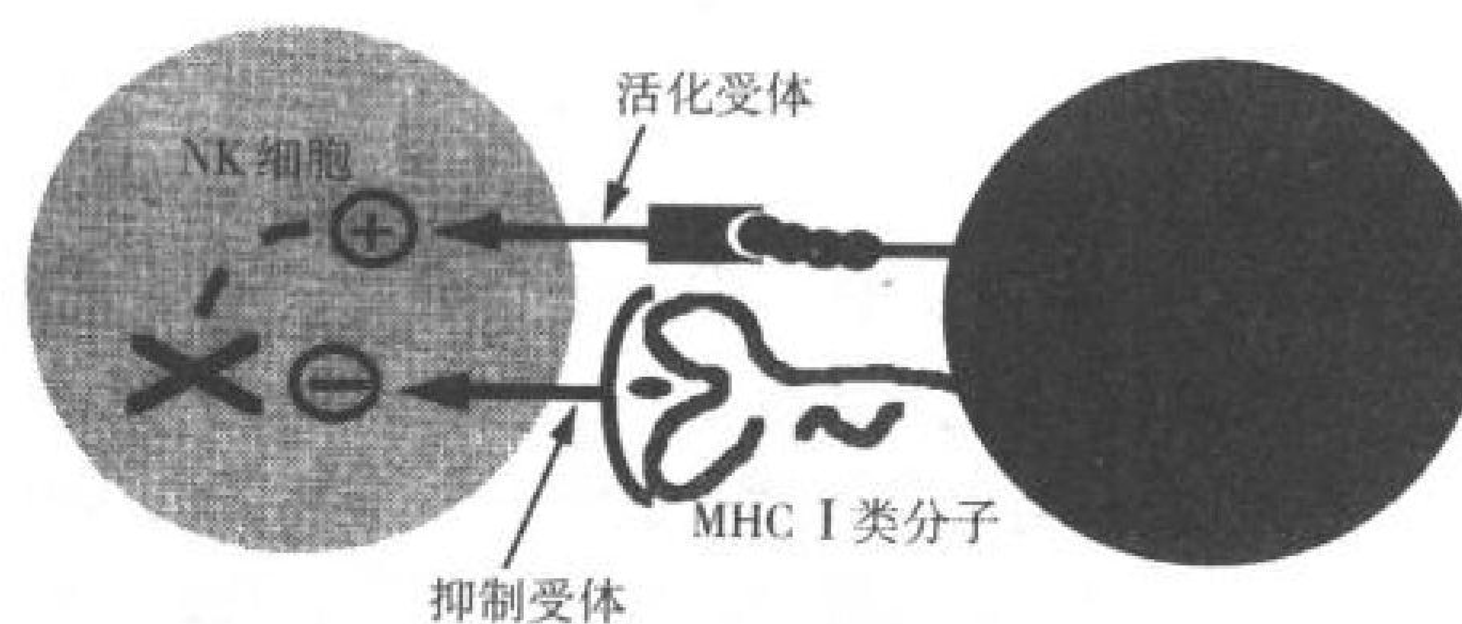


图 17.2 自然杀伤的两受体模型。此模型预测 NK 细胞表达两种类型的受体，一个起活化作用，与靶细胞上的配体相互作用。另一个受体与 MHC Ⅰ类分子相互作用，然后传送一干预信号通过活化受体的抑制信号。

活化受体

被敏感靶细胞活化时，NK 细胞呈现 Ca^{2+} 流动和肌酸磷酸化翻转等生化事件[103]，可能导致颗粒出胞，细胞因子的分泌及细胞因子、细胞因子受体和颗粒组分基因的转录。然而这些现象在 NK 细胞受靶细胞活化时却难以得到证明，这可能是相对弱的刺激或仅仅活化了一效应细胞亚群的缘故。在任一事件中，到目前为止对于此过程还没有得到好的描述。另外，NK 细胞还可被更好的特征化的机制包括 ADCC(抗体诱导)、逆向 ADCC 和凝集素促进的杀伤来活化从而杀伤靶细胞，所有这些看起来是模仿生理性的 NK 细胞的活化作用，虽然活化的最初步骤(细胞表面分子的动员)可能不同，因为细胞表面上的这些途径并不知道是否彼此有生理上的关联，但是杀伤靶的后果看起来均来自与颗粒出胞作用有关的最终共同途径，当自然杀伤特异性和活化途径的分子基础越来越清楚时，就有可能更准确的描述彼此间的关联。

目前关于 NK 细胞受体还没有取得共识，好比 TCR-CD3 和 BCR 分别是 T 细胞和 B 细胞上肯定的一部分一样。尽管进行了集中的研究，但产生 TCR 分子定义的方法仍无法全面成功地剖析 NK 细胞靶识别的复杂性，例如消减杂交仅仅停留于有限的成功[107]。功能性 NK 细胞肿瘤很稀少[103]。试图通过用针对 NK 细胞的 mAb 来阻止自然杀伤通常都没有得到成功。相反，通过 mAb 来诱导 NK 细胞的特异性刺激在鉴别备选的活化受体和研究 NK 细胞的活化方面却特别成功。通过这种通常方法已经特征化了数个分子。

FcγRⅢ(CD16)可能是最肯定的活化受体，通过它 NK 细胞介导与 IgG 孵育的靶细胞的 ADCC[108,109]。与其他具有 Fcγ 受体的效应细胞不同，NK 细胞是独特的，因为它们仅表达已知 FcγR 中的一个——FcγRⅢ，它与 IgG 的 Fc 部分以低亲和力结合[48]。虽然近来的研究表明 NK 细胞也许表达其他 Ig 类型的受体，但这样的受体还未从分子上特征化。NK 细胞仅仅表达两个 FcγRⅢ同种型中的一种 hu FcγRⅢA[48]，它拥有与 FcγRⅢ

B分子相同的胞外域,但是huFcγRⅢA是一种跨膜分子,而huFcγRⅢB则通过磷酸肌醇连结在细胞膜上,表达在中性粒细胞上。在小鼠中,仅一种FcγRⅢ类型存在[111],它与mu FcγRⅢ有95%的序列同源。与mu FcγRⅢ的一种作用很广的mAb,mAb2.4G2(ATCC,HB197)也与mu FcγRⅡ反应[111]。

跨膜huFcγRⅢA与mu FcγRⅢ分子与TCR-CD3复合物的ζ链相联或者更普遍的是与高亲和力IgE受体(FcεRI)γ链相联[39]。无论哪一种相联的链,对于huFcγRⅢA和mu FcγRⅢ分子在细胞表面的最佳表达和耦合到胞内信号转导途径都是必需的。交联后受体活化(T细胞活化的痕迹)生化事件,包括Ca^{2+}的动员,磷酸肌醇代谢、$p56^{lck}$、磷脂酰肌醇Cg1、PI-3激酶和转录因子如NFAT的活化[112~116]。而且,CD16刺激导致增殖(伴随合适生长因子如IL-2),并且细胞因子基因(IFN-γ,TNF-α),受体(IL-2R)和颗粒组分(穿孔素、颗粒酶)的转录水平升高。最后通过CD16 NK细胞活化导致颗粒出胞作用和杀伤靶作用,NK细胞因而介导敏感靶的ADCC,并且通常是由于FcγRⅢ的交联而活化。

在实验室,ADCC分析本质上与自然杀伤分析以同一方式进行,靶对NK细胞的自发溶解相对不敏感,但当存在一个针对靶表面抗原的抗体时靶就变得敏感了,当靶没有方便的抗原或特异性的抗体时,靶就与三硝基苯酚TNP半抗原化,然后抗TNP-mAb就可介导ADCC[117]。假如用小鼠靶mAb时,这种mAb必须是能与CD16分子结合的同种型,CD16结合小鼠IgG同种型存在种间区别,小鼠IgG3结合人CD16是最有效的(3 > 2a > 2b > > 1),然而它与小鼠CD16的结合却是以最低亲和力(2b > 2a > 1 > > 3)[48]。因此,如果有必要的话,可将兔抗小鼠Ig多克隆抗体加到小鼠Ig孵育过的靶来介导ADCC。因为兔IgG通常强烈地结合人和小鼠CD16。实验还可以利用针对靶细胞的多克隆抗血清。为了证明通过ADCC机制抗体诱导杀伤,细胞溶解应当依赖抗靶细胞抗体和其Fc或NK的FcγRⅢ受体。用蛋白A或G或抗FcγRⅢmAb可成功阻止NK细胞上的FcγRⅢ。然而,假设靶也表达Fc受体就应该用抗FcγRⅢmAb的$F(ab')_2$或Fab片段,因为抗FcγRⅢ能通过CD16在一个叫做逆向ADCC作用中触发。

582

在体内,ADCC在宿主防御病原体中可发挥作用,抗体结合到病原体表面或感染细胞的表面,可分别介导病原体或感染细胞的杀伤,因为CD16触发细胞因子的释放和细胞因子受体表达,CD16也可调节随后的免疫反应或使NK细胞对细胞因子作出反应。然而,NK细胞通常参与早期的免疫反应这与同种型转变到IgG产生的较迟需要相反,这些不协调的动态学使ADCC在体内NK细胞中的作用变得不清楚。

然而,ADCC与自然杀伤似乎非常相似,并对NK细胞活化的特征化很重要。但CD16对NK细胞识别靶并不必需,因为$CD16^-CD3^-$淋巴细胞仍能介导自然杀伤[47],而且CD3ζ在CD16链接时发生磷酸化但当NK细胞暴露于NK敏感靶细胞时却不能磷酸化。另外,渥曼青霉素,一种相对PI-3激酶选择性抑制剂,阻止CD16刺激,但却不阻止自然杀伤[118,119],这些数据强烈表明ADCC和自然杀伤通过不同的近端信号途径,虽然有可能NK细胞对靶细胞的刺激比起用单抗蓄意交联CD16的刺激要微弱得多,但是对Fc受体γ链的进一步的研究表明它与NK细胞上的CD16普遍相关。一个γ链的靶向突变使ADCC丧失却没有影响自然杀伤[108],因而,尽管CD16有活化NK细胞的能力和作为NK细胞活化的一个模型,但它并不负责自然杀伤。

当一种凝集素如ConA加入细胞毒分析中,NK细胞也能被活化而杀伤靶细胞,关于这种凝集素促进的溶解现象,近来的研究,特别是对小鼠NK细胞的溶解现象,广泛使用来自ConA活化的脾制备物的淋巴母细胞靶[120]。因为外源凝集素不是按常规路线剔除的(带有特异性的单糖,α-甲基甘露糖苷),被ConA刺激淋巴母细胞靶的自然杀伤有可能是由于凝集素促进的杀伤。然而,这些影响假定用凝集素活化T细胞模仿TCR-CD3刺激一样的方法来模仿自然杀伤和其他NK细胞活化过程。与通过凝集素活化T细胞一样,涉及凝集素促进NK细胞溶解作用的分子仍未清楚地得到肯定。

表17.3 NK细胞上推测的活化受体

分子	配体
CD16(FcγRⅢ)	IgG的Fc
NKR-P1(NK1.1)	碳水化合物
LAG-3	?
2B4	?
NK-TR1	?
CD2	LFA-3
CD69	?
Ly-6	?
gp42	?
p50	MHCⅠ类
Ly-49D	MHCⅠ类(?)

相反在逆向 ADCC 分析中[121],涉及 NK 细胞活化的分子却经常在分子水平得到定义。在这种分析中几种 mAb 能活化 NK 细胞(表 17.3),集中了分子识别的这样相对的独特功能特性,因为大多数 NK 细胞表面分子被特异性 mAb 交联时活化并没发生。逆向 ADCC 分析是在类似于 ADCC 分析的方式进行的。在逆向 ADCC 分析中,抗体结合于 ADCC 中的相反方向(图 17.3)。抗体与 NK 细胞表面分子发生特异性反应,其 Fc 部分结合靶细胞上的 Fc 受体,后者明显起桥梁和交联作用[121]。抗体通常不能诱导不表达 Fc 受体的靶细胞的溶解作用。另外,阻止抗体结合到靶细胞上的 Fc 受体则抑制逆向 ADCC 作用,通过胃蛋白酶裂解而产生的 $F(ab')_2$ 片段可完成此过程。在这样的制备物中,通过蛋白 A 层析法可去除完整的 IgG 和 Fc 片段,而抗体特异性证明是完整的。可作替代的是,结合靶细胞 Fc 受体上的 IgG 可通过加入蛋白 A 或 G 饱和活化抗体从而受体受阻。假设抗靶细胞 Fc 受体的抗体用来起阻止作用,Fc 区域应当被排除掉来阻止通过 Fc 动员 NK 细胞上的 CD16 而导致 ADCC 现象的逆向活化。因此,当适当地得到控制以后,逆向 ADCC 分析在鉴别活化 NK 细胞活性的细胞表面分子中很有用。

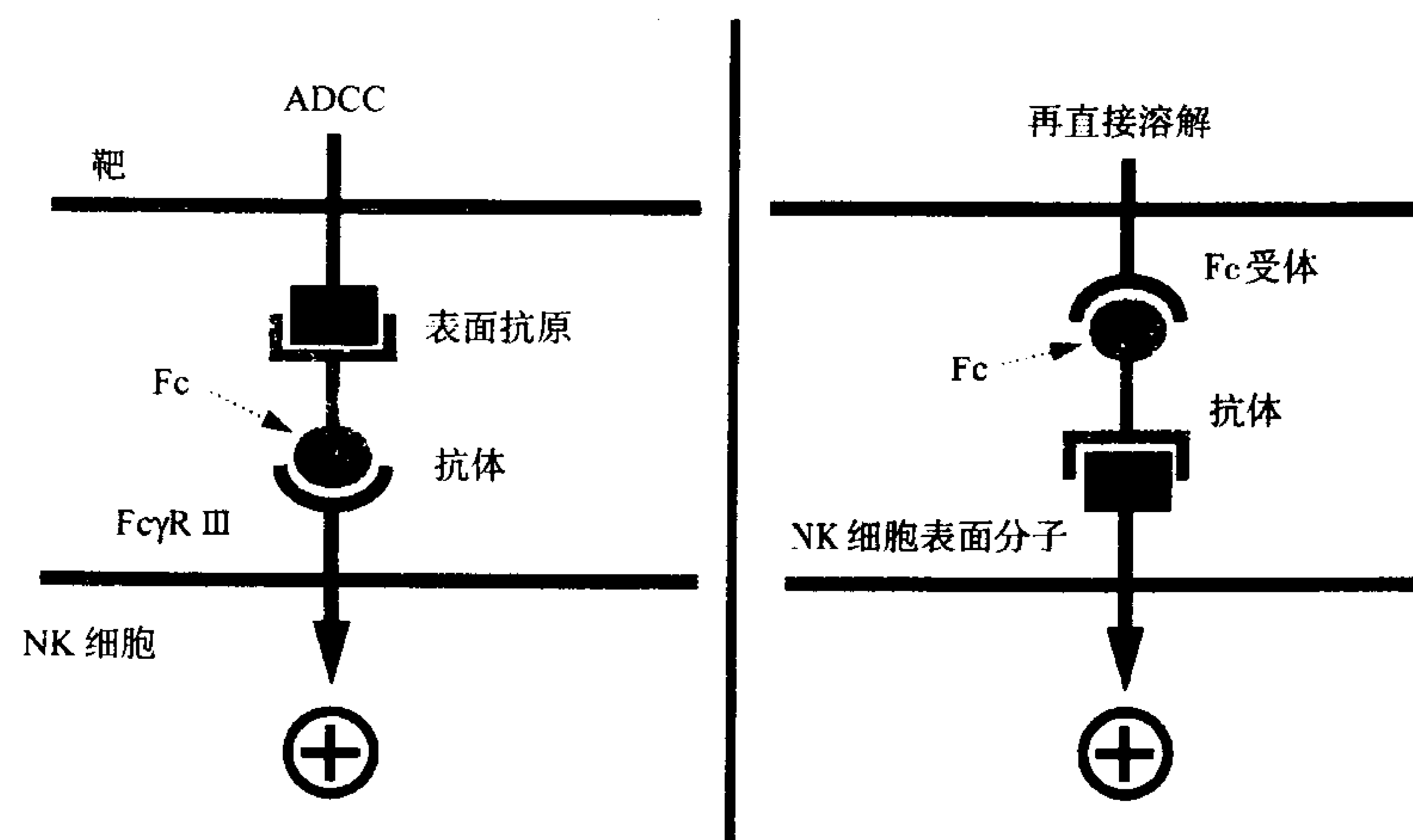


图 17.3 ADCC 和逆向 ADCC 的图解比较。注意抗体对 NK 细胞而言在相反方向。

583

在逆向 ADCC 分析中,最早证实的由二硫键连接的同型二聚体(60kDa)(下面将详述)大鼠 NKRP1 分子表达于所有 NK 细胞上[122]。虽然 NKR-P1 分子表达于叫做 $NK1^+$ T 细胞的 α/βT 细胞亚群上[123],但是这种表达是相对选择性的。NKR-P1 已知属于一个由呈现等位基因多态性的不同基因编码的分子家族[124,126]。这推测的分子是Ⅱ型膜蛋白(外部 C 端)带有一同源于 C 型外源凝集素超家族结构域[127],虽然大鼠 NKR-P1 的同种型在文献中还未见描述,但小鼠中至少有三种 NKR-P1,分别称为 MusNKR-P1A,B 和 C,它们具有显著的核苷酸同源性[106]。在 C57BL/6 小鼠中 NK1.1 由 MusNKR-P1C 编码[126],所有三个同种型的转录子在散在的和克隆的 NK 细胞种群[124,125,128]的 RNA 印迹是容易检测到的,这表明个体的 NK 细胞能同时表达 $NKR-P_1$ 家族的多个成员但由于缺乏合适的血清学试剂还没在蛋白水平得到证明。C57BL/6 和 BALB/c 这些基因的等位基因形式彼此之间有 1% ~ 10% 的不同,这与通过对基因组 DNA 印迹分析检测到 RFLP 的变异相关[124,125,129]这些分子的表达也存在种的不同,BALB/c NK 细胞上表达显著低[129],最后编码小鼠 NKR-P1 分子的基因聚集在 6 号染色体的叫做 NK 基因复合物(NKC)的一个区域[106,125]。

几个研究表明啮齿类 NKR-P1 分子可以活化 NK 细胞,像提到的抗 NKR-P1 分子的 mAbs 在逆向 ADCC 分析中,能够触发新鲜分离和 IL-2 活化的 NK 细胞溶解[61,122],而且,抗 NKR-P1mAb 刺激事件与 NK 细胞暴露于它们的敏感靶细胞后所发生的事件类似,包括肌醇磷酸化代谢,Ca^{2+} 动员和颗粒出胞作用[122,130]。重要的是,大鼠 RNK-16 细胞系 NKR-P1 缺失的突变不能杀伤某些靶细胞,即使它杀伤别的,包括 YAC-1[131],转染大鼠 NKR-P1A 可恢复突变体杀伤正常敏感 IC-21 靶细胞的能力,这与以下假说一致:NKR-P1A 是 NK 细胞的一种

活化受体，它对 IC-21 靶细胞的决定簇有特异性。因为 NKR-P1 分子与 C 型凝集素同源，并且这个超家族的几个成员以 Ca^{2+} 依赖的方式结合碳水化合物，所以 NKR-P1A 的配体被假定为碳水化合物，然而，其准确的本质仍不清楚，下游信号事件还没有分析，不管怎样，NKR-P1A 是在自然杀伤靶细胞中定义的第一个 NK 细胞活化受体。

由于几个方面的分歧，使 NKR-P1 分子在自然杀伤中的作用未能得到普遍的接受。第一，抗啮齿类 NKR-P1 分子的 mAb 并不阻止对敏感靶细胞的自然杀伤，然而这可解释为在单一 NK 细胞上不只一个 NKR-P1 家族成员表达[105,106]。假如这些分子有交叠的特异性，而抗 NKR-P1 mAb 仅仅阻止 NKR-P1 家族一个成员，其他成员仍然能够活化 NK 细胞；另一解释是抗啮齿类 NKR-P1 mAb 可能是优势活化，人的 NKR-P1 是通过 cDNA 克隆鉴别的但抗人 NKR-P1 mAb 相反地不能活化 NK 细胞[132]。然而，这种 mAb 阻止一鼠科靶细胞的自然杀伤；第二，RNK-16 的 NKR-P1 缺失突变体保留杀伤几种靶细胞的能力[131]。最后，BALB/c 小鼠拥有 NKR-P1 基因的等位基因形式但是以低水平表达或完全不表达[129]，尽管 BALB/c NK 细胞能介导对 YAC-1 靶细胞的自然杀伤，但这确证了 NKR-P1 缺失突变仍能杀伤 YAC-1 这一观察，对这些有分歧数据的解释是 NK 细胞在识别和活化自然杀伤使用别的受体，也许至今未定义的 NKR-P1 的同种型或别的受体。重要的是，这些结果也强烈表明 NK 细胞可能有几个不同自然杀伤受体，这些受体一起使细胞的多个克隆具有杀伤一组不同靶细胞的能力。然而，可得到的数据强烈支持 NKR-P1 是负责至少一些靶的自然杀伤的一个活化受体中的地位。

其他候选的活化分子包括小鼠 2B4 分子[133]。它是Ⅰ型整合膜蛋白，为 Ig 超家族的一个成员，与 CD48 和 CD58(LFA-3)同源[134]。这个分子的表达与新鲜分离脾和 IL-2 活化的 NK 和 T 细胞的自发细胞毒活性相关。抗 2B4 mAb 识别同一种的一个等位基因的决定簇，如同 NK 细胞与抗 NK1.1 mAbPK136 的反应性。然而，2B4 并不连接到 6 号染色体的 NKC 上，而是由小鼠的 1 号染色体编码。重要的是抗 2B4 增强对几个靶细胞的杀伤，但明显不是 Fc 受体依赖性，这表明逆向 ADCC 机制并不涉及而且也许是抗 2B4 直接活化的作用。另外，抗 2B4 mAb 也许阻止一个抑制性的相互作用，对其地位的了解可通过其配体的鉴别来帮助解决。

另一活化分子 LAG-3，它与 CD4 结构上高度相关，它是一个Ⅰ型整合膜蛋白，是带有一个 IgV 区类似区域和三个 IgC2 类似区域的 Ig 家族的一个成员[135]，其基因与具有不同之处的 CD4 基因共同集中在小鼠 6 号染色体上[136]。LAG-3 表达于活化的 T 细胞和 NK 细胞，但并不表达于静息的淋巴细胞上。虽然有证据表明它可以像 CD4[135]一样结合 MHCⅠ类分子，但一个全面的在小鼠 LAG-3 的突变即导致被 polyI:C 活化的 NK 细胞自然杀伤的缺陷[137]，这与活化受体有识别靶细胞的功能这一可能性相一致。然而，如 MHCⅡ类分子限制性 T 细胞上的 CD4 分子，LAG3 可能是推测活化受体的一个协同受体分子，这些问题通过进一步的分析将被得到解决。

NK-TR1 分子是被 Ortaldo 和其同事在人 NK 细胞上鉴别的[138~140]。在一系列研究中，他们首次产生一种阻止自然杀伤的针对 K562 的单抗。随后，他们制备了一种针对与大多数 $CD56^+$ 淋巴细胞上 80、110 和 150kDa 分子反应的兔抗独特型抗血清阻止 LGL 结合到靶细胞的 mAb。这种抗血清的 $F(ab')_2$ 片段阻止杀伤，但也能触发颗粒出胞作用和 IFN-γ 的产生，这种抗独特型的抗血清被用来克隆编码带有几个疏水性区域和一同源于具有明显种类保守性互补 DNA 的亲环蛋白区域的 150kDa 分子，当 NK-TR1 的反义构造表达于大鼠 NK 细胞系时，自然杀伤降低，这可能与反义转录子产生的效率有关。然而，ADCC 没有受到影响，近来的研究拓展了对人和小鼠 NK 细胞的这些观察[141]。这些研究表明 NK-TR1 分子在自然杀伤但不是 ADCC 中的信号转导中起着重要的作用，随后详细的分析将对这个分子在 NK 细胞功能中的作用提供进一步的洞察。

584

另外几种 NK 细胞表达的分子可活化细胞溶解作用。研究得最清楚的是 CD2、小鼠 CD69 和 Ly-6，以及大鼠 gp42 分子。抗 CD2 单抗可以在再直接溶解分析中诱导 $CD3^-$ NK 细胞溶解靶细胞[142]，但 $CD2^-$ NK 细胞仍能介导自然杀伤[12]。相似地，针对小鼠 CD16 和 Ly-6，大鼠 gp42 的 mAb 能够触发杀伤[61,62]（一多克隆抗 Ig 在大鼠抗 Ly-6 mAb 诱导这种效应是必需的），CD69 编码于 NK 基因复合物中和其他 NKC 受体包括 NKR-P1 和 Ly-49 结构上相关。有趣的是，CD69 的表达并不局限于 NK 细胞，当被抗 CD69 单抗交联时在很大一类造血细胞上具有功能

上的活性。Ly-6 属于当交联时能活化淋巴细胞的小 GPI(8kDa)锚锢分子的一个大家族[143]。大鼠球蛋白(gp)42 最先是在 IL-2 活化 NK 细胞和大鼠 RNK-16 NK 细胞系上得到鉴别的[62]。抗 gp42 能活化 RNK-16 但并不能活化 IL-2 激活的 NK 细胞。然而,针对 CD69、Ly-6 和 gp42 分子的抗体不能触发静息 NK 细胞,因为这些分子并不表达在新鲜分离的 NK 细胞而是通过其他途径仅仅在活化后才表达的,因为新鲜分离的 NK 细胞仍能自然杀伤,因而 CD69,Ly-6 和 gp42 并不涉及自然杀伤地触发,尽管并不知道它们的生理学作用,但它们的活化潜力,结合 IL-2 活化 NK 细胞能杀伤比新鲜分离 NK 细胞很大范围靶细胞的观察,表明这些分子有助于这种表型。

在 NK 细胞 MHC Ⅰ类特异性受体上出现的信息表明并非所有这些受体都是抑制性的,正如下面将详述的,几个例子描述这些受体有与 MHC Ⅰ类特异性受体相似的外部区域,但缺乏涉及抑制作用的胞质基序。例如在人类中,KIR 最初描述为识别靶 HLA Ⅰ类分子时抑制 NK 细胞杀伤作用的 p58 分子,有趣的是,p50 分子与同样高相关 p58KIR 相比较时在它们的胞质区含有截断面[144,145]。用抗 p50 抗体或 MHC Ⅰ类配体交联 p50 分子分别表现为协同刺激 NK 或 T 细胞的活化[146]。相似地,在小鼠 Ly-49D 和 Ly-49H 分子拥有与抑制受体如 Ly-49A 不同的胞质区,但其胞外区与其他 Ly-49 家族成员却是非常相关[147],近来的研究表明抗 Ly-49DmAb 通过直接交联能活化 NK 细胞[148],虽然不清楚其假定的 MHC Ⅰ类配体是否能触发活化作用。这些结果表明 NK 细胞活化的一个方面可能是通过 MHC Ⅰ类分子直接刺激(或共刺激)。事实上,这种可能性的一个说明是大鼠 NK 细胞的同种异型反应性的描述,它表明同种异型 MHC Ⅰ类分子在刺激而不是抑制中的作用[149]。没有 NK 细胞活化受体方面的知识,在那么辅助分子在 NK 细胞活化中的作用是难以描述的。目前不清楚哪一种分子是类似于 TCR 的主要的触发者,哪一个分子在辅助作用中作用更大。然而,NK 细胞的功能很可能依赖于黏附分子,如 LFA-1 和调节生化活化作用的分子如 CD45[63,150~153]。然而,其他分子,如 NK 细胞上的 CD28 和 CD44 以及靶细胞上的 B7-1 的作用与 NK 细胞活化的目前知识结合却有点困难,尽管它们在作为共刺激分子证明为具有重要作用或起着其他作用[154~158]。

清楚地,NK 细胞可通过几个不同受体而触发;而且可能同时通过多重不同受体参与敏感靶细胞与 NK 细胞的相互作用。鉴于这些观察,一些研究者支持这一假设:即活化来自通过一个或多个受体的信号,这些受体并不必须是 NK 细胞特异性的,且通常归类为黏附分子,如 CD2、整合素(LFA-1)或共刺激分子,包括 CD28[159]。结合任何一种以上分子的配体能够强大地刺激 NK 细胞,暗示没有一个受体系统是特异性涉及自然杀伤的。在另一个方面,NKR-P1 是履行一个在自然杀伤中明显识别和活化作用的例子,它是相对 NK 细胞特异性的。然而,NKR-P1 并不能解释所有自然杀伤,其他 NK 细胞特异性的活化受体有待鉴别。

MHC Ⅰ类分子特异性的抑制性 NK 细胞受体

NK 细胞上 MHC Ⅰ类抑制受体是两种通常结构中的一种[160](图 17.4):①C 型凝集素样受体,它们是二硫键连结的Ⅱ型整合膜蛋白(胞外为 C 端),所有已知此型分子编码在 NK 基因复合物中,最先在小鼠中得到描述;②Ig 超家族受体,它们是Ⅰ型整合膜蛋白。这些分子编码在不同的遗传位点,最早是在人类中得到描述的。进行的研究表明两种类型中的受体都表达在小鼠和人 NK 细胞上;它们相互之间的关联正在进行密切地研究当中。因为对小鼠的凝集素样受体和人类的 Ig 样受体知道得多一些,所以在对知道较少的相互受体的整合信息之前将对这些各自受体作描述。

小鼠 MHC Ⅰ类分子 NK 细胞受体

细胞表面分子 Ly-49A 是 NK 细胞上第一个在分子水平得到描述的抑制性 MHC Ⅰ类分子特异性受体[161]。Ly-49A 与 NKR-P1 分享不一般的结构特征。包括作为一二硫键连接的同二聚体(40kDa)亚基,表达于细胞表面,Ⅱ型整合膜定位和 C 型凝集素超家族同源性(图 17.4)。以前称 Ly-49,现在理解为 Ly-49A 分子属于一高度相关分子的家族。Ly-49 和 NKR-P1 家族分子被不同的,位于小鼠 6 号染色体 NK 基因复合物遗传上相连基因座所编码[106,147,162]。与 NKR-P1 相反,NKR-P1 表达于所有 NK 细胞上,Ly-49A 仅仅表达在 C57BL/6 小鼠 NK 上不同亚群(20%),Ly-49A 的功能上看起来与 NKR-P1 分子相反。

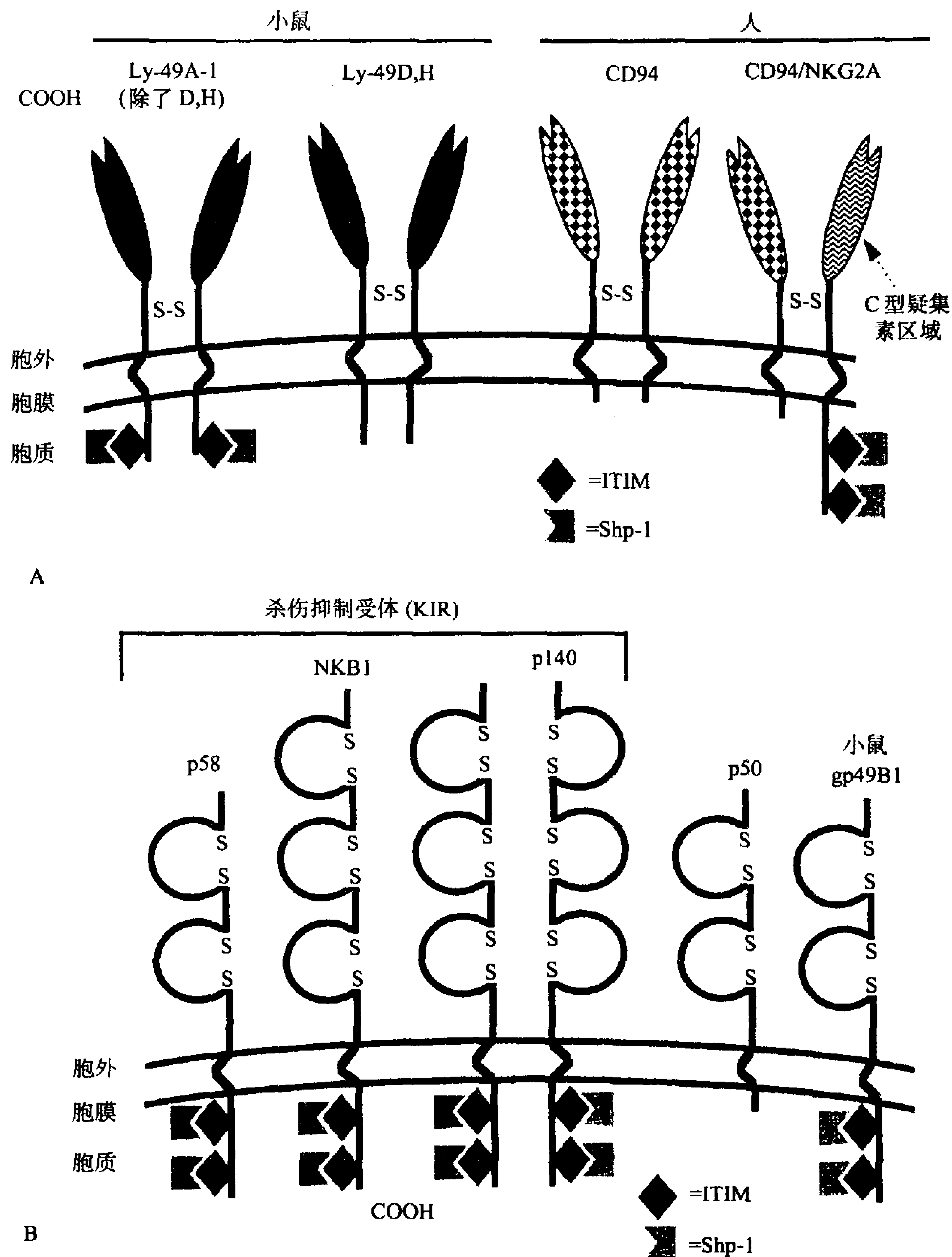


图 17.4 NK 细胞上 MHC Ⅰ类特异性受体。近来的证据支持以下假设：小鼠和人 NK 细胞表达两种针对 MHC Ⅰ类分子特异性的结构类型受体。这些分子通过与靶细胞上的 MHC Ⅰ类分子相互作用和调节 NK 细胞活性来提供 NK 细胞的特异性。一种类型的 NK 细胞受体(A)，最早是在小鼠中证实，由凝集素样Ⅱ型跨膜蛋白组成，并由二硫键连成二聚体。在小鼠体内，Ly-49 分子形成同型二聚体，不管结合的多肽后者具有结合 H-2Ⅰ类分子的能力，并传递抑制信号。Ly-49D 和 H 具有不同的胞质域，在跨膜域有带电残基，有活化作用。人 CD94 有一短的胞质域。依据 NKG2 是否含有一个 ITIM，如：NKG2A，可与 NKG2 分子形成同型二聚体或异型二聚体，而提供活化或抑制信号。小鼠 Ly-49 和人 CD94，NKG2 表现为不同的受体。另一种类型受体(B)，最初在人体中得到证实。由 Ig 超家族，Ⅰ型整合膜蛋白组成，具有 2～3 个 Ig 区域，通过结合 MHC Ⅰ α1 螺旋上的一区域而授予对 HLA-A、-B 和 C 的特异性。p140 受体是由二硫键连结而成的二聚体。其他的都表达为单聚体。HLA 特异性表现受所结合多肽的影响，这表明 KIR 同 HLA Ⅰ类分子一样与多肽直接接触。一个相关的分子，gp49B1 表达于小鼠 NK 细胞上。在凝集素和 IgSF 受体中可以发现三种通常类型的胞质域。抑制受体含有 ITIM 序列，表现为截断的（p50）、在跨膜区有带电残基，或交替的胞质域（Ly-49D 和 Ly-49H）的分子，可能通过相关信号分子刺激 NK 细胞。在目前，所有这些受体在 NK 细胞亚群交叉表达；一个 NK 细胞能够表达一个类型的多个受体。

有几个证据支持 Ly-49A 是一 MHC Ⅰ类分子特异性受体这一假设。

①体外功能分析。Ly-49A$^+$ 细胞亚群不能溶解表达 H-2^d 和 H-2^K 单体型 MHC Ⅰ类分子靶细胞的溶解[163~165]。

585 H-2D^d 转染表达使敏感靶细胞对 Ly-49A$^+$ NK 细胞自然杀伤作用和 ADCC 有抗性[163~165]。然而被转染的靶细胞和别的 H-2^d 或 H-2^k 靶细胞对 Ly-49A NK 细胞的溶解作用敏感。

②细胞结合分析。中国仓鼠卵母细胞(CHO)通过 DNA 扩增表达高水平转染的 Ly-49A 分子,与表达转染 H-2D^d 的靶细胞结合[166]。当 CHO 细胞和靶细胞各自分别通过转染表达 Ly-49A 和其他配体时,结合作用才发生。在固有性表达 Ly-49A 的肿瘤细胞系和固定免疫纯化的 MHC Ⅰ类分子中也得到类似结果[167]。

586 ③体内表达分析。用抗 Ly-49 A mAbA1 在两色流式细胞仪上对 NK1.1$^+$ 细胞进行检测,Ly-49A 表达水平仅仅在 MHC 同系和表达 H-2D^d H-2D^k 的 H-2D^d 转基因小鼠中下调[168]。这表现是由于 Ly-49A 和宿主 MHC Ⅰ类分子之间的细胞外相互作用,因为骨髓镶嵌研究表明供体 C57BL/10(H-2^b)NK 细胞(通常正常水平 Ly-49A)在 B10 A(H-2D^d)受体中发育时其 Ly-49A 表达下调[169]。这并不是负性选择的缘故,因为存在同样的百分率 Ly-49A$^+$ NK 细胞,并且 Ly-49A(如在 Ig49A$^-$)在体外培养时可恢复[170]。

④抗体阻止研究,针对 Ly-49A 或 H-2D^d $\alpha1/\alpha2$(但非 $\alpha3$ 分子域)的 F(ab$'$)$_2$ 部分在杀伤试验中能够普遍逆转抗性并在细胞结合分析中阻止黏附[163,164,166]。

⑤基因转换分析。在一 MHC Ⅰ类分子控制 Ly-49A 转基因的表达导致在所有 NK 细胞表达一致的 Ly-49A[171]。大部分转基因 NK 细胞被 H-2D^d 特异性地抑制,而野生型的 NK 细胞则没有;因为大部分野生型 NK 细胞是 Ly-49A(如同 Ly-49A$^-$)并不被 H-2D^d 抑制,这一结果表明 Ly-49A 遗传上的转换授予功能性的影响。而且,转染 Ly-49A cDNA 入 RNK-16 大鼠 NK 细胞系授予其不能溶解表达 H-2D^d 的靶细胞[172],有限的研究也表明 Ly-49A 识别 H-2D^k,这在杀伤试验和体内表达分析和平行研究中得到证明。因此,Ly-49A 是一针对 H-2D^d 和 H-2D^k 的 MHC Ⅰ类特异性受体。

Ly-49A 和 H-2D^d 之间的分子作用已得到进一步描述。抗 Ly-49A mAb 阻止其与 MHC Ⅰ类分子间的相互作用表现为结合到假定的碳水化合物识别域(CRD)[173]。另外,此区域和一近膜 19aa 区域表现为与 MHC Ⅰ类分子相互作用所需要。这与基于 Ly-49 分子与 C 型凝集素 CRD 的对准结论一致,暗示近膜区像一个叶柄支持远侧的 CRD。关于 MHC Ⅰ类基因座,目前表现为 Ly-49A 特异性动员 H-2D^d 分子结合多肽的区域[161]。以上提及的抗 H-2D^d mAb 阻断研究支持这一模型。另外,Ly-49A 的表达在 B10 D2^{dml} 小鼠中下调,B10. D2^{dml} 小鼠表达由 $\alpha1$ 和带有来源于 H-2L^d 余下部分的 H-2D$^d\alpha2$ 域一半氨基酸末端的 dml 镶嵌分子。因为 H-2L^d 在杀伤或结合实验中不与 Ly-49A 反应,这局限了 Ly-49A 在 H-2D^d 上的结合位点仅限于多肽结合域这一区域上,因而,Ly-49A 与 MHC Ⅰ类分子的相互作用类似于 TCR 识别 MHC Ⅰ类分子上的区域,而不是 CD8 结合到 MHC Ⅰ类分子上相对恒定的 $\alpha3$ 区域[95]。

Ly-49A 与 H-2D^d 相互作用的本质看起来与 TCR-MHC Ⅰ类分子的相互作用有着基本的不同,因为前者表现为不依赖多肽。Correa 和 Raulet 使用了几种合成肽,它们相应于以前用免疫纯化和测序[175]测定了的 H-2D^d 相关肽[174]。当外源性 TAP 缺乏但含有 H-2D^d 转染细胞,这些多肽使 H-2D^d 的表达稳固,并对 Ly-49A$^+$ NK 细胞的杀伤表现出抗性。H-2D^d 相关的天然肽的分析证明没有增强保护的特定多肽。而且,Orihuela 等表明丙氨酸代替肽仅含有所需 H-2D^d 锚基序便能够稳固 H-2D^d 并授予对 Ly-49A$^+$ 细胞杀伤的抗性[176]。相反,外源性 β_2m 能够稳固 H-2D^d 表达在一空洞的构型中并不授予抗性。最后,对 H-2D^d 与一肽诱导构型相对特异性的 mAb 是惟一能阻止 Ly-49A 和 H-2D^d 相互作用的单抗,因而,Ly-49A 结合到 H-2D^d 多肽诱导的构型决定基上,而不是直接结合多肽。

关于 Ly-49A 的研究支持"丢失自己"假说的基本规则,不管被结合的多肽如何,H-2D^d 分子都将与 Ly-49A 相互作用。假如 H-2D^d 在 $\alpha1/\alpha2$ 上突变、结合肽发生改变或失去了,或者 MHC Ⅰ类分子表达被任何机制下调,Ly-49A 将不再结合而且将不会提供抑制信号,结果这些靶细胞便对表达 Ly-49A 的 NK 细胞所发挥的溶解作用敏感。在另一方面,假如被病原体编码的多肽存在,H-2D^d 的表达没有改变,靶细胞将继续得到保护而不被 Ly-49A$^+$ NK 细胞所溶解,但对抗原特异性的 H-2D^d 限制性 T 细胞的溶解作用敏感。

假如 Ly-49A 在表明 NK 细胞的 MHC Ⅰ类分子特异性中很重要的话,那又是什么决定 Ly-49A-NK 细胞的特异性呢? MHC Ⅰ类分子的极端多基因和多形态(多基因、多等位基因)也表明 NK 细胞的 MHC Ⅰ类受体将同样有区别。虽然没有 Ly-49 基因物理上的重排证据,但 Ly-49 家族的多样化存在于几个水平(多基因,多等位基因的,交替的剪切)。9 个不同的 Ly-49 分子(由 Ly-49A 到 Ly-49I)已经在 C57BL/6 小鼠中得到证实[147,162,177]。另外,Ly-49 家族在种间存在区别;因而一种基因可有多重等位基因。Ly-49A cDNA 在共同的实验小鼠中证实至少有五个不同 RFLP 受体[178]。至少两种等位基因形式的 Ly-49A/C 已经报道,有几种 Ly-49A 等位基因相应于 RFLP 组[179,180]。而且,Ly-49 等位基因可受等位基因的相斥[179](包括在 NK 细胞的发育部分)。最后,有证据说明 Ly-49 基因的交替剪切。Ly-49G 组含至少两个表达的序列,由于删除或插入共显性外显子 DNA 片段而不同[147],Ly-49D 和 Ly-49H 转录子也表现为交替剪切[181]。因而,Ly-49 家族由一小组多样化的分子库组成。

对 Ly-49C/I 和 Ly-49G2 进行研究,证明有与 Ly-49A 相似的特性,这为 Ly-49 家族在决定 NK 细胞特异性与这一普遍的作用提供了支持。mAb SW5E6 与一二硫键连接的同型二聚体(54kDa 亚基)反应[182],后者存在于 C57BL/6 上大约 40%NK 细胞上。最初的 cDNA 克隆与表达分析表明这种 mAb 与 Ly-49C 反应。$5E6^+$ NK 细胞被 $H\text{-}2K^b$ 特异性的抑制[183]。然而,近来 研究表明这种 mAb 5E6 也与 Ly-49I 反应,复杂化了以前的研究[184]。mAb 4LO3311 与以前已知的一种 NK2.1 抗原反应,表现为 Ly-49C 特异性,但并不与 Ly-49I 反应。虽然 Ly-49C 和 Ly-49Z 的特异性需再次评估,但这些分子的特异性却是与 Ly-49A 相似的。LGL-1 抗原被与鼠 NK 细胞亚群反应的大鼠 mAb 4D11 识别[185]并表达为一二硫键连结的同型二聚体(87kDa 不还原,40kDa 还原),后者难以用巯基乙醇还原[186]。当一编码 LGL-1 分子的 cDNA 从-CB.17-SCID NK 细胞库分离时,发现它与 C57BL/6 小鼠中的 Ly-49G 密切相关,可以代替 BALB/c 等位基因形式的 Ly-49G2[187]。LGL-1 分子表现为对 $H\text{-}2D^{d+}$ 和 $H\text{-}2L^d$ 有特异性的抑制受体。然而与之相矛盾,抗 $H\text{-}2D^d$ 或抗 $H\text{-}2L^d$ 特异性的单抗单独便能允许 $H\text{-}2^d$ 靶细胞(带有 $H\text{-}2D^d$ 和 $H\text{-}2L^d$)被 $Ly\text{-}49G2^+$ NK 细胞溶解,而 MHC Ⅰ类配体将继续提供负性信号给 $Ly\text{-}49G^+$ NK 细胞,尽管阻止了别的分子的识别,这些数据表明,Ly-49G2 可同时识别两种分子。然而,可得的数据表明,Ly-49 家族成员除 Ly-49A 外都是 MHC Ⅰ类分子特异性的抑制性受体。

Ly-49 分子的碳水化合物特异性的评价是由其结构与 C 型凝集素等超家族关联激起的,后者能以 Ca^{2+} 依赖方式结合碳水化合物决定簇[127]。而且,阻止与 MHC Ⅰ类分子相互作用的抗 Ly-49 单抗表现为结合到推测的碳水化合物识别区域[173]。另外,此区域和一近膜 19 氨基酸区域是所与 MHC Ⅰ类分子相互作用所必需。事实上,Ly-49A 结合复杂的云芝多糖;这种结合被阳离子螯合物部分抑制[188]。相似的报告存在于 Ly-49C/I[189]。这表明 Ly-49 分子也可结合到 MHC Ⅰ类配体的碳水化合物决定簇上。因为 Asn 连接的糖基化作用位点在 MHC Ⅰ类分子间是保守的;相关的碳水化合物也表现为相对一致[190]。这为 Ly-49 的特异性提供了基础。然而,Ly-49 分子与 MHC Ⅰ类分子碳水化合物残基结合还没有直接证据。重要的是,C 型凝集素可有结合到同一 C 型凝集素区域的碳水化合物和非碳水化合物配体。例如,CD23(以低亲和力与 IgE 上的单独的糖残基)结合 IgE(FcεRⅡ)Fc 区域[191]。然而,CD23 特异性结合 CD21 上的碳水化合物决定簇[191],因而对 Ly-49 受体特异性结合碳水化合物作进一步分析是必需的,而且有可能不管其结合 MHC Ⅰ类分子是否碳水化合物依赖性的,外源性的糖可阻止其与 MHC Ⅰ类分子的相互作用。

最后,尽管普遍的概念认为 MHC Ⅰ类分子抑制 NK 细胞,但并非所有 Ly-49 家族成员都是抑制性受体。虽然大多数胞质区含有 ITIM,后者暗含一负性信号(下文将详述),但 Ly-49D 和 Ly-49H 却并不含有此区域[147]。Ly-49D/Ly-49H 的配体并不知道,但并不奇怪这些受体是否与 MHC 分子相互作用和直接活化或协同刺激 NK 细胞功能。抗 Ly-49D 特异性 mAb 表现为直接刺激 NK 细胞的活化[148]。而且,大鼠 NK 细胞对 MHC 的异常反应性是由定位到 Ly-49 聚集体的活化受体所介导的[193]。将来对 Ly-49 受体的研究将通过发展的血清学上的工具来区分个体成员而得到帮助。

587

人 NK 细胞 MHC Ⅰ类特异性受体

对人 NK 细胞克隆的一系列研究表明 mAb GL183 和 EB6 识别具有几个特征的血清学上不同的 55kDa 或

58kDa 分子,最初叫 p58。首先,它们选择性表达于重叠的 NK 细胞亚群,第二,这些分子的表达与靶细胞某些 MHC Ⅰ类等位基因上的表达相关。第三,对于一给定带有 p58 分子的 NK 细胞克隆敏感的靶细胞与其一 mAb 有反应性的;通过编码某种 HLA-C 分子的 cDNA 的转染可产生抗性。第四,抗性 HLA-C 转染靶细胞在存在适当抗 P58 mAb 时被溶解,mAb 的影响用 $F(ab')_2$ 片段可发生,这表明 p58 与靶细胞上 HLA Ⅰ类分子的相互作用介导这种抑制作用。因而,p58 分子显示的特性与 MHC Ⅰ类分子特异性的人 NK 细胞抑制性受体的作用相一致,类似于以上描述的正在作平行研究的 Ly-49A 系统。

有趣的是,别的研究表明当 NK 细胞生长于存在异常 MHC 决定簇细胞中时 NK 细胞的特异性会发生偏斜[195,196]。这种特异性与位于 HLA-Cα1 域在 77 和 80 位点成对残基的反应性相关。所有已知 HLA-C 分子分成两组,一组 Asn77-Lys80(HLA-Cw2,-Cw4,-Cw5 和 Cw6),另一组是 Ser77-Asn80(HLA-Cw1,-Cw3,-Cw7 和-Cw8)。事实上,转染分析表明 p58 对 HLA-C 分子的特异性与前者(特异性 1)EB6 表位的表达有关而不是后者 NK 细胞克隆上 GL183 表位(特异性 2)[195,197,198]。然而,人 NK 细胞 HLA-C 受体表现为混杂的特异性,这有赖于 77 和 80 号残基。

NKB1(p70)分子在亚群表达和 NK 细胞克隆与 HLA Ⅰ类特异性关联方面与 p58 分子相似[159,199]。然而与 p58 分子不同,NKB1 具有不同的分子质量(70kDa)和对 HLA-B 的特异性。$NKB1^+$ 克隆被表达转染 HLA-Bw4 分子的靶细胞特异性抑制,抗 NKB1 单抗可以逆转这种抑制作用。分析 HLA-B 等位基因的结果表明,这种特异性由 α1 上区域所授予的,此区域与 p58 识别 HLA-C 上一区域重叠[200]。而且 HLA-Bw4 上 N 端连结的糖基化位点(残基 86)的缺乏,并不改变反应性,这表明碳水化合物对 NKB1 与 HLA-Bw4 的相互作用并不必需。最后,除了它们表现为二硫键连接的二聚体外,HLA-A3 和所有特异性受体具有与 p58 和 NKB1 相似的特性[201],而其他人发现一类似于 NKB1 的单基因 HLA-A3 特异性受体[202]。因而,在目前,所有经典 HLA Ⅰ类位点代表性的等位基因能通过 p58/NKB1/p140 受体抑制 NK 细胞,尽管不知道是否有与每一种经典 HLA Ⅰ类等位基因反应的受体存在。

588

当现在统称 KIR[203] 的 p58 和 NKB1 分子的 cDNA 克隆后,惊讶地发现它们编码具有 Ig 类似域的Ⅰ型整合膜蛋白,而不具有 Ly-49 家族的特征(图 17.4),随后,多重 cDNA 被识别,并被发现编码两个主要的受体类别,即两或三个 C2 型 IgSF 区域组成[159,194,196,207~211]。p58 分子含有两个 Ig 域,而 NKB1(p70)拥有三个 Ig 区域,p140 分子由三个 Ig 区域的二硫键连结的单聚体所组成。KIR 胞外域同源于人 Fcα 受体和小鼠 gp49,一肥大细胞特异性的分子。胞外域也含有 Zn^{2+} 结合基序的富含组氨酸区,目前的数据表明 Zn^{2+} 结合对与 HLA Ⅰ类分子的相互作用并不必需[207]。更为重要的是,两种类型的 KIR 分子拥有相对长的胞质域(76 或 84aa),胞质区含有能招募有抑制细胞活化的调节子的两个 ITIM 序列。

随后的分析提供了明确的证据,说明 KIR 分子是抑制性的 HLA Ⅰ类特异性受体。

①KIR 直接结合到 HLA Ⅰ类分子。可溶性 p58-Fc 融合蛋白结合到表达适当转染 HLA Ⅰ类等位基因的细胞上[212,213]。另外,天然的凝胶电泳表明[214],在溶液中可溶性仅含胞外域的 p58 分子发现特异性结合到 HLA-C 配体上。

②KIR 的基因转换。含有 KIR cDNA 的牛痘结构短暂表达于人 NK 细胞克隆;特异性和抑制功能被转移[212]。因而,很清楚 KIR 分子是 NK 细胞上 MHC Ⅰ类分子特异性抑制受体。

近来的研究证明 HLA 分子上的第 80 位残基(残基 80)在其与 KIR 相互作用中比残基 77 更为重要[215,218]。然而,在 HLA-C 分子 KIR 足印强调了残基 73、76 和 90 有更大范围的影响。有趣的是,空 HLA Ⅰ类分子能够被识别[217],但别的研究指明 KIR 分子受结合到 HLA 分子上的肽的影响[219]。后者可能与以前观察到的即大部分人 NK 细胞对 HLA Ⅰ结合裂口上一边袋单残基有特异性相关[92]。而且,用一涉及单个 KIR 分子的转染系统作的详细分析支持结合肽所起的作用[220]。在各种各样的 KIR 分子中是否存在识别的差异这需进一步的分析来确定。

KIR 家族分子克隆也导致了由于缺乏 ITIM 而具有的截断胞质域(残基 39)的两种 NK 细胞受体(也叫 p50)的识别[144,221](图 17.4)。然而,这些分子含有与 KIR 分子胞外域高度相关的胞外域。在逆向 ADCC 分析

中。这些分子当 NK 细胞受抗 p58 mAb 刺激时能活化 NK 细胞。对组成型地表达 p50 的 T 细胞克隆的研究表明 p50 分子伴随着 TCR-CD3 复合物的活化起协同作用[146]。虽然这些分子在 NK 细胞活化中的作用正在评价之中,但可得的数据表明 p50 分子可能是协同刺激受体而不是 NK 细胞的直接活化剂。

目前已知有 20 多种 KIR 序列,它们编码具有 66% ~ 99%相似性的多肽[159,194,19,207~211]。KIR 分子家族的各种各样克隆的 cDNA 之间的关系正在研究之中。目前还不清楚哪一种是等位基因的变种,分离的基因产物或交替的剪切形式。任何给定个体的 HLA 单体型与这些受体的关联仍有待阐明,尽管 NKB1 血清学的表达表现为不与 HLA 单体型相关[222]。然而,人 KIR 分子克隆为研究 MHCI类活化和抑制受体提供了重要帮助。

人 KIR 分子和 Ly-49 家族分子结构上的差别导致人们推测:人和小鼠进化了结构上不同的受体系统来处理“丢失自己”[223]。然而现在已清楚,小鼠的 IL-2 活化的 NK 细胞表达 gp49B1,一种具有两个 Ig 类区域的Ⅰ型整合膜蛋白[224,225]。gp49 分子,现已被识别为三蛋白家族,是最早描述为肥大细胞特异性的分子。gp49A 是一个没有胞质 ITIM 的跨膜单体分子,而 gp49B1 是编码从跨膜域截断的明显可溶性分子(gp49B2)的一个基因的交替剪切产品[226,227]。虽然还没有建立这一概念说 gp49B1 与 MHCⅠ类分子相互作用,并且它也不可代表鼠 KIR 分子的同源物,但 gp49b1 在其胞质尾含有能抑制 NK 细胞活性的 ITIM[225]。在肥大细胞中,mAb 诱导 gp49B1 的交联通过 FcεRⅠ抑制活化[228]。因而,小鼠 IL-2 活化的 NK 细胞表达属于两个主要抑制受体家族的分子。

相反地,也有证据表明人 NK 细胞能够表达凝集素样的受体。人 NK 细胞克隆被证实能被 HLAⅠ类分子所抑制。但是以独立于 p58 的方式[229]。当一允许抗性靶细胞溶解的 mAb 产生了,这些单抗与以前已知调节 NK 细胞活性的 CD94 反应。CD94 变化性表达于人 NK 细胞上[230]。以^{125}Ⅰ标记细胞的免疫沉淀分析表明 mAb 与以前叫做 Kp43 的一二硫键连结的二聚体(70kDa NR,43kDa R)反应。CD94 在一些 NK 细胞克隆上的表达可能与靶细胞 HLA-B7 分子的保护效应有关[229]。具有 HLA-B7 的靶细胞转染 C1R 后可保护靶细胞被 CD94^{high} NK 细胞克隆的溶解。通过完整的抗 CD94 单抗或其 $F(ab')_2$ 片段可恢复溶解;这与 CD94 识别 HLA-B7 和随后的细胞毒抑制一致。相反,别的 NK 细胞 CD94 动员表现为活化 NK 细胞活性[231]。因而,CD94 的功能分析结果,依赖于 NK 细胞克隆而表现相反的结果(被特异性的 MHCⅠ类分子活化或抑制)。

用抗 CD94 单抗的表达克隆产生编码且有外部的 C 型凝集素区域的Ⅱ型整合膜蛋白与 NKR-P1 和 Ly-49 很相关[232]。奇怪的是,CD94 含有一短胞质域(7aa),这表明它应当与另一组分有关来介导其功能活性。而且,抗 CD94 单抗免疫沉淀的分子不能从^{125}Ⅰ标记的 CD94 转染体上检测到,尽管用同一 mAb FACS 很容易检测到[233,234]。当一针对 CD94 的多克隆抗血清产生后,它可通过蛋白质印迹检测到从^{125}Ⅰ标记的 NK 细胞克隆的免疫测定中不可见的 27kDa 的种类,表明这种类没有用^{125}Ⅰ标记上。然而,抗 CD94 mAb 与^{125}Ⅰ标记的 NK 细胞克隆裂解物中的 43kDa 分子反应[233]。随后,此 43kDa 分子被发现为 NKG2A;这种 43kDa 分子以前被证实为 Kp43。因而,CD94 与 NKG2A 形成的异质二聚体为其他不同的功能性和生化上的研究提供了解释。

589

NKG2A 属于一高度相关分子所组成的一个小家族成员,它们是与 NKR-P1、Ly-49 和 CD49 很相关的具有 C 型凝集素域的Ⅱ型整合膜蛋白[237],这些分子是以前通过底物杂交证实的并且是相对 NK 细胞特异性的。NKG2A 和 NKG2B 可能为同一基因交替剪切的产物,然而 NKG2C 和 NKG2D 是不同基因的产物。虽然 NKG2A 含有 ITIM,另一叫 NKG2 分子没有,但可能标明这些分子涉及到别的 NK 细胞功能如活化作用。关于这一方面,以前的研究表明 NKG2C 能识别肿瘤靶细胞上的结构[238]。虽然 CD94 分子表面上能表达为一同型二聚体,但是这个分子的关联现在仍不知道。相反地,NKG2 仅仅在另一分子如 CD94 形成 CD94-NK 异型二聚体的复合物时才表达。这些分子的特异性刚好开始弄清楚[239],但是有可能这种异型二聚体的特异性和功能将依赖于此二聚体中 NKG2 伙伴链。CD94 是否与别的伙伴有关并不知道。因而,人 NK 细胞也表达 C 型凝集素样受体[159,194,240]。

在 C 型凝集素受体中,在人 CD94-NKG2A 受体和小鼠 Ly-49 中有几个明显的不同之处。第一,CD94-NKG2A 分子是异型二聚体,而 Ly-49 分子仅仅描述为同型二聚体[173,241]。第二,没有一个 Ly-49 家族成员描述

为与 CD94 一样短的胞质域。第三，CD94 表现为有最小的多态性，并且可能作为一稳定的伙伴链表达在每一个人 NK 细胞上，然而到目前为止的研究表明 Ly-49 分子具有多态性，单个的 Ly-49 家族成员表达在 NK 细胞的交叉亚群上，最后，CD94 和 NKG2 分子并不表现为与 Ly-49 严格的同源性。通过序列对准仅仅发现远端的关联，表明这些分子组成不同的基因家族，因而，人和小鼠可以表达 CD94-NKG2 和 Ly-49 受体，这是将来研究的主题。

虽然 C 型凝集素受体与 Ig 超家族受体两者之间的关联还没清楚阐明，但它们之间除结构不同之外还有别的差别。Ly-49A 分子结合其 MHC Ⅰ类配体而与 MHC 相关的多肽无关[174,176]，然而 KIR 分子能有多肽特异性[219,220]。对其他受体的这些特征的评价还在推测阶段。

NK 细胞与靶细胞相互作用的功能性后果(如活化作用或抑制作用)表现为依赖于 NK 细胞受体(或活化或抑制作用)和靶细胞上与这些受体的配体。重要的是，许多这些受体协同表达在单个的 NK 细胞上。不像 BCR 和 TCR，一表达在一个体 NK 细胞上的 NK 细胞受体去排除别的受体仍需描述。然而，在 NK 细胞受体领域的研究仍处于其早期阶段。别的受体的存在的测定仍需做更多的工作。已知受体的特异性，这些受体与其他的关联和每一受体对个体的 NK 细胞的所有特性的作用仍需要更多的工作去做。现在仍不清楚，比如，是否这两种结构类型的受体类似于 MHC Ⅰ类限制性 T 细胞上 CD8 和 TCR 互为共同受体[242]。最后，别的辅助分子如黏附分子和共刺激分子在这些受体方面的作用目前仍不知道。在这快速发展的领域期望有重要地进展。

NK 细胞受体抑制作用的生化机制

对 NK 细胞裂解功能进行不同的分析如自然杀伤和 ADCC，使用抗 CD69、Ly-69 或 NK1.1 进行逆向 ADCC，凝集素促进的溶解[163~165]，发现动员 Ly-49A 分子显著地影响 NK 细胞的特异性[163~165]。因为这些活化途径在细胞表面并非物理性相关的，所以这些结果表明 Ly-49A 是一种抑制性的受体。近来，对 Ly-49A 转基因 T 细胞进行的研究表明 T 细胞的异常反应受 Ly-49A 动员的抑制[171]。相似的抑制影响在动员人 NK 细胞上 KIR 分子后也发现[159,194,196,207,210,240]。而且，通过组成型表达 KIR 分子的 T 细胞上的 TCR，动员 KIR 可抑制其活化[243]。最后，对 MHC Ⅰ类抑制的 NK 细胞的活化事件的早期分析表明了信号方面的不同[244]。因而，抑制似乎比活化事件更占优势，并被认为是 MHC Ⅰ类特异性受体所介导的负性信号起次要作用。

通过表明存在于 CD22 和 FcγRⅡB 胞质域由 ΨxYxxL(在这里 Ψ = 疏水的)序列组成的 ITIM 在受体交联时发生磷酸化，这些研究为洞察抑制机制提供了条件[245,246]。这导致 SHP-1 的募集，后者通过对已磷酸化的活化分子进行去磷酸化而拮抗酪氨酸激酶的活化作用。一个人 KIR 分子有由 24 个残基分离开的一个 ITIM。每一个 ITIM 在交联(或酪氨酸磷酸酶的抑制作用)时被磷酸化并能直接结合 SHP-1[247~249]。相反，Ly-49A 每条链仅有一个 ITIM，但 Ly-49 分子被正常表达成同型二聚体。虽然 Ly-49A 的磷酸化到目前仅在 Pervanadate(酪氨酸磷酸酶抑制剂)的处理下发生过。但代表 Ly-49A 的 ITIM 磷酸肽能结合 SHP-1，Ly-49A 动员募集 SHP-1[172,250]。另外，酪氨酸在 Ly-49A ITIM 中的关键作用也得到证明[172]。然而，在肥大细胞，ITIM 也能结合含有调节肌醇磷酸代谢的肌醇磷酸 5-磷酸酶的 SH2 结构域[251]。目前对此酶在 NK 细胞的抑制信号级联中的作用仍不知道。然而，可得的数据强烈支持这样一个抑制机制：随着 ITIM 的磷酸化和 SHP-1 的募集，受体发生关联。这种机制受两种类型抑制受体的操纵。

对人 T 细胞 Jurkat 细胞系与 KIR 转染体进行研究，KIR ITIM 被 $p56^{lck}$ 酪氨酸激酶磷酸化[252]。虽然 NK 细胞确实表达 $p56^{lck}$，但仍不清楚 NK 细胞是否通过这一机制磷酸化所有其抑制受体。因为自然杀伤的活化途径仍需更详细地了解，所以，抑制效应的下游调节子并没有很好地被理解。然而，近年的研究表明，一主要磷蛋白在 KIR 交联时被分化性地磷酸化的是 pp36，pp36 是 Grb2 和磷酸脂酶 PLCγ1 相互作用的接头分子[252,253]。在暴露于敏感靶细胞的 NK 细胞中，pp36 被磷酸化，这可被 KIR 动员靶细胞上的 MHC Ⅰ类配体所阻止。而且，在交联 CD16 时检测到一相似的磷蛋白，这为 ADCC 被 MHC Ⅰ类受体所抑制提供了合适的解释。对 NK 细胞的抑制途径如活化途径一样进行剖析可对此领域作进一步的了解。

590

NK 基因复合物

在证明 *Ly*-49 连锁到控制 *NK*1.1 表达的基因座后，*NK* 基因复合物（*NKC*）最早被定义为 *NKR-P*1 和 *Ly*-49 基因家族遗传上的连锁[178,255]。由于连锁到不相关的 *Prp* 基因座，这些基因被定位到远侧小鼠 6 号染色体上[125,178]，最初的遗传图谱数据是通过重组近交小鼠 RELP 变异体的种分布格局而提供的，紧密的连锁是通过大的杂交组来证实的，表明 *Nkrpl* 和 *Ly*-49 相距不到 0.1cM。因为小鼠的基因组估计不超过 1500cM，因此这些基因之间的连锁看起来不可能是偶然事件，虽然此基因家族编码的蛋白质分享几个通常的特征（选择性 NK 细胞的表达，二硫键连结的二聚体，Ⅱ型跨膜定位，外部的 C 型凝集素超家族同源性，多态性，在测定 NK 细胞特异性上的功能性活性），但家族之间并没有核苷酸同源性，另外图谱研究表明这些基因座有重组，通过遗传连锁分析证明有分离现象。因而，*Ly*-49 和 $NKR\text{-}P_1$ 家族是高度相关的但由不同基因座编码，遗传上的连锁表明此基因组区域与 NK 细胞功能相关。

NKC 的重要性通过在小鼠，大鼠和人中得到证实而被突出了（图 17.5）。小鼠 *NKC* 位于在几个遗传位点连锁顺序中具有保守性染色体区域的中间，由于人 *Prp* 同源性的定位，表明人的染色体区域应当是染色体 12p13[106,125]。随后 *NKR-P* 和 *CD69* 基因的定位验证了这一定位[132,258]。$NKR\text{-}P_1$ 和 Ly-49 家族之间的相似性也表明在 NKC 中有另外的分子被编码。这些分子与 NK 细胞的功能有关，是结构上相关联的，发现 CD94 和 NKG2 分子（至今未在小鼠中得到证实并被认为与 Ly-49 不同）是在人 NKC 中编码的这一发现支持上述预测[232,259,260]（图 17.6）。这为对杂交方法有抗性的小鼠 CD94 和 NKG2 的证实提供一种手段。

小鼠	大鼠	人	
Ly-49	*rLy-49*	?	Ⅱ型C型凝集素二硫键连结的二聚体
Nkrp1	*rNkrp1*	*NKRP1*	
?	?	*CD94*	
?	*rNkg2*	*NKG2*	
Cd69	?	*CD69*	
?	?	*AICL*	
Cmv1	?	?	功能性定义
Rmp1	?	?	
Chok	?	?	
?	*Nka*	?	

图 17.5 *NKC* 在小鼠、大鼠和人基因组之间具有保守性，且含有其他 *NK* 细胞基因和基因座。

*CD*69 基因也是在人和小鼠 *NKC* 中编码的[258,261]，虽然 *CD*69 在静息造血细胞中通常缺乏，但促有丝分裂原，比如佛波酯和抗 CD3 可快速诱导 CD69 转录子和蛋白的表达[258,261,263]。CD69 多肽表达成由二硫键连结而成的 28kDa 和 32kDa 亚基组成的二聚体，去糖基化肽在 SDS-PAGE 中具有相同的迁移，这表明它被表达为具有各种程度糖基化的单体，通过二硫键连结而成同型二聚体，虽然 CD69 的推测配体还没得到证实，但抗 CD69 mAb 在形形色色的 T 细胞中触发几个事件，包括 T 细胞的增殖和血小板活化[264]，在逆向 ADCC 分析中，IL-2 活化 NK 细胞的细胞裂解活性也能被抗 CD69 触发[61]，近来编码 CD69 的 cDNA 的克隆表明它为 C 型凝集素超家族的Ⅱ型整合膜蛋白，与 Ly-49 和 NKR-P1 有 20% 到 25% 的同源性[258,265,266]，这表明 NKC 并不是限于编码 NK 细胞特异性分子的基因。CD69 与 Ly-49 和 NKR-P1 分子不同之处在于 CD69 缺乏一叶柄域。这在研究活化诱导的 C 型凝集素（AICL）分子中重申了[267]，这是另一种具有外部 C 型凝集素域与造血细胞上活化后诱导的 CD69 在序列上全面结构和表达上有很大同源性的Ⅱ型跨膜蛋白。虽然其功能不知道，但它在胞质域实际上的缺乏与 CD94 相似。因而，NKC 编码Ⅱ型跨膜 C 型凝集素样分子，其表达并不仅仅限于 NK 细胞。

近来，通过对一大组杂交小鼠进行分析，作出了两个高分辨率的 *NKC* 遗传连锁图谱，通过评价 YAC 产生了一物理图谱[257,268,269]，这些图谱普遍一致，确认了以前的遗传连锁对准，并能够彼此定向（图17.6）。基于重叠非嵌合 YAC，并被多重会聚证实，此 2.1 兆碱基物理图谱表明 *NKP*1 家族和 *Ly*-49 家族聚集分离成两个不同的区域[269]，所有已知小鼠 *NKC* 基因除存在于 *Ly*-49 聚集端粒 *Ly*-49*B* 外均得到说明[270]。有趣的是，非多态性 *CD*69 基因位于 *NKRP*1 和 *Ly*-49，尽管两种侧面基因聚群的广泛的多态性和等位基因多态性。而且，

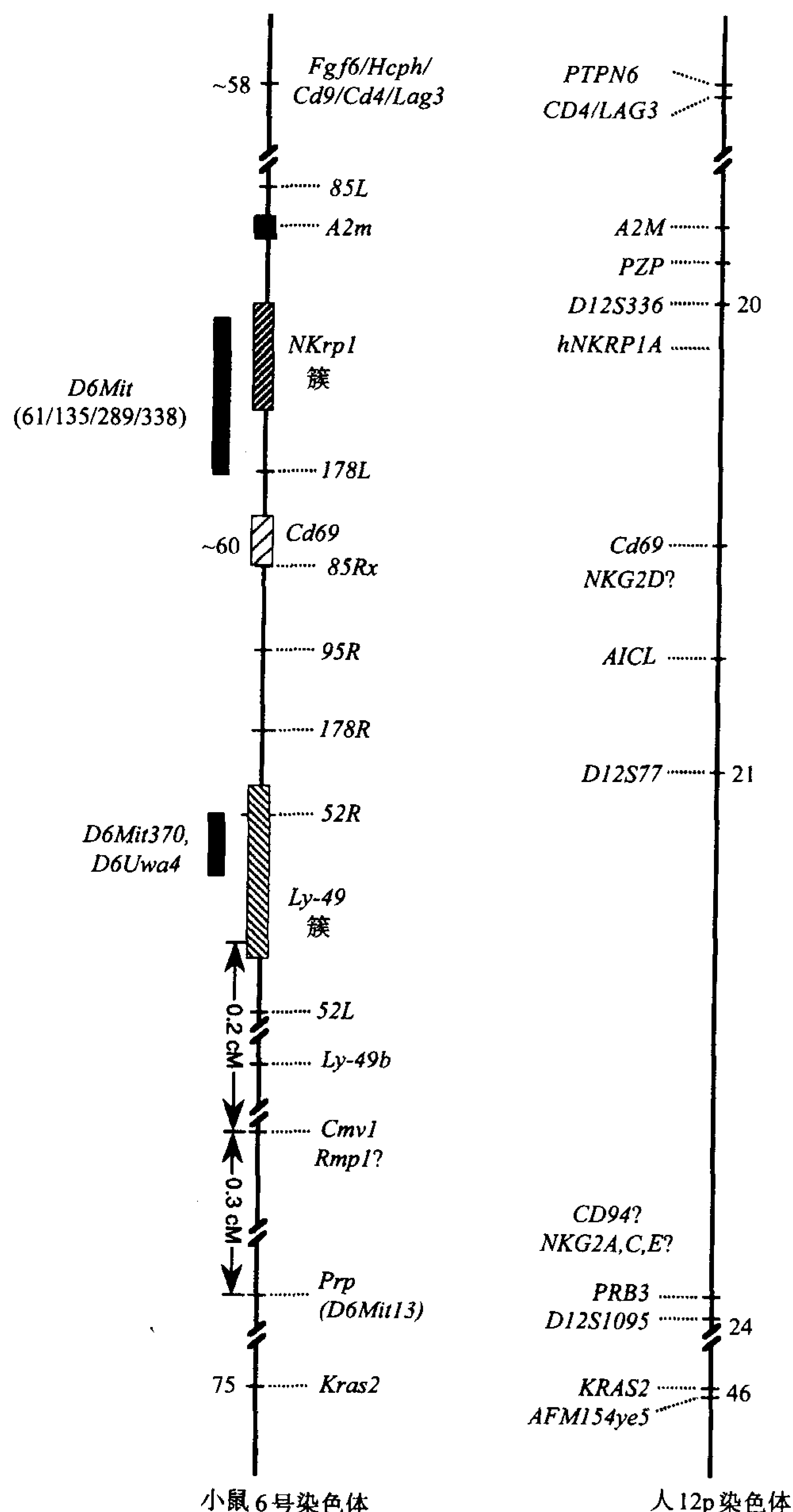


图17.6　小鼠(6号染色体)和人(12p染色体)NKC的复合图谱。染色体连锁组(着丝粒-*Hcph/Cd4/Lag3-A2m-CD69-Prp-Kras2*-端粒)和(端粒-*PTPN6-CD4/LAG3-A2M-CD69-PRB3-KRAS2*-着丝粒)分别促进小鼠和人遗传区域的对准。然而,小鼠间隔的染色体定位与人相反。小鼠*NKC*基因已在图上标明(阴影盒)。小鼠*Nkrp1*和*Ly-49*簇之间的物理学距离大约为1兆字节。另外,*Ly-49*基因在*Ly-49*簇区域的次序已测定过(着丝粒-*Ly-49e-Ly-49d/f-Ly-49h-Ly-49g-Ly-49c-Ly-49a*-端粒),但没有表明。通过指定位点之间的重组频率测定,小鼠*Cmv1*的遗传位置被表明。人的已被准确定位的*NKC*基因用染色体ticks表明。还未准确定位,但其位置通过比较啮齿类和人NKC已推测出的*NKC*基因通过缺乏染色体ticks表明。此遗传区域其他*NKC*相连基因的准确位点不知(?)。小鼠和人染色体的序列标签位点(STS)标记也表明,遗传图谱单位cM已指定。

*NKC*覆盖一个相当大的物理距离,占据了*NKrP1*和*Ly-49*之间的1兆碱基,可超过这个区域包含人CD94和NKG2的鼠科同源性。

虽然据推测*LAG-3*基因应当包括在*NKC*中[137],但它遗传上定位于一个非常大的区域。有趣的是,编码SHP-1的*Hcph*基因也在附近一区域,但其相当大的距离近来预先排除其作为NKC基因的正式考虑。然而,因为两者都编码结构上不同的分子,像MHC,NKC有可能含有编码功能上相关但结构上不同分子的基因[270]。例如,除了抗原呈递(MHC)分子,MHC还含有编码抗原处理、肽转运和MHC装备的基因[271],用一相似方式,NKC可编码结构上不同的分子,这些分子对NK细胞的活性却很重要,编码α2球蛋白的被连结的A2m基因和别的基因在这方面可能相关。 591

NKC对NK细胞功能的重要性在于这些遗传区域的NK细胞介导的表型性状表明了,对巨细胞病毒(MCMV)的遗传上测定的抗性是受*MHC*和非*MHC*基因座的多基因控制,惟一一个已定义的非*MHC*基因

座，*Cmv1* 对别的致死性 MCMV 感染的抗性有作用[272]。在这个模型中，抗性体现在抗性品系（C57BL/6）与敏感小鼠（BALB/c）相比时脾中显著的低病毒复制能力。NK 细胞介导对 MCMV 的抗性，因为用抗 NK1.1 或抗唾液酸基缺乏的 GM1 抗体排除 NK 细胞时，抗性消失[273,274]。然而，有趣的是，Cmv1 在肝中并不能控制 MCMV，这表明 NK 细胞的影响是组织特异性的[275]。Scalzo 和其同事最初定位 *Cmv1* 到与 NKC 连锁的近侧 6 号染色体上[256,272]。大批回交组的研究图谱支持其紧密连锁到 *Ly-49* 与 *NKRP*1 重组，这表明 *Cmv1* 可编码 NK 细胞上的一个分子，此分子负责对 MCMV 感染细胞或 MCMV 本身的识别[257,268]，虽然此基因产物与 NKC 其他成员结构上相关，但至今不清楚 *Cmv*1 是否编码一个活化或抑制分子，关于后者，疱疹病毒含有编码 MHC Ⅰ类样分子的可读框，这种分子能动员 MHC Ⅰ类特异性受体抑制 NK 细胞的功能，对 Cmv1 基因产物的识别可为 NK 细胞在病毒抗性中的作用的理解起很大进展作用。

Rmp1 也定位于 NKC，这是用一与 *Cmv1* 高度相似的方式编码近交小鼠抵抗小鼠痘（缺肢）能力不同的等位基因的一个基因座[278]。其与 *Cmv1* 的关联不知。它可能等同于 *Cmv1* 或紧密相连而高度相关但不同的基因。在大鼠，NK 细胞介导的对 MHCⅠ类分子的异常特异性也定位到 *Ly-49* 附近的 NKC。奇怪的是，这个叫 Nka 的基因，表现为编码可能是由于 MHC 诱导 NK 细胞活化而不是抑制而产生的不同[149,193,276]，这可能与某种小鼠 Ly-49 分子对活化 NK 细胞的能力相关[148]。最后，C57BL/6 和 BALB/c NK 细胞甚至在它们杀伤许多别的肿瘤靶细胞方面有相等能力的情况下，它们在杀伤 CHO 细胞的能力上也有本质上的不同，这种表型定位到一个叫 *Chok* 的遗传基因座，它与 NKC 相连[280]。因而，对 NKC 的进一步分析将揭露不但已知的基因（*Nkrp1*、*Ly*49、*CD*69、*NKG*2 和 *CD*94）而且还包含被 NK 细胞介导的编码表型性状的基因（*Cmv*1、*Rmp*1、*Nka* 和 *Chok*）。

NK 细胞在宿主防御和免疫调节中的作用

NK 细胞和肿瘤监视

592

足够的文献支持 NK 细胞在抵抗肿瘤生长和稳定中起作用，但普遍上这些研究利用肿瘤过继性的转移[5]。另外，主要由 IL-2 活化的 TCR-CD3⁻ NK 细胞组成的 LAK 细胞用来注入对普通治疗有顽固性的癌症病人身上[281]。有几个完全减缓的病例已见报道，但这种治疗需要高剂量重组人 IL-2 的静脉内注射，而 IL-2 有显著的毒性。然而，这种形式的免疫治疗为有效的癌症治疗带来了希望。

在涉及继承性肿瘤细胞转移给小鼠的实验方案中，NK 细胞表现为 24 小时内排除 90% 以上的肿瘤细胞[282]，用体外自然杀伤肿瘤的方法评价，这与各种各样小鼠品系的 NK 细胞的活化水平直接相关。抑制 NK 细胞的活性或用抗体删除 NK 细胞使肿瘤排斥作用消失。假如 NK 细胞的细胞裂解结构通过靶向突变呈现无力，体内肿瘤排斥作用显著降低，如穿孔素缺乏小鼠不能清除肿瘤[283]。在另一方面，通过各种各样的介质如 polyI:C 和 *C. parvum* 来提高 NK 细胞的活性，则能提高宿主排除肿瘤的能力[282]，实验系统的进一步的评价表明选择性的 NK 细胞效应将建立于这些观察之上，特别是关于防治肿瘤方面。

虽然近交小鼠表明有不同的内在 NK 细胞活性，但这些不同的遗传基础还没完全弄清楚。然而，发展与 NKC 同类的小鼠在这方面是有用的[284]。另外，目前在体内分析 NK 细胞的功能有几个小鼠品系是有用的。V(D)J 重组（SCID，RAG-1$^{-/-}$，RAG-2$^{-/-}$）缺陷小鼠没有混淆分析的 T 细胞，并且 NK 细胞在脾中占很大百分比[32~34]。与这些重组缺陷的小鼠相比，几个小鼠种由过分表达人 CD3ε[285] 或人 FcεR Ⅰ γ[286]，或在 IL-2Rβ 链的全面突变而使 NK 和 T 细胞的发育缺陷，也有用。beige（*bg*）小鼠有影响 NK 细胞杀伤能力的突变，但是此缺陷时是在影响许多不同细胞类型颗粒的溶酶体转运蛋白中，因而这种缺陷不是 NK 细胞特异性的[287~289]。因而，虽然没有 NK 细胞缺陷的特异性小鼠，但有几个小鼠品系在体内评价 NK 细胞功能是有用的。

对体内肿瘤清除的几个分析是可得的。肿瘤接种物皮下注射后，跟着控制长期的动物存活或损伤大小。然而，由于存在肿瘤特异性肽，即使在同系宿主中 T 细胞免疫应答可影响肿瘤存活。放标肿瘤细胞可随之肺清除分析，因为肺中的放射性活性是肿瘤负荷的指标，因为这种分析可在肿瘤孵育 4～48 小时后进行，因此

它在一非免疫宿主中提供了一相对局限于 NK 细胞反应中的指标。

在体外肿瘤对 NK 细胞敏感性的自然杀伤分析可能并不与体内肿瘤排斥准确相关[282]，在体外相对抗性的肿瘤在体内敏感，并不是偶然现象。对此现象的一个可能解释是这种分析的相对敏感性，尽管有可能是 NK 细胞在体内更有效；另一解释是，在体外培养期间肿瘤发生了改变了，一些研究者在体内继代接种其肿瘤靶来避免组织培养诱导的状态。然而，NK 细胞的大多数分析涉及在体外培养的 YAC-1 或 K562 靶细胞。

NK 细胞与宿主对病原有机物的防御

NK 细胞在宿主对病原体的防御作用对人 NK 细胞选择性的缺陷病人更加显著[290]，在此病人的外周血中存在正常数目的 B 和 T 细胞，但却检测不到 $CD56^+$ 细胞。体外功能分析证明有正常 B 和 T 细胞应答，但其外周血没有自然杀伤作用，且不能被 IFN 刺激。其临床过程主要表现为由多重细菌和疱疹病毒包括水痘，疱疹单显性组合；通常仅仅为一黏膜病原体导致的无法控制的血负荷感染而引起的频繁的反复发作。在别的病历报告中，NK 细胞缺乏的病人没有一个显著的临床过程，但却存在反复病毒感染的问题或者与病毒感染有关的临床表现[291,292]。最后，NK 细胞并不表现为在出生时就完全发育了，因为中枢血淋巴细胞的低自然杀伤性，这通过啮齿类的脾 NKR-P1 表达的个体发生的研究确证了这一观点[293,294]。有趣的是，在经典 TORCH 综合征中，出生缺陷和严重胎儿异常与母亲弓形虫、风疹、巨细胞病毒和疱疹病毒感染有关[295]。因为 NK 细胞对这些有机物是有活性的，在新生期 NK 细胞的相对不成熟可能有临床上的关联。因而，有趣的是降低的 NK 细胞活性与对感染的敏感性有关。

有报道说被人免疫缺陷Ⅰ型病毒(HIV-1)感染的病人 NK 细胞活性异常[296]。NK 细胞能被人疱疹病毒感染，后者诱导细胞病性改变和重新表达 CD4。CD4 是 HIV-1 的细胞内受体，NK 细胞并不正常表达此分子[297]，这使 NK 细胞对 HIV-1 的感染敏感，废除了自然免疫，这个发现为 AIDS 病人中 NK 活性显著降低提供了一合理解释，这也许是被有机体机会性感染的一个原因。

在实验模型中，NK 细胞在几种病毒感染是重要的，包括以上描述的对 MCMV 的根除。然而，NK 细胞并不对所有病毒有效。例如，它们在对流感和淋巴细胞 choriomeningitis 病毒的免疫防御中作用就不大，尽管感染刺激了 NK 细胞的活性[298]，目前不知为何 NK 细胞对某些病原体有效而对别的又没有效果，但有一些证据怀疑优势的免疫反应是有组织特异性的。而且，NK 细胞介导其抗病毒效应的机制还没清楚，NK 细胞对几种其他病原体，包括革兰氏阳性和阴性菌也有活性[299]，NK 细胞的活性在分枝杆菌真菌如甲隐球菌和原生动物寄生虫包括利什曼原虫和弓形虫中也见报道。

593 应当强调的是，NK 细胞反应与其在肿瘤模型的天然免疫系统中的作用是一致的，并补充了特异性和调节性的免疫反应。NK 细胞的活性不需首先暴露于病原体或体内克隆膨胀，这与免疫系统(B 和 T 细胞)特异性效应臂中细胞的扩大的反应相反，克隆膨胀的扩增需要显著时间，通常是数天到数周，到那时宿主由于某种病原体感染已经死亡了。在此期间 NK 细胞可以提供一早期的防御系统。当用抗体来排除体内 NK 细胞时，抗体必须在病毒孵育之前或 48 小时之内用，来证明对 MCMV 感染的免疫敏感性[247,300]。假如抗体注射晚了小鼠则保持抗性，表明 NK 细胞的效应发生在病毒感染的 48 小时之内。

然而，NK 细胞并不是宿主防御反应的静态参与者，因为 NK 细胞会积聚在病毒复制位置[301,302]。另外，近来的研究证明当 β_2m 突变的小鼠反复暴露于非毒性鼠弓形虫(*Toxoplasma gondii*)时会引起 NK 细胞的显著膨胀[303]，这与 NK 细胞介导的对毒性感染的抗性有关，虽然这种积聚(通过迁移募集原位增殖或两者)的有力机制还没有阐明，但它增加了 NK 细胞的活性可被免疫增强这一可能性。

NK 细胞的免疫调节

除了前面讨论的涉及自然杀伤和 ADCC 的细胞毒性，NK 细胞还产生细胞因子并对其作出反应。NK 细胞产生细胞因子在调节特异性免疫反应中的关键作用，在检查体内 NK 细胞对感染作出反应和对 T 细胞的影响研究中得到了最好的证明[299,304]。根据其细胞因子产生的格局，Th 细胞分化成 Th1 和 Th2 两个功能性

亚群[305]。Th1 通过产生 IL-2 和 IFN-γ 对细胞介导的免疫有作用,而 Th2 细胞产生调节体液免疫反应,包括 Ig 同种型产生的 IL-4,IL-5 和 IL-10。在抗性宿主中,对各种各样细胞内有机物如硕大利什曼原虫的保护性 T 细胞反应主要通过 IFN-γ 来调节。IFN-γ 是一显著影响初始 T 细胞分化成 Th1 亚群的多效的细胞因子[304,306],虽然 IFN-γ 也被 Th1 细胞产生,但 NK 细胞产生的 IFN-γ 的重要性被强调在其产生时间上[307]。虽然在用病原体急性实验动员后几天到几周 Th1 细胞才产生 IFN-γ,但 NK 细胞在感染 2 天之内就产生可检测得到的 IFN-γ。因而,在宿主反应中颇具特征性的早期 NK 细胞反应,如 IFN 产生是调节 T 细胞对细胞内病原体反应的主要决定因素。

是什么刺激 NK 细胞产生 IFN-γ 呢? 主要的因子是 IL-12,IL-12 也叫 NK 刺激因子。它是由来源于分离开的两基因的 35kDa 和 40kDa 链通过一个二硫键连结起来的异质二聚体[308]。IL-12 是由 B 细胞和吞噬细胞如巨噬和中性粒细胞,对胞内有机体摄取作出反应和暴露于细菌性内毒素所产生的。例如,被硕大利什曼原虫或单核细胞增多性利斯特氏杆菌[309,310]感染时,宿主的巨噬细胞产生 IL-12,后者是 NK 在体内外产生 IFN-γ 的强大诱导剂,TNF-α 能增强 IL-12 诱导的 IFN-γ 的产生,但 TNF-α 单独不能起刺激作用[309]。重要的是,这一系列事件即使在缺乏成熟 T 和 B 细胞的 SCID 小鼠中也表现出保护作用。相似的研究在被 MCMV 感染的小鼠中报道:被 MCMV 感染的小鼠主要是由 NK 细胞控制的[311,312],有趣的是 IFN-γ 对 MCMV 的控制主要体现在肝脏,这表明 NK 细胞效应机制的器官特异性不同性[275]。在这些系统中,是否有由非细胞因子介导直接的 NK 细胞活化涉及,人们并不清楚。在另一方面,NK 细胞对 IL-12 的反应能被其他细胞因子控制,单核细胞产生的细胞因子 IL-10(也被 Th2 产生)抑制鼠和人 NK 细胞 IFN-γ 的产生[309]。最后,NK 细胞上 IL-12 受体还没有弄清楚,虽然近来的研究表明:T 细胞对 IL-12 的刺激需要两条链(IL-12Rβ1 和 IL-12Rβ2),且它们是分化调节的[373]。然而,NK 细胞产生 IFN-γ 在调节随后的免疫反应是重要的,它本身又被别的细胞因子正性和负性地调节。

NK 细胞能调节特异性的免疫系统其他的组分,大概通过 IFN-γ,例如,NK 细胞能够通过诱导促进 IgG2a 和 IgG3 类型转换的 Th1 细胞来调节 Ig 的分泌[314,315]。NK 细胞显然产生调节免疫系统的别的细胞因子,包括 IL-1β、IL-3、IL-6、TGF-β、TNF-α、TNF-β、GM-CSF 和巨噬细胞 CSF(M-CSF)[27,316~321]。然而,需提醒的是某些细胞因子的产生通常是在富含 NK 细胞的异质淋巴种群实验中检测的,在这些富含 NK 细胞种群中排除 T 细胞的困难性使得有些细胞因子有被污染细胞产生的可能,避免这一问题的实验模型是使用没有成熟 T 细胞但有正常 NK 细胞功能的 SCID 小鼠[309],检测克隆的 NK 细胞系的细胞因子的产生将会有帮助。在这一方面,目前没有证据表明 NK 细胞像 Th 细胞一样,依据其细胞因子的产生分成免疫调节亚群。然而,很清楚 NK 细胞有显著影响免疫应答的潜力。

相反地,分化成 Th2 表型表现为免疫应答早期细胞产生的 IL-4 所调节的。有趣的是,这种细胞在几种水平与 NK 细胞相似,但它是 TCR-CD3$^+$ T 细胞[123]。在小鼠,NK1$^+$ T 细胞表达通常与 $V_\beta8$、$V_\beta2$ 或 $V_\beta7$ 链相结合的一恒定 $V_\alpha14$-$J_\alpha281$ TCR 链。一相似的 T 细胞种群在人类中描述过。像小鼠 NK 细胞,NK1$^+$ T 细胞表达不同于 NK 细胞选择性的分子如 NK1.1 和 Ly-49 家族的分子,尽管表达 CD4,然而这些 T 细胞是 CD1 限制性的,它们在发育中需要 CD1 的表达,这与 NK 细胞相反[322,323]。相似于相应部分的 NK 细胞在免疫反应早期产生能驱使 Th 细胞分化成 Th1 表型的 IFN-γ,NK1$^+$ T 细胞在对 TCR 动员的反应中通过早期产生 IL-4 来诱导细胞分化成 Th2 表型[324,325]。虽然 NK1.1 的作用和 Ly-49 分子的抑制影响还没研究清楚,但对这些分子进一步的检查可揭示其比目前所理解的对 NK 细胞有更密切的联系。

NK 细胞对血细胞发生的调节作用:杂种抗性

594

NK 细胞调节骨髓移植物重新定居于辐射受体的能力。例如,在别的同系辐射小鼠 NK 细胞排斥来自 β_2m 缺陷小鼠的骨髓移植物[86,87],这提供了一个清楚例子并洞察了叫杂种抗性一相关现象[88]。在这种违反实体组织经典规律的移植模型中,照射 F_1 杂种小鼠排斥来自随便一种近亲母体的骨髓。杂种抗性是由宿主 NK 细胞介导[326],这一现象通过证明 SCID 小鼠展现这种现象,而用抗 NK 细胞抗体排除 NK 细胞则排除了对母体骨髓的排斥作用[327,328],此过程表现为涉及到被一连结到 H-2D^d 区域的位点编码的母本决定簇的识

别[89]。对转基因 H-2D^{d}C57BL/6 小鼠和 dm_1 嵌合小鼠的研究强烈表明母本决定簇是 MHC Ⅰ类分子如 H-2D^d 本身[329,330]。

然而，几个观察似乎表明叫血细胞发生组织相容性-1(Hh-1)的母本决定簇，涉及杂种抗性[88]。对 MHC 同属小鼠的广泛研究证明排斥的特异性依据传统供体或受体的 MHC Ⅰ类单体型不能划分成组。而且，特异性之间存在显著的重叠。尽管对 MHC 重组小鼠的分析表明假定的 Hh-1 基因与 H-2D 亚区域分离并驻于一很中端的区域[89]，但这仅基于一小部分还不清楚其 H-2D 基因是否完整的重组小鼠。为了进一步理解杂种抗性的分析，大鼠对 MHC 分子有异常特异性，表现为不是抑制受体而是活化[149,193,279]作用。因此，杂种抗性的问题变得很难理解。

描述 NK 细胞对母本决定簇特异性的另一种方法是：生产 mAb 来识别介导特异性供体骨髓排斥的 NK 细胞[182]，注射抗 Ly-49C/I 特异性 mAb SW5E6 消除对表达 H-2^d 骨髓移植物的排斥[171]，这些观察提供一份外的理解。因为以前对母本决定簇的分析是在不知道假定受体特异性的情况下进行的[89]。在 Ly-49 分子中，这种考虑可能会更显著，因为这些受体有着混乱的特异性，涉及别的不成组的 MHC Ⅰ类分子如 H-2D^d 和 H-2D^k，而不是 Ly-49 的 H-2D^b 的[331,332]。而且，不知道个体的 Ly-49 家族成员这种不同等位基因形式是否有不同的特异性。然而，Ly-49 家族被包含在杂种抗性的 NK 细胞特异性中。

近来的研究趋向于支持杂种抗性是由于"丢失自己"这一解释。通过一体外杂种抗性模型对 Ly-49C/I 的特异性进行了研究。在这个分析中，IL-2 活化的 NK 细胞用来作为对 ConA 刺激的淋巴母细胞进行杀伤分析[120]。尽管有可能这种杀伤代表凝集素促进的杀伤，但此分析在测定 NK 细胞对 MHC Ⅰ类分子的特异性是有用的。Bennett 和 Kumar 小组测定到来自 F_1 近交小鼠的 5E6$^+$ NK 细胞杀伤 H-2^d 但不杀伤 H-2^b 淋巴母细胞，这与使用 SW5E6 单抗在体内排斥的实验数据一致[182,183]。然而，依据新的数据表明这种 mAb 识别两种 Ly-49 分子(Ly-49C 和 Ly-49I)，对这种特异性作进一步的分析是必需[184]。然而，杂种抗性表现解释为体内 NK 细胞对不表达 MHC Ⅰ类分子的全面补充物的骨髓前体的反应性，而 MHC Ⅰ类分子在宿主中表达。

排斥机制没有清楚地理解。NK 细胞用与一自然杀伤一致的方式直接杀伤干细胞[88,333]。然而，颗粒酶 B 对杂种抗性是不需的，尽管它对自然杀伤是需要的[334,335]，而且，穿孔素和 Fas 介导的细胞毒性明显不涉及一相关实验模型，排斥异已基因骨髓移植物[336]，表明 NK 细胞对骨髓移植的影响并不是由于对干细胞的直接裂解作用；另外一种可能，NK 细胞可通过产生细胞因子，如 CSF 间接影响血细胞的生长与分化[319,320]用粒细胞 CSF 处理可消除杂种抗性，这支持了细胞因子的作用[337]，但此保护机制不清楚。因而，对杂种抗性的进一步评价是必要的。

因此，NK 细胞调节骨髓移植物的能力代表了剖析 NK 细胞特异性和识别的一重要实验系统。这也是在治疗人类疾病时为广泛接受骨髓移植具有明显临床重要性的领域。

NK 细胞和母胎相互作用

NK 细胞在母胎相互作用中的地位的间接证据是正在出现的一个令人感兴趣的研究领域[338]。有几个有关的观察。

NK 细胞在所有到目前为止所检查到哺乳种类中，均聚集于靠近胎儿滋养层的子宫中[339]。最初描述为颗粒状 metrial 腺细胞，它们现在被识别为母本的和骨髓来源的 NK 细胞。这种细胞呈现典型的 NK 细胞标志且表现为活化的，因为表达活化标记如 CD69。功能分析表明这些细胞的行为像普通的 NK 细胞。

非经典的 MHC Ⅰ类分子(HLA-G)表达于绒毛处的滋养层[340]。相反，别的 MHC Ⅰ类或Ⅱ类分子不表达在这儿。虽然一鼠科的胎盘还没得到证实，但近来 MHC Ⅰb 类分子被描述选择性表达在小鼠胚囊和胎盘，这表明它为一种 HLA-G 的功能性类似物[341]。虽然 HLA-G 能结合肽而且可能呈递抗原给 HLA-G 限制性的 T 细胞[342~344]，但 HLA-G 的表达也能通过与 KIR、CD94-NKG2A 或别的未定义的分子的相互作用抑制人 NK 细胞[343,345~348]。有趣的是，HLA-G 表现为完全抑制来自许多不同供体的多克隆 NK 细胞亚群的自然杀伤[348]。这就有可能是胎儿滋养层细胞 HLA-G 的表达抑制了母本 NK 细胞，从而保护胎儿免受排斥；在另一方面，由

于在 β_2m 或 TAP 基因的靶向突变引起 MHCⅠ类分子缺乏的小鼠明显表现为发育正常[349,350]。然而,HLA-G 的表达并不像经典 MHCⅠ类分子一样对装备和运输到细胞表面是必需的;HLA-G 能表达在缺乏 TAP 表达的细胞上[351]。而且,交替剪切的 HLA-G 转录子被描述编码有明显功能活性的可溶性分子。因而,对 NK 细胞和 HLA-G 的研究关联到母体对胎儿的耐受。

NK 细胞的发育

几个模型系统证明 NK 细胞是骨髓来源的[353,354],早期在骨髓嵌合小鼠的研究表明从低或高的脾 NK 细胞活性的小鼠中移植的骨髓,能够转移各自的活性而不管辐射宿主内在的能力[355],寻找骨髓的同位素锶 89,选择性切除骨髓从而影响 NK 细胞活性[356]。相似的发现在用雌二醇处理和同系 osteopetrotic 的小鼠中也报道过,雌二醇影响骨髓发育[358]。更近,NK 细胞表明从血细胞发生的干细胞中发育而来;转移小数目这些前体可在宿主体内产生供体来源的血细胞发生的谱系和 NK 细胞[359,360],重要的是,髓样前体和 NK 细胞前体表现为不同。

虽然随后的淋巴细胞谱系分离没有清楚理解,但对 *Ikaros* 基因的研究证明这个基因关键性涉及淋巴细胞谱系分化的起源,*Ikaros* 编码属于 DNA 结合蛋白的 Krüppel 家族的一锌指转录因子家族,此成员选择性表达于淋巴细胞上[361]。通过同源重组对这基因进行靶向突变导致 B、T 和 NK 细胞的完全缺乏[362]。重要的是,因为这种小鼠是发育正常的并且所有别的血细胞发生谱系表现完整,因而这强烈表明 NK 细胞来自淋巴细胞前体。

因为 NK 细胞更像 T 细胞,所以并不奇怪 NK 和 T 细胞可能来自一瞬时的共用前体细胞。然而,NK 细胞在重组酶结构突变如 SCID 靶向突变 RAG-1 或 RAG-2[32~34] 的小鼠中明显正常,NK 细胞在无胸腺裸鼠中也明显正常[294],证明 NK 细胞的发育并不需要一个功能性的胸腺。然而,在 14.5 天的胎儿胸腺中,一亚群细胞表达在 T 细胞中通常不表达的 FcγRⅢ[49]。这些 FcγRⅢ$^+$ 细胞在体内不表达 NK1.1,但在体外培养时却表达,没有证据表明这些细胞具有 TCR 基因重组和呈现对 YAC 像成人外周血 NK 细胞一样的自然杀伤。有趣的是,这些胸腺内细胞的转移导致供体起源的 T 和 NK 细胞的发育。虽然这些实验还没有用克隆的细胞种群重复。但通过体外对能来自 CD3$^-$ CD4$^-$ CD8$^-$(三重阴性,TN)胎儿胸腺细胞,当其放置于鼠胚胎胸腺器官培养物中(FIOC)[363],CD56$^+$,CD5$^-$ 亚群的人 NK 细胞的发育的分析支持这些技艺上的困难。NK 细胞从一 CD34^{bright}TN 细胞发育而来,然而仅 T 细胞在等同条件下从 CD34^{dim} 细胞发育而来。而且,相似的结果在体外分析胎儿鼠胸腺培养物中 IL-2 和 IL-15 对表达 IL-2Rβ 链的 TCR-CD3 细胞的影响时也得到[364]。如此的胸腺当转移到非淋巴胸腺叶时表现为分化成 TCR-CD3$^+$ 细胞,然而培养在含有 IL-15 的细胞悬液中时导致 TCR-CD3 NK 细胞的发育,高浓度 IL-2 或 IL-15 有利 NK 细胞的优先发育,这些研究强烈支持这一原理。NK 和 T 细胞在末端谱系分离之前立即分享一共同前体细胞。

几个另外的证据支持一个多能 T 和 NK 细胞前体阶段存在。在早期发育阶段,NK 细胞和 T 细胞在发育的胎儿肝脏中都表现为来源于血细胞发生的前体细胞。人胎儿肝脏含有与成熟 NK 细胞相似但缺乏 CD3 组分的表面表达[36]。这些细胞呈现 NK 样的杀伤格局,NK 细胞表面分子和 TCR 基因的胚系构型。然而,这些细胞与成熟 T 细胞相似,因为在它们的胞质表达 CD3γ、δ 和 ε 组分,表明一旦 TCR 基因被生产性地重排,它们可能就易于表达在细胞表面;相反,成人 NK 细胞仅表达 CD3ε,这可能是由于别的 CD3 组分的选择性缺乏[365]。相似的细胞近来在小鼠中也见报道[366]。胎儿肝脏前体可迁移到胸腺,在那儿它们仍有潜力发育成 T 细胞或 NK 细胞[49,367~369];而且,颗粒酶基因的表达在大多数不成熟(胎儿)小鼠胸腺细胞中能检测到,然而颗粒酶通常仅在成熟细胞毒性淋巴细胞中检测得到[370];最后,人 CD3ε 基因的转基因的过分表达导致 T 和 NK 发育的选择性缺乏,这与 NK/T 细胞前体中 CD3 组分的表达一致[285]。然而,CD3ε 的表达对 NK 细胞的发育并非所需,因为 NK 细胞在一 CD3ε 靶向突变的小鼠中表现正常[371],一致的结果在对过分表达 FcεRⅠγ 链的转基因研究中也得到过[286]。总之,得到的数据强烈支持 NK 和 T 细胞之间存在紧密发育关系。

黏附受体在 NK 细胞发育中的作用需要进一步的检测。然而，对骨髓嵌合小鼠的研究发现，表达 NK1.1 的供体骨髓细胞中很少发现有 Mac-1(α_M，β1 整合素)的表达，但在脾 NK 细胞中这种 Mac-1 也可见有表达[372]，在体外实验中，Mac-1$^+$ 骨髓细胞对 IL-2 有反应并产生细胞毒性 NK 细胞[373]。因而，整合素如 Mac-1 要么是发育阶段的一个标志，要么涉及 NK 细胞归巢到组织位点。

细胞因子在 NK 细胞发育中的作用也仍在研究之中。虽然 NK 细胞在体外高浓度 IL-2 时能发生增殖，但在 IL-2 或 IL-2Rα 链上的靶向突变表现为并不影响 NK 细胞的发育[67,68]。相反，在 IL-2Rβ 或 IL-2Rγ(γc)上的靶向突变同在免疫系统其他缺陷一样导致 NK 细胞的缺乏[69~71]。然而，IL-7 受体使用相似的组份，但 IL-7Rα 缺乏小鼠却有正常 NK 细胞[374]，对这些观察的解释指向 IL-15，因为在一信号受体中使用 IL-2Rβ 和 γ 链作为其组分[73,74]。事实上，鼠和人 NK 细胞可从在体外用 IL-15 培养的骨髓细胞或胎儿细胞中衍生[76,77,364]，阻止 IL-2R 信号的下游途径将同时导致 NK 细胞的缺陷。例如，Jak1 和 Jak3 是 Janus 家族涉及 IL-2 受体信号酪氨酸激酶。干预 Jak3 导致 NK 细胞的缺乏(在别的缺陷间)[375]，但在其他信号转导缺陷小鼠中 NK 细胞的发育还没有全面估价。

596

NK 细胞清楚地与别的细胞因子反应，但这些反应可能主要是效应反应而不是发育，干预细胞因子如(IL-2)或细胞因子途径(IL-2R 或 STAT4，JAK2，Tyk2)可能不会导致任何发育的 NK 细胞缺陷而是影响其效应功能。然而，近来的研究表明 IL-12 能够诱导人 NKR-P1A$^+$，CD56$^-$ 前体细胞发育成典型的 NKR-P1A$^+$ CD56$^-$ NK 细胞[376]，因而对于细胞因子在 NK 细胞发育中的作用，其具体细节需进一步的分析。

关于 NK 细胞的发育和 NK 细胞受体的表达，NKR-P1 分子在啮齿类的 NK 细胞原癌基因的分析中是有用处的。尽管抗 NK1.1(MusNKR-P1C)mAb PK136 并不染色组织切片，但 NK1.1 的表达通过流式细胞仪在胚胎胸腺假定的前体细胞中可以检测到[49]，对脾 NKR-P1 表达的研究表明从出生到几个星期的大鼠中表现出随年龄的增大而阳性细胞的百分率升高[294]，这证实了新生动物在出生时没有全面功能的 NK 细胞，如同在中枢血中对感染的临床敏感性和减低的自然杀伤表明的一样[293,295]。

就 Ly-49 分子在发育中的表达而言，它们表达在暴露于 IL-15 骨髓培养物中发育的鼠 NK 细胞上[76]。有趣的是，来源于胚胎的鼠 NK 细胞在体外发育时经常不表达任何 Ly-49 家族成员[366,377]，这与以前的观察来源于其他方法的 NK 细胞克隆也有这种表型一致[128]。在几种不同的解释中，目前普遍赞成的一假设是：不表达 Ly-49 成员的 NK 细胞可能代表能在体外很好生长的不成熟细胞。这种解释被在体内观察到的即 Ly-49 分子的表达甚至在原癌基因中都是一相对迟的成熟事件的支持[378]，其他 NK 细胞受体的研究显然在研究之中并将会产生有意思的结果，因为这些分子定义了 NK 细胞的特异性。

MHC Ⅰ类分子表现为影响 NK 细胞的发育。关于 Ly-49 的表达，有明显证据表明，在体内这些分子与其 MHC Ⅰ类配体相互作用[168,169]，在 H-2D^{d}或 H-2D^k 小鼠，Ly-49A 表达下调，但 Ly-49A$^+$ 细胞不像带有自身反应性 TCR T 细胞的负性选择，不能被剔除。体内 Ly-49 动员的一功能性后果是：表达其配体的小鼠的 Ly-49A$^+$ NK 细胞表现为在对其配体敏感性上有改变[170,379~381]。然而，目前的方法学需要通过针对 Ly-49 分子的 mAb 进行阳性选择从而分离特异性 NK 细胞，因为这种 mAb 可能阻断 Ly-49 分子和其配体的相互作用，对新鲜分离的 NK 细胞进行功能性的评价是不易的，除非这些细胞是在体外生长的；这也许影响可能在体内这种情况下不反应的 NK 细胞活性。然而，MHC 单倍体表现为影响被表达 Ly-49 分子的库[382]。

这也许存在调节每一 Ly-49 分子交替等位基因表达的排斥过程，因为一个体 NK 细胞表现为仅表达任何一给定 Ly-49 分子的等位基因[179]，然而，一随机过程并没有被排除，NK 细胞由此表达两种等位基因，因为一给定 Ly-49 分子可偶然发生，而且如此双重表达的细胞可能特难发现。针对其大部分 NK 细胞上表达 Ly-49 分子的转基因小鼠的一部分问题可得到解决。

在另一方面，在独立于 MHC Ⅰ类分子的耐受机制方面有一些证据，虽然 β_2m 缺乏骨髓受其他同系正常 NK 细胞的排斥[86,87]，但 β_2m 缺乏小鼠的 NK 细胞对 β_2m 缺乏骨髓是耐受的，并不排斥异己基因的骨髓[85]。这也许是由于 β_2m 缺乏 NK 细胞降低的活性的原因，因为它在体外针对 YAC-1 靶细胞的力量减少，相似的发现在 TAP 缺乏小鼠中也见报道[383]，对 MHC Ⅰ类分子缺陷小鼠中 NK 细胞的耐受的基础还没有全面理解但可

能与活化受体的不同相关。

最后，在评价 NK 细胞的发育需要小心谨慎，当在 NK 细胞的定义上达到共识时，这有必要依赖标志物（CD56，NK1.1），并排除 T 细胞。然而，在不成熟的 NK 细胞种群，可能在别的方式认为是 NK 细胞特异性的细胞表面标记表达上有非协调性的调节作用。而且，TCR-CD3⁻但忠实的 T 细胞前体可能容易与 NK 细胞混淆。很清楚，新分子和对 NK 细胞和其前体有忠诚性和特异性鉴别能力的血清学工具将会特别有帮助。

NK 细胞的临床关联

前面讨论的是关于肿瘤监视和 NK 细胞在免疫治疗中可能的用处，在宿主对感染的防御、骨髓移植和免疫调节中的作用。与 NK 细胞缺乏相反，有几个别的临床问题与 NK 细胞的膨胀有关。近来，特征化了一个 NK 细胞淋巴瘤[384]。在亚洲特别盛行，此肿瘤频繁存在于一不平常的位置，窦或鼻腔。作为其特征的是，此肿瘤细胞不表达表面 CD3，并有不重排的胚系 TCR 基因，但 NK 细胞的标记如 CD56 可经常见到。有趣的是，大部分这些肿瘤与居先的 EBV 感染相关，病人也可能有并发皮肤脉管炎，在一显然无关的失调中，几个病人发现有 NK 细胞的淋巴细胞溶解作用[385]。这些病人也许有暗示一自身免疫性疾病的相关的红细胞发育不全，败血症和中性粒细胞不足脉管炎。最后，免疫血栓血细胞减少紫癜病人其循环 NK 细胞数目增加[386]。因而，几个临床症状描述为提高的 NK 细胞数目，既有恶性也有非恶性的多克隆膨胀。

NK 细胞在自然免疫失调的病理发生中也起重要作用，在早期的类风湿关节炎中，浸润关节的细胞表达颗粒酶并不表达 T 细胞标志[387]，表明 NK 细胞涉及对假定病因介质的早期免疫反应或可能促进或维持 T 细胞表明涉及的自身免疫状态。报道在免疫缺陷有关的稀有包含体肌炎综合症病人中，NK 细胞浸润有条纹肌肉[388]。在小鼠自身免疫性疾病中，NK 细胞影响疾病的发展[380,390]。最后，NK 细胞包含在急性移植物与宿主疾病中，或在临床或在实验模型中[391,392]。总之，这些研究表明 NK 细胞在临床疾病中起一重要作用。对 NK 细胞的发育下一分子学定义将有助于对此作进一步的理解。

597

致谢

我感谢我们室过去的和现在的成员以及我们的实验员在剖析自然杀伤的分子基础上的一贯兴趣。我还要感谢 Mike Brown、Jon Heusel、Tony Scalzo、Hamish Smith 和 Larry Wang 对本章的评论。感谢 Mike Brown 绘制了图17.6。作者实验室的研究得到国家健康研究所（NIH）、Barnes-Jewish 医院研究基金、Monsanto-Washington 大学研究会和 Howard Hughs 医学研究所的资助。

（许桂莲 译）

参 考 文 献

1. Savary CA, Lotzova E. Phylogeny and ontogeny of NK cells. In: Lotzova E, Herberman RB, eds. *Immunobiology of Natural Killer Cells*. Vol. 1. Boca Raton, FL: CRC Press, 1986:45–60.
2. Humphreys T, Reinherz EL. Invertebrate immune recognition, natural immunity and the evolution of positive selection. *Immunol Today* 1994;15:316–320.
3. Kiessling R; Klein E, Wigzell H. Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells: Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975;5:112.
4. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 1975;16:216.
5. Herberman R. *NK Cells and Other Natural Effector Cells*. New York: Academic, 1982.
6. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989;47:187–376.
7. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr-labelled allogeneic target cells in vitro: Inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 1968;14:181.
8. Timonen T, Ortaldo J, Herberman RB. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med* 1981; 153:569.
9. Timonen T, Saksela E. Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. *J Immunol Methods* 1980;36:285.
10. Inverardi L, Witson JC, Fuad SA, Winkler-Pickett RT, Ortaldo JR, Bach FH. CD3 negative "small agranular lymphocytes" are natural killer cells. *J Immunol* 1991;146:4048–4052.
11. Shortman K, Wilson A, Scollay R, Chen WF. Development of large granular lymphocytes with anomalous, non-specific cytotoxicity in clones derived from Ly 2^+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:2728.
12. Lanier LL, Phillips JH. A map of the cell surface antigens expressed on resting and activated human natural killer cells. In: Reiherz EL, ed. *Leukocyte Typing II*. Vol. 3. New York: Springer-Verlag, 1986:165–180.
13. Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, et al. *The Leucocyte Antigen Factsbook*. London: Academic, 1993.
14. Shuskik C, Cohen IR, Schwartz RS, Lathan-Griffin E, Waksal SD. T lympho-

cytes with promiscuous cytotoxicity. *Nature* 1976;263:699.
15. Brooks CG, Holscher M, Urdal D. Natural killer activity in cloned cytotoxic T lymphocytes: Regulation by interleukin 2, interferon, and specific antigen. *J Immunol* 1985;135:1145–1152.
16. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: Molecular and cellular aspects [Review]. *Annu Rev Immunol* 1994;12:735–73.
17. Lowin B, Beermann F, Schmidt A, Tschopp J. A null mutation in the perforin gene impairs cytolytic T lymphocyte– and natural killer cell–mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11571–5.
18. Kojima H, Shinohara N, Hanaoka S, et al. Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1994;1:357–364.
19. Kagi D, Ledermann B, Burki K, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994;369:31–7.
20. Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 1994;76:977–987.
21. Shresta S, Heusel JW, Macivor DM, Wesselschmidt RL, Russell JH, Ley TJ. Granzyme B plays a critical role in cytotoxic lymphocyte-induced apoptosis [Review]. *Immunol Rev* 1995;146:211–221.
22. Henkart PA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: Two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* 1994;1:343–346.
23. Montel AH, Bochan MR, Hobbs JA, Lynch DH, Brahmi Z. Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cell Immunol* 1995;166:236–246.
24. Arase H, Arase N, Saito T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J Exp Med* 1995;181:1235–1238.
25. Lee RK, Spielman J, Zhao DY, Olsen KJ, Podack ER. Perforin, Fas ligand, and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells. *J Immunol* 1996;157:1919–1925.
26. Oshimi Y, Oda S, Honda Y, Nagata S, Miyazaki S. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol* 1996;157:2909–2915.
27. Perussia B. Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines [Review]. *Curr Opin Immunol* 1991;3:49–55.
28. Lanier LL, Phillips JH, Hackett J Jr, Tutt M, Kumar V. Natural killer cells: Definition of a cell type rather than a function [errata *J Immunol* 1987;138:996 and 1987;138:2745]. *J Immunol* 1986;137:2735–9.
29. Ritz J, Campen TJ, Schmidt RE, et al. Analysis of T-cell receptor gene rearrangement and expression in human natural killer clones. *Science* 1985;228:1540.
30. Lanier LL, Cwirla S, Federspiel N, Phillips JH. Human natural killer cells isolated from peripheral blood do not rearrange T cell receptor β chain genes. *J Exp Med* 1986;163:209.
31. Dorshkind K, Pollack SB, Bosma MJ, Phillips RA. Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid). *J Immunol* 1985;134:3798.
32. Hackett J Jr, Bosma GC, Bosma MJ, Bennett M, Kumar V. Transplantable progenitors of natural killer cells are distinct from those of T and B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:3427–3431.
33. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992;68:869–877.
34. Shinkai Y, Rathbun G, Lam K-P, et al. Rag-2–deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992;68:855–867.
35. Ashwell JD, Klausner RD. Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 1990;8:139–168.
36. Phillips JH, Hori T, Nagler A, Bhat N, Spits H, Lanier LL. Ontogeny of human natural killer (NK) cells: Fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 epsilon, delta proteins. *J Exp Med* 1992;175:1055–66.
37. Anderson P, Caligiuri M, Ritz J, Schlossman SF. CD3-negative natural killer cells express zeta TCR as part of a novel molecular complex. *Nature* 1989;341:159.
38. Lanier LL, Yu G, Phillips JH. Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* 1989;342:803–805.
39. Letourneur O, Kennedy IC, Brini AT, Ortaldo JR, O'Shea JJ, Kinet JP. Characterization of the family of dimers associated with Fc receptors (Fc epsilon RI and Fc gamma RIII). *J Immunol* 1991;147:2652–6.
40. Rolink A, ten Boekel E, Melchers F, Fearon DT, Krop I, Andersson J. A subpopulation of B220⁺ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains natural killer cell progenitors. *J Exp Med* 1996;183:187–194.
41. Hercend T, Griffin JD, Bensussan A, et al. Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone: Characterization of two natural killer associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J Clin Invest* 1985;75:932.
42. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986;136:4480.
43. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 1989;169:2233.
44. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: Structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 1987;236:799.
45. Rutishauser U, Acheson A, Hall AK, Mann DM, Sunshine J. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 1988;240:53.
46. Nitta T, Yagita H, Sato K, Okumura K. Involvement of CD56 (NKH1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer–target cell interactions. *J Exp Med* 1989;170:1757.
47. Lanier LL, Ruitenberg JJ, Phillips JH. Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J Immunol* 1988;136:3478–3485.
48. Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 1991;9:457–491.
49. Rodewald HR, Moingeon P, Lucich JL, Dosiou C, Lopez P, Reinherz EL. A population of early fetal thymocytes expressing Fc gamma RII/III contains precursors of T lymphocytes and natural killer cells. *Cell* 1992;69:139–50.
50. Hackett J Jr, Tutt M, Lipscomb M, Bennett M, Koo G, Kumar V. Origin and differentiation of natural killer cells. II. Functional and morphologic studies of purified NK-1.1⁺ cells. *J Immunol* 1986;136:3124–31.
51. Seaman WE, Sleisenger M, Eriksson E, Koo GC. Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK-1.1. Reduction in host defense against malignancy without loss of cellular or humoral immunity. *J Immunol* 1987;138:4539–4544.
52. Koo GC, Peppard JR. Establishment of monoclonal anti-Nk-1.1 antibody. *Hybridoma* 1984;3:301–303.
53. Kasai M, Iwamori M, Nagai Y, Okumura K, Tada T. A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur J Immunol* 1980;10:175–180.
54. Young WW Jr, Hakomori SI, Durdik JM, Henney CS. Identification of ganglio-N-tetraosylceramide as a new cell surface marker for murine natural killer (NK) cells. *J Immunol* 1980;124:199–201.
55. Suttles J, Schwarting GA, Stout RD. Flow cytometric analysis reveals the presence of asialo GM1 on the surface membrane of alloimmune cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986;136:1586–1591.
56. Reynolds CW, Wiltrout RH. *Functions of the Natural Immune System*. New York: Plenum, 1989.
57. Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer–resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2–activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1982;155:1823–1841.
58. Trinchieri G, Matsumoto-Kobayashi M, Clark SC, Seehra J, London L, Perussia B. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. *J Exp Med* 1984;160:1147–1169.
59. Phillips JH, Lanier LL. Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytolysis. *J Exp Med* 1986;164:814–825.
60. Ortaldo JR, Mason A, Overton R. Lymphokine-activated killer cells. Analysis of progenitors and effectors. *J Exp Med* 1986;164:1193–1205.
61. Karlhofer FM, Yokoyama WM. Stimulation of murine natural killer (NK) cells by a monoclonal antibody specific for the NK1.1 antigen. IL-2–activated NK cells possess additional specific stimulation pathways. *J Immunol* 1991;146:3662–3673.
62. Seaman WE, Niemi EC, Stark MR, Goldfien RD, Pollock AS, Imboden JB. Molecular cloning of gp42, a cell-surface molecule that is selectively induced on rat natural killer cells by interleukin 2: Glycolipid membrane anchoring and capacity for transmembrane signaling. *J Exp Med* 1991;173:251–260.
63. Umehara H, Takashima A, Minami Y, Bloom ET. Signal transduction via phosphorylated adhesion molecule, LFA-1 beta (CD18), is increased by culture of natural killer cells with IL-2 in the generation of lymphokine-activated killer cells. *Int Immunol* 1993;5:19–27.
64. Nishio M, Spielman J, Lee RK, Nelson DL, Podack ER. CD80 (B7.1) and CD54 (intracellular adhesion molecule-1) induce target cell susceptibility to promiscuous cytotoxic T cell lysis. *J Immunol* 1996;157:4347–4353.
65. Taniguchi T, Minami Y. Minireview: The IL-2/IL-2 receptor system: A current overview. *Cell* 1993;73:5–8.
66. Nakarai T, Robertson MJ, Streuli M, et al. Interleukin 2 receptor γ chain expression on resting and activated lymphoid cells. *J Exp Med* 1994;180:241–251.
67. Schorle H, Holtschke T, Hunig T, Schimpl A, Horak I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 1991;352:621–4.
68. Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 1995;3:521–530.
69. Suzuki H, Duncan GS, Takimoto H, Mak TW. Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J Exp Med* 1997;185:499–505.
70. DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:377–381.
71. Cao X, Shores EW, Hu-Li J, et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 1995;2:223–238.

72. Sugamura K, Asao H, Kondo M, et al. The interleukin-2 receptor gamma chain: Its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID [Review]. *Annu Rev Immunol* 1996;14:179–205.
73. Cosman D, Kumaki S, Ahdieh M, et al. Interleukin 15 and its receptor. *Ciba Found Symp* 1995;195:221–233.
74. Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, Waldmann TA. IL-15: A pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels [Review]. *Immunity* 1996;4:329–336.
75. Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, et al. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J* 1995;14:3654–3663.
76. Puzanov IJ, Bennett M, Kumar V. IL-15 can substitute for the marrow microenvironment in the differentiation of natural killer cells. *J Immunol* 1996;157:4282–4285.
77. Mrozek E, Anderson P, Caligiuri MA. Role of interleukin-15 in the development of human CD56⁻ natural killer cells from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996;87:2632–2640.
78. Paul WE. *Fundamental Immunology*. New York: Raven, 1984.
79. Paul WE. *Fundamental Immunology*. 3rd ed. New York: Raven, 1993.
80. Kärre K, Ljunggren H-G, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2–deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986;319:675–678.
81. Piontek GE, Taniguchi K, Ljuggren HG, et al. YAC-1 MHC class I variants reveal an association between decreased NK sensitivity and increased H-2 expression after interferon treatment or in vivo passage. *J Immunol* 1985;135:4281–4288.
82. Quillet A, Presse F, Marchiol-Fournigault C, et al. Increased resistance to non-MHC–restricted cytotoxicity related to HLA A,B expression. Direct demonstration using beta 2-microglobulin–transfected Daudi cells. *J Immunol* 1988;141:17–20.
83. Franksson L, George E, Powis S, Butcher G, Howard J, Kärre K. Tumorigenicity conferred to lymphoma mutant by major histocompatibility complex–encoded transporter gene. *J Exp Med* 1993;177:201–205.
84. Salcedo M, Momburg F, Hammerling GJ, Ljunggren HG. Resistance to natural killer cell lysis conferred by TAP1/2 genes in human antigen-processing mutant cells. *J Immunol* 1994;152:1702–1708.
85. Liao NS, Bix M, Zijlstra M, Jaenisch R, Raulet D. MHC class I deficiency: Ssusceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* 1991;253:199–202.
86. Hoglund P, Ohlen C, Carbone E, et al. Recognition of beta 2-microglobulin–negative (beta 2m⁻) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from beta 2m⁻ mice: Nonresponsiveness controlled by beta 2m⁻ bone marrow in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:10332–10336.
87. Bix M, Liao NS, Zijlstra M, Loring J, Jaenisch R, Raulet D. Rejection of class I MHC–deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature* 1991;349:329–331.
88. Yu YYL, Kumar V, Bennett M. Murine natural killer cells and marrow graft rejection. *Annu Rev Immunol* 1992;10:189–213.
89. Rembecki RM, Kumar V, David CS, Bennett M. Bone marrow cell transplants involving intra-H-2 recombinant inbred mouse strains. Evidence that hemopoietic histocompatibility-1 (Hh-1) genes are distinct from H-2D or H-2L. *J Immunol* 1988;141:2253–2260.
90. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition [Review]. *Immunol Today* 1990;11:237–244.
91. Nishimura MI, Stroynowski I, Hood L, Ostrand-Rosenberg S. H-2Kb antigen expression has no effect on natural killer susceptibility and tumorigenicity of a murine hepatoma. *J Immunol* 1988;141:4403.
92. Storkus WJ, Salter RD, Alexander J, et al. Class I–induced resistance to natural killing: Identification of nonpermissive residues in HLA-A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5989–5992.
93. Colonna M, Brooks EG, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science* 1993;260:1121–1124.
94. Litwin V, Gumperz J, Parham P, Phillips JH, Lanier LL. Specificity of HLA class I antigen recognition by human NK clones: Evidence for clonal heterogeneity, protection by self and non-self alleles, and influence of the target cell type. *J Exp Med* 1993;178:1321–36.
95. Jorgensen JL, Reay PA, Ehrici EW, Davis MM. Molecular components of T-cell recognition. *Annu Rev Immunol* 1992;10:835–873.
96. Burgert HG, Maryanski JL, Kvist S. "E3/19K" protein of adenovirus type 2 inhibits lysis of cytolytic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1356–1360.
97. Browne H, Smith G, Beck S, Minson T. A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and beta 2 microglobulin. *Nature* 1990;347:770.
98. Howcroft TK, Strebel K, Martin MA, Singer DS. Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon tat of HIV. *Science* 1993;260:1320–1322.
99. Holtkamp B, Cramer M, Rajewsky K. Somatic variation of H-2Kk expression and structure in a T-cell lymphoma: Instability, stabilization, high production and structural mutation. *EMBO J* 1983;2:1943–1951.
100. Gattoni-Celli S, Kirsch K, Timpane R, Isselbacher KJ. Beta 2-microglobulin gene is mutated in a human colon cancer cell line (HCT) deficient in the expression of HLA class I antigens on the cell surface. *Cancer Res* 1992;52:1201–1204.
101. Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F, Harris AL, Gatter KC. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer* 1996;73:148–153.
102. Kärre K. Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: A reevaluation and a hypothesis. In: Herberman RB, Callewaert DM, eds. *Mechanisms of Cytotoxicity by NK cells*. Orlando: Academic, 1985:81–103.
103. Seaman WE, Eriksson E, Dobrow R, Imboden JB. Inositol trisphosphate is generated by a rat natural killer cell tumor in response to target cells or to crosslinked monoclonal antibody OX-34: Possible signaling role for the OX-34 determinant during activation by target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:4239–4243.
104. Kaufman DS, Schoon RA, Leibson PJ. MHC class I expression on tumor targets inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity without interfering with target recognition. *J Immunol* 1993;150:1429–1436.
105. Yokoyama WM. Recognition structures on natural killer cells [Review]. *Curr Opin Immunol* 1993;5:67–73.
106. Yokoyama WM, Seaman WE. The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: The NK gene complex [Review]. *Annu Rev Immunol* 1993;11:613–635.
107. Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Miyokawa N, Bach FH. Isolation and characterization of NK cell or NK/T cell-specific cDNA clones. *J Mol Cell Immunol* 1990;4:295–304.
108. Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, Ravetch JV. FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. *Cell* 1994;76:519–529.
109. Hazenbos WLW, Gessner JE, Hofhuis FMA, et al. Impaired IgG-dependent anaphylaxis and arthus reaction in Fc-gamma-RIII (CD16) deficient mice. *Immunity* 1996;5:181–188.
110. Rabinowich H, Manciulea M, Metes D, et al. Physical and functional association of Fc mu receptor on human natural killer cells with the zeta- and Fc epsilon RI gamma-chains and with src family protein tyrosine kinases. *J Immunol* 1996;157:1485–1491.
111. Perussia B, Tutt MM, Qiu WQ, et al. Murine natural killer cells express functional Fc gamma receptor II encoded by the Fc gamma R alpha gene. *J Exp Med* 1989;170:73–86.
112. Anegon I, Cuturi MC, Trinchieri G, Perussia B. Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J Exp Med* 1988;167:452–472.
113. Cassatella MA, Anegon I, Cuturi MC, Griskey P, Trinchieri G, Perussia B. Fc gamma R(CD16) interaction with ligand induces Ca^{2+} mobilization and phosphoinositide turnover in human natural killer cells. Role of Ca^{2+} in Fc gamma R(CD16)-induced transcription and expression of lymphokine genes. *J Exp Med* 1989;169:549–567.
114. Azzoni L, Kamoun M, Salcedo TW, Kanakaraj P, Perussia B. Stimulation of Fc gamma RIIIA results in phospholipase C-gamma 1 tyrosine phosphorylation and p56lck activation. *J Exp Med* 1992;176:1745–1750.
115. Kanakaraj P, Duckworth B, Azzoni L, Kamoun M, Cantley LC, Perussia B. Phosphatidylinositol-3 kinase activation induced upon Fc gamma RIIIA-ligand interaction. *J Exp Med* 1994;179:551–558.
116. Aramburu J, Azzoni L, Rao A, Perussia B. Activation and expression of the nuclear factors of activated T cells, NFATp and NFATc, in human natural killer cells: Regulation upon CD16 ligand binding. *J Exp Med* 1995;182:801–810.
117. Wunderlich J, Shearer G. Unit 3.11. Induction and measurement of cytotoxic T lymphocyte activity. In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, eds. *Current Protocols in Immunology*. New York: Greene Publishing, 1993.
118. Vivier E, Morin P, O'Brien C, Druker B, Schlossman SF, Anderson P. Tyrosine phosphorylation of the Fc gamma RIII(CD16): Zeta complex in human natural killer cells. Induction by antibody-dependent cytotoxicity but not by natural killing. *J Immunol* 1991;146:206–210.
119. Bonnema JD, Karnitz LM, Schoon RA, Abraham RT, Leibson PJ. Fc receptor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase in natural killer cells is associated with protein kinase C–independent granule release and cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1994;180:1427–1435.
120. Chadwick BS, Miller RG. Hybrid resistance in vitro. Possible role of both class I MHC and self peptides in determining the level of target cell sensitivity. *J Immunol* 1992;148:2307–2313.
121. Leo O, Sachs DH, Samelson LE, et al. Identification of monoclonal antibodies specific for the T cell receptor complex by Fc receptor-mediated CTL lysis. *J Immunol* 1986;137:3874–3880.
122. Chambers WH, Vujanovic NL, DeLeo AB, Olszowy MW, Herberman RB, Hiserodt JC. Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-activated killer cells. *J Exp Med* 1989;169:1373–1389.
123. Bendelac A. Mouse NK1⁺ T cells [Review]. *Curr Opin Immunol* 1995;7:367–374.

124. Giorda R, Trucco M. Mouse NKR-P1. A family of genes selectively coexpressed in adherent lymphokine-activated killer cells. *J Immunol* 1991;147:1701–1708.
125. Yokoyama WM, Ryan JC, Hunter JJ, Smith HR, Stark M, Seaman WE. cDNA cloning of mouse NKR-P1 and genetic linkage with LY-49. Identification of a natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6. *J Immunol* 1991;147:3229–3236.
126. Ryan JC, Turck J, Niemi EC, Yokoyama WM, Seaman WE. Molecular cloning of the NK1.1 antigen, a member of the NKR-P1 family of natural killer cell activation molecules. *J Immunol* 1992;149:1631–1635.
127. Drickamer K. Ca^{2+}-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins. *Curr Opin Struct Biol* 1993;3:393–400.
128. Karlhofer FM, Orihuela MM, Yokoyama WM. Ly-49-independent natural killer (NK) cell specificity revealed by NK cell clones derived from p53-deficient mice. *J Exp Med* 1995;181:1785–1795.
129. Giorda R, Weisberg EP, IP TK, Trucco M. Genomic structure and strain-specific expression of the natural killer cell receptor NKR-P1. *J Immunol* 1992;149: 1957–1963.
130. Ryan JC, Niemi EC, Goldfien RD, Hiserodt JC, Seaman WE. NKR-P1, an activating molecule on rat natural killer cells, stimulates phosphoinositide turnover and a rise in intracellular calcium. *J Immunol* 1991;147:3244–3250.
131. Ryan JC, Niemi EC, Nakamura MC, Seaman WE. NKR-P1A is a target-specific receptor that activates natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* 1995;181: 1911–1915.
132. Lanier LL, Chang C, Phillips JH. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol* 1994;153:2417–2428.
133. Mathew PA, Garni-Wagner BA, Land K, et al. Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* 1993;151:5328–5337.
134. Garni-Wagner BA, Purohit A, Mathew PA, Bennett M, Kumar V. A novel function-associated molecule related to non–MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* 1993;151:60–70.
135. Baixeras E, Huard B, Miossec C, et al. Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens. *J Exp Med* 1992;176:327–337.
136. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med* 1990;171:1393–1405.
137. Miyazaki T, Dierich A, Benoist C, Mathis D. Independent modes of natural killing distinguished in mice lacking Lag3. *Science* 1996;272:405–408.
138. Frey JL, Bino T, Kantor RRS, et al. Mechanism of target cell recognition by natural killer cells: Characterization of a novel triggering molecule restricted to $CD3^-$ large granular lymphocytes. *J Exp Med* 1991;174:1527–1536.
139. Anderson SK, Gallinger S, Roder J, Frey J, Young HA, Ortaldo JR. A cyclophilin-related protein involved in the function of natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:542–546.
140. Giardina SL, Anderson SK, Sayers TJ, et al. Selective loss of NK cytotoxicity in antisense NK-TR1 rat LGL cell lines. Abrogation of antibody-independent tumor and virus-infected target cell killing. *J Immunol* 1995;154:80–87.
141. Ortaldo JR, Mason AT, Mason LH, Winklerpickett RT, Gosselin P, Anderson SK. Selective inhibition of human and mouse natural killer tumor recognition using retroviral antisense in primary natural killer cells—involvement with MHC class I killer cell inhibitory receptors. *J Immunol* 1997;158:1262–1267.
142. Siliciano RF, Pratt JC, Schmidt RE, Ritz J, Reinherz EL. Activation of cytolytic T lymphocyte and natural killer cell function through the T11 sheep erythrocyte binding protein. *Nature* 1985;317:428–430.
143. Gumley TP, McKenzie IF, Sandrin MS. Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules [Review]. *Immunol Cell Biol* 1995;73:277–296.
144. Biassoni R, Cantoni C, Falco M, et al. The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J Exp Med* 1996;183:645–650.
145. Bottino C, Sivori S, Vitale M, et al. A novel surface molecule homologous to the p58/p50 family of receptors is selectively expressed on a subset of human natural killer cells and induces both triggering of cell functions and proliferation. *Eur J Immunol* 1996;26:1816–1824.
146. Mandelboim O, Davis DM, Reyburn HT, et al. Enhancement of class II–restricted T cell responses by costimulatory NK receptors for class I MHC proteins. *Science* 1996;274:2097–2100.
147. Smith HRC, Karlhofer FM, Yokoyama WM. The Ly-49 multigene family expressed by IL-2–activated natural killer cells. *J Immunol* 1994;153: 1068–1079.
148. Mason LH, Anderson SK, Yokoyama WM, Smith HRC, Winklerpickett R, Ortaldo JR. The Ly-49D receptor activates murine natural killer cells. *J Exp Med* 1996;184:2119–2128.
149. Vaage JT, Naper C, Lovik G, et al. Control of rat natural killer cell-mediated allorecognition by a major histocompatibility complex region encoding nonclassical class I antigens. *J Exp Med* 1994;180:641–651.
150. Melero I, Balboa MA, Alonso JL, et al. Signaling through the LFA-1 leucocyte integrin actively regulates intercellular adhesion and tumor necrosis factor-alpha production in natural killer cells. *Eur J Immunol* 1993;23:1859–1865.
151. Bell GM, Dethloff GM, Imboden JB. CD45-negative mutants of a rat natural killer cell line fail to lyse tumor target cells. *J Immunol* 1993;151:3646–3653.
152. Liu JH, Wei S, Blanchard DK, Djeu JY. Restoration of lytic function in a human natural killer cell line by gene transfection. *Cell Immunol* 1994;156:24–35.
153. Helander TS, Carpen O, Turunen O, Kovanen PE, Vaheri A, Timonen T. ICAM-2 redistributed by ezrin as a target for killer cells. *Nature* 1996;382:265–268.
154. Nandi D, Gross JA, Allison JP. CD28-mediated costimulation is necessary for optimal proliferation of murine NK cells. *J Immunol* 1994;152:3361–3369.
155. Galandrini R, De Maria R, Piccoli M, Frati L, Santoni A. CD44 triggering enhances human NK cell cytotoxic functions. *J Immunol* 1994;153:4399–4407.
156. Wu TC, Huang AY, Jaffee EM, Levitsky HI, Pardoll DM. A reassessment of the role of B7-1 expression in tumor rejection. *J Exp Med* 1995;182:1415–1421.
157. Yeh KY, Pulaski BA, Woods ML, et al. B7-1 enhances natural killer cell-mediated cytotoxicity and inhibits tumor growth of a poorly immunogenic murine carcinoma. *Cell Immunol* 1995;165:217–224.
158. Chambers BJ, Salcedo M, Ljunggren HG. Triggering of natural killer cells by the costimulatory molecule CD80 (B7-1). *Immunity* 1996;5:311–317.
159. Lanier LL, Corliss B, Phillips JH. Arousal and inhibition of human NK cells [Review]. *Immunol Rev* 1997;155:145–154.
160. Yokoyama WM. Natural killer cells. Right-side-up and up-side-down NK-cell receptors [Review]. *Curr Biol* 1995;5:982–985.
161. Yokoyama WM, Daniels BF, Seaman WE, Hunziker R, Margulies DH, Smith HR. A family of murine NK cell receptors specific for target cell MHC class I molecules [Review]. *Semin Immunol* 1995;7:89–101.
162. Wong S, Freeman JD, Kelleher C, Mager D, Takei F. Ly-49 multigene family. New members of a superfamily of type II membrane proteins with lectin-like domains. *J Immunol* 1991;147:1417.
163. Karlhofer FM, Ribaudo RK, Yokoyama WM. MHC class I alloantigen specificity of $Ly\text{-}49^+$ IL-2–activated natural killer cells. *Nature* 1992;358:66–70.
164. Karlhofer FM, Ribaudo RK, Yokoyama WM. The interaction of Ly-49 with H-2Dd globally inactivates natural killer cell cytolytic activity. *Trans Assoc Am Physicians* 1992;105:72–85.
165. Correa I, Corral L, Raulet DH. Multiple natural killer cell–activating signals are inhibited by major histocompatibility complex class I expression in target cells. *Eur J Immunol* 1994;24:1323–1331.
166. Daniels BF, Karlhofer FM, Seaman WE, Yokoyama WM. A natural killer cell receptor specific for a major histocompatibility complex class I molecule. *J Exp Med* 1994;180:687–692.
167. Kane KP. Ly-49 mediates EL4 lymphoma adhesion to isolated class I major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med* 1994;179:1011–1015.
168. Karlhofer FM, Hunziker R, Reichlin A, Margulies DH, Yokoyama WM. Host MHC class I molecules modulate in vivo expression of a NK cell receptor. *J Immunol* 1994;153:2407–2416.
169. Sykes M, Harty MW, Karlhofer FM, Pearson DA, Szot G, Yokoyama W. Hematopoietic cells and radioresistant host elements influence natural killer cell differentiation. *J Exp Med* 1993;178:223–229.
170. Olsson MY, Kärre K, Sentman CL. Altered phenotype and function of natural killer cells expressing the major histocompatibility complex receptor Ly-49 in mice transgenic for its ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1649–1653.
171. Held W, Cado D, Raulet DH. Transgenic expression of the Ly49A natural killer cell receptor confers class I major histocompatibility complex (MHC)-specific inhibition and prevents bone marrow allograft rejection. *J Exp Med* 1996;184:2037–2041.
172. Nakamura MC, Niemi EC, Fisher MJ, Shultz LD, Seaman WE, Ryan JC. Mouse Ly-49A interrupts early signaling events in natural killer cell cytotoxicity and functionally associates with the Shp-1 tyrosine phosphatase. *J Exp Med* 1997;185:673–684.
173. Brennan J, Mahon G, Mager DL, Jefferies WA, Takei F. Recognition of class I major histocompatibility complex molecules by Ly-49: Specificities and domain interactions. *J Exp Med* 1996;183:1553–1559.
174. Correa I, Raulet DH. Binding of diverse peptides to MHC class I molecules inhibits target cell lysis by activated natural killer cells. *Immunity* 1995;2:61–71.
175. Corr M, Boyd LF, Padlan EA, Margulies DH. H-2Dd exploits a four residue peptide binding motif. *J Exp Med* 1993;178:1877–1892.
176. Orihuela M, Margulies DH, Yokoyama WM. The NK cell receptor Ly-49A recognizes a peptide-induced conformational determinant on its MHC class I ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11792–11797.
177. Brennan J, Mager D, Jefferies W, Takei F. Expression of different members of the Ly-49 gene family defines distinct natural killer cell subsets and cell adhesion properties. *J Exp Med* 1994;180:2287–2295.
178. Yokoyama WM, Kehn PJ, Cohen DI, Shevach EM. Chromosomal location of the Ly-49 (A1, YE1/48) multigene family. Genetic association with the NK 1.1 antigen. *J Immunol* 1990;145:2353–2358.
179. Held W, Roland J, Raulet DH. Allelic exclusion of Ly49-family genes encoding class I MHC-specific receptors on NK cells. *Nature* 1995;376:355–358.
180. Sundback J, Kärre K, Sentman CL. Cloning of minimally divergent allelic forms of the natural killer (NK) receptor LY-49C, differentially controlled by host genes in the MHC and NK gene complexes. *J Immunol* 1996;157:3936–3942.
181. Silver ET, Elliott JF, Kane KP. Alternatively *spliced LY-49D and H transcripts are* found in IL-2-activated NK cells. *Immunol Today* 1996;44:14–17.

182. Sentman CL, Hackett J Jr, Kumar V, Bennett M. Identification of a subset of murine natural killer cells that mediates rejection of Hh-1d but not Hh-1b bone marrow grafts. *J Exp Med* 1989;170:191–202.
183. Yu YY, George T, Dorfman JR, Roland J, Kumar V, Bennett M. The role of Ly49A and 5E6(Ly49C) molecules in hybrid resistance mediated by murine natural killer cells against normal T cell blasts. *Immunity* 1996;4:67–76.
184. Brennan J, Lemieux S, Freeman JD, Mager DL, Takei F. Heterogeneity among LY-49c natural killer (NK) cells—characterization of highly related receptors with differing functions and expression patterns. *J Exp Med* 1996;184:2085–2090.
185. Mason L, Giardina SL, Hecht T, Ortaldo J, Mathieson BJ. LGL-1: A non-polymorphic antigen expressed on a major population of mouse natural killer cells. *J Immunol* 1988;140:4403–4412.
186. Mason LH, Yagita H, Ortaldo JR. LGL-1: A potential triggering molecule on murine NK cells. *J Leukoc Biol* 1994;55:362–370.
187. Mason LH, Ortaldo JR, Young HA, Kumar V, Bennett M, Anderson SK. Cloning and functional characteristics of murine large granular lymphocyte-1: A member of the Ly-49 gene family (Ly-49G2). *J Exp Med* 1995;182:293–303.
188. Daniels BF, Nakamura MC, Rosen SD, Yokoyama WM, Seaman WE. Ly-49A, a receptor for H-2Dd, has a functional carbohydrate recognition domain. *Immunity* 1994;1:785–792.
189. Brennan J, Takei F, Wong S, Mager DL. Carbohydrate recognition by a natural killer cell receptor, Ly-49C. *J Biol Chem* 1995;270:9691–9694.
190. Barber LD, Patel TP, Percival L, et al. Unusual uniformity of the N-linked oligosaccharides of HLA-A, -B, and -C glycoproteins. *J Immunol* 1996;156: 3275–3284.
191. Vercelli D, Helm B, Marsh P, Padlan E, Geha RS, Gould H. The B-cell binding site on human immunoglobulin E. *Nature* 1989;338:649–651.
192. Aubry JP, Pochon S, Graber P, Jansen KU, Bonnefoy JY. CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature* 1992;358:505–507.
193. Dissen E, Ryan JC, Seaman WE, Fossum S. An autosomal dominant locus, Nka, mapping to the Ly-49 region of a rat natural killer (NK) gene complex, controls NK cell lysis of allogeneic lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183:2197–2207.
194. Moretta A, Biassoni R, Bottino C, et al. Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes [Review]. *Immunol Rev* 1997;155:105–117.
195. Colonna M, Borsellino G, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:12000–12004.
196. Colonna M. Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors [Review]. *Immunol Rev* 1997;155:127–133.
197. Ciccone E, Pende D, Viale O, et al. Involvement of HLA class I alleles in natural killer (NK) cell-specific functions: Expression of HLA-Cw3 confers selective protection from lysis by alloreactive NK clones displaying a defined specificity (specificity 2). *J Exp Med* 1992;176:963.
198. Moretta A, Vitale M, Bottino C, et al. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 1993;178:597–604.
199. Litwin V, Gumperz J, Parham P, Phillips JH, Lanier LL. NKB1: A natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med* 1994;180:537–543.
200. Gumperz JE, Litwin V, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med* 1995;181:1133–1144.
201. Pende D, Biassoni R, Cantoni C, et al. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: A novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med* 1996;184:505–518.
202. Dohring C, Scheidegger D, Samaridis J, Cella M, Colonna M. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A. *J Immunol* 1996;156:3098–3101.
203. Long EO, Colonna M, Lanier LL. Inhibitory MHC class I receptors on NK and T cells: A standard nomenclature [Letter]. *Immunol Today* 1996;17:100.
204. Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, et al. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* 1995;2:439–449.
205. Colonna M, Samaridis J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 1995;268:367–368.
206. D'Andrea A, Chang C, Franz-Bacon K, McClanahan T, Phillips JH, Lanier LL. Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *J Immunol* 1995;155:2306–2310.
207. Long EO, Burshtyn DN, Clark WP, et al. Killer cell inhibitory receptors—diversity, specificity, and function [Review]. *Immunol Rev* 1997;155:135–144.
208. Salter RD, Chan HW, Tadikamalla R, Lawlor DA. Domain organization and sequence relationship of killer cell inhibitory receptors [Review]. *Immunol Rev* 1997;155:175–182.
209. Selvakumar A, Steffens U, Dupont B. Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors [Review]. *Immunol Rev* 1997;155: 183–196.
210. Valiante NM, Lienert K, Shilling HG, Smits BJ, Parham P. Killer cell receptors—keeping pace with MHC class I evolution [Review]. *Immunol Rev* 1997; 155:155–164.
211. Renard V, Cambiaggi A, Vely F, et al. Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells—a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes [Review]. *Immunol Rev* 1997;155:205–221.
212. Wagtmann N, Rajagopalan S, Winter CC, Peruzzi M, Long EO. Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer. *Immunity* 1995;3:801–809.
213. Dohring C, Colonna M. Human natural killer cell inhibitory receptors bind to HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 1996;26:365–369.
214. Fan QOR, Garboczi DN, Winter CC, Wagtmann N, Long EO, Wiley DC. Direct binding of a soluble natural killer cell inhibitory receptor to a soluble human leukocyte antigen-Cw4 class I major histocompatibility complex molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7178–7183.
215. Cella M, Longo A, Ferrara GB, Strominger JL, Colonna M. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med* 1994;180:1235–1242.
216. Luque I, Solana R, Galiani MD, et al. Threonine 80 on HLA-B27 confers protection against lysis by a group of natural killer clones. *Eur J Immunol* 1996; 26:1974–1977.
217. Mandelboim O, Reyburn HT, Valesgomez M, et al. Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med* 1996;184:913–922.
218. Mandelboim O, Reyburn HT, Sheu EG, et al. The binding site of NK receptors on HLA-C molecules. *Immunity* 1997;6:341–350.
219. Malnati MS, Peruzzi M, Parker KC, et al. Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science* 1995;267:1016–1018.
220. Peruzzi M, Wagtmann N, Long EO. A p70 killer cell inhibitory receptor specific for several HLA-B allotypes discriminates among peptides bound to HLA-B-asterisk-2705. *J Exp Med* 1996;184:1585–1590.
221. Moretta A, Sivori S, Vitale M, et al. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* 1995;182:875–884.
222. Gumperz JE, Valiante NM, Parham P, Lanier LL, Tyan D. Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibililty complex haplotype. *J Exp Med* 1996;183:1817–1827.
223. Gumperz JE, Parham P. The enigma of the natural killer cell [Review]. *Nature* 1995;378:245–248.
224. Wang LL, Mehta IK, Leblanc PA, Yokoyama WM. Cutting edge: Mouse natural killer cells express GP49b1, a structural homologue of human killer inhibitory receptors. *J Immunol* 1997;158:13–17.
225. Rojo S, Burshtyn DN, Long EO, Wagtmann N. Type I transmembrane receptor with inhibitory function in mouse mast cells and NK cells. *J Immunol* 1997; 158:9–12.
226. Arm JP, Gurish MF, Reynolds DS, et al. Molecular cloning of gp49, a cell-surface antigen that is preferentially expressed by mouse mast cell progenitors and is a new member of the immunoglobulin superfamily. *J Biol Chem* 1991;266: 15966–15973.
227. Castells MC, Wu X, Arm JP, Austen KF, Katz HR. Cloning of the gp49B gene of the immunoglobulin superfamily and demonstration that one of its two products is an early-expressed mast cell surface protein originally described as gp49. *J Biol Chem* 1994;269:8393–8401.
228. Katz HR, Vivier E, Castells MC, McCormick MJ, Chambers JM, Austen KF. Mouse mast cell gp49B1 contains two immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs and suppresses mast cell activation when coligated with the high-affinity Fc receptor for IgE. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10809–10814.
229. Moretta A, Vitale M, Sivori S, et al. Human natural killer cell receptors for HLA-class I molecules. Evidence that the Kp43 (CD94) molecule functions as receptor for HLA-B alleles. *J Exp Med* 1994;180:545–555.
230. Aramburu J, Balboa MA, Izquierdo M, Lopez-Botet M. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and gamma/delta TCR+ T lymphocytes. II. Modulation of natural killer cytotoxicity by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J Immunol* 1991;147:714–721.
231. Brumbaugh KM, Perezvillar JJ, Dick CJ, Schoon RA, Lopezbotet M, Leibson PJ. Clonotypic differences in signaling from CD94 (KP43) on NK cells lead to divergent cellular responses. *J Immunol* 1996;157:2804–2812.
232. Chang C, Rodriguez A, Carretero M, Lopez-Botet M, Phillips JH, Lanier LL. Molecular characterization of human CD94: A type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. *Eur J Immunol* 1995;25:2433–2437.
233. Phillips JH, Chang CW, Mattson J, Gumperz JE, Parham P, Lanier LL. CD94 and a novel associated protein (94ap) form a NK cell receptor involved in the recognition of HLA-A, HLA-B, and HLA-C allotypes. *Immunity* 1996;5:163–172.
234. Perez-Villar JJ, Carretero M, Navarro F, et al. Biochemical and serologic evidence for the existence of functionally distinct forms of the CD94 NK cell receptor. *J Immunol* 1996;157:5367–5374.
235. Lazetic S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked het-

erodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 1996;157:4741–4745.

236. Carretero M, Cantoni C, Bellon T, et al. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 1997;27:563–567.
237. Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 1991;173:1017–1020.
238. Duchler M, Offterdinger M, Holzmuller H, et al. NKG2-C is a receptor on human natural killer cells that recognizes structures on K562 target cells. *Eur J Immunol* 1995;25:2923–2931.
239. Sivori S, Vitale M, Bottino C, et al. CD94 functions as a natural killer cell inhibitory receptor for different HLA class I alleles—identification of the inhibitory form of CD94 by the use of novel monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1996;26:2487–2492.
240. Lopez-Botet M, Perezvillar JJ, Carretero M, et al. Structure and function of the CD94 C-type lectin receptor complex involved in recognition of HLA class I molecules [Review]. *Immunol Rev* 1997;155:165–174.
241. Yokoyama WM, Jacobs LB, Kanagawa O, Shevach EM, Cohen DI. A murine T lymphocyte antigen belongs to a supergene family of type II integral membrane proteins. *J Immunol* 1989;143:1379–1386.
242. Janeway CA Jr. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 1992;10:645–674.
243. Phillips JH, Gumperz JE, Parham P, Lanier LL. Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes. *Science* 1995;268:403–405.
244. Kaufman DS, Schoon RA, Robertson MJ, Leibson PJ. Inhibition of selective signaling events in natural killer cells recognizing major histocompatibility complex class I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6484–6488.
245. D'Ambrosio D, Hippen KL, Minskoff SA, et al. Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by FcγRIIB1. *Science* 1995;268:293–297.
246. Campbell MA, Klinman NR. Phosphotyrosine-dependent association between CD22 and protein tyrosine phosphatase 1C. *Eur J Immunol* 1995;25:1573–1579.
247. Burshtyn DN, Scharenberg AM, Wagtmann N, et al. Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity* 1996;4:77–85.
248. Campbell KS, Dessing M, Lopez-Botet M, Cella M, Colonna M. Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* 1996;184:93–100.
249. Fry AM, Lanier LL, Weiss A. Phosphotyrosines in the killer cell inhibitory receptor motif of NKB1 are required for negative signaling and for association with protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* 1996;184:295–300.
250. Olcese L, Lang P, Vely F, et al. Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 1996;156: 4531–4534.
251. Ono M, Bolland S, Tempst P, Ravetch JV. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature* 1996;383:263–266.
252. Binstadt BA, Brumbaugh KM, Dick CJ, et al. Sequential involvement of LCK and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. *Immunity* 1996;5:629–638.
253. Valiante NM, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. Killer cell inhibitory receptor recognition of human leukocyte antigen (HLA) class I blocks formation of a PP36/PLC-gamma signaling complex in human natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 1996;184:2243–2250.
254. Galandrini R, Palmieri G, Piccoli M, Frati L, Santoni A. CD16-mediated p21ras activation is associated with Shc and p36 tyrosine phosphorylation and their binding with Grb2 in human natural killer cells. *J Exp Med* 1996;183:179–186.
255. Sentman CL, Hackett J Jr, Moore TA, Tutt MM, Bennett M, Kumar V. Pan natural killer cell monoclonal antibodies and their relationship to the NK1.1 antigen. *Hybridoma* 1989;8:605–614.
256. Scalzo AA, Lyons PA, Fitzgerald NA, Forbes CA, Yokoyama WM, Shellam GR. Genetic mapping of Cmv1 in the region of mouse chromosome 6 encoding the NK gene complex-associated loci Ly49 and musNKR-P1. *Genomics* 1995; 27:435–441.
257. Forbes CA, Brown MG, Cho R, Shellam GR, Yokoyama WM, Scalzo AA. The Cmv1 host resistance locus is closely linked to the Ly49 multigene family within the natural killer cell gene complex (NKC) on mouse chromosome 6. *Genomics* 1997;41:406–413.
258. Lopez-Cabrera M, Santis AG, Fernandez-Ruiz E, et al. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med* 1993;178:537–547.
259. Yabe T, McSherry C, Bach FH, et al. A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins. *Immunogenetics* 1993;37:455–460.
260. Plougastel B, Jones T, Trowsdale J. Genomic structure, chromosome location, and alternative splicing of the human NKG2A gene. *Immunogenetics* 1996;44: 286–291.
261. Ziegler SF, Levin SD, Johnson L, et al. The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to the NK gene complex. *J Immunol* 1994;152:1228–1236.
262. Hara T, Jung LKL, Bjorndahl JM, Fu SM. Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-teradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. *J Exp Med* 1986;164:1988–2005.
263. Yokoyama WM, Koning F, Kehn PJ, et al. Characterization of a cell surface-expressed disulfide-linked dimer involved in murine T cell activation. *J Immunol* 1988;141:369–376.
264. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells [Review]. *Immunol Today* 1994;15:479–483.
265. Hamann J, Fiebig H, Strauss M. Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain. *J Immunol* 1993;150:4920–4927.
266. Ziegler SF, Ramsdell F, Hjerrild KA, et al. Molecular characterization of the early activation antigen CD69: A type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. *Eur J Immunol* 1993;23: 1643–1648.
267. Hamann J, Montgomery KT, Lau S, Kucherlapati R, van Lier RAW. AICL: A new activation-induced antigen encoded by the human NK gene complex. *Immunogenetics* 1997;45:295–300.
268. Depatie C, Muise E, Lepage P, Gros P, Vidal SM. High-resolution linkage map in the proximity of the host resistance locus CMV1. *Genomics* 1997;39: 154–163.
269. Brown MG, Fulmek S, Matsumoto K, et al. A 2 megabase YAC contig and physical map of the natural killer gene complex on mouse chromosome 6. *Genomics* 1997;42:16–25.
270. Brown MG, Scalzo AA, Matsumoto K, Yokoyama WM. The natural killer gene complex—a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity [Review]. *Immunol Rev* 1997;155:53–65.
271. York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex [Review]. *Annu Rev Immunol* 1996;14:369–396.
272. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Simmons A, La Vista AB, Shellam GR. Cmv-1, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J Exp Med* 1990;171:1469–1483.
273. Shanley JD. In vivo administration of monoclonal antibody to the NK 1.1 antigen of natural killer cells: Effect on acute murine cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 1990;30:58–60.
274. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Wallace CR, et al. The effect of the Cmv-1 resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J Immunol* 1992;149:581–589.
275. Tay CH, Welsh RM. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J Virol* 1997;71: 267–275.
276. Beck S, Barrell BG. Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* 1988;331:269–272.
277. Rawlinson WD, Farrell HE, Barrell BG. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol* 1996;70:8833–8849.
278. Delano ML, Brownstein DG. Innate resistance to lethal mousepox is genetically linked to the NK gene complex on chromosome 6 and correlates with early restriction of virus replication by cells with an NK phenotype. *J Virol* 1995;69: 5875–5877.
279. Rolstad B, Vaage JT, Naper C, et al. Positive and negative MHC class I recognition by rat NK cells [Review]. *Immunol Rev* 1997;155:91–104.
280. Idris AH, Scalzo AA, Yokoyama WM. A genetic locus controlling tumor killing maps to the NKC [Abstract]. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99(suppl):256.
281. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985;313:1485–92.
282. Herberman RB, Gorelik E. Role of the natural immune system in control of primary tumors and metastasis. In: Reynolds CW, Wiltrout RH, eds. *Functions of the Natural Immune System*. New York: Plenum, 1989:3–37.
283. van den Broek MF, Kagi D, Zinkernagel RM, Hengartner H. Perforin dependence of natural killer cell–mediated tumor control in vivo. *Eur J Immunol* 1995;25:3514–3516.
284. Scalzo AA, Lyons PA, Fitzgerald NA, Forbes CA, Shellam GR. Establishment of the BALB.B6-Cmv-1r strain: A mouse strain congenic for the Cmv-1 resistance gene and the natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6. *Immunogenetics* 1995;41:148–151.
285. Wang B, Biron C, She J, et al. A block in both early T lymphocyte and natural killer cell development in transgenic mice with high-copy numbers of the human CD3E gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9402–9406.
286. Flamand V, Shores EW, Tran T, et al. Delayed maturation of $CD4^-$ $CD8^-$ Fc gamma RII/III^+ T and natural killer cell precursors in Fc epsilon RI gamma transgenic mice. *J Exp Med* 1996;184:1725–1735.
287. Barbosa MD, Nguyen QA, Tchernev VT, et al. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature* 1996;382:262–265.
288. Kingsmore SF, Barbosa MD, Tchernev VT, et al. Positional cloning of the Chediak-Higashi syndrome gene: Genetic mapping of the beige locus on mouse chromosome 13. *J Invest Med* 1996;44:454–461.
289. Perou CM, Moore KJ, Nagle DL, et al. Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nat Genet* 1996;13:303–308.
290. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent

without natural killer cells. *N Engl J Med* 1989;320:1731–1735.
291. Ballas ZK, Turner JM, Turner DA, Goetzman EA, Kemp JD. A patient with simultaneous absence of "classical" natural killer cells (CD3⁻, CD16⁺ and NKH1⁺) and expansion of CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻, NKH1⁺ subset. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:453–459.
292. Jawahar S, Moody C, Chan M, Finberg R, Geha R, Chatila T. Natural Killer (NK) cell deficiency associated with an epitope-deficient Fc receptor type IIIA (CD16-II). *Clin Exp Immunol* 1996;103:408–413.
293. Seki H, Ueno Y, Taga K, Matsuda A, Miyawaki T, Taniguchi N. Mode of in vitro augmentation of natural killer cell activity by recombinant human interleukin 2: A comparative study of Leu-11⁺ and Leu-11⁻ cell populations in cord blood and adult peripheral blood. *J Immunol* 1985;135:2351–2356.
294. Cook JL, Ikle DN, Routes BA. Natural killer cell ontogeny in the athymic rat. Relationship between functional maturation and acquired resistance to E1A oncogene-expressing sarcoma cells. *J Immunol* 1995;155:5512–5518.
295. Greenough A. The TORCH screen and intrauterine infections [Review]. *Arch Dis Child* 1994;70:F163–165.
296. Rook AH, Masur H, Lane HC, et al. Interleukin-2 enhances the depressed natural killer and cytomegalovirus-specific cytotoxic activities of lymphocytes from patients with the acquired immune deficiency syndrome. *J Clin Invest* 1983;72: 398–403.
297. Lusso P, Malnati MS, Garzino-Demo A, Crowley RW, Long EO, Gallo RC. Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature* 1993;362: 458–462.
298. Welsh RM, Tay CH, Varga SM, Odonnell CL, Vergilis KL, Selin LK. Lymphocyte-dependent natural immunity to virus infections mediated by both natural killer cells and memory T cells. *Semin Virol* 1996;7:95–102.
299. Bancroft GJ. The role of natural killer cells in innate resistance to infection [Review]. *Curr Opin Immunol* 1993;5:503–510.
300. Bukowski JF, Woda BA, Welsh RM. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J Virol* 1984;52:119–128.
301. Biron CA, Turgiss LR, Welsh RM. Increase in NK cell number and turnover rate during acute viral infection. *J Immunol* 1983;131:1539–1545.
302. Natuk RJ, Welsh RM. Accumulation and chemotaxis of natural killer/large granular lymphocytes at sites of virus replication. *J Immunol* 1987;138:877–883.
303. Denkers EY, Gazzinelli RT, Martin D, Sher A. Emergence of NK1.1⁺ cells as effectors of IFN-gamma dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I–deficient mice. *J Exp Med* 1993;178:1465–1472.
304. Locksley RM. Interleukin 12 in host defense against microbial pathogens [Comment]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:5879–5880.
305. Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 1989;46:111.
306. Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. *Immunol Today* 1993;14:335–338.
307. Scharton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania* major in mice. *J Exp Med* 1993;178:567–577.
308. Trinchieri G. Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity [Review]. *Annu Rev Immunol* 1995;13:251–276.
309. Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3725–3729.
310. Tripp CS, Gately MK, Hakimi J, Ling P, Unanue ER. Neutralization of IL-12 decreases resistance to Listeria in SCID and C.B-17 mice. Reversal by IFN-gamma. *J Immunol* 1994;152:1883–1887.
311. Orange JS, Wang B, Terhorst C, Biron CA. Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J Exp Med* 1995;182:1045–1056.
312. Orange JS, Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN-alphabeta, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 1996;156:4746–4756.
313. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12Rbeta2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997;185:817–824.
314. Michael A, Hackett JJ, Bennett M, Kumar V, Yuan D. Regulation of B lymphocytes by natural killer cells. Role of IFN-g. *J Immunol* 1989;142:1095–1101.
315. Snapper CM, Yamaguchi H, Moorman MA, Mond JJ. An in vitro model for T cell-independent induction of humoral immunity. A requirement for NK cells. *J Immunol* 1994;152:4884–4892.
316. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990;76:2421.
317. Peters PM, Ortaldo JR, Shalaby MR, et al. Natural killer-sensitive targets stimulate production of TNF-α but not TNF-β (lymphotoxin) by highly purified human peripheral blood large granular lymphocytes. *J Immunol* 1986;137:2592.
318. Paya CV, Kenmotsu N, Schoon RA, Leibson PJ. Tumor necrosis factor and lymphotoxin secretion by human natural killer cells leads to antiviral cytotoxicity. *J Immunol* 1988;141:1989.
319. Cuturi MC, Anegon I, Sherman F, et al. Production of hematopoietic colony stimulating factors by human natural killer cells. *J Exp Med* 1989; 169:569.
320. Pistoia V, Zupo S, Corcione A, et al. Production of colony-stimulating activity by human natural killer cells: Analysis of the conditions that influence the release and detection of colony stimulating activity. *Blood* 1989;74:156.
321. Vitolo D, Vujanovic NL, Rabinowich H, Schlesinger M, Herberman RB, Whiteside TL. Rapid IL-2-induced adherence of human natural killer cells. Expression of mRNA for cytokines and IL-2 receptors in adherent NK cells. *J Immunol* 1993;151:1926–1937.
322. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 1995;268:863–865.
323. Bendelac A. Positive selection of mouse NK1⁺ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med* 1995;182:2091–2096.
324. Yoshimoto T, Bendelac A, Hu-Li J, Paul WE. Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4⁺, NK1.1⁺ T cells that promptly produce interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11931–11934.
325. Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE. Role of NK1.1⁺ T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science* 1995;270: 1845–1847.
326. Bordignon C, Daley JP, Nakamura I. Hematopoietic histoincompatibility reactions by NK cells in vitro: Model for genetic resistance to marrow grafts. *Science* 1985;230:1398–1401.
327. Murphy WJ, Kumar V, Bennett M. Rejection of bone marrow allografts by mice with severe combined immune deficiency (SCID). Evidence that natural killer cells can mediate the specificity of marrow graft rejection. *J Exp Med* 1987;165: 1212–1217.
328. Sentman CL, Kumar V, Koo G, Bennett M. Effector cell expression of NK1.1, a murine natural killer cell–specific molecule, and ability of mice to reject bone marrow allografts. *J Immunol* 1989;142:1847–1853.
329. Öhlén C, Kling G, Hoglund P, et al. Prevention of allogeneic bone marrow graft rejection by H-2 transgene in donor mice. *Science* 1989;246:666–668.
330. Milisauskas VK, Nakamura I. The ability of H-2Dd molecule to affect natural resistance to hemopoietic allografts is an intrinsic property shared by Ddm1 but not Ld. *Eur J Immunol* 1994;24:336–342.
331. Yokoyama WM. Commentary. Hybrid resistance and the Ly-49 family of natural killer cell receptors. *J Exp Med* 1995;182:273–277.
332. Zheng WP, Kiura K, Milisauskas VK, Denardin E, Nakamura I. Murine NK cell allospecificity-1 is defined by inhibitory ligands. *J Immunol* 1996;156:4651–4655.
333. Bellone G, Valiante NM, Viale O, Ciccone E, Moretta L, Trinchieri G. Regulation of hematopoiesis in vitro by alloreactive natural killer cell clones. *J Exp Med* 1993;177:1117–1125.
334. Graubert TA, Russell JH, Ley TJ. The role of granzyme B in murine models of acute graft-versus-host disease and graft rejection. *Blood* 1996;87:1232–1237.
335. Shresta S, MacIvor DM, Heusel JW, Russell JH, Ley TJ. Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92: 5679–5683.
336. Baker M, Podack ER, Levy RB. Fas and perforin cytotoxic pathways are not the major effector mechanisms in allogeneic resistance to bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 1995;770:368–369.
337. Iizuka K, Kaneko H, Yamada T, Kimura H, Kokai Y, Fujimoto J. Host F1 mice pretreated with granulocyte colony-stimulating factor accept parental bone marrow grafts in hybrid resistance system. *Blood* 1997;89:1446–1451.
338. Yokoyama WM. Commentary. The mother-child union: The case of missing-self and protection of the fetus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5998–6000.
339. Croy BA. Granulated metrial gland cells: Hypotheses concerning possible functions during murine gestation [Review]. *J Reprod Immunol* 1994;27:85–94.
340. Schmidt CM, Orr HT. Maternal/fetal interactions: The role of the MHC class I molecule HLA-G [Review]. *Crit Rev Immunol* 1993;13:207–224.
341. Sipes SL, Medaglia MV, Stabley DL, et al. A new major histocompatibility complex class I b gene expressed in the mouse blastocyst and placenta. *Immunogenetics* 1996;45:108–120.
342. Shawar SM, Vyas JM, Rodgers JR, Rich RR. Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules [Review]. *Annu Rev Immunol* 1994;12:839–880.
343. Diehl M, Munz C, Keilholz W, et al. Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters. *Curr Biol* 1996;6:305–314.
344. Schust DJ, Hill AB, Ploegh HL. Herpes simplex virus blocks intracellular transport of HLA-G in placentally derived human cells. *J Immunol* 1996;157: 3375–3380.
345. Pazmany L, Mandelboim O, Valesgomez M, Davis DM, Reyburn HT, Strominger JL. Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. *Science* 1996;274:792–795.
346. Munz C, Holmes N, King A, et al. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells. *J Exp Med* 1997;185:385–391.
347. Söderstrom K, Corliss B, Lanier LL, Phillips JH. CD94/NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in recognition of HLA-G by decidual and peripheral blood NK cells. *J Immunol* 1997;159:1072–1075.
348. Rouas-Freiss N, Marchal RE, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED. The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: Is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory recep-

tors? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5249–5254.

349. Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R. Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8⁻ cytolytic T cells. *Nature* 1990;344: 742–746.
350. Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploegh HL, Tonegawa S. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8⁺ T cells. *Cell* 1992;71:1205–1214.
351. Lee N, Malacko AR, Ishitani A, et al. The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity* 1995;3:591–600.
352. Ishitani A, Geraghty DE. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3947–3951.
353. Spits H, Lanier LL, Phillips JH. Development of human T and natural killer cells [Review]. *Blood* 1995;85:2654–2670.
354. Moore TA, Bennett M, Kumar V. Murine natural killer cell differentiation—past, present, and future. *Immunol Res* 1996;15:151–162.
355. Haller O, Kiessling R, Orn A, Wigzell H. Generation of natural killer cells: An autonomous function of the bone marrow. *J Exp Med* 1977;145:1411–1416.
356. Haller O, Wigzell H. Suppression of natural killer cell activity with radioactive strontium: Effector cells are marrow dependent. *J Immunol* 1977;118:1503–1506.
357. Kumar V, Ben-Ezra J, Bennett M, Sonnenfeld G. Natural killer cells in mice treated with 89strontium: Normal target-binding cell numbers but inability to kill even after interferon administration. *J Immunol* 1979;123:1832–1838.
358. Seaman WE, Gindhart TD, Greenspan JS, Blackman MA, Talal N. Natural killer cells, bone, and the bone marrow: Studies in estrogen-treated mice and in congenitally osteopetrotic (mi/mi) mice. *J Immunol* 1979;122:2541–2547.
359. Hackett J Jr, Bennett M, Kumar V. Origin and differentiation of natural killer cells. I. Characteristics of a transplantable NK cell precursor. *J Immunol* 1985; 134:3731–3738.
360. Moore T, Bennett M, Kumar V. Transplantable NK cell progenitors in murine bone marrow. *J Immunol* 1995;154:1653–1663.
361. Molnar A, Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1994;14:8292–8303.
362. Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, et al. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 1994;79:143–156.
363. Sanchez MJ, Muench MO, Roncarolo MG, Lanier LL, Phillips JH. Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med* 1994;180:569–576.
364. Leclercq G, Debacker V, de Smedt M, Plum J. Differential effects of interleukin-15 and interleukin-2 on differentiation of bipotential T/natural killer progenitor cells. *J Exp Med* 1996;184:325–336.
365. Lanier LL, Chang C, Spits H, Phillips JH. Expression of cytoplasmic CD3 epsilon proteins in activated human adult natural killer (NK) cells and CD3 gamma, delta, epsilon complexes in fetal NK cells. Implications for the relationship of NK and T lymphocytes. *J Immunol* 1992;149:1876–1880.
366. Manoussaka M, Georgiou A, Rossiter B, et al. Phenotypic and functional characterization of long-lived NK cell lines of different maturational status obtained from mouse fetal liver. *J Immunol* 1997;158:112–119.
367. Skinner M, Le Gros G, Marbrook J, Watson JD. Development of fetal thymocytes in organ cultures. Effect of interleukin 2. *J Exp Med* 1987;165:1481–1493.
368. Skinner M, Marbrook J. Effect of interleukin 2 on fetal thymocytes in organ cultures: Generation of lymphokine-activated killer cells. *Cell Immunol* 1988;112: 104–111.
369. Plum J, Koning F, Leclercq G, Tison B, De Smedt M. Expansion of large granular lymphocytes in IL-2–driven 14-day-old fetal thymocytes in organ culture. *J Immunol* 1990;144:3710–3717.
370. Ebnet K, Levelt CN, Tran TT, Eichmann K, Simon MM. Transcription of granzyme A and B genes is differentially regulated during lymphoid ontogeny. *J Exp Med* 1995;181:755–763.
371. Renard V, Ardouin L, Malissen M, et al. Normal development and function of natural killer cells in CD3 epsilon delta 5/delta 5 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7545–7549.
372. Miller SC. The development of natural killer (NK) cells from Thy-1loLin-Sca-1⁺ stem cells: Acquisition by NK cells in vivo of the homing receptor MEL-14 and the integrin Mac-1. *Immunobiology* 1994;190:385–398.
373. Migliorati G, Moraca R, Nicoletti I, Riccardi C. IL-2–dependent generation of natural killer cells from bone marrow: Role of MAC-1⁻, NK1-1⁻ precursors. *Cell Immunol* 1992;141:323–331.
374. He YW, Malek TR. Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J Exp Med* 1996;184: 289–293.
375. Park SY, Saijo K, Takahashi T, et al. Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* 1995;3:771–782.
376. Bennett IM, Zatsepina O, Zamai L, Azzoni L, Mikheeva T, Perussia B. Definition of a natural killer NKR-PLA(+)/CD56(-)/CD16(-) functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12. *J Exp Med* 1996;184:1845–1856.
377. Brooks CG, Georgiou A, Jordan RK. The majority of immature fetal thymocytes can be induced to proliferate to IL-2 and differentiate into cells indistinguishable from mature natural killer cells. *J Immunol* 1993;151:6645–6656.
378. Dorfman JR, Raulet DH. Developmental expression of Ly49 receptors on murine natural killer cells [Abstract]. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99(suppl):256.
379. Sentman CL, Olsson MY, Kärre K. Missing self recognition by natural killer cells in MHC class I transgenic mice. A "receptor calibration" model for how effector cells adapt to self [Review]. *Semin Immunol* 1995;7:109–119.
380. Hoglund P, Sundback J, Olssonalheim MY, et al. Host MHC class I gene control of NK-cell specificity in the mouse [Review]. *Immunol Rev* 1997;155:11–28.
381. Dorfman JR, Raulet DH. Major histocompatibility complex genes determine natural killer cell tolerance. *Eur J Immunol* 1996;26:151–155.
382. Held W, Dorfman JR, Wu MF, Raulet DH. Major histocompatibility complex class I dependent skewing of the natural killer cell LY49 receptor repertoire. *Eur J Immunol* 1996;26:2286–2292.
383. Ljunggren HG, Van Kaer L, Ploegh HL, Tonegawa S. Altered natural killer cell repertoire in Tap-1 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6520–6524.
384. Jaffe ES, Chan JK, Su IJ, et al. Report of the Workshop on Nasal and Related Extranodal Angiocentric T/Natural Killer Cell Lymphomas. Definitions, differential diagnosis, and epidemiology. *Am J Surg Pathol* 1996;20:103–111.
385. Tefferi A, Li CY, Witzig TE, Dhodapkar MV, Okuno SH, Phyliky RL. Chronic natural killer cell lymphocytosis: A descriptive clinical study. *Blood* 1994;84: 2721–2725.
386. Garcia-Suarez J, Prieto A, Reyes E, et al. Persistent lymphocytosis of natural killer cells in autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP) patients after splenectomy. *Br J Haematol* 1995;89:653–655.
387. Tak PP, Kummer JA, Hack CE, et al. Granzyme-positive cytotoxic cells are specifically increased in early rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1735–1743.
388. Dalakas MC, Illa I. Common variable immunodeficiency and inclusion body myositis: A distinct myopathy mediated by natural killer cells. *Ann Neurol* 1995;37:806–810.
389. Takeda K, Dennert G. The development of autoimmunity in C57BL/6 lpr mice correlates with the disappearance of natural killer type 1-positive cells: Evidence for their suppressive action on bone marrow stem cell proliferation, B cell immunoglobulin secretion, and autoimmune symptoms. *J Exp Med* 1993;177: 155–164.
390. Harada M, Lin T, Kurosawa S, et al. Natural killer cells inhibit the development of autoantibody production in (C57BL/6 x DBA/2) F1 hybrid mice injected with DBA/2 spleen cells. *Cell Immunol* 1995;161:42–49.
391. Acevedo A, Aramburu J, Lopez J, Fernandez-Herrera J, Fernandez-Ranada JM, Lopez-Botet M. Identification of natural killer (NK) cells in lesions of human cutaneous graft-versus-host disease: Expression of a novel NK-associated surface antigen (Kp43) in mononuclear infiltrates. *J Invest Dermatol* 1991;97:659–666.
392. Muluk SC, Hakim FT, Shearer GM. Murine cytomegalovirus infection can enhance hybrid resistance through modulation of host natural killer activity. *J Immunol* 1990;145:1113–1119.

第 18 章　脊椎动物免疫系统的起源和进化

Du Pasquier, Martin Flajnik[1]

605

所有活的生物，从其生长发育的起始就处在各种各样病原体的包围之中，然而，它们分别通过不同的免疫机制使它们的个性特征得以延续。令众多生物进化学家和免疫学家非常感兴趣的是：所表现出的这些各式各样的免疫现象，其识别机制是否具有一些相同之处呢？这些识别机制进化上是否有一定的关联呢？可以肯定的一点是：脊椎动物免疫系统的组分并不普遍存在于所有生物，但是在其他众多门类的生物中追溯它们起源应是可能的。要达到同样的有效防护的目的，各种生物可能会采取不同的机制，但是应该有一定的相同之处。而且，当现有的机制不能保证一种生物的生存时，大自然似乎会寻求另一种更为有效的防护机制。原则上讲，一种简单有效的免疫系统应当是：能够同时识别异己，而排异反应受自我识别的限制，当自我信号缺失时，防御反应被活化；或是有一系列受体，分别识别异己，一类受体偶联有防御反应机制，另一类受体则缺失这种偶联。实际上，脊椎动物免疫系统同时采用了这两种机制，而且甚至针对异己信号所发生的不同反应中，一些分子也是相同的，或属于同一家族的成员。在进化的过程中，这两种系统可能并不总是同时存在的，通过比较性研究可以明确它们之间的关系。

在下文中，适应性免疫系统的特征以黑体表示。

在个体发育成长的过程中，一种适应性的免疫系统积蓄了大量的**淋巴细胞**。这些淋巴细胞都带有能在相互接触中识别异己的特异表面受体。如果所带的受体能识别一种表位，这种细胞就增生分化(**克隆选择**)。一些受体能接受**细胞因子**或体内其他免疫相关产物的刺激，经**信号传导**，这些增殖分化的细胞就具有了**效应功能**(杀伤功能或分泌抗体)。

抗原特异性受体、**免疫球蛋白**(**immunoglobulin, Ig**)和 T **细胞受体**(T cell receptor, TCR)，都是含有 Ig 结构域的多肽链二聚体。经体细胞**基因重组**，这些分子就获得了能与特异表位结合的 V 区，从而决定了分子识别抗原的特异性。对细胞表面的这种受体特异性的**筛选**机制很复杂：主要是通过抗原肽与**主要组织相容性复合体**(MHC Ⅰ 或 MHC Ⅱ)分子共呈递的方式来进行。原则上，只保留了那些在外周免疫系统不与自身发生反应的细胞。受刺激后，免疫系统活化，发生以**特异性**和**记忆功能**为特征的免疫应答。适应性的免疫系统针

---

① L. Du Pasquier: Basel Institute for Immunology, CH-4005 Basel, Swizerland. M. Flajnk: Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland, Baltimore, Maryland 21201-1559.

对抗原的应答的整个过程其实就是在个体发育和免疫应答期间体细胞进化的一个实例;与生物个体一样,免疫细胞也遵循同样的突变和适者生存的选择规律。脊椎动物的免疫系统有时也会发生自身免疫的现象,可能是由于受体的体细胞重排障碍,对这种现象发生机制的研究将有助于阐明特异的适应性的免疫系统的起源。

对生物进行跨种属和门类比较,不仅可以提示免疫系统发生发展的历史,而且,通过区分哪些是保守的,哪些是发展变化而来的,将使人们对人类免疫系统中哪些是基本的,哪些是附属的有更多的认识和了解。

免疫系统组分的起源

概述

606

要进行免疫系统进化的研究,我们却只能选择众多物种中的代表性个体的免疫系统并比较其异同。不幸的是,今天所能研究的这些物种,仅仅是漫漫历史长河中出现的众多物种中的少数幸存者。许多物种在地球上存现的平均周期约为一两百万年。与过去相比,高等后生动物种类少多了。这就好像是说,在进化早期的某一阶段,许多门类差异显著的生物群体迅速形成,其中有许多生物群体因不能适应环境而遭淘[1]。如果说进化是一个“先大量试验生产,继而依照指标选用的过程”[2]的话,免疫系统的发展亦是如此。

生命有机体必须一方面防御外来入侵与破坏,另一方面与同类竞争生存资源。与同种来源的细胞发生融合并受其影响的现象仍可见于许多海洋后生动物(如多孔动物、腔肠动物、被囊动物等),但实际上在脊椎动物,这种现象已不复可见。古老的多态性识别机制可能已演变为脊椎动物体内的一种现象,并从而进化成免疫系统的细胞间相互作用。

巨噬细胞、白细胞和淋巴细胞的起源

造血细胞来源于中胚层。从众多物种中找出具有最原始明确中胚层的生物应是可能的(图 18.1),并可将其看作是免疫系统进化的起始点。在具有三个胚层结构的后生动物中,中胚层是由外胚层相关的胚胎细胞发育而来的[3]。果蝇体内与造血相关的一个 GATA 因子的发现(在脊椎动物是 GATA1、2、3),预示与造血相关的某些分子机制的确为后口动物和原口动物所共有[4]。

巨噬细胞功能原始,其功能机制理当被从原生动物到哺乳动物骨髓来源的细胞所共有。通过采用伪足包绕微生物的方式介导的吞噬作用,为除阿米巴等原生动物之外,从无脊椎动物的血细胞到脊椎动物的巨噬细胞所共有的一种机制[5]。不断循环的哺乳动物体内的单核细胞和无脊椎动物体内的血细胞都参与体内的免疫反应。一些情况下,可检出来自不同生物巨噬细胞表面所表达分子的保守性。其中,清除剂受体(scavenger receptor,SR)家族参与细胞表面对非己配体的识别[6]。细胞间质中一氧化氮(NO)也参与多种哺乳动物的生理机制,诸如血管舒张和吞噬杀伤等,这一点在具有三个胚层结构的生物中也是一致的[7]。在果蝇巨噬细胞表面人们还分离出一个具有诱导凋亡作用的受体。它是一个 CD36 家族的成员,参与巨噬细胞清除其他凋亡的细胞的过程。因此,“巨噬细胞的最原始的功能可能是参与组织塑性,后来才演变为参与宿主防护。”[8]

在环节动物和吻腔动物中参与细胞介导的移植免疫的淋巴细胞样细胞,最初出现于体腔,据认为是原始 T 细胞。在这些生物中,对培养的细胞以刀豆蛋白 A(ConA)、植物血凝素(PHA)和细菌脂多糖(LPS)刺激,并不能诱生明显的细胞系[9~12]。棘皮动物和尾索动物的淋巴细胞样细胞参与移植排斥和自然杀伤;而且,尾索动物中的这类细胞显得能受 PHA 刺激[13,14]。

至今,在无脊椎动物中尚未发现表达含有 V 区的免疫球蛋白超家族(IgSF)分子的白细胞,因为只有这样的分子才可以看作 Ig 或 TCR 分子的祖先。amalgam[15]是惟一一个表达受中胚层控制,类似于 fasciclin 和 lachesin 等分子,但是它仅表达于神经系统的细胞[16]。像 twchin 等 IgSF 分子也可在同样是来源于中胚层的肌细胞表面检出。对不同细胞系,研究验证它们在进化过程中是否因为发生启动子序列的突变,以至出现淋巴细胞特化基因,而这些基因本来是表达在其他组织类型的细胞上的,将是很有意义的一项工作。

C': 补体
C_1,C_2,V: 免疫球蛋白结构域类型
DIg: 参与防御反应的免疫球蛋白超家族成员
E: 中胚层来源的效应细胞
H: 遗传控制下的组织不相容性反应
IL: 白介素同源蛋白或类似物
M: 移植排斥的特异记忆现象
MHC Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ 主要组织相容性复合体Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型
NK: 自然杀伤细胞活性
Reg: 淋巴细胞信号传导途径的保守性

H E C2 V DIg Reg
单肢亚门（昆虫纲）

H E M MHC Ⅲ C'
无颌类
（七鳃鳗，黏盲鳗）

H E M C2 C1 V MHC Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ C' Reg IL DIg
有颌（鲨鱼 → 人）

E H
甲壳纲
（蟹）

有螯亚门
（蜘蛛）

脊椎动物亚门
（鱼→哺乳动物）

H E MHC Ⅲ
尾索动物亚门
（被囊动物）

头索动物亚门
（两栖类）

脊索动物门

H E M C' IL
棘皮动物门（海星）

H E C2 V DIg
软体动物门
（蜗牛）

H E NK
双带动物门
（蚯蚓）

裂体体腔动物

肠体腔动物门

E NK
星虫动物门
（星虫）

须腕动物门
（须虫）

半索动物门
（柱虫）

毛颚动物门
（箭虫）

C2
线形动物门
（圆虫）

扁形动物门
（扁虫）

H E M
纽形动物门
（带虫）

假体腔动物

无体腔动物

真体腔动物门

栉水母动物门
（栉水母）

二胚层动物
（外胚层）
内中胚层

三胚层动物
（外胚层
中胚层
内胚层）

H
腔肠动物门
（珊瑚 冠水母日）

真后生动物

后生动物

H C2
海绵动物门
（海绵）

侧生动物

中生动物

扁盘动物

原生动物（门）

直游虫

单胚层动物

图18·1 动物免疫系统中的成分

所有生物门类的多态性识别机制趋同吗?

本节主要讨论无脊椎动物中参与移植排斥,免疫特异记忆和发挥免疫效应功能的细胞类型。这里假定移植排斥反应中的特异性记忆的反映是带有识别特异非己抗原受体的细胞特异性增生。但是,这样的研究所得的结果却没能提示明确的答案。(图 18.1,表 18.1)。尽管在多个门类的生物中都可遇到同种识别现象,但是特异性免疫记忆在体外却难以检测。这样,克隆选择机制可能并不是普遍存在的识别异己的基本机制。

表 18.1 所有生物组织相容性反应的特异记忆现象

门纲	宿主种类	同源还是异源移植	排斥反应时间(天)			评价	参考文献
			首次	再发 (3RD SET 又发)	结合		
1.海绵动物门	*Callyspongia*	同源移植	7~11	3.8~7.2	4.6~6.8	特异记忆	17
	Hymeniacidon	同源移植	5.2~11.1	7~9.8	5.4~12.25	无记忆	20
	Ephudatia	同源移植				无记忆	19
2.腔肠动物门	*Montipora*	同源移植	19.2-25.3	116.-14.4	18.4-28.5	特异记忆	27
	Eunicella	同源移植				体外杀伤检测无记忆特性	30
	Anthopleura	同源移植				无记忆	28
3.纽形动物门	*Lineus*	异源移植	14~16	6.8~9.8	12.3~18	特异记忆	36
4.环节动物门	*Lumbricus*	异源移植	7~60(17.8)	4~32(15.7)	5~81(43)	特异记忆*	51,52
	Eisenia	异源移植	66.30±20.4	67.0±22.6	ND	无特异记忆*	47~50
5.节肢动物门	*Periplaneta*	同源移植	7	3.5	7	特异记忆(外皮下移植)	42
	Periplaneta	同源移植				无特异记忆(外皮移植)	39,40
6.棘皮动物门	*Cucumaria*	同源移植	165	43	ND	可疑记忆?	
	Dermasterias	同源移植	213	44	44>n>300	特异记忆	54
	Lytechinus	同源移植	38	12	12	无特异性记忆	55
7.被囊动物门	*Styela*	同源移植	38.2±5.9	22±2.6	30	特异记忆	14
	Botryllus	同源移植	32~95	9~62	ND	无记忆	67
8.脊椎动物门	*Agnatha* 无颌类 (*Eptatretus*)	同源移植	71.9	28	19~28	特异记忆	547
	Gnathostomata 有颌类(*Xenopus*)	同源移植	30.9±5.1	18.6±1.9	35±7.8	特异记忆	476

* 这两种情况下,二期移植在初期移植后 5 天进行,结果相互冲突,同源移植亦是如此。

海绵动物门

细胞表面多态性机制决定,即使是同种海绵,也不能形成单一克隆[1,2]。

在海绵动物中,至少存在两种不同的同种排斥机制:屏障形成和细胞毒性反应[17,18]。两种机制均未发现存在记忆现象[19]。细胞毒性反应表现为移植组织表面布满原始细胞,而屏障形成则与厚角细胞介导的排斥作用相关[17,20,21]。

在丛体细芽海绵(*Microciona prolifera*)中,迅速而特异的识别现象很可能类似于 NK 细胞遇到异物时的表现。丛体细芽海绵中的这种种属特异细胞黏附现象是由称作凝集因子的多分子复合体介导的。化学方法去糖基后显示其中一个成分占蛋白总量的 90%。这个组分(35kDa)的序列与钠钙泵蛋白有一定同源性。海绵细胞黏附可能基于多个小的糖基蛋白亚单位的结合作用[22]。在弥漫美丽海绵(*Callyspongia diffusa*)中,在不同个体来源的细胞混合时,可以发生凝集现象,外源细胞被一种称作灰细胞的杀伤细胞杀死。解释结果时,作者倾向于认为海绵免疫细胞发育过程中存在一种阳性选择的机制以保证自我识别[23]。还有人称在海绵(*Geodia*)的一个酪氨酸激酶受体的 IgC2 区,存在多态性。将这种多态性和移植排斥反应联系起来考虑将是很有意义的[24]。

腔肠动物门

对水螅纲生物(4 种)和珊瑚虫纲(至少 70 种)的研究表明,这些生物都有识别异己和发挥杀伤机制的功能[25~27]。效应机制包括精细识别的接触抑制、屏障形成和刺丝囊介导的囊化。尚未发现明确的记忆现象(表 18.1)[27~30]。在蔷薇珊瑚(*Montipora verrucosa*)中发现的记忆现象在珊瑚(*Eunicella*)不明显。海葵在受重复移植刺激后,刺丝囊生成小囊的速度加快,但没发现特异的记忆现象。 608

在小螅纲(*Hydractinia*)中,同种识别受一个具有多态性的基因控制,共存在六个等位基因来决定着再次反应时反应强度的强弱[31,32]。通过对生物进行种系追溯研究,发现似乎一个单体型差异就可引起可见的排斥反应[33]。依据生殖根增生的程度不同,建立了不同种系间的阶梯状显著性差异[34]。现已分离出在发育过程中能自我降解的突变株。这种自我降解是由于识别受体的突变还是由于识别表位的突变呢? 作者还是较倾向于这种机制是发生在生殖细胞阶段而不是在体细胞阶段,从而决定是否发生耐受现象[35]。

纽形动物门

这些三胚层结构的生物(图 18.1)现在被认为是体腔动物(原体腔)。纽虫(*Lineus*)对同种移植不发生排斥,有时甚至对异种移植也不发生排斥(*Lineus ruber*-*Lineus viridis*)。排斥一旦发生,则表现为特异识别,伴随记忆和特殊化细胞的聚集(表 18.1)[36,37]。免疫全能性细胞来自靠近咽部的肠段。在将 *Lineus sanguinuts* 的肠段和 *Lineus lacteus* 的前段移植连接构建而成的生物嵌合体上,再移植上 *Lineus ruber* 的前颈段。这种情况下的免疫排斥与 *Lineus ruber*-*Lineus sanguineus* 移植结合型的排斥现象一致。如将 *Lineus lacteus* 的肠段保留,排斥现象则雷同于 *Lineus ruber*-*Lineus lacteus* 移植结合型[38]。去除肠段的免疫细胞生成部位,就会导致免疫排斥功能的丧失[38]。

节肢动物门

昆虫中的同源识别机制并不普遍存在,有时甚至连异种排斥都没有[39]。美洲大蠊(*Periplaneta americana*)一般不排斥从东方蠊(*Blatta orientails*)来的移植物。然而,如果先以不相容的蟑螂属(*Blaberus craniifer*)组织进行移植刺激,它们将能排斥本来应当是相容的东方蠊源的组织[39]。也就是说,改变它的识别阈值后,宿主免疫系统能把一些本可接受的组织当作异物加以识别,继而活化[40]。然而,有报道称,对于美洲大蠊,同种成员之间也存在不相容性[41]。带有特异记忆特征的迅速应答(7 天)的研究发现[42],支持在节肢动物门中存在着对非己的特异识别。

软体动物门

受操作困难方面的影响,移植实验得出的结果难以总结。软体动物门似乎缺乏同种排斥(对瓣鳃目和头足纲的研究详见综述[43,44]),而在腹足纲(*Planorbarius corneus*)中却发现对无论是异种还是同种移植物(神经节、触手)都有的囊化现象[45]。直到近来,在椎实螺属中一个含五个 C2 样结构域,作为一个 MDM(软体动物防御分子)[46],参与抗寄生反应的 IgSF 型分子的发现,才使人们能认识无脊椎动物之间,以及无脊椎动物和脊椎动物之间的关系。光滑双脐螺的参与抗寄生反应的一些分子也与 IgSF 有一定的相似性。血纤蛋白原相关蛋白(*FREP*),作用类似凝集素,可以降解寄生虫源蛋白。这两个分子的 N 端都含 IgV 区的结构域相似的一个结构域与。 609

环节动物门和星虫动物门

在这些生物,对产生组织不相容性的原因有两种看法:究竟是免疫现象呢还是因为移植后血管和神经的生长不良[48~50]? 当对来自不同地域的生物进行体壁移植可发生由来自中胚层胚脏壁的细胞体腔细胞介导的免疫排斥[51]。因为同种反应一般较弱,人们重点研究的是异种移植(表 18.1)[48,52,53]。然而,和脊椎动物相似,决定异种排斥的机制和决定同种排斥的机制可能并不相同。移植物受到来自中胚层的巨噬细胞或杀伤性白细胞的攻击。这些能黏附并明显破坏移植物,直径为 10~30μm 的大细胞,以前曾被叫做巨噬细胞、中性粒细胞或颗粒状线型细胞。这些细胞富含溶酶体和磷酸酶。同时还观察到小细胞增生现象[9,10]。

当昆虫的白细胞与外源的或同源的红细胞混合,4～6个小时内就有40%以上的靶细胞溶破[11]。白细胞是通过合成多肽链,介导受体和表位之间结合,从而发挥这种类似于NK细胞的随机杀伤活性的[11]。这些效应细胞近似于脊椎动物体内的小淋巴细胞。现认为这种杀伤机制较为原始,可能是免疫监视机制的雏形。

棘皮动物门

因棘皮动物免疫系统与脊椎动物免疫系统具相关性人们对其很感兴趣。有三种棘皮动物都能排斥外源移植物:海参、海星和海胆(表18.1)[13]。对海星(*Dermasterias imbricata*)的研究提供了关于免疫记忆最有说服力的证据(表18.1)[54]。并不是所有棘皮动物都发现有免疫记忆现象的明确证据支持。海胆(*Lytechinus pictus*)对异物发生排斥反应发生的速度与这二者的亲缘关系远近有关,但不受是初次反应还是再次反应的影响[55]。海星(*Dermasterias*)的效应细胞和体腔细胞的体外生长均不受PHA或美洲商陆影响,但却明显能受LPS和Con A刺激生长[13]。从海胆体腔液里分离出的巨噬细胞在体外同样能杀伤同种细胞[56]。

尾索动物亚门

在尾索动物初生菊海鞘(*Botryllus prinigenus*)或史氏菊海鞘(*B. schlosseri*)(区域性被囊动物)中,组织相容性反应受融合基因座(fu/HC)的控制,而且机制复杂[57,58]。通过克隆融合,这种本来被认为是相容的单倍体细胞的确能发生细胞反应,尽管比较微弱[59]。单倍体个体间普遍缺乏反应可能是和阈值或基因剂量效应相关。不同个体细胞间容受现象的差别在于fu/HC一个等位基因的多态性,并受其他基因座的影响[58,60～62]。杂合子个体生物能容受纯合子个体的组织。融合与否和是否容受都依赖于不同的识别步骤:先识别自己[63],再识别非己[63]。有趣的是,同一家族生物的融合模式可以帮助人们预期两者间能否受精[57]。一个AB型(A,B分别代表组织相容性基因座上的等位基因)个体的卵子不能被A型或B型的精子受精。这被看作是在精子和卵子表面可能存在着识别分子的证据。

Buss称这种组织相容性在进化中经受选择来限制精子的受精能力[64]。的确,无论在自然界中还是人工饲养的史氏菊海鞘,都曾检出体细胞或生殖细胞的嵌合现象。与预期相一致[57,65],发生嵌合的两种生物的受精率高于不能检出嵌合体的两种生物,支持融合基因座的多态性可能限制生殖细胞嵌合体的形成的想法。

柄海鞘属带有一些特异记忆的特征[14]。从柄海鞘(*Styela clava*)来源的血细胞在体外通过细胞接触能介导同种细胞毒性反应[66]。在菊海鞘属中没发现这种记忆现象[67]。

结论

在多数动物中,大部分同种识别基础上的识别与杀伤机制还没被阐明。对这许多生物的,特别是某些寄生海鞘类生物,同种识别机制的研究发现,实情要比预期的复杂得多,尚待深入研究。从同种识别的研究来看,除发现有同种多态性识别外,没发现明显的功能相似性。同时,还不能明确地说这些无脊椎动物模型中任何一个与脊椎动物的同种识别是否统一。

防御反应信号传递途径的保守性

昆虫和甲壳纲动物至少通过三种主要途径(细胞的、黑化的和体液的途径)来抵抗微小有机体的入侵[68～72],其中一些在基因表达调控上与脊椎动物有相同性。

昆虫细胞免疫途径

昆虫的血细胞来自中胚层,具有囊化和吞噬外源颗粒的能力[73]。果蝇幼虫中,那些细胞分为两个亚群可在所谓的淋巴腺内找到。其中5%～10%参与超氧歧化途径(黑化途径)。其他大量的细胞则发挥吞噬作用或分泌抗菌多肽。在渗入外源颗粒后,这些细胞就分化成大的扁平细胞(叶细胞)可以囊化外来物。给大蚕蛾(*Hyalophora cecropia*)注射细菌后,它就能分泌一个IgSF家族成员hemolin到血淋巴中去。hemolin是首先和细菌表面结合的分子之一。可能参与形成引发免疫应答有关的蛋白复合体[74]。hemolin刺激巨噬细胞活性,因此其活性可以被LPS加强。hemolin还影响血细胞蛋白的酪氨酸磷酸化。这表明它可以通过包括PKC

活化和酪氨酸磷酸化等机制在内的途径来调节免疫应答[75]。

昆虫体液免疫系统

在昆虫受细菌或真菌感染后,可以很快的分泌许多带有种特异性的抗菌肽[76,77]。我们只探讨这些抗菌肽的形成分泌机制与脊椎动物一些蛋白的形成分泌机制是否相同。在部分抗菌肽基因的5′端区,转录因子的结合位点与哺乳动物的相同。在蚕蛾抗菌肽基因的5′端区已检出了一个IL-6作用区和两个可能的LPS作用区[78]。蚕蛾拥有至少三种可被细菌诱导的、能结合5′端非转录区的不同核蛋白,表明这些蛋白质可能参与抗菌肽的表达。

果蝇受病原体(细菌或真菌)刺激后,可以活化蛋白酶水解一种前体蛋白,生成Spätzle。Spätzle是受体Toll的胞外配体。Toll的胞内部分与哺乳动物IL-1受体的胞质区同源。NF-κB也参与此信号传导途径[79](图18.2)。人类中,已经检出一个与Toll同源的蛋白质,能通过NF-κB途径活化炎症因子的表达[80]。κB基序为果蝇和其他双翅目生物活化抗菌基因所必需[81,82]。果蝇抗菌肽基因的启动子也含有与κB基序相作用的GATA位点。同样的情况也发生在哺乳动物免疫相关基因中,如IL-6和IL-3[83]。哺乳动物中这些基序被转录因子NF-κB识别,属于Rel家族,含两个成员。果蝇的Rel家族成员Dorsal与胚胎发育中腹背轴形成有关[84],在免疫应答过程中也会表达[79]。

已检出一个抗菌肽生成相关基因的突变型:*imd*。在突变体中,以κB基序进行检查,检测不出任何DNA-蛋白杂合体,证实了NF-κB途径的重要性。然而,突变体中仍可发现另一种抗真菌肽drosomysin的基因。因此,体液免疫应答的调控至少存在着两种途径(图18.2)。特定病原体如何影响这两种途径尚待研究[79]。

与NF-κB核内定位抑制作用相关的胞质中的IκB等效物的作用机制也非常保守。在哺乳动物,IL-1通过与淋巴细胞的IL-1受体结合,致使IκB与NF-κB解离[85];在果蝇腹背化形成过程中,Spätzle与受体Toll结

611

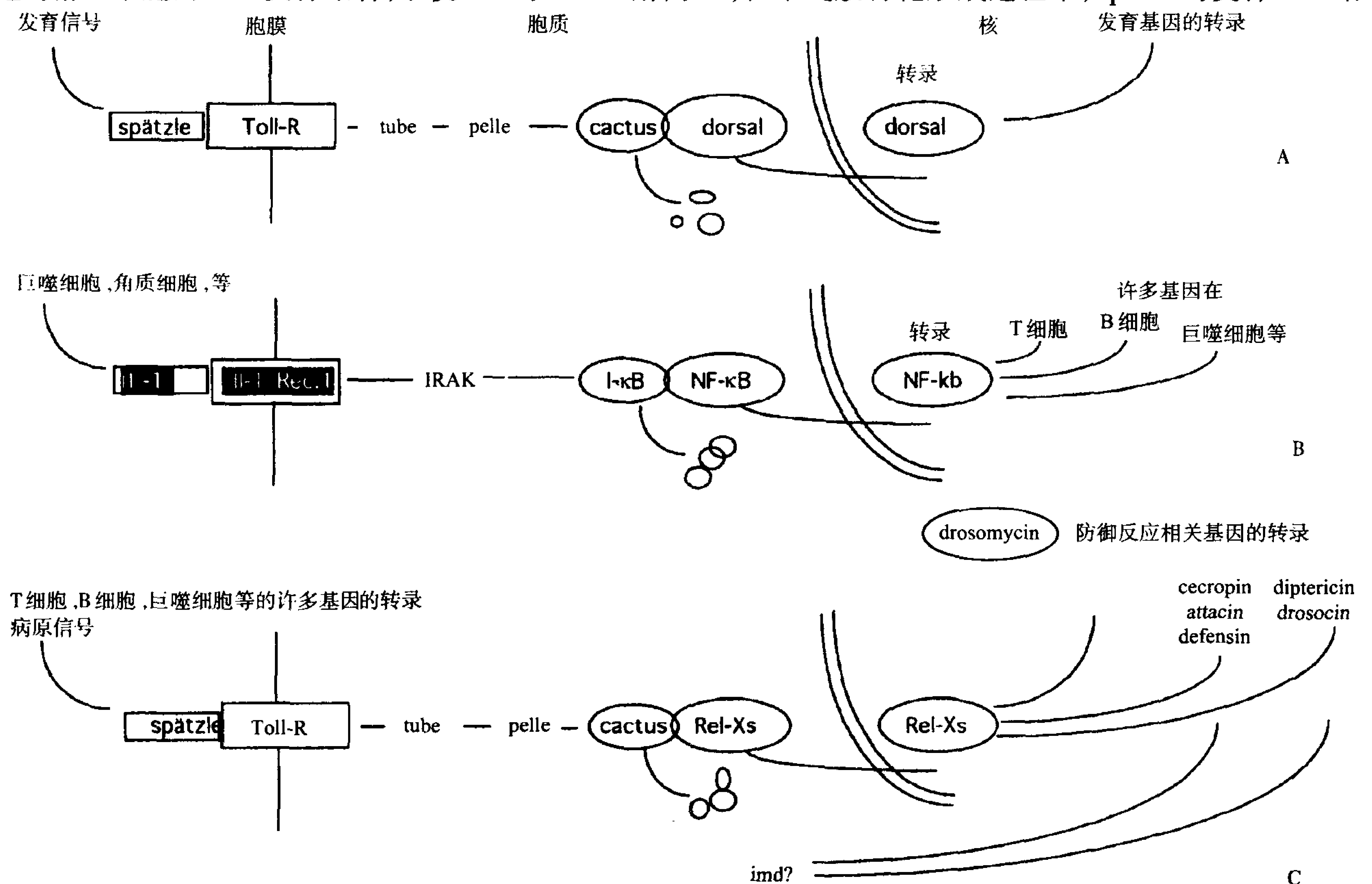


图18.2 防御反应和发育过程中信号传导的保守性。

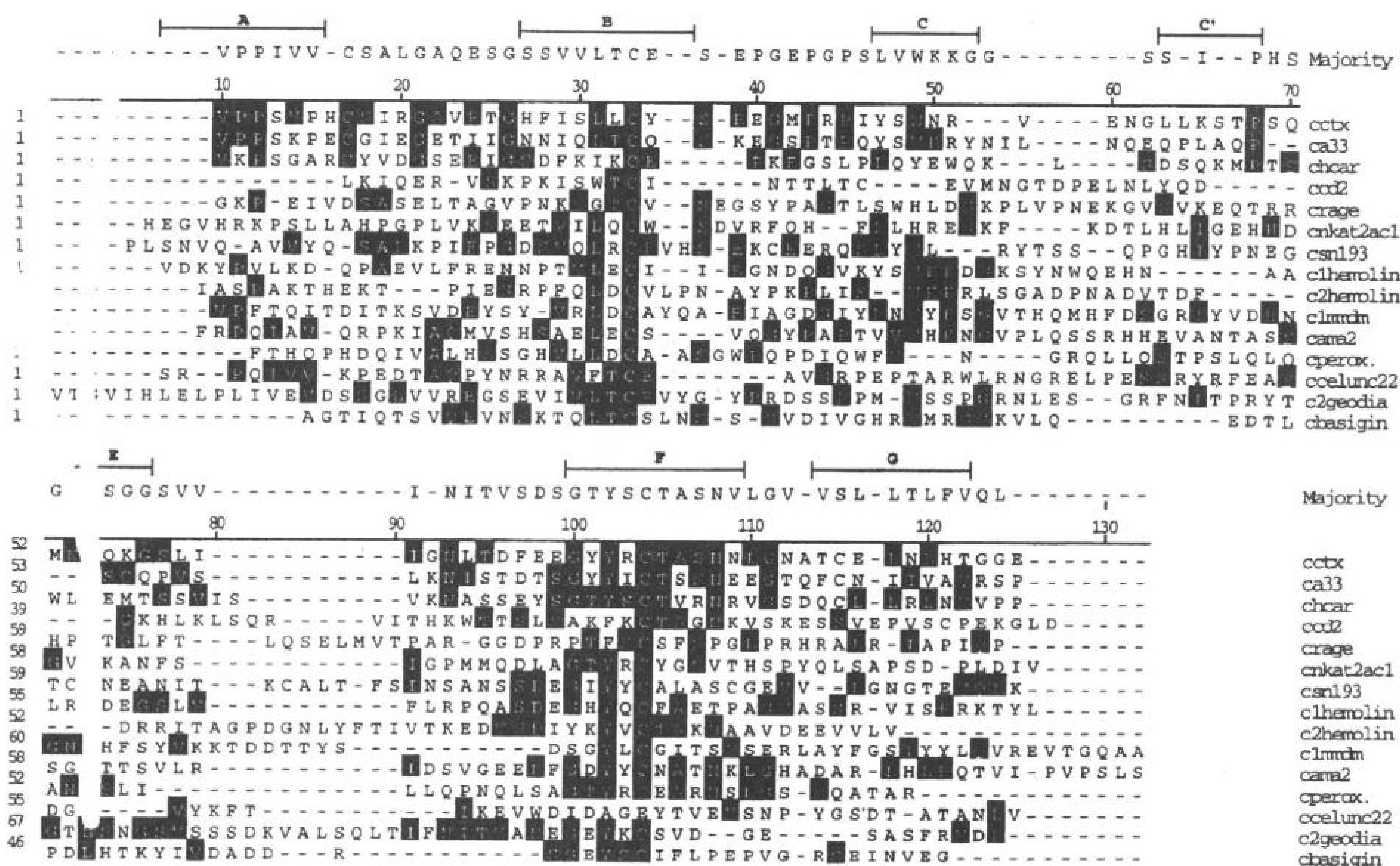


图 18.3 跨动物物种对 IgC 区进行的氨基酸序列比对和系统进化树分析。图例显示了所分析的氨基酸序列的跨度。每个小格显示的是氨基酸发生替换的频率。每对序列的长度代表了序列间的差异大小(应用 Lasergene 程序分析)。CTX,爪蟾胸腺皮质标记蛋白[115];CA33,一个 CTX 的人源同源蛋白[117];CD2,V-C2 受体,CD48 的配体;hcar,柯萨奇病毒受体,另一个 CTX 的人源同源基因[582];cnkat2ac1,一个 NK 细胞杀伤抑制型受体[583];c RAGE,一个超级糖酰化末端产物的受体[121];c basign,CD147,一个造血细胞和表皮细胞的表面分子[584];C1 和 C2 hemolin,hemolin 的两个结构域,hemolin 是蚕蛾体内参与体液免疫的一个可溶性的分子[74]。Cama2,amalgam 的第二个恒定区。Amalgam 是果蝇的一个黏附分子[15];C perox,peroxidasin C2 区中的一个,peroxidasin 参与果蝇防御反应和发育[99];Celunc22,twitchin 的一个 C2 区,twitchin 是一个 *C. elegans* 的一个结合 IgSF 的 myosin 分子[98];mdm,MDM 的第一个 C2 区,椎实螺属的一个软体动物防御分子[46];C2 geodia,海绵酪氨酸激酶受体的外末端 C2 区[23,585];ChftcR,鲨鱼 TCR β 链[162]。如果没有注释,请参考 Barclay AN et al., The leucocyte antigen, 2nd ed. Facts book series. London: Academic Press, 1997。

合引发的级联效应导致 Cactus 和 Dorsal 的分离。在果蝇免疫应答过程中，Toll 通过 Dorsal 相关的 Rel 蛋白以类似的方式传递信号。

植物抗病性

信号传导瀑布效应的相似性同样可见于植物的抗病性机制[86]。烟草 N 基因编码一种序列与 Toll 和 IL-1 受体信号传递区同源的胞质蛋白，通过与 Toll 类似的级联效应传递信号引起防御反应[87]。西红柿中与 IRAK 基因同源的 PTO 基因，为防御反应所必需[88,89]，也存在相同的机制。在 *Arabidopsis*，NPR1 是一个 Cactus 同源基因，为抵御多种病原体所必需[90]。正如 Wilson 等所说那样，"在昆虫，哺乳动物，植物中共存的一种信号调节瀑布效应含义深远，特别是当考虑到这些生物群体可能是由单细胞生物进化而来时。"

免疫球蛋白和 T 细胞受体的起源

跨动物种群寻找 IgSF C 结构域

脊椎动物中，多种淋巴细胞胞外受体由 Ig 结构域构成，但 NK 细胞一些受体对 MHC 蛋白的识别由 Ig 结构域或 C 型凝集素构成[91,93]。

Ig 结构域含有一个由两个 β 片层构成的三明治结构。每个 β 片层由含 5~10 个氨基酸的反向平行 β 链构成。通常在链 B 和链 F 间形成一个非常保守的二硫键。一些原核生物的分子，比如 PapD 和一些细菌蛋白都含有 Ig 结构域[94~96]。因此，IgSF 分子的分化进化很可能是从古老的细菌分子开始的，尽管该结构域是从真核生物中水平获得的可能性尚难排除。

包括侧生动物等众多门类生物中 IgSF 蛋白的存在表明：早在无体腔动物和真体腔动物进化分歧前，Ig 已经是重复基因编码了。无论是后口动物还是单细胞动物[97]（图 18.1，图 18.3）。然而，除脊椎动物外，IgSF 成员不存在重排现象，在无脊椎动物 IgSF 成员中有着难以想像的特性，如胞内肌凝蛋白的结合蛋白，twitchin，美丽线虫（*Coenorhabditis elegans*）的一种胞质分子[98]。一些分泌型分子也参与免疫应答：上述的 hemolin（4 个 C2 结构域），MDM（5 个 C2 结构域）[46]，FREP（一个 V 样 Ig 结构域）[47]，和 peroxidasin（一个 V 样 Ig 结构域和 4 个 C2 样结构域）[99]。

IgSF 结构域被分作两大类：C 区和 V 区[100,101]。C 区又可分为三类。

①所有门类生物的许多膜蛋白中见到的"老式的"C2 型由 8 段氨基酸序列组成两个 β 片层。这些序列间的连结环变异较大，可能与结合对象不同有关[102]。在 C2 型结构域，β 片层的 E-F 区带有 V 样特征。

②含有 7 段氨基酸序列的 C1 型区的分布仅见于脊椎动物适应性免疫系统内的 MHC/TCR/Ig/tapasin[103,104]。

③许多归为 C2 型的分子应重新检定，看它们是否像 telokin 或 axonin 那样，能与所有 C2 型或一些 C1 型分子相结合，同时会有 C2V 样特征和 C1 特征[105]。

无脊椎动物中的 V 结构域

赋予 Ig 和 TCR 特异性的 V 结构域，含有另外的序列和一个环，来决定识别配体时的特异性。图 18.4 比较了本节中提到的各种 V 结构域。

Ig 区结合多种配体的能力由分子的不同部位决定[102]。在 V 区可见于昆虫的两个 GPI 锚联蛋白，lachesin[16] 和 amalgam[15]，同样都是 V2-C2-C2 结，它们可能具有从古老受体进化到后口动物的共同特性。DTRK，一种果蝇酪氨酸激酶受体，也有两个胞外 V 区，其一较短。无脊椎动物中，V 区也可与处在 IgC2 区外的其他结构域相连。蜗牛的 FREP 血淋巴因子，能结合病原体（外来蛋白）。在末端含有一个与多基因家族相关的 V 区（5~10 个基股）[47]。C2 区 B、C 序列间成 C、E 序列间的环，与 V 区的 CDR 环相似，可以介导配体识别。

有两个现象可以说明 V 区参与适应性免疫系统，其中的受体通常是异源双聚体[107,108]：①多变性（发生在细胞复制过程或体细胞重排或突变后）形成早于二聚体形成；②双聚化（同源双聚化）先发生，因受体要与

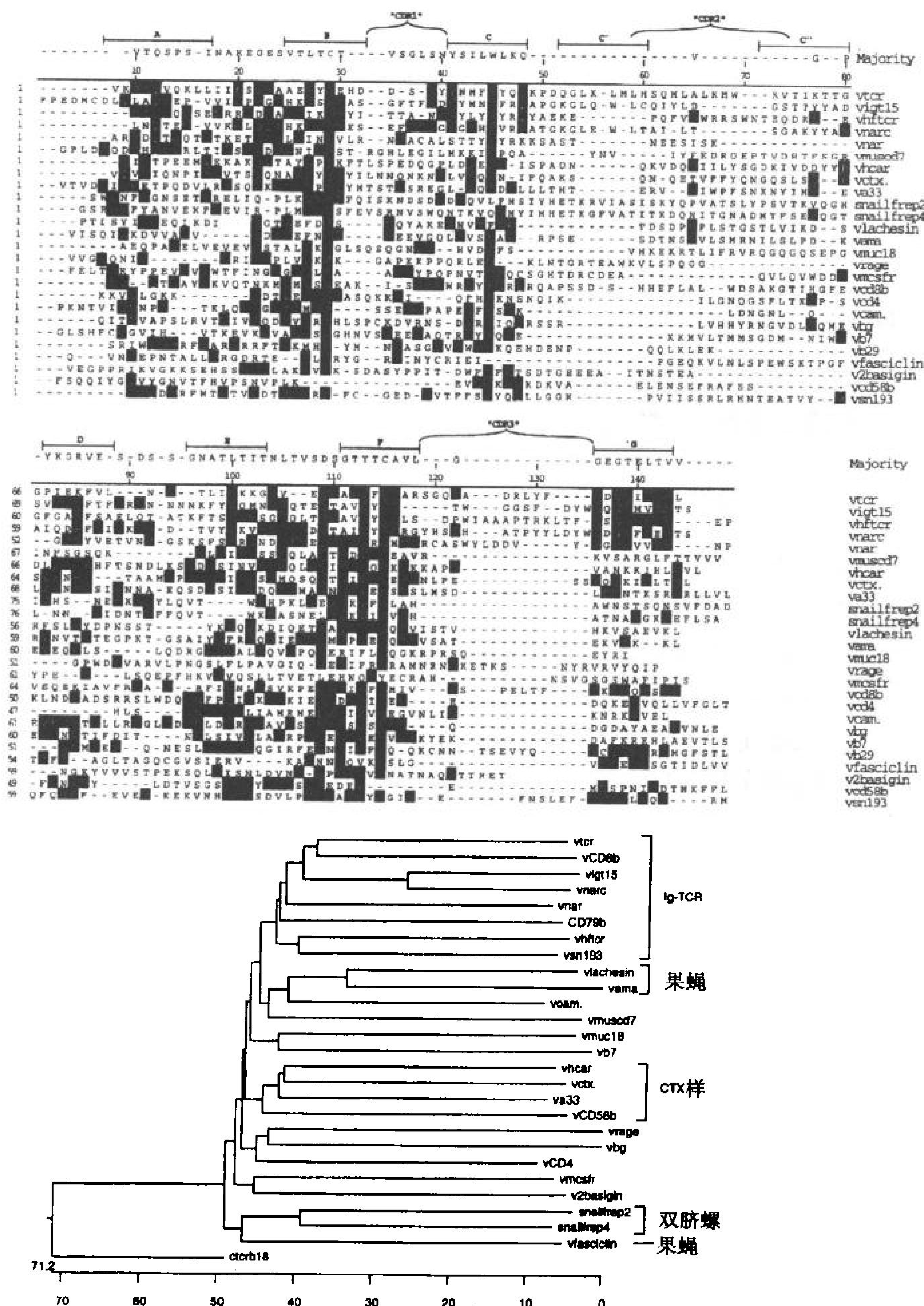


图 18.4　跨动物物种对免疫球蛋白 V 结构域进行的氨基酸序列比对和系统进化树分析，着重分析脊椎动物的 IgV 区。图例显示了所分析的氨基酸序列的遗传亲缘程度。每个小格显示的是氨基酸发生替换的频率。每对序列的长度代表了序列间的差异大小（Lasergene 程序）。V TCR，幼龄爪蟾 TCR V_β 结构域[166]；V Igt15，幼龄爪蟾 Ig 重链 V 区[393]；V isf TCR，*Heterodontus mostoma* 的 TCR V_β 结构域[162]；Vnarc；*Ginglymostoma cirratum* Ig NARC 的 V 结构域（IgW）[188]；Vnar，*Ginglymostoma cirratum* NAR 的 V 结构域[195]；Vmuscd7，小鼠 CD7 受体的 V 结构域；V car[582]，CTX[111] 和 Va33[117]，人和两栖类 CTX 家族成员的 V 区（参见图 18.3 中它们的 C 结构域）；蜗牛 frep2 和 frep4，软体动物参与抗寄生虫反应的两个分子的 V 结构域[47]；V lachesin，果蝇的黏附分子[15]；V ama，果蝇的黏附分子；V muc18，一个 V－V-C2-C2-C2 型分子，参与人的黑色素瘤生长抑制[111]；V rage，一个超级糖酰化末端产物的受体[121]；VM-csfr，单核巨噬细胞表达的克隆刺激因子；V CD8 或 CD4，CD8 或 CD4 共受体的 V 区；Vcam，VCAM；Vbg，鸡 MHC 编码的 BG 抗原，表达在红细胞，B 和 T 细胞[114]；Vb7，B7-2 现在称作 CD864；Vb29，表达 IgM 的 B 细胞受体 CD79b 的共受体；V fasciclin，昆虫参与神经元生长的分子；V basign，表达在早期胚胎的黏附分子；Vcd58，一个 V-C2 型哺乳动物受体，CD2 的配体；Vcd58b，淋巴细胞受体 CD58 的 V 区；Vsn-193，一种以 TCR 分子引物从 teleost fish 分离出来的分子的前 V 区[155]；cTCRb18，指爪蟾 TCR β 受体恒定区结构域[166]；蜗牛 FREP，软体动物双脐螺参与抗寄生反应的纤维蛋白原相关分子。

配体结合牢固获取结合亲和力，继而V区可变。

V结构域和寡聚体受体

可能现在一些分子保持了诸如V区和C2区非重排的原始特性[107,109]。这些分子可能界于黏附分子和特异受体之间，研究这些分子有助我们限定什么是原始受体。

在类人猿和脊椎动物中，一些带有V区的分子没有体细胞重排机制（amalgam，lachesin，V-，它们的基因——昆虫来源的C2-C2和哺乳动物来源的CD2、CD86、CD80、CD58、hCAR、B7，都是V-C2型）。这些分子都是寡聚体，在特定生物中可能并不存在于免疫系统。它们或没有内含子（amalgam）或缺乏V区剪切机制CD4，[110]Mucl8[111]。但都无一例外的，在可重排的J链中含中胚层细胞来源的amalgam和外胚层来源的lachesin，都由一个V区和两个C2区构成，且都是非整合膜蛋白，二者均参与神经系统的发生。tactile，一种哺乳动物T细胞整合膜蛋白，与amalgam和lachesin非常相似[112]。

V结构域和二聚体受体

至今在无脊椎动物尚未发现IgV区不经重排的二聚体受体。在脊椎动物、BG[113,114]、CD28、CD8、CTX[115]、ChT1[116]、A33和CTH均属二聚体受体。它们的寡聚体亚单元的V结构域偶联的是C2结构域而不是C1结构域。这些分子可能是由早期淋巴细胞受体演化而来。在TCR的Ig结构域，每个亚基由J片段编码的G区序列，带有一个脱糖环的特性。这就使G序列旁侧的一些氨基酸转向二聚体的内侧，形成IgSF区所谓的三层结构。这样的折叠形成结合抗原区的6个CDR环的最佳配位[119]。在CTX，CTX和Cht1[118,120]，一种假定的二聚体分子，它们的外显子-内含子组织机制与受体RAGE相似[121]。RAGE是一种V-C2-C2结构的单聚体形式整合膜蛋白，与形成生物的糖酰化蛋白终产物有关。与CTX相同，其V区基因不含有剪切连接机制。这种情况仅见于RAGE的V区，CTX的同源蛋白和Basign。RAGE带有一个不发生重排的V区，而且不含有糖酰化环，可能与CTX样分子有着共同的祖先。RAGE可以识别高度糖酰化的衰老蛋白，影响耐受机制[122]，表达在造血细胞系细胞。这可能与重排机制刚起始发生时的早期脊椎动物体内的那些受体相似。

613

重排机制的起源

许多模型显示：进化过程中，受体的体细胞通过RAG机制发生重排。RAG是两种淋巴细胞特异蛋白，RAG-1和RAG-2[124]。与有颌类动物的RAG基因相一致，至今还从另外四个纲的脊椎动物中分离出了RAG基因：软骨鱼类[125]、硬骨鱼类[126~128]、两栖类动物[129]和哺乳动物。RAG-1和RAG-2都有很强的保守性。每种情况下，这些基因都紧密相连，在染色体上有不同的起始位点。在RAG-1和RAG-2的某些区段都曾发现与细菌重组酶的一定同源性。其他关系包括酵母RAD-16，参与DNA修复的一种分子和其他一些参与基因表达的基因[130]。与原核蛋白的这种紧密联系[130]表明脊椎动物的基因重组机制或是水平获得或从细菌等进化而来。的确，RAG位点的基因组织形式具有转座子的某些特性：重组信号序列与转座子调控序列的外切位点相似[108]。

MHC的起源

MHC的出现

在软骨鱼类以前的脊椎动物体内尚未检出MHC基因克隆。在有颌类动物中，MHCⅠ类、MHCⅡ类分子，可诱导蛋白酶体成分lmp2[131]、lmp7[132,133]和抗原呈递相关蛋白TAP都已经检出，但在本属较古老的八目鳗和盲鳗中却没有发现这些蛋白质的存在。因此，和Ig与TCR一样，MHC好像是在进化中突然出现的。对于一些（无颌类）无颌类生物中的缺乏Ig/TCR和MHC现象的解释存在三种可能性：①在圆口纲生物出现时这些基因尚未出现；②这些基因可能因不同的外周环境在一些生物种类中丢失了；③这些基因又进一步分化致使采用传统的方法分离不出[132]。

最可能的MHC前体可能还是被囊动物的融合/排斥基因。该基因在表达调控与其他无脊椎动物模型相似。在该系统,自我多态性标志的识别关闭了排斥级联效应[57,58],这种现象与NK细胞的信号识别和传导方式相似。NK细胞通过一套受体来阻滞MHC限制性的自身杀伤[134,135,158]。在小鼠和人的NK细胞,TCR识别的看来是MHCⅠ型分子的肽结合区的α螺旋而不是肽-MHC复合体[136]。因此,菊海鞘的同种应答类似于NK细胞的同种识别而不是T细胞的同种识别[137]。我们还要注意,对其他的多态性识别机制也已有所了解[138],而一些还与MHC介导的不同。

在无脊椎动物或脊椎动物的IgSF间共有的一个特性就是:这些由非重排基因编码的蛋白,其基因包括V、I或C2区但不含C1区。C1区仅存于Ig、TCR、MHC和tapasin[103,104]。在这些细胞表面受体中,Ig、TCR,MHC等识别其他分子的机制包括:识别同一细胞上的分子,类似B细胞表面的CD79α和CD79β,T细胞表面的c3复合体或其他细胞的CD4、CD8。有趣的是,C1区有关的这些相互作用仅当C1与C2区不同时才发生。TCR与Ig分子形成的共同受体表明共转录机制可能要求进化中对受体进行体细胞重排[139]。因此,很可能C1区一开始并不存在于抗原特异性受体,而是在后来通过外显子混进了MHCⅠ类或MHCⅡ类基因[115]。或者是C1区是古老MHCⅠ或MHCⅡ类基因的一部分。无论是何种情况,含有C1区分子的进化历史上可能都是联系在一起的。

肽结合区的起源

MHC肽结合区的进化起源问题仍是一个谜。肽结合区可能来自IgSF区。IgSF和MHCⅠ类分子的α2和MHCⅡ类分子的β1肽结合区有同样的大小和相同的外显子/内含子剪切位点,而且双硫键也出现在相同的位置[140]。然而,β片层的拓扑结构在这两个基因家族不同,当然,在任何两个IgSF结构域也没有相同的螺旋。因此,很可能MHCⅠ类分子和MHCⅡ类分子是另外一种尚不明确的基因家族[提供肽结合区(PBR)]与IgSF(近膜C1区)的嵌合体[141]。热激蛋白HSP70家族成员能识别范围广得多的多肽[142]。它们也与MHCⅠ类分子存在微弱的相似性[141],而且HSP70基因在某些脊椎动物定位于MHC复合体[143~145]。因此,很可能是HSP70提供给MHC分子肽结合区[141,146]。而且,功能方面的研究也表明HSP在生物发育和免疫功能中发挥着重要的作用[147]。然而,核磁共振和晶体衍射资料不支持HSP70与MHC肽结合区存在明显相关性。在HSP70肽结合区存在一个β链平台,可以用来结合多种形式不同的肽,但在MHC这些β链并不相邻。实际上,这种拓扑结构与在IgSF结构域发现的近似[148,149]。对肽结合区起源的寻求仍需进行。

小结

免疫系统成分间的同源性或相似性研究表明在脊椎动物和无脊椎动物之间并不存在明显的界限。在无脊椎动物和无颌鱼类中,惟一缺乏的机制可能就是决定B细胞和T细胞生成和克隆选择的重排机制。

脊椎动物免疫系统的这套含有众多成分的系统可能都与这种"先创造,后规范"有关。的确,这形成了一种需要选择来避免自身免疫发生的环境。因此,MHCⅠ和MHCⅡ应是与TCR相伴进化的。我们应当看到在脊椎动物中(图18.5),这种免疫系统的基本框架与哺乳动物中的一样非常保守,仅存在微小的变异。

脊椎动物免疫系统

T细胞受体

脊椎动物的T细胞受体(TCR)相关生化资料积累不多,除鸟类有两种TCR已经被单克隆抗体(mAb)检出外[150],对TCR大部分的比较研究是针对其基因序列进行的。因此,对种系发育发生过程中各种脊椎动物T细胞的功能还了解不多(表18.2)。尚未发现类别转换现象。

从脊椎动物开始,两类TCR,TCRαβ和TCRγδ的编码基因就已经存在了[151~153]。更精确的说,从鳐(skate),属的*Raja eglanteria*(一种原始有颌类动物)中,用PCR的方法分离出来的互补DNA(cDNA)与哺乳动物的α、β、γ、δTCR基因存在同源性[154,156]。至今,尚未成功地从无颌类动物无脊椎动物发现类似序列。

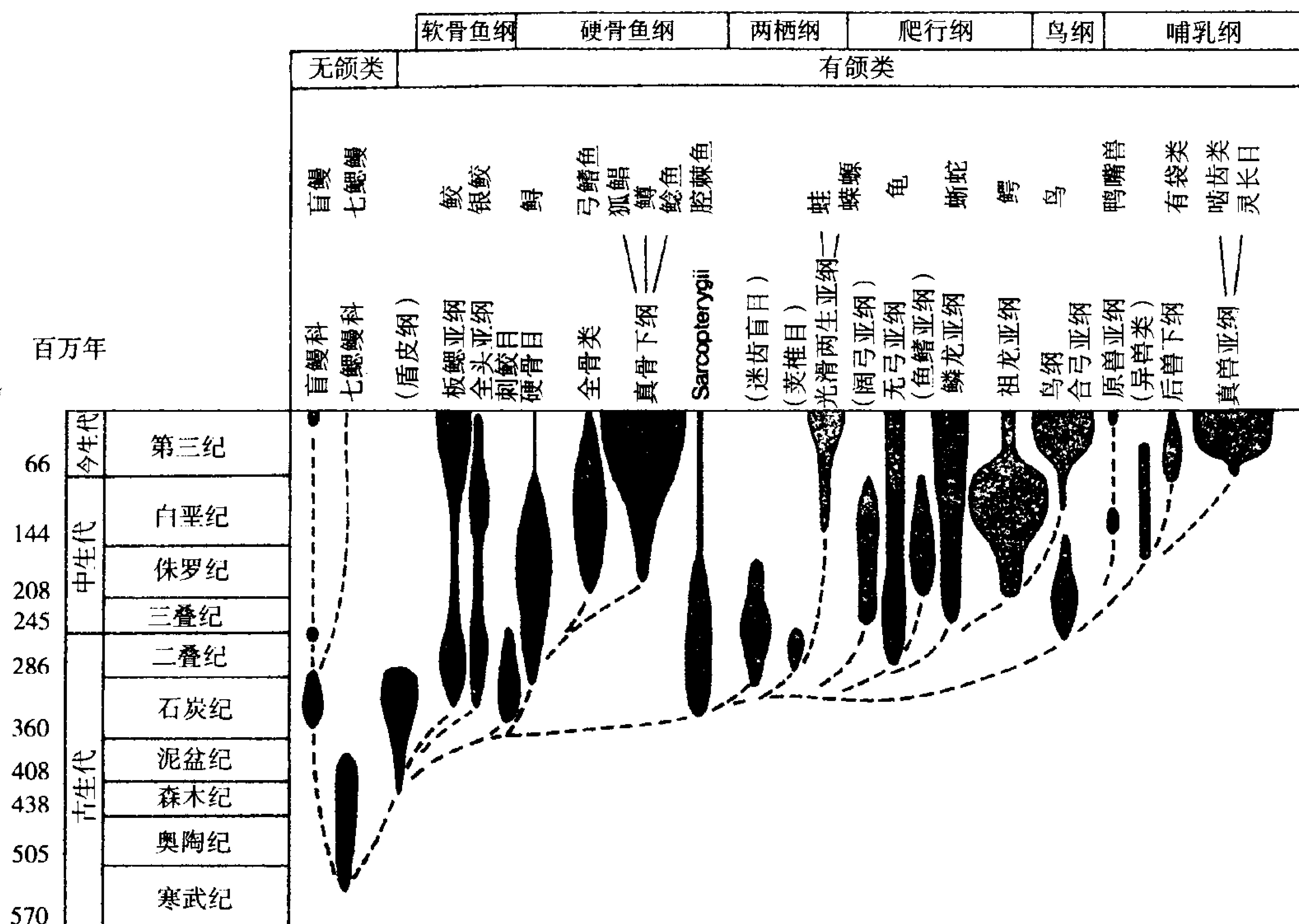


图 18.5　进化过程中的多种脊椎动物(注意已经灭绝的种类)。

α 链恒定区

据已有资料跨脊椎动物纲对基因 α 和 β 稳定区的比较结果如下所示:软骨鱼系[156]、硬骨鱼系[157]、两栖纲[158]和鸟纲[159]的 α 链基因保守性不明显。β 链 IgSF 结构域的自身结构也问题重重。脊椎动物 TCRα 链,与 E、F 相同,A、B 和 C 序列都较易识别,尽管它们与哺乳动物中的相比要短得多。D 序列像是丢失了,难以检出。胞外结构域序列总体上缺乏保守性,以及它们在鸟纲和硬骨鱼系中长度较短,表明其共同受体在结构上与传统的 CD3 复合体存在明显差异[157,158]。

跨膜区和胞质区尾巴是该类分子中最为保守的部分。和 C_{β} 相似,至今研究的所有物种 C_{α} 的跨膜片段都存在一个 CART 基序[160]。这个基序所含的氨基酸形成一个与 CD3 复合体结合和信号传导所必需的表面。除此之外,朝向 IKL 残基的也较保守,可能主要是与 CD3 复合体中其他成分结合。在硬骨鱼系、鸟纲和哺乳动物中,该分子的胞质区存在明显的保守性。　*618*

β 链恒定区

四种软骨鱼类,角鲨[161,162]、红鳟[163]、鲶鱼和鲑鱼[164]以及两种两栖类动物(蝾螈[165]和爪蟾[166])的 TCRβ 的基因序列已经检测出。

除典型的 Ig 结构域特征外,脊椎动物 TCRβ 链还存在一些保守区,特别是在 81 ~ 86 位,这可能与 TCR 的双聚体形成有关[167]。跨膜区的 CART 基序也很保守(图 18.6)。也存在一些显著的差异,比如,哺乳动物带有的 98 ~ 120 位的易溶区在非哺乳类脊椎动物不存在。爪蟾类的 TCRβ 恒定区基因缺乏糖基化位点。TCRβ 恒定区基因的数目可发生变化,在哺乳动物和蝾螈中,C_{β} 基因复制或四倍复制。角鲨比鳐含有较多的恒定区基因,而 Ig 基因更多。鳟鱼的基因不增多,资料显示存在三倍或更少的 C_{β} 基因,而且不具有多态性。在鸡或幼爪蟾可能都只含有一个拷贝的 C_{β} 基因,尽管爪蟾是一个假四倍体生物[166]。在更多倍体生物中,仅假

图 18.6　脊椎动物 TCR-α 和 TCR-β 序列比对分析。1. α 链。注意不同物种之间的非保守性，但是在跨膜区保守性相当高，这里可以发现 CART 基序。2. β 链。注意 β 链间较高的保守性，不仅在半胱氨酸回旋区保守，在 80～90 这段序列同样保守，其作用是二聚体形成所需要的。易溶区的插入仅存在于哺乳动物。

八倍体的 *X. amieti* 含有两个位点。而蝾螈,与大多数脊椎动物不同,含有4个拷贝的 C_β 基因,似乎含有4个 DJC_β 簇共用一种 V_β 基因。

V_α 的多样性

TCR V 区之间的相似性没有 IgV 区那么高,这可能是因 T 细胞识别的是 MHC 分子和肽的双重识别限定,使 TCR V 区获得了与 IgV 区不同的特征[170]。脊椎动物的 TCR 都是如此。鳐的六个 cDNA 克隆中有四个 V_α 家族已经检出[158],在鳟中检出六个[157],在管状鲶鱼中检出三个 V_α 家族。在蝾螈中,五个 V_α 和至少14个 J_α 片段已经检出。所有这些序列都与哺乳动物的 V_α 序列明显相关。所有的 α 基因座看来有许多 J 片段;32个不同的鳟 J_α 序列已经测序,较 β 链为多[157]。这种较多的同源性序列是因其缺乏 D 基因座吗? 很可能,D 基因座的缺失和 J、V 片段的多样性是为了适应这种二级重排和受体修饰。V_α 片段与 V^β 不同,CDR3 区的大小惊人地保守,这种结构可能为 TCR/MHC。肽相互作用所必需[171]。

V_β 的多样性

在冷血脊椎动物大量的 V_β 家族中,A 是一个较为保守的特性。在角鲨中至少有七个不同的 TCR V_β 家族已经被分离出。其 TCR 基因和 Ig 一样形成基因簇结构,在鳐中有 4~6 个,至少有 4 个存在于鳟(其一的部分氨基酸序列与人 Vb20 家族相似中。在爪蟾属中有 11 个,在斑点美西螈中则有 13 个。

D 片段 GGGACAGGG(哺乳动物和鸡中的 D_β)可在所有脊椎动物中遇到,它们单独存在或与其他 D_β 偶联。D 片段通常显示对甘氨酸的亲和性,表明一些 D 区残基可能与 CDR3 的结构稳定性相关。鳟鱼中有 10 个 J_β[163],包括等位基因在内,爪蟾属中则至少有 11 个[166]。

在蝾螈中,V_β 可以被分为 9 类,它们之间有 75%或更高的同源性[165,167,172]。但只有 35V_β 被克隆出,可能会存在更多的 V_β 家族。所有的 V_β 基因都较保守。少数还与哺乳动物的 V_β 基因关系密切,如人 V_β13 基因和 V_β20 片段和海洋动物 V_β 和 V_β14 有同源性。N 核苷酸表达于近 40%和 73%的 β 链 VDJ 联接在 2.5 月龄和 10 到 25 月龄的动物中。相应的,在蝾螈和爪蟾属中,近 30%的 β 链 cDNA 是不完全重排的。不同来源的蝾螈 TCRβ CDR3 基因是相同的。而在爪蟾属中还未发现这种特性[166]。

γδ 受体

软骨鱼类鳐(*Raja eglanteria*)的 cDNA 序列,与原始的带有 V 区多样性 TCRγ 和 δ 的基因显示明显的同源性。δ 受体仅含 D 片段,纯一的 D 片段,联接区的多样性程度不同[156]。

鸡的 γδ 细胞很早以前就已经检出[150]。从胸腺,脾的 γδT 细胞系用 Northern 印迹的方法可检出其转录产物,而在 B 细胞或 γδT 细胞系则检不出。在鸟类 TCR 基因座也检出了 3 个 V_γ 亚族、3 个 J_γ 基因片段和一个 C_γ 基因。所有的 V_γ 亚族在胸腺细胞发育成熟的早期参与重排。以胚胎发育的第 10 天开始,γ 片段多样性发生变化,其中包括随机的 V-J_γ 片段的重组,核酶活性和 P 核肽,N 核肽的共同参与[173]。鼠和人的 γδ 多样性没有 αβ 那么大。在牛和鸡,两种分子的多样性较差,且在 γδ 细胞生长发育过程中似乎存在配体介导的选择作用[174]。在绵羊,γδTCR 的多样性是胸腺依赖性的,并遵循生长调节的顺序,还未发现不变的 γδTCR[175]。

CD3 复合体

仅有两种非哺乳动物的 CD3 复合体成分已分离:鸟纲[176]和两栖纲[177]。在爪蟾属中,一个 CD3 克隆与人和鸟的 CD3γ 和 δ 链有同源性。它由 5 个外显子编码,结构特征像哺乳类 CD3δ 基因,而不是含 7 个外显子的 CD3γ 基因。因尚未检出一个 γ 样基因,这个基因就代表了哺乳类 CD3γ 基因和 δ 基因的共同起源。同样,一个鸡 CD3 链的 cDNA 克隆编码难于归人 γ 或 δ 基因族[178]。CD3γ 胞质区部分的基因序列具有信号传导的重要性,在鸡中特别保守。脊椎动物间,所有 CD3 序列的一些残基高度保守[176~179]。

免疫球蛋白和抗体

619 一个典型的 Ig 分子由 4 条多肽链构成,两条重(H)链,两条轻(L)链通过一些二硫键连接成一个大分子。每条链都含有一个线状的 Ig 结构域结合部位。

Ig 重链:恒定区

无颌类脊椎动物

从盲鳗和八目鳗血清中未分离出任何 Ig 样分子。难道说 Ig 和 TCR 起源于一种已经绝灭的脊椎动物吗? 或是环形圆口纲具有一种独特的脊椎动物免疫系统?

有颌类

在进化过程中,Ig 重链恒定区基因序列显得不那么保守,环形片段的插入和缺失现象在 C 区要比在 V 区常见得多[180]。

原始的有颌类很好的说明了这种"先多样分化,再规范定型"的机制。的确,在软骨鱼类有着相当多的 Ig 独特型;尚待从其他门类生物中研究其同源性。

IgM　在所有的有颌类生物中,Ig 折叠的所有特征都尚保存良好[181,182]。μ 重链含有 4 个 C1 样区和一个 V 区。重链间或重链与轻链间通过二硫键连接,IgM 亚单位都形成五聚体,仅硬骨鱼类例外,形成的是四聚体[183]。荧光偏光分析显示:哺乳动物和鲨鱼的 IgM 分子的可变基因座及变异幅度并不相同。所有种类生物中的 IgM 都是明显糖基化的[185,168~188]。C_H4 非常保守,尤其是在 C 端区。不同的脊椎动物 IgM 的 4 个 C_H 区中,每个都有几个 μ 链特异残基[186],表明脊椎动物 μ 链存在一条连续的进化途径。在鲨鱼类、哺乳动物和两栖纲中,μ 跨膜片段非常保守,但通过其形成的膜型 Ig 分子却变异很大[189]。除硬骨鱼类,其跨膜片段由一个选择性剪切机制作用的外显子编码外,跨膜片段都距 C_H4 末端约 30 个 bp。硬骨鱼类剪切发生在 C_H3 末端,C_H4 在膜型分子中则是缺失的[190~192]。而在全骨类鱼中,C_H4 含有一些基序可作为形成编码膜连型 μ 链 mRNA 的剪切位点。在弓鳍鱼,C_H3 中还含有一个神秘的剪切位点[193,194]。

新抗原受体　新抗原受体(NAR),一种在铰口鲨血清发现的新的二聚体,至今仅见于软骨鱼类,由两条重链构成。每条重链含有一个由 5 个 C1 区重排生成的 V 区[195]。该二聚体的 C 区与其他 Ig 重链并不紧密相关。通过 cDNA 克隆和 NAR 特异抗体的细胞表面染色显示:NAR 最初发现于血清,很可能是一种受体,因其膜型分子的存在。它们可能是通过单一 V 区以单价形式结合抗原的。在进化过程中,NAR 的 V 区归于人 V_γTCR 区,在肺鱼也已经检出一个类似特性的分子[196]。

IgNARC[188] 或 IgW[125]　从鲨鱼中分离出编码此独特型成熟蛋白分子的 cDNA 分子含有一个 N 端 V 区,继而 6 个 C1 型 C 区,C 端尾巴属于典型的分泌型 Ig。N 端的两个 C 区与鳐的 IgX 独特型类似,剩余的 4 个 C 区与 NAR 同源。由 cDNA 序列推出的 IgNARC 重链可能与轻链相关,这点已得到生化资料的确认。V 片段和 C 片段可能像 IgM 那样是簇型组织的。

IgX 或 IgR　在斑鳐(*Raja kenojei*)中[197,198]这种分子首先被当作第二型 Ig 蛋白被发现的,这种只有重链而没有 μ 独特型的鳐 Ig 基因被命名为 X 型(注意不要与爪蟾属的 IgX 相混淆)是通过用鳐 V_H 和 C_H1,以与 μ 样独特型相应区互补的特异探针检索一个脾 cDNA 库时发现的。X 型 Ig 重链基因的恒定区含两个特征性的 Ig 区和一个半胱氨酸丰富的 C 端区[199]。该分子的远侧部分似由 IgNARC 基因重复复制序列编码的[188]。表达 IgX 的细胞并不生成 IgM,但在生物发育早期,两种分子都可见到[200]。图 18.7 显示了上述四种独特型的可能性关系。

IgD 同源物　因 IgD 最初仅见于灵长目和啮齿目动物,人们以为 IgD 可能是最近才进化成的 Ig。然而,从硬骨鱼类检出的一种新型 Ig 分子,部分与 δ 重链同源[201]。这类分子可能也存在于肺鱼[196]。除了一个可选择的分泌型或膜型 C 端外,这种怪异分子还含有一个重排的 V 区,μ 链 C_H1 区和 7 个与 μ 同源性的 C 区。

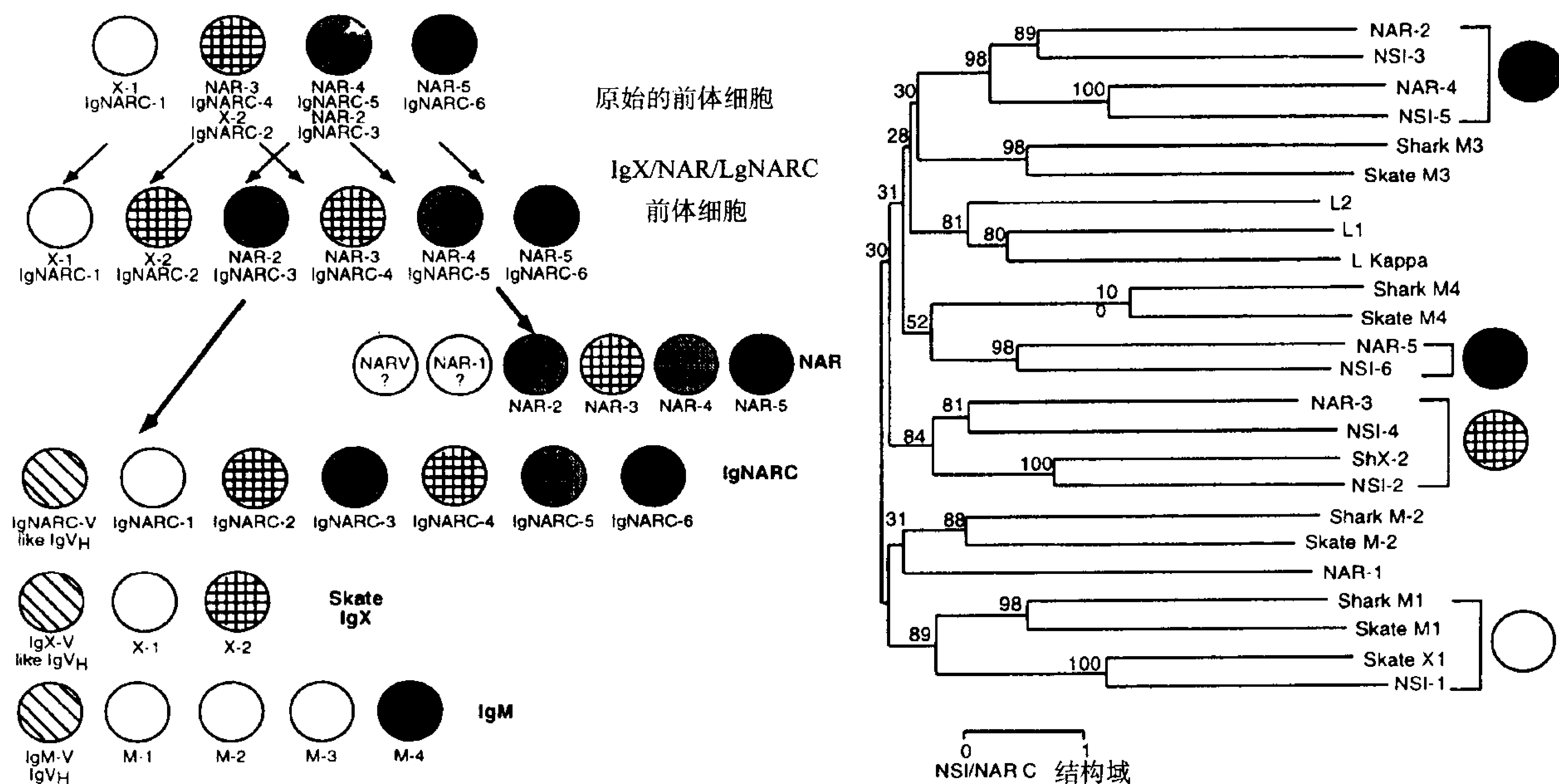


图 18.7 从原始的免疫球蛋白向 IgM 进化的可能历程。Ig、NAR 和 NARC 之间的关系的建立依赖于序列比较。IgNARC (VC1C2)N 端的 3 个结构域与 IgX 同源,而其 C 端 4 个结构域与 NAR 的最后 4 个结构域同源。X1 和 NAR5 结构域同样是 IgMC1 和 C4 的同源物。细箭头指示复制。粗箭头指示整个 NAR 和 IgNARC 分子从一个共同祖先分子的进化。进化树是一个同样多样性抗原受体的 C 区的临近交联树。它表明 IgNARC 是一个很相近的 NAR 的同源体,并很可能是 IgX 的同功能体。本图 Greenberg 等的数据修饰而制[188]。

类似 δ,其基因紧跟 μ 链基因下游,带有分离的决定型还是膜型的末端外显子,在一些 B 细胞存在着和 μ 链共表达现象。这种鱼分子比 IgD 大,但可变性没有 IgD 好(缺乏铰链区),这种分子可能不是 IgD 的同源物。

其他与 IgG、IgE、IgA 和开关相关的独特型　许多独特型含有 4 个恒定结构域:爪蟾属的 IgX 和 IgY[202~205],黑斑蛙的无 μ 独特型[206],蝾螈的 IgY[207,208] 和鸟类的 IgA 或 IgY[209]。在爪蟾属生物,IgY 是胸腺依赖性的,IgM 和 IgX 则不是,尽管胸腺切除可影响特异 IgM 抗体的生成[210,211]。胃肠的 IgM 和 IgX 型浆细胞很多,IgY 型浆细胞则几乎没有。蝾螈发育早期,IgM 就可见于血清,并占免疫应答中合成抗体的大部分。蝾螈的 IgY 在发育过程中出现较晚,并且似乎对免疫刺激剂不敏感。从孵化后 1 个月到 7 个月,IgY 可见于肠上皮细胞并渐趋消失,与生成分泌型成分相关。在 9 月龄的该种动物,IgY 已经从肠进行性消失,血清中也不再能检出。蝾螈 IgY,像爪蟾属的 IgX,可能是哺乳类 IgA 的相应成分[212]。爪蟾属的膜型 IgX 和 IgY 与任何不含 μ 链的哺乳动物 Ig 独特型不同源,可能更类似于 mIgM[189,213]。mIgY 的跨膜区和胞质区与鸟类 mIgY 和哺乳类的 mIgG 和 mIgE 共享一些氨基酸残基,表明现代的这些独特型可能与两栖类的 mIgY 有着共同的祖先。尽管鸟类 mIgY 和哺乳类 mIgG 在跨膜区外显子的序列惊人的相似,它们与 mIgY 总体相似性非常低。因此,表达生成爪蟾属 mIgY 的那些基因很可能在原始的两栖类或更早阶段发生了变化,最后才决定了鸟类的 mIgY 和哺乳类的 mIgG 和 mIgE。[204,213]

620

脊椎动物中,在两栖动物尚未发现重链类别转换现象[214]。爪蟾属的转换型 μ 链(S_μ)(5kb,图 18.8)含有 23 个近 150bp 长的重复序列,这些重复序列含有小的内部重复序列和回文结构,比如与哺乳动物相同的 AGCT 序列。在表达 IgX 的细胞,μ 基因被去除,S_μ 和 S_χ 结合。S_μ 和 S_χ 都像哺乳动物那样,富含 AT 序列。重组通常发生在:一条单链 DNA 折叠机制所示从线状 DNA 向环状 DNA 转变处。这种在哺乳动物保守的类别转换连接机制,表明微基因座参与决定重组的剪切位点。S 区的重组特性因此与结构连接起来,而不是与碱基组成有关,回文序列的重复为生成很多微基因座提供了基础。

重链可变区

重排过的 V_H 基因含有一个领头序列(由断裂基因外显子编码),后跟 4 个骨架区和 3 个 CDR 基因。所有有颌脊椎动物都存在这种规范的 V_H CDR1 核苷酸序列[215]。生殖细胞系的惟一显著区别是鲨鱼缺乏保守的八聚体和 5′端区的 TATA 盒(图 18.8)。所有物种中,一条完整的 IgV 基因通过生发细胞 V、D、J 片段组装

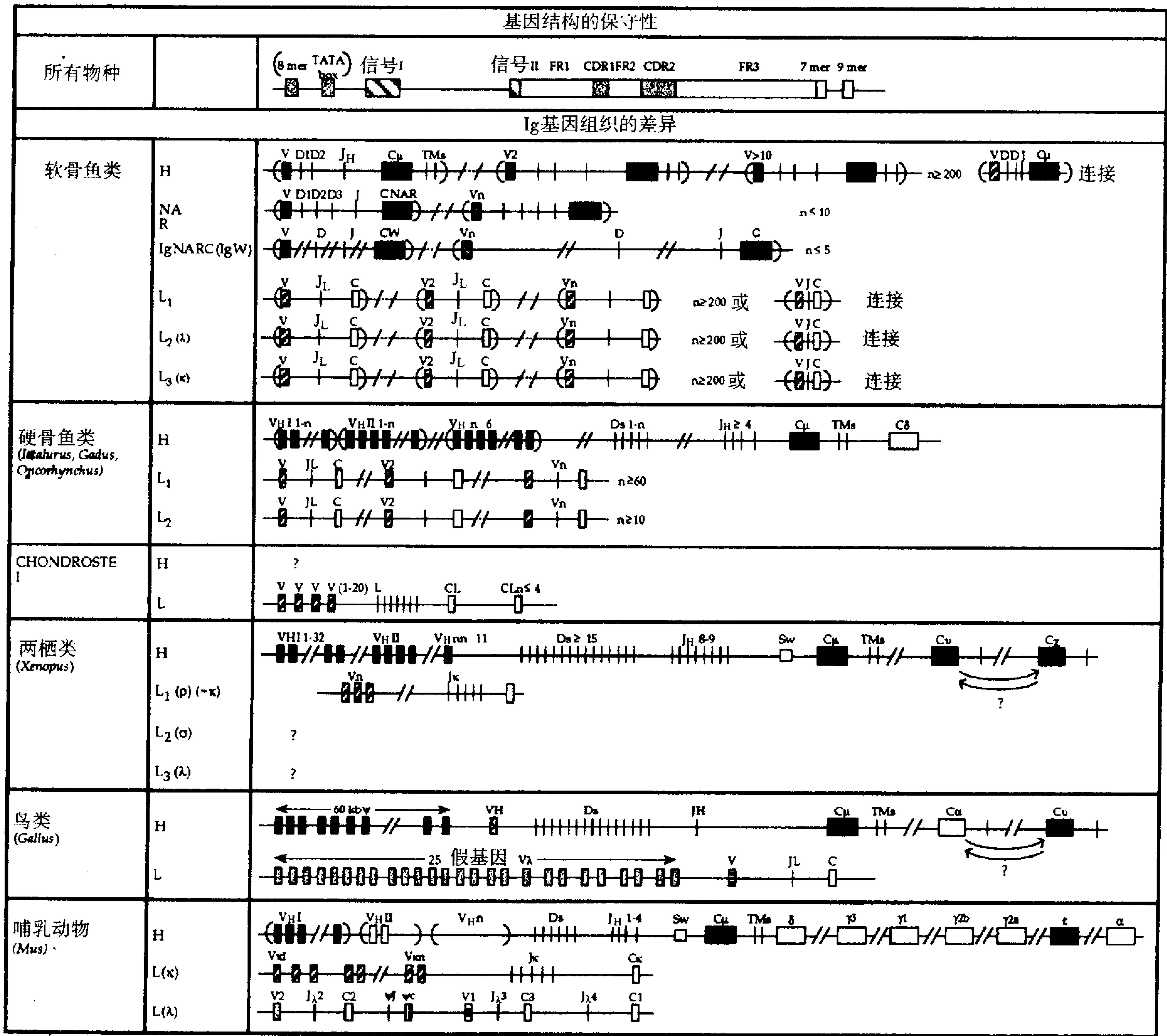


图 18.8　不同种类脊椎动物免疫球蛋白基因的组织形式。FR,框架;7mer 和 9mer,7 聚体和 9 聚体;TM,跨膜区。参考文献见正文。

而成。在软骨鱼类中,有着大量的(可能超过 100 个)用于编码重链的基因簇[216]。每个单倍体生物细胞编码 NAR 的只有四个 V 区基因[195],通过 Sourthern 印迹在铰口鲨中仅检出少数 NARC V 区基因[188]。在硬骨鱼类的鲇鱼中,7 个 V_H 家族已经分离出,每个家族都含有 7～10 个基因,大多数有可读框。在鳟鱼中,检出了 11 个 V_H 家族[218,219]。爪蟾含有至少 20～30 个成员,10%～30%是假基因。其他的家族则要小些(1～8 个成员)。所以可以采用的 V_H 成员在 90～100 左右[220～222]。爬行纲含有数目众多的 V_H 片段[223]。在黄腹彩龟(*Pseudemys scripta*)中,4 个家族,每个单倍体基因组共有 700 个 V_H 成分,假基因的频数为 5/34[224,225]。同样地,用杂交的办法从蛇鳄鱼(*Chelydra serpentina*)中检出了 125 个基因与小鼠 V_HS107 具同源性。在冷血脊椎

动物中，V_H 片段的数目看来并不限制抗体的多样性变化。在鸟纲的鸡中，约含有 80 个 V_H 片段，只有一个不是假基因（下文会作相应讨论）。

D 片段

621

在软骨鱼类中，它们的 Ig 基因成簇存在，每簇只有一个或两个 D 片段，而且这些簇也是互相之间略带变化的复制品（图 18.10）[216]。因此，重复并不意味着多样性。真骨鱼目、两栖纲和爬行纲，重链基因座的组织方式与哺乳动物的近似，从 cDNA 抽提出的 D 片段数目约为 10～16 个。在爪蟾属中检出两个生发细胞的 D 片段[227]，它们再结合信号序列与哺乳类的相似。鸟类的 D_H 片段约有 15 个而且彼此很近似[226]。

对进化过程中保留 D 片段的现象似乎可找到理由进行解释。一种解释是结构形成的需要。D 可以增加抗体的多样性，有时还可以增加 CDR3 的长度。长度的增加可能会影响到结合位点。在 NAR 中，编码基因的长度和 CDR3 的组成可满足形成特异三级结构的需要。一个 D 编码的 Cys 可与 FR2 中的一个 Cys 形成连接，稳定形成的环可能参与这种不寻常的单聚体受体的抗原结合。这种情况下，三个不同的 D 片段参与形成 CDR3。

622

另一种解释是为重排所必需[107]。在一个杂合双聚体（H-LIg，或 αβTCR 或 γδTCR），只有一个 V 基因座（V_H、V_β、V_δ）带有一个 D 片段。如果 D 片段的保存是为了增加多样性，很可能某些双链受体的两条链都获得了 D 片段。奇特的是，无论在 Ig 还是 TCR，带有 D 片段的链都是首先进行重排的。这表明一些分子的一定保守性与分子重排有关。实际上，经过 VDJ 重排，不再可能发生其他重排（参见第 6、10、11 章），因剩余的不重排的 V 和 J 片段没有互补的空区了（除非神秘的九聚体发样作用，这种情况在少数情况下可发生[127]）。因此，经过重链或 β 链的重排，带有成功重排的重链或 β 链基因的前 B 或前 T 细胞增生时，这些基因就固定了，这可能为其他基因座在原有基因座不变的情况下发生二次重排提供了时间。

这种情况的一个例外可能是 TCRγ 重排优先于 δ 链重排，但 γ 链基因座重排变化很少，而 δ 链位于 α 基因座。

总之，D 的选择可能允许通过 N 加的方法丰富的多样性。可能一个没有轻链的受体，如最基本受体 NAR，受生物进化的驱动力作用。如果这个受体是二聚体，进化过程中 D 片段的保存可能在于锁定基因座。

J 片段

软骨鱼类，J 片段的多重复制与 D 片段一样，并不一定代表多样性。鲶鱼的 9 个 J_H 片段紧密排列，形成一个不到 2.2kb 的簇，长度和序列的高度一致性表明 J_H3 和 J_H7 可能由不等交换产生。每个 J_H 片段似乎都是有功能的，连接多样性在 CDR3 区很显著。因此，高等脊椎动物 J_H 片段的结构和组织特征可能起始于脊椎动物种系发育的早期。爪蟾属动物因类别不同，分别可以找到 8 个或 9 个 J_H 片段。有一个是假基因其中一些 J_H 片段含有一个假九聚体，可以直接与一个 V 片段相连[227]。在龟类中，至少已确认了 16 个 J_H 片段，分别带有互不相同的特征性的 RSS，其中只有一个是假基因[224,225]。而鸟类仅有一个 J_H 片段[226]。

V_H 基因的进化

V_L 和 V_H 基因代表了一个脊椎动物由进化产生的最复杂的受体基因系统。一个关键的问题就是，抗体 V 基因 CDR 在进化过程中是怎样变化的？特别是同时它们还要受多基因家族同源性的限制[229]，以及在很强的选择丢失的情况下。V_H 家族的产生早于哺乳动物的分支，因此很保守，反映了对蛋白序列的选择现象。保守区位于重链的溶剂接触面，与抗原结合位点相隔一定的距离。在 RSS 内还检出了一个种属特异性区[230]。

在一个进化树上，脊椎动物的 V_H 基因形成 A、B、C、D、E 等几个家族（图 18.9）[231]。软骨鱼的所有 V_H 基因，例如，鲨鱼和鳐，属于单种簇 E；硬骨鱼的 V_H 基因归于 D 簇。相反，C 群包括一些鱼类 V_H 基因和两栖类、爬虫类、鸟类和哺乳类的 V_H 基因。A 群和 B 群基因则只含哺乳类和两栖类的基因。另一种种系发育分析将

哺乳类 V_H 基因分成了 3 个亚群(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ),它们可能在基因组中已经共同存在了约 400 000 000 年了。由各种有功能基因分化而来的假基因可能进化得快得多[231]。几乎没有证据能说 V_H 基因家族可归于共同进化,像其他以研究种特异位点的保守性为主的研究提示的那样,生成同源基因[232]。因 IgV 区基因在体细胞高度突变,因此,对这些基因是否直接受阳性选择存在争议[233]。然而,一些结构特征(如密码子偏倚)和一个 CDR 区核苷酸取代的高替换/静寂率值支持进化过程中存在阳性选择[130,234]。

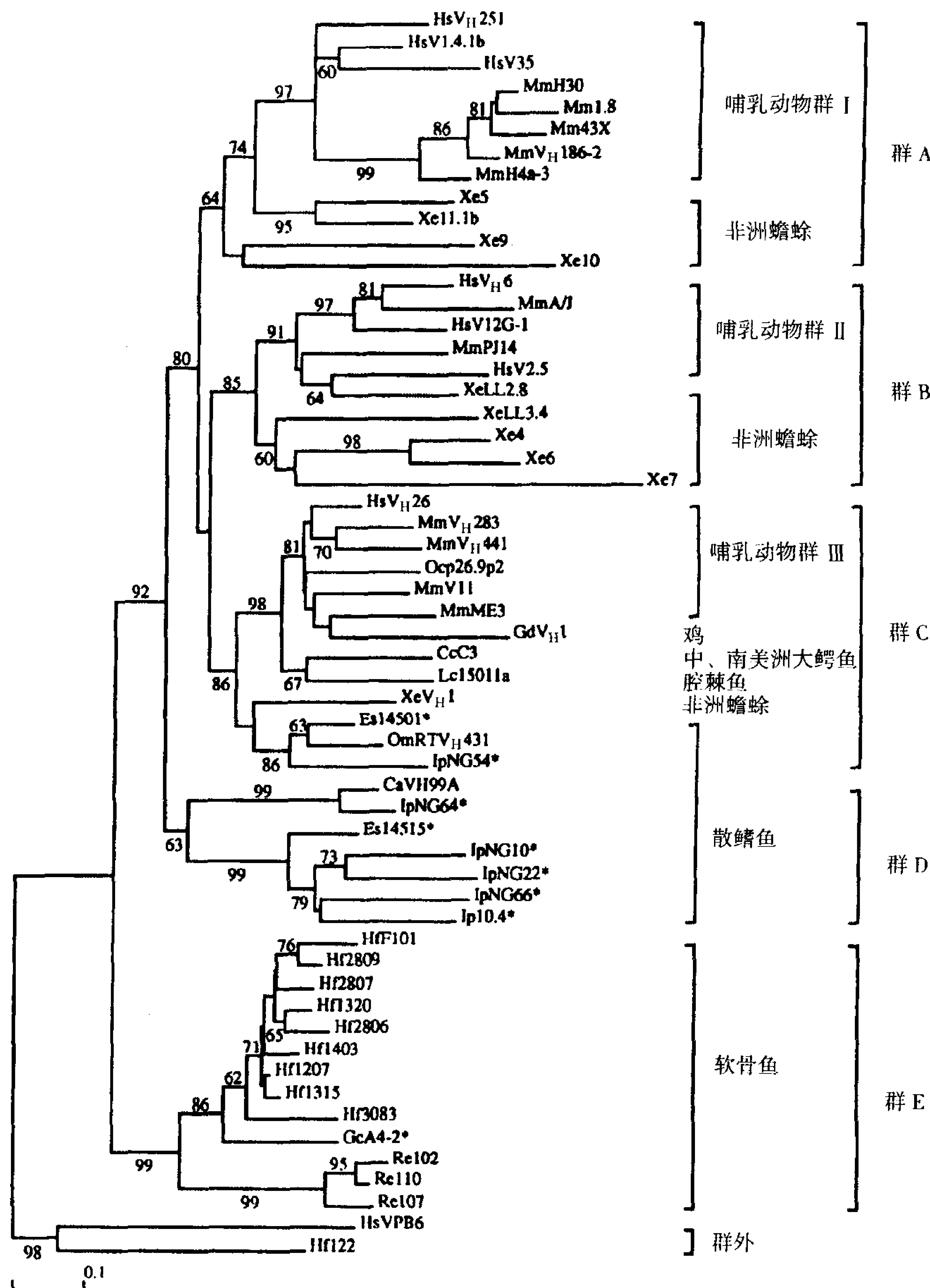


图 18.9　55 个 V_H 和两个 V_L 基因(群外)的进化树。每个内部分支处标记的数字反映了分支序列与稳定传递之间出现差异的可能性。经授权后复制[227]。

总之,在长期的进化过程中脊椎动物似带有一个很大的 V 区基因库,鸟类的 V 区基因库容量有限,似乎是个例外,但就正如下面要讨论的那样,基因的保守性可能可以弥补这种情况[235]。

轻链

在软骨鱼类已经克隆出三型轻链基因[236~238]。1 型较原始,与爪蟾属 δ 链相仿;2 型则与鸟、爪蟾和哺乳

动物的 λ 链相似。2 型轻链家族在软骨鱼类板鳃亚纲,鲨目和鳐目中存在,表明它存在于所有软骨鱼类;3 型更像 κ 链。因此 κ-λ 链的进化分支出可能会很古老[236],能够说明其间过渡阶段的成分还未发现。

多倍轻链分子(分子质量 22~26kDa)已经在鱼类免疫球蛋白检出,可能反映了独特型的多样性。一些种类中,采用单抗的方法检出了多种轻链类分子,比如鲇鱼中的 F 和 G 独特型[239],鳕鱼的 L1 链都与软骨鱼类的 3 型(κ 样)分子同源[240,241]。在鳟鱼中,两种独特型已有记载,其中独特型 L2 与软骨鱼类的 L1 型分子以及爪蟾属的 δ 链更相像[242]。

在爪蟾属的轻链,ρ(κ 样),δ 和 λ 基因都已经分离出[243~245]。在 ρ 基因座,只找到一个 C 基因,它与最丰富的轻链相关。它的 RSS 是 κ 型的,而且 5 个 J 片段彼此非常相像[246]。在哺乳动物中,当其他基因经重排后,可以检出此基因座属 κ 型[247]。应用单抗进行研究表明这三种独特型分子的分子质量分别为 25、27 和 29kDa;而且相应地,二维凝胶显示它们具有较高的异源性;而且,与 IgY 重链相比,它们能与一些轻链独特型关系更密切[248]。对不同生物基因组 DNA 进行 Sourthern 印迹显示 V_L 和 C_L 序列都具多样性。光滑爪蟾(*X. laevis*)的三个 Ig 轻链基因独特型已经克隆出,它们与哺乳动物的 λ 基因相关。这个基因座由六个典型的 V_L 家族组成[245]。在 D 基因座的 J 片段带有一个由两个丝氨酸替换的不同寻常的脱糖环[244]。鳐的主要轻链含有一个链间二硫键,可能是弥补这种生物中重链和轻链间缺少共价连接的功能[249,250]。

爬虫类的两型轻链已检出[251],鸡和火鸡已证实只表达一型轻链结构(图 18.8),这种位点的作用可能和这种情况有关。非生产性重组没检到不表达的等位基因,因为如果它们表达的话,将会给良好的连接造成很大的压力。这种情况会导致第二轻链的冗余[236]。但对于单一轻链,如鸡的单一 J 链与鸟类独特的重组模式类似(参见下一节)[252]。

在哺乳动物(参见第 5、6 章),轻链独特型表达变化很大;鼠类表达的 95% 以上是 κ 链,而反刍动物主要表达 λ 链[253]。

J 链

623

正常情况下,小鼠的 IgM 是作为一个缺乏 J 链的六聚体而合成的,如带有 J 链,则是五聚体[254]。因为对爪蟾属进行的一些研究提示 Ig 六聚体的存在[255,256],所以对 J 链的保守性进行研究,并寻找能与其形成二硫键的半胱氨酸就显得很有意义。在鳐[257]和爪蟾[258]等属,已经检出了与哺乳动物 J 链同源的分子。序列一致性分别为 55% 和 60%。表达水平最高的部位是肠。很可能形成六聚体的那种独特型来自 IgX,因其重链基因在 CH4 区的 Cys 位前含一个终止子,故而能与 J 链反应。[205]

不同物种 Ig 基因的组织形式和作用方式不同

基因的组织

在所有脊椎动物,Ig 基因由分布在染色体上的基因经重排而成。在冷血脊椎动物也已经观察到等位基因排斥现象[259]。

软骨鱼类,鲨鱼(东太虎鲨)的 Ig 重链基因复合体可能由数百个族组成,每个都含有 V、D、J 和 C 片段成分[260];这些成分的重排基本上发生在一个族之内。尽管存在 N 多样性和有时两个 D 片段都参与发生作用,潜在多样性肯定没哺乳动物的多。对东太虎鲨的 Ig 表达人们尚了解不多,而且东太虎鲨缺乏那种高度保守的八聚体也很令人们迷惑。很可能是被一个 TCR 样的启动子替换了。鲨鱼基因座的特异构成提示与鼠基因座具有相同的排除机制。同时,几个 C_L 也共存于同一条染色体上。

624

硬骨鱼,蛙,和哺乳类动物的 Ig 重链基因座的结构非常相似[182,262,263]。V_H 基因的多个家族,每个都含有许多功能明显不同的基因成分(1~30 个),已经从一些基因组 D 和 J 片段成分中分离出了。结合重排的可能性明显会比鲨鱼重链基因座通过簇型组织产生的多样性要高得多。

轻链基因组织形式变化较多。软骨鱼类板鳃亚纲的组织形式一样,都是成簇组织的,因为重链不含 D

片段。从东太虎鲨中分离出的原始型的软骨鱼类 Ig 轻链Ⅰ型基因成簇组织,其内 V、J 和 C 紧密连接。生殖系连接在一起的基因(重组前),首先发现于软骨鱼类的重链基因,也存在于轻链基因[237]。硬骨鱼的轻链簇型与鲨鱼[183,240]和哺乳动物的 λ 链很相似(图 18.8)。软骨鱼系(鲟鱼)的轻链组织形式很类似于哺乳动物的 κ 链,这表明在硬骨鱼类和软骨鱼类的成簇组织形式是各自独立发展起来的[264]。在爪蟾属中[265],似乎存在一些据认为是来自一个家族的多个 V_ρ 片段、5 个 J 片段和一个独立的 C 片段[244,246]。

在一些情况下,同一个基因可以编码不同的 Ig,比如鸭子[266]和骆驼[267]中的 IgY 基因座在经选择性剪切后即可如此。现已表明,鸟类 IgY 的长和短两种形式相应地与人的 IgE 和 IgG 等价[204,261]。

B 细胞分化

在不同的脊椎动物中,B 细胞发育过程中的重排过程遵循不同的机制。

在爪蟾属中[265],22℃时,V_H 基因座的重排发生于受精后第 5 天左右,并且,9 天之内,所有的 V_H 都要发挥作用。V_H1 最先,继而是 V_H3,V_H 片段的 2、6、9 和 10 在第 9~10 天开始重排,而 5、7、8 和 11 等在第 13 天开始重排。

继而发生 V_L 的重排:ρ 和 σ 基因座。ρ 在第 7 天开始重排,也即是在 V_H 重排的两天之后,类似于哺乳动物中的情况。在此早期阶段,这些细胞分布于肝,在那里它们的数目从 0 增加到 500。在 5 天龄的幼蟾中,可检出尚未发生轻链重排的前 B 细胞[268]。后来,重排似乎停止于变态期,这一点可以由前 B 细胞的低水平和淋巴结系统的第二生发中心的 RAG 再表达来提示。RAG 表达于成人,这一点可以由 Northern 印迹以及分离环化切除 DNA 重排正在进行的一种标记来表示[269]。

第 12 天以前,淋巴器官中仅胸腺可见。在第 12 天,脾开始显现,并开始具有应答抗原的能力[270]。至此尚未发生选择现象,编码外/框内区的比率(2:1)可以提示。第 12 天过后,这种比率降为 1:1,也即是说,重组经过了选择。第 10~12 天的 cDNA(这期间 B 细胞数从 80 增加到 500)的量并不多,显示似乎不发生克隆选择,而且每个细胞都含有所有这些序列。幼蛙中,RAG-1 和 RAG-2 的表达水平在胸腺中较高,在肝和脾中次之,在肾中就更少了。在成蛙中,胸腺和骨髓是表达这两个基因的主要场所[129]。在骨髓中的表达以及在骨髓中检出重组环[269]表明重组现象的发生并不像鸟类那样仅局限于早期,而是遍及整个生命历程。蝌蚪的重排与哺乳动物的重排一样[227],以 N 多样性的缺失为其特点,而且 CDR3 较小[271],这或可有助于解释幼蛙和成蛙之间在抗体多样性和反应强度上的差异[270,272]。

在鸟的胚胎期,将生成前 B 细胞的前囊干细胞形成囊滤泡(约有 10 000 个滤泡)。每个体内这样的滤泡将会生成一群 IgM^+ 的细胞。孵化后三周,囊细胞去向外周,B 细胞也不再从多能干细胞生发而来[273]。这样,鸡的一生仅发生 2×10^4 次有功能重排。Ig 基因的重排发生在极有限的一段时间内,可能是在法氏囊克隆形成的早期(孵化中第 8~9 天)。这就形成了一个 IgM^+ 的细胞池,鸟可以在一生中不断更新 B 细胞池。尽管普通的 Ig 基因座的结构与蛙和哺乳类的相似,只发生一次重排,因在每一个等位基因中只有一个有功能的 V_L 或 V_H 片段。在囊发育过程中重链通过一种称作超转换的机制产生了多样性,其中,一些假基因作用类似给体(25ψL 和近 80ψH),而独特的重排的基因作为受体[226,252,274,275]。重链的情况更复杂,因其 D 片段更多[226]。在种系发育过程中,生殖重排的选择与单一 D 片段读框的选择并行,表明这些的产生原因是 D-D 连接。这就决定了长片段的 DNA 可以通过基因转换而进一步多样化。超转换机制也影响 D 片段,因为大多数作为给体的假基因都是融合的 VD 片段[226]。在非哺乳动物种类中,没发现前 B 受体基因 VpreB 和 λ5 的同源分子的存在(参见第 6 章以了解其在哺乳动物中的作用)。

在哺乳动物中,其分子的多样性机制也是多样的。兔子的重链基因座,与鸡的一样,许多的外周 B 细胞在发育起始先进行单一的 V_H 链的重排。在其阑尾的发育的过程中,通过采用上游片段作为给体进行重排体现多样性[276]。在反刍动物中,理想的派尔集合淋巴结(IPP)是一种囊样原始 B 细胞器官。尽管囊和绵羊的 IPP 显示形态上的一致性,它们产生多样性的机制不同:鸡是转换,而绵羊的则是超突变[277]。随着资料的积累,B 细胞发育可以根据其不同的功能形式划分为不同的类群。兔、牛、猪和鸡,与鱼、两栖类、爬虫类和大

多数哺乳动物不同，它们只有一个 V_H 家族，其中只有部分是有功能的(有时只有一个是有功能的)。前一类动物通过生命早期后体腔滤泡的基因转换，而不是终生在骨髓进行的那种，来形成抗体的多样性。它们也似乎缺乏 IgD，因此，IgD 可能在一些哺乳动物群中发挥着促进抗体多样化的作用[278]。在鱼类检出了一个 IgD 的同源物，因此研究鱼类的多样性识别机制将会很有趣[86]。

总之，所有有颌类动物，它们的潜在抗体结合性位点库是很大的。并不是所有的物种都采用连接组合的不同来增加多样性，因它们的基因结构不允许，但所有的物种共享 VDJ 片段，以便在 B 细胞的发生发育过程中形成功能性 Ig 基因，而且这种基因的表达也需要经过明显的体细胞突变。淋巴小结的组成成分和 Ig 基因的共进化问题值得注意。可能是复制或多倍体引起，这据认为是分化过程中的事件，可能会带来淋巴细胞的问题。例如，如果淋巴细胞数目太少不足以表达新的多倍体 V_H 的潜在多样性怎么办？这并不是一个难遇的问题，比如，蛙类如 *X. ruwenzoriensi* 的多倍体个体体形较小，而且其淋巴细胞数目也比二倍体对照组要少[279]。多倍体现象并不仅见于两栖类，大西洋大马哈鱼含有两个独立的 IgM 基因座，它是一种近四倍体动物[280]。

625

免疫应答中抗体多样性的实际水平：体细胞突变

潜在的多样性总是超过淋巴细胞的表达能力。因此，我们必须注意鉴别潜在的能力和抗体真实的水平。

非哺乳类脊椎动物的抗体多样性水平较低，而且研究方法也是间接的形态学研究，免疫应答过程中的亲和力检测以及用同步电泳的方法对抗原结合片段的计数和独特型分析等。哺乳动物中抗体应答的突变被认为是对能产生高亲和力的抗体的 B 细胞克隆的选择之后，而不是早先的选择。因此，突变形成基础水平的抗体多样性。

无颌类

盲鳗和八目鳗能对绵羊红细胞、KLH、细菌噬菌体和布鲁氏菌、人红细胞[185]等产生体液免疫应答。对链球菌 A 群抗原，盲鳗抗体识别的主要是鼠李糖，而哺乳动物识别的主要是 *N*-氨基已糖部分[281]。这种抗体后来转变成补体的 C3 成分[262]。C3 旁路途径很早以前就在环口动物门中发现了，但对无颌类生物是否具有 Ig 尚不清楚。然而，它们的确带有淋巴细胞和浆细胞[284~286]。

有颌类

软骨鱼系

以 2 型布鲁氏菌和 p - azobenzenearsonate 免疫过后，东太虎鲨可以产生一次低亲和力的抗体应答，这种情况在受检个体中差异很小，并且在再次免疫时也没有明显改变[287,288]。这表明鲨鱼的抗体异源性水平较低；从不同个体中分离的轻链变化有限，其主链带有独特的等同位点[289]。铰口鲨(*Ginglymostoma cirratum*)，以热灭活的 A 型链球菌疫苗进行免疫，产生的抗体通过凝胶电泳显示：6 个远系繁殖的个体的电泳形势各个不同[289]。然而，和在东太虎鲨中一样，轻链的多样性并不在再次免疫后增多。在铰口鲨属中，抗体结合配体的异源性包括分子内在结构水平的异源性[184,290]。这种异源性或许应该根据这个物种的 IgM 基因座的组织形式而进行重新考虑，在 IgM，没有独特型清除现象。或许，产生的是嵌合抗体分子。

软骨鱼系独特的 V 基因家族拥有 100 ~ 200 个成员[216,291]。这种大量的同源性阻碍了体细胞突变的研究进程，直到在鲨鱼发现了一个独特的 V_H 系基因[292]。鲨鱼中这个基因的突变率要比爪蟾属中的高一点。纯粹的体细胞突变，表达时连接在一起的 V_L 基因，也可见于另外一种软骨鱼类，鳐[293]，但是，传统的、重排的 V 片段要使用得多得多[294]。突变率可以计算，但是没有发现与免疫应答之间存在联系。突变的频率和形式并不代表高的体细胞突变率。因此，体细胞突变优先于将各个相关的基因片段组合起来的多样性形成[292]。

因为在 NAR 这里只有一个 V 基因家族，含有 4 个基因，所以可以估计突变的发生情况，但是，和鲨鱼中对 IgM 的研究一样，进行的是随机 CDNA 分析。突变的频率约为爪蟾和角鲨中 Ig 突变率的 10 倍，比起多数哺乳动物，突变率也要高得多。因为突变的高发生率且许多基因都是相邻的。所以很难为其建立一种确定形式，一些 cDNA 可能含有一些片段，这些片段可能来自其他基因系列的基因座，表明 NAR 基因会发生转

变。至今尚不知道 NAR 基因是先多样化形成一个抗体库呢还是通过接触抗原以后发生突变而致[195]。

硬骨鱼系

鲤鱼的抗 DNP 应答含有的 IgM 在 IEF 中 pH 值介于 4～6.4 之间。在每个个体中，IEF 抗原结合键的数目较少(最多为 23)，而且远系个体间仅存在很小的变异[288,295～297]。对 NP 存在高水平的天然抗体[298]，但是其亲和力非常低。它们可以占到所有抗体总量的 11%。作为一个规律，在鱼类中没有检测到亲和力变化现象，尽管在鳟鱼可以见到朝较好方向变化的改变[299]。鳟鱼的抗 TNP 抗体的亲和力轻微增加应归因于对现有较小群体抗体的选择或体细胞突变[300]。在自身受精的或母系鳟鱼，限制性的遗传异源性可能对个体间免疫应答的抗体变异度影响更为明显。在鲶鱼，外周血白细胞可以对胸腺依赖抗原和非胸腺依赖抗原都能产生很强的初级或次级应答，不仅在体内如此，体外实验也出现同样的结果[302]。对这些抗 TNP 抗体的等偏差分析这些抗体的亲和力显示 2.0×10^6(L/mol)。轻链的用途可以在应答过程中有所变化。在初次应答以后，很快产生近 20% 的 G 型轻链(约两周)，约 90% 后面产生的抗体带的是 F 独特型(三周)[304]。高水平的天然抗体经常被发现，在有些情况下，这与抵抗病毒感染有关[305]。大量的研究着眼于研制疫苗。鲶鱼的 B 细胞、巨噬细胞和 T 细胞的容易获得，可有助于对抗体体外生产和抗体调节的研究。

626

两栖纲

有尾目表达的抗体库在 40 天达到高峰，都是 IgM 型的，尽管血清中也含有 IgY[309]。它们对胸腺依赖性抗原作用不强，这可能是因为缺少 T 细胞的帮助。无尾目幼蛙蛙可以特异地与多种抗原反应，并表现出一种模式的抗 DNP IgM 反应。不同的抗 DNP 抗体数目不超过 40，在哺乳类则有 500 种。再次反应时，应答的强度在首次反应的 10 倍以上，在两周而不是 3 周就达到了高峰。亲和力没有明显的改变，抗体类型同样变化不大[310]。在爪蟾属，蛋白序列异源性很低。抗 DNP，甚至非免疫相关球蛋白，在重链或是轻链的 N 端的 V 区很容易产生容易解释的序列。爪蟾属的 cDNA 序列与此不符，它们有很强的序列异源性[312,313]。同种的爪蟾属可以对 DNP、异源 RBC 或磷脂等产生同样的具有相同或相似 IEF 型或独特型的抗体，而远系的个体产生的抗体则不同。IEF 型和独特型都是可以遗传的，表明这种多样性主要来自生殖基因的表达而与体细胞突变关系不大[314,315]。因此，在幼蛙和成蛙，体细胞突变是后续于抗原特异免疫应答亲和力成熟的高峰。V_H 基因，和哺乳类的 V_H 基因一样，带有一些基序(A/G G C/T A/T)，有报道称是高突变区[220,317]。在 V_H1 家族的 32 个成员中[318]，仅有 5 个的表达是明显放大了的，表明免疫作用是受到一定的调节的。仅检测到很低水平的突变率。在 CDR1 和 CDR2 区的突变率也不高，CDR3 区则没有[313]。尽管突变的频率比起哺乳动物的 B 细胞要低得多，当人们考虑突变率的时候就将突变率等同起来了。以淋巴瘤细胞的发生为基础[319]，体细胞突变率很等同于哺乳动物细胞的。估计的频率——$2.5\times10^{-4}\sim4.1\times10^{-5}$/bp/细胞一代——仅比高免疫力小鼠的水平低 4 到 7 成。因此，这表明并不是缺少变化，也不是低异源性的原因，而且低亲和力看来可能是因为缺乏对这些突变体的筛选。的确，因为 CDR 区相当低水平的对无意基因的替换和高水平的 GC/AT 突变替换率，因此，有人认为并不存在什么机制来对这些突变体进行筛选，这可能也与在爪蟾属不存在生发中心有关。GC 偏差现象同样可见于鲨鱼[269,320]。

总之，如果把超突变、cDNA 异源性和型显著性等资料汇总起来考虑，或许我们可以发现一些关系。在新的修饰过的选择模式下，发育较慢的克隆被产生较早的抗体清除掉了。

爬行纲、鸟纲和哺乳纲

在爬行纲中，抗体的亲和力没有增强的现象，同时没有 IEF 的同型分子表明这种生物的异源性较低[321,322]。序列分析和对轻链的二维凝胶电泳显示鸡的异源性较小鼠的差[323,324]。鸡的抗 DNP 和抗荧光素抗体的亲和力增加不明显再次证实了这种低水平的异源性。在免疫发生以后，没有明显的改变，即使在多次免疫刺激后，你等上一年也是如此[325,327]。仅在使用弗氏佐剂后，才可以检测到低水平的高亲和力抗体的出现。已经发现在免疫刺激后，生发中心进行的高亲和力转变 Ig 基因的体细胞突变[328]。

在兔子中，突变现象很明显。或许是很强的突变能力扩展了由转变而生成的抗体库，或是在免疫应答过程中转变现象仍在继续[329]。认为鸡相当低水平的亲和力转变是因为基因转变和体细胞突变之间的一个平衡就很没有说服力啦。的确，DNA 大片段的转变看来不是理想的调节免疫应答的机制。同样的情况可能对

兔子也是适合的,因为兔子的基因转变和基因突变现象很明显[329]。区别可能在分化过程中,哪种机制起的作用大一点儿。在哺乳动物,可以观察到很明显的变异:从有袋类生物不存在再次免疫应答现象[330]到eutherian的抗体亲和力可以增加1000倍以上,但是这种偏差发生的机制还没有明确[269]。

总之,尽管所有的脊椎动物具有很强的生成多样性抗体的能力,仅有恒温脊椎动物,甚至仅有哺乳动物完全发挥了这种能力。为何如此尚不清楚。可能对冷血脊椎动物免疫系统的压力没有其他脊椎动物那么强,因为很强的内在免疫和它们的淋巴系统结构的特殊性不适合选择体细胞突变。

主要组织相容性复合体(MHC)

脊椎动物的MHC和T细胞功能

T细胞可以通过其他细胞呈递的与MHCⅠ类或Ⅱ类分子结合的小肽段来区分识别自己和非己,也就是MHC限制[331,332]。在小鼠发现的T细胞–抗原呈递细胞(APC)合作,通过专职APC呈递处理抗原,和T细胞的胸腺内发育的机制普遍存在于几乎所有脊椎动物(表18.2)。至今尚未在软骨鱼系发现MHC限制的T细胞应答现象,但是对所辨认出的MHCⅠ类和Ⅱ类分子[333~335]及TCR基因[161]重排现象表明功能分析可能可以揭示MHC限制性可能至少在一些适应性免疫应答中存在。同样,蝾螈的免疫应答功能很弱,而且生化证据显示美西螈的MHC多态性较弱(表18.2)[309,336]。然而,因为这种生物的MHC类基因刚分离成功[337,338],所 627 以还有待验证。实际上,初步的分析表明Ⅰ类分子的基因序列的异源性要比预期的大的多[339]。

高度的序列差异而结构趋同

Ⅰ类分子[340]和Ⅱ类分子[341]的三维结构基本一致。两个远膜端由两条α螺旋在8个β片层的平台上形成PBR结构,近膜端是IgSF C1样的结构。尽管在脊椎动物中Ⅰ类和Ⅱ类分子的序列一致性差异很大,4个胞外结构域的组织形式和其他的一些保守的特性可能可以在一些祖先基因中存在(147,342)。在Ⅰ类分子中,在PBR的α2,IgSF的α3区和微球蛋白区存在二硫键,但不存在于PBR的α1结构域(图18.10)[343,344]。Ⅱ类分子的IgSF近膜端α2和β2结构域带有经典的二硫键,它的β1区,与Ⅰ类分子的α2区一样,带有一个域内二硫键。Ⅱ类分子的α1区,和Ⅰ类分子的α1区一样,缺少二硫键,只在硬骨鱼系中[343],带有类似Ⅱ类分子DM区样的结构[344,345],这和真正的Ⅱ类基因一样古老(图18.11)。Ⅰ类和Ⅱ类分子的胞外区外显子/内含子结构同样很保守,但是研究显示一些硬骨鱼系最近才在它的编码IgSF α2区的外显子中插入了一个内含子[346]。

Ⅰ类基因的其他保守特性(图18.10;表18.2)还包括在α1和α2结构域之间的一个糖酰化位点、一个Tyγ和胞质区存在1~3个Ser(它在哺乳动物可以被磷酸化),以及同时存在一些较为稳定的离子键[347,348]。Ⅱ类分子带有2个DM结构,而Ⅰ类分子只有一个;保守位点在于Ⅱ类分子的α和β跨膜/胞质区可能有利于双聚化(图18.10)[349]。总之,因为因为不同生物中MHC基因的序列一致性非常低,这些保守的特性可能对维持这些分子的结构和功能是非常重要的。 628

经典的和非经典的Ⅰ类和Ⅱ类分子

Ⅰa类分子(经典的)和Ⅰb类分子(非经典的)的基因可以在几乎所有脊椎动物主要群体中找到。Ⅰa类基因被定义为广泛存在的,它们正好位于MHC复合体内,而且具有多态性[342,350]。另外,Ⅰa类分子编码生成的蛋白几乎在两端的PBR区都有8个保守的位点;它们与连接的肽段原子间的相互作用被压缩到8到9个位点[351];这种特性可以使我们很好地从两栖类和鱼类中将Ⅰa类基因和Ⅰb类基因鉴别开来[352]。因此,肽段间的紧密连接,一种Ⅰa类分子形成变化的源泉,允许从内质网到细胞表面的转移,可能是进化的一个保守特性。

至今发现,Ⅰa类分子/Ⅰb类分子的这种区别存在于所有生物种类;1~3种具有多态性的Ⅰa类基因广泛地表达在所有生物;另外,多态性较差的或单一型的基因(Ⅰb)的表达具有组织特异性[342]。那么,为什么Ⅰb类基因可以长期发挥作用而不退化消失呢[353,354]?在哺乳动物中,Ⅰb类基因,比如CD1[355,356]和M3[357]

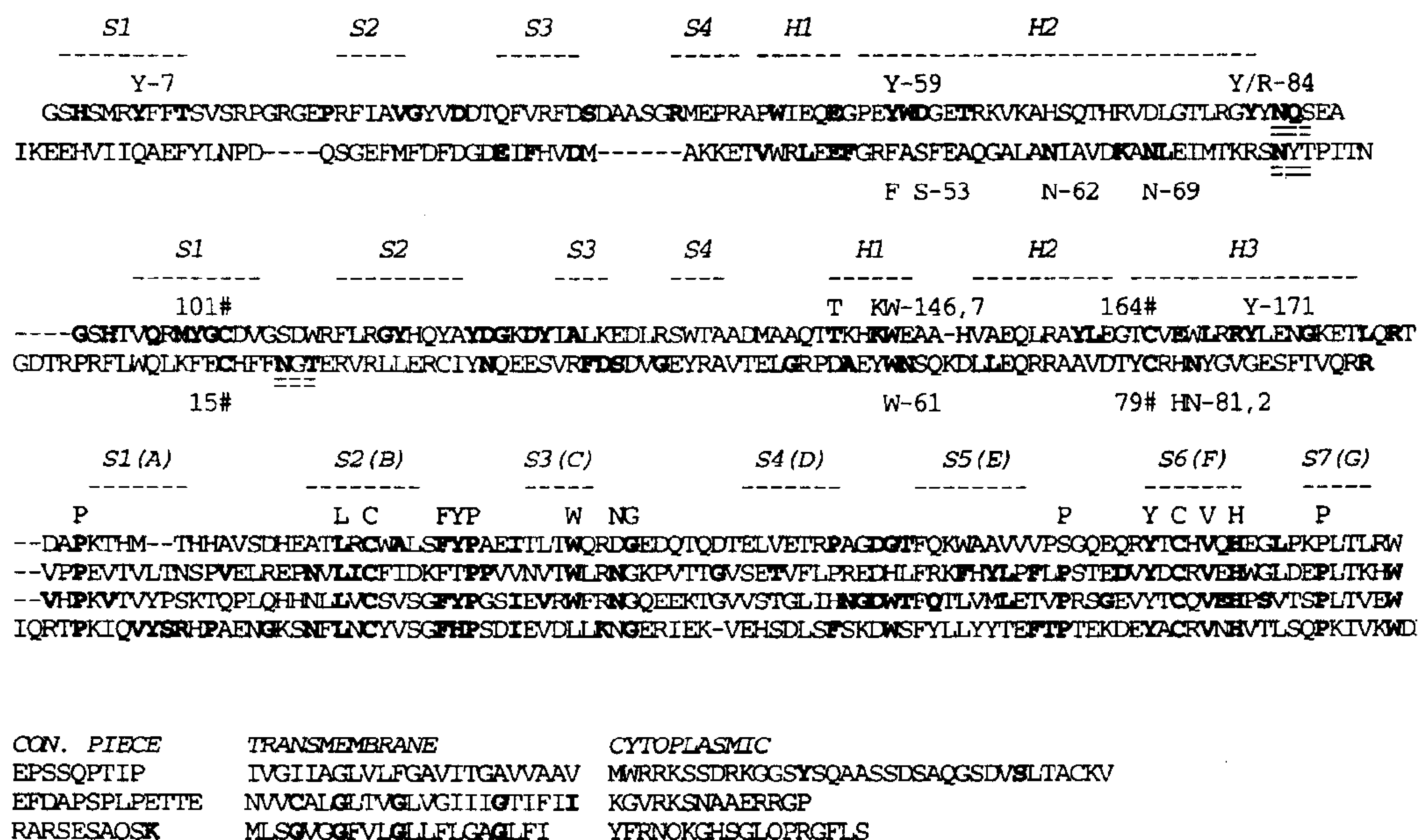


图 18.10 在所有脊椎动物中，经典的Ⅰ型和Ⅱ型分子中普遍保守的氨基酸残基。所显示的是 HLA-A2 和 DR1 分子，因为其胞外区晶体结构已经建立。醒目显示的和阴影标记的是普遍存在于所有脊椎动物的经典的Ⅰ型和Ⅱ型分子中的氨基酸残基。对比上方显示的氨基酸残基比较的是Ⅰ型分子 PBR a1 和 PBR a2，对比分析下方显示的是Ⅱ型的 PBR a1 和 b1 的非多态性残基可以结合到所捕获肽段主链的原子上去。在 Ig 结构域，对比分析上方显示的是在所有 C1 型结构域中保守的氨基酸残基，并至少可以见于一半以上的序列。注意，β_2 微球蛋白仅见于哺乳动物、鸟类和硬骨鱼类。下划双线的残基是保守的糖酰化位点。片段(S)和片段(H)分别显示了 PBR 的结构域，而(S)显示了 IgSF 结构域。PBR 和跨膜区/胞质区中加粗显示的氨基酸残基的功能，参见表 18.3，其他地方首先进行的序列分析。

表 18.2 脊椎动物 MHC 的结构和功能

	功能特征	已经确认的基因和分子
无颌类	移植排斥是慢性的[547]	补体 C3[262,410,414,415][C3 是人体内 MHC 分子的类似物(参见第 19 章图 19.15)]
有颌类 环口纲 软骨鱼系	无 MLR，移植排斥是慢性的[433]	Ⅱα[548]，Ⅱβ[334]，Ⅰ cDNA[335,549]
硬骨鱼系 真骨总目	MLR，移植排斥[440,441,550]，抗原呈递[451,452]，胞内抗原呈递[453]，组织相容性依赖 T-B 相互作用[551]	Ⅱα[343]，Ⅱβ[140,346,552,554]，Ⅰα[390,391,555,556] 和Ⅰβ[140,391,400,552,557] cDNA 和 gDNA 已经在多种生物检出(斑马鱼，鲤鱼，鳟鱼，大马哈鱼，丽鱼科鱼等)β_2 微球蛋白 cDNA 已经在斑马鱼[553]，鲤鱼[399]，鳟鱼[400,401]检出
两栖纲 无尾目	MLR；GVH；CTL；移植排斥；MHC 限制性中 T-B 细胞间的相互作用；在 tadpoles Ⅰα 缺失，在 T 细胞学习中的作用；耐剪切[476,558]；多态性Ⅱ类分子仅见于成熟 T 细胞	Ⅱα[559,560]，Ⅱβ[559~561]，Ⅰα[352,562] 基因和蛋白已经检出，Ⅰβ cDNA[392]，β_2 微球蛋白样分子与Ⅰ类分子共沉淀[367,368,562]；在红细胞上[563]，与Ⅰα相关的分子还有 C4，Bf[385,387]
有尾目	弱MLR；表达的发育调节[336]；低度增生；慢性移植排斥[564]；Ⅰ类分子泛素化[339]	Ⅰa[337]，ⅠβDNA[338]；Ⅱ类分子和Ⅰ类分子的蛋白可以和外源抗血清共沉淀[565]
爬行纲 蜥蜴科	MLR；GVH；CTL[566~568]；移植排斥，但不是正式地和 MHC 相关	Ⅰa cDNA[154]，Ⅰ类，Ⅱ类和Ⅱβ_2m 样蛋白可以和外源抗血清发生共沉淀[565]
鸟纲 鸡形目	MLR；GVH；T-B 相互作用；移植排斥；GVH；切割耐受[569]；T-B 相互作用的 NHC 限制性；多态性[113,570]	Ⅰα[350,388]，Ⅱβ[388]，Ⅱα[571] 和 β_2m[350] cDNA 和蛋白已确认存在。黏粒克隆包含大部分 MHC 和 Rfpy 基因座[388,572,578]。B-G 分子的 cDNA 和基因[336,365,574~576]
哺乳纲 啮齿目	所有的参数首次确定(参见第 8、12 章)	

缩写：MHC，主要组织相容性复合体；MLR，混合淋巴细胞反应；CTL，细胞毒性 T 淋巴细胞；GVH，移植物抗宿主；C3，C4，补体成分。

与Ⅰa类基因不同或互补。还有可能就是Ⅰb类基因被保留下来作为表达分子的储备库,就像在猴子中那样[358]。因为Ⅰa类分子在生物合成时不稳定,它们在免疫应答或在维持体内环境稳定方面可能会发挥其他的功能。比如新生的FC受体,它参与结合跨膜传输IgG[359,360];一种锌指糖蛋白(AZGP1)的功能被认为是传递锌[361]。难道说原先MHC分子的功能并不与抗原呈递相关吗?至今,那些有记载的具有抗原呈递以外功能的分子可能是从具有呈递功能的分子进化而来的[147,362](图18.12)。

Ⅱ类分子也具有一些保守的位点可以结合到肽段的主链原子上去,但是它们都位于沟的内部(图18.10和表18.1)。因此,与肽段上原子的紧密结合发生在Ⅱ类分子PBR的中部[341](图18.10;表18.1),肽在两端都可以突出出来。至今确认的惟一的非经典的Ⅱ类分子是前面提到的DM分子,它没有这样的位点。至今仅从哺乳类生物中克隆出了DM分子,但是它们看来存在与所有带有经典Ⅱ类分子的生物中。

629

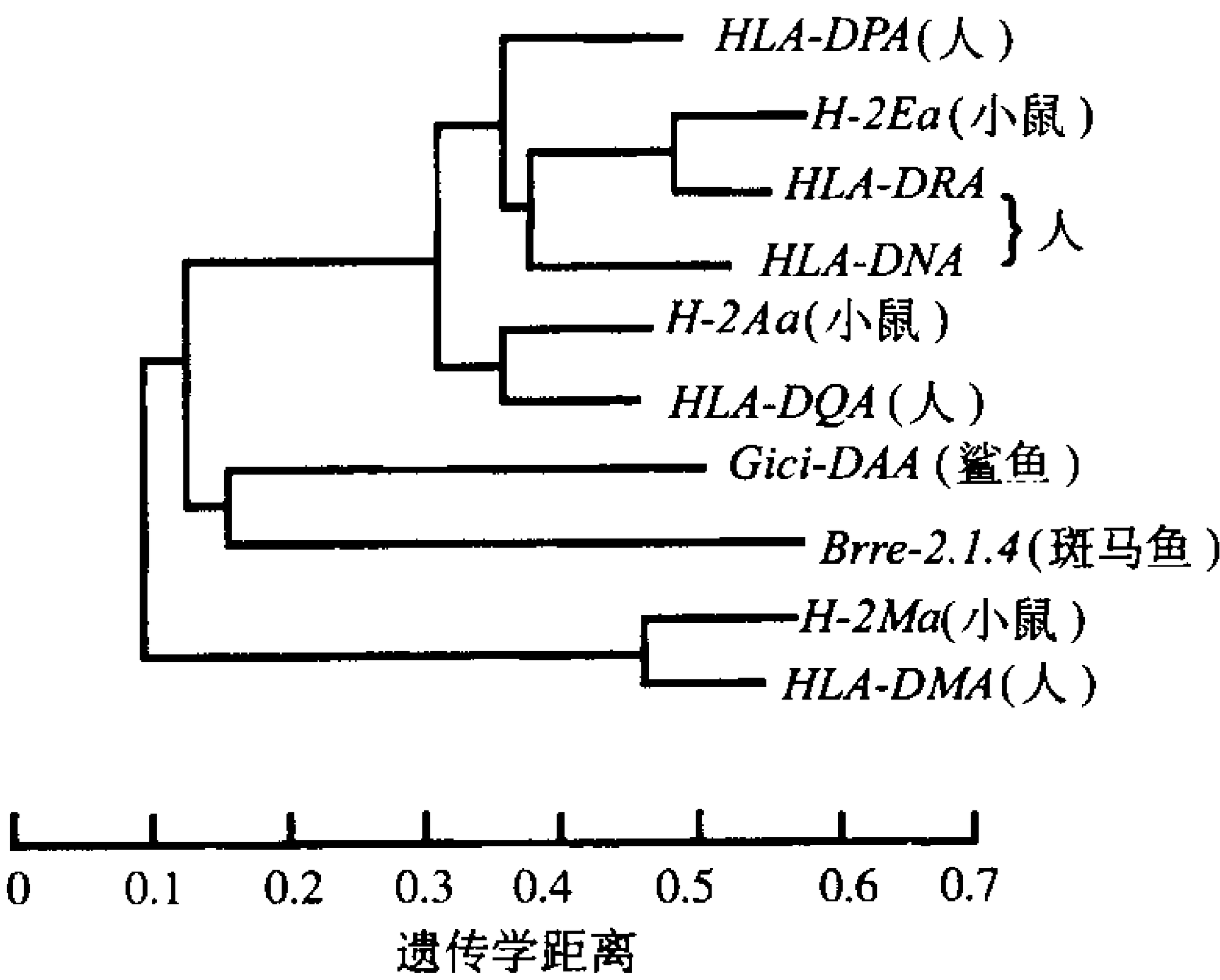


图18.11 多种物种的Ⅱ类分子a2结构域的进化树分析,含小鼠和人的DM分子。注意哺乳动物的DM分子基本上是从根部分支的,表明它们在进化过程早期就已经作为Ⅱ类分子开始出现了。经授权后复制于kasahara等[147]。

表18.3 进化上保守的PBR和TM/Cyt中的Ⅰ类和Ⅱ类分子中的残基的功能

	类	残基
盐键	Ⅰ类	R44-DE61;E56-RK170(接近沟一侧);H93-D119;E166
	Ⅱ类	D_a27(多个物种中结合Ha3的盐键)
糖酰化位点	Ⅰ类	Q8T
	Ⅱ类	Nb19;Tb21
二硫键	两者	N86/Na 78
	两者	C101/Cb15-C164/Cb79
转折	Ⅰ类	P20;G26;G112;G120;G175
	Ⅱ类	Gb45;Gb54
肽段	Ⅰ类	Y7(N端);V25;Y59(N端);Y/R-84(C端);D119;T143(C端);K146(C端)W147(N端);Y159;Y171(N端)
	Ⅱ类	
	两者	Na62;Na69;Nb82 W147/Wb61
胞质内能与Ig样分子相互作用的Ⅰ类分子, Ⅱ类跨膜分子		Y-320(小鼠外星子6,人);5-335(外星子7) Ca195,Ga198,Ga209,Kb198,Gb202,Gb205,Gb209,Gb216
PBR和Ig样区相互作用	Ⅰ类	T10;Y27;V25;D29;Q96;Q115;G120;D122
	Ⅱ类	Ea30
	两者	D119/Nb33;L179/Rb93
未指定的	Ⅰ类	S38,W51,W60,D61,T64,Q87,G91,Q96,M98,Y99,G100,Y113,Y118,D121,FY122,A125,L160,L168,L179,R181
	Ⅱ类	Fa32,Da35,Va42,La45,DEa47,Fa48,Ka67,La70,DNb41,Sb42,Ab58,Nb62,Lb68

注:氨基酸残基的数字标识依赖于HLA-A2[340]、DR1α和β[341]。所应用的序列检测的是小鼠和人[331,350]、鸟[350,388,577]、两栖类[337,352,561,578]、爬虫类、真骨类[343,390,391,399-401,552-556,579-581]和软骨鱼系[333-335,549]中经典的Ⅰ类和Ⅱ型类分子中保守的残基。

经允许修改自参考文献[342]。

图 18.12　经典的(正体)和非经典的(斜体)Ⅰ类分子 a-3 结构域的进化树分析。注意以下几个方面:a.经典的Ⅰ类基因,即使是在哺乳动物之间,也不是同功能体;b.来自同一个祖先基因的一些非经典的基因和经典基因可以存在于同一分类群。例如 H2-M3 和 H-2K、D、L 和 Xela-UAA1 和 XNC 基因;c.另外一些非经典基因的出现早于哺乳动物的出现,例如 Fcγrt 和 CD1。注意在后一种情况,仅有基因 MICA 特性类似于 MHC。(经授权后引自 kasahara 等[362],遗传距离对应于每位点氨基酸替换的数目。)

MHC 基因的多态性

所有脊椎动物中,MHC 是多态性变化最大的区域,无论是等位基因的数目还是等位基因变化的多样性都是如此[331]。除了进化上保守的 PBR 残基(图 18.10 和表 18.3)外,那些与抗原肽结合部位的变化最大。这些残基要经历阳性选择,也就是说,几乎每一个现今研究过的经典的Ⅰ类和Ⅱ类分子,编码这些位点的基因非同一替换

630

要比同一替换多得多[363,364]。物种间的 MHC 变异主要是通过突变、基因转换和选择后重组而获得[147,331]。这与 Ig 基因座的差别形成的机制不同，在 Ig 中，变化主要通过基因表达调控和多样性生成为主，从而引起不同的种类之间基因的多样性。

疾病相关性

尽管人们认为 MHC 的多态性对保护个体不受各种各样的病原体入侵非常重要[331,336]，而且，这也是进化原动力的作用结果，但是很难说某一个特定的位点是与某种疾病的耐受力和(或)易感性是相关的。然而在鸡中，则有疾病和 MHC 之间的明显相关的证据。比如带有 B21 核型的鸡在感染马雷克病病毒时有 95%的存活率，带有其他核型的鸡的抵抗力则差异很大[364]。因为在I类分子的表达和对病毒的抵抗力之间存在着内在的联系，可能是 NK 细胞而不是 T 细胞在发挥保护作用[134,336,366]。为追求商业利润而进行的疾病相关性分析(如鱼类)也成果颇丰。

表达的进化发育

在哺乳类和鸟类，Ⅱ类分子的表达优先于Ⅰ类分子的发育生成[331,336]。在爪蟾属同样是如此，具有免疫能力的幼蟾在 APC，如 B 细胞上高水平表达Ⅱ类分子，而仅在变态期才开始表达低水平的Ⅰa 类分子[367,368]。免疫蛋白酶体成分 lmp7 和各种Ⅰb 类独特型分子的表达水平也较低。有趣的是，幼蟾的皮肤和胃肠等带有可接触外在环境的上皮的器官，共表达Ⅰ类和Ⅱ类分子。据认为这样的表达可以增强幼虫的免疫保护能力，但是Ⅰ类分子的表达应该限制在那些变态期要经历很大形态学变化和维持内在稳定的器官。在变态以后，Ⅱ类分子也改变了它们的分布规律，高水平表达于未被活化的 T 细胞[369,370]。蝾螈的Ⅱ类分子在发育过程中也经历很大的变化，在幼螈表达于 B 细胞，然后扩展到表达在所有的血细胞，包括后来的红细胞[371]。MHC 表达的变化并不与美西螈神奇的变态相关，但是Ⅱ类分子在红细胞中的表达变化则与从幼螈到成螈的变化相关。至今分离的Ⅰ类分子的转录物仅在发育的早期表达，从孵化开始前。

鲤鱼的Ⅰ类和Ⅱ类的转录物在受精后 1 天的胚胎中可以检测出，并在第 14 天达到高峰。然而，预期要出现的Ⅰa 分子直到第 13 周才开始出现，β_2m 在几周前就可以检测出。这可能表明鲤鱼造血系统在早期发育过程中，存在另外的Ⅰ类分子表达现象[372]。

连锁的意义

因为I类分子和II类分子结构上近似，它们在基因水平上就应该是相关的。但是，为什么结构上不相关的I类发展变化中的基因，包括蛋白酶体成分 lmp7 和 lmp2 和 TAP 基因，也可以在哺乳动物 MHC 中找到呢[373,376](图 18.3)？这存在两种可能的解释：它们是早先就存在于 MHC 中的参与加工和呈递作用的基因；再就是它们是被原来的 MHC 吸纳来的并不参与加工和呈递抗原的其他基因[143]。根据在人和小鼠中在对等的染色体上存在相似的 MHC 基因簇的现象，Kasahara 等人提出这样的假说：I类分子、II类分子、蛋白酶体、传递子和III类分子等基因的祖先早就连锁在一起了，甚至在适应性的免疫系统出现之前[377,378](图 18.14；图 18.15)。的确，这些簇中的一些基因在果蝇属和线虫[379,380]就连锁在一起了，而其他的基因，比如 CTX 家族中的 IgSF 成员与其他种类中的类似分子相近[381]。Ohon 提出：在脊椎动物出现早期，1 个或是 2 个基因组的复制可能为免疫系统生成新分子提供了原材料。无论是 Ig/TCR/MHC 还是 lmp/TAP 在鲤鱼和八目鳗都不能区分开，所有这些基因和 Znα_2 糖蛋白可能已经在第 2 轮复制时就已经出现了。因为I类基因可以在两到三个簇中找到，I类样分子可能在进化上优先于II类分子。的确，由编码决定的对I类分子的 NK 样识别机制可能在适应性免疫系统出现之前就已经存在了。然而，这些受体中没有一个带有，能使它看起来像是祖先免疫受体的 IgV 区样结构。

鸟纲[336,365]、真骨类[383]或两栖纲生物[384]，不像哺乳纲生物那样，lmp 和 TAP 基因是和Ⅰ类基因连锁在一起的，而不是和Ⅱ类基因联系在一起。这种情形在斑马鱼中最为明显，因为Ⅰ类基因/lmp/TAP 和Ⅱ类基因分别位于不同的染色体。原来的模型显示：Ⅲ类分子基因区，原来曾称作“不相关位点区”[331]，是插进 MHC 区的，而不是后来通过进化生成的，但是 B 因子、C4 和 HSP70 都位于爪蟾属的 MHC，因此，将哺乳类和两栖类生物的共同祖先中Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ三类分子的相关性定在了 300 000 ~ 350 000 年以前。另外，假如 Kasahara 的解释

是正确的[377,378]，可以考虑Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ三类分子的相关性出现早于有颌类生物的出现，因此出现于两栖类就不足为奇了。总之，这些资料表明，硬骨鱼类中的Ⅰ类和Ⅱ类甚至Ⅲ类分子的不相关性是一个推论来的结果。对此，对软骨鱼类进行相关性分析将会解开好多疑团。

鸡的 MHC，B 复合体，位于一个微染色体上，内含子大小和基因间距离都非常小(图 18.13)。实际上，鸡的Ⅰ类基因被发现是因为它们出现在含有ⅡB 类基因的同一个质粒克隆中[388]。至今，Ⅰa 类、Ⅱ类(含 DM)和 TAP 基因都位于 MHC，但是没有发现蛋白酶体基因的存在，而且几乎所有的Ⅲ类基因都被清除掉了，C4 的一个片段除外。尽管几乎所有的Ⅲ类基因都可能会在其他染色体上找到[389]，lmp2/7 可能在基因组中是不存在的。的确，结合在鸡Ⅰ类分子上的肽有时以谷氨酸或是天冬氨酸结尾，这在被含有 lmp2 和 lmp7 的哺乳类生物的蛋白酶溶解后就很少存在了[365]。为解释疾病和特殊核型的相关性，Kaufman 说鸡带有一个最小部分的基本 MHC，只允许那些必需的基因存在。

632

图 18.13　人、鸡、爪蟾，斑马鱼间 MHC 分子关系作图分析。基因间的联系的远近并不是以基因的大小衡量，而是主要和基因片段的排列顺序相关，爪蟾属例外，因为在这种生物，不要说基因片段的顺序，就是基因的具体结构还不清楚。本图中只显示了文中讨论过的基因。鸡的 MHC 基因结构中的较粗的斜线指示的是位于同一染色体上而不是同一基因群的基因。在爪蟾属和斑马鱼中的分段显示该区域没有相关的基因。黑盒和带有向前斜线的盒子分别指示较高和很低水平表达的Ⅰa类基因。图来源于 Trowsdale(人[143])、Kaufman(鸡[336,365,579])、Flajnik(爪蟾属[382])和 Klein。

总之，在研究过的所有非哺乳动物中，经典的Ⅰ类基因多出现在 TAP 和 lmp 附近，表明加工和呈递抗原的基因原来是位于同一个簇内[147,383]。尽管硬骨鱼类在约 100,000 年前走上了另外的道路，所有生物中Ⅰ类基因都存在很强的相关性[390,391]。在哺乳动物中，Ⅰ类基因区并不与 lmp/TAP 相关，并且非常不稳定[147,383]。同样的Ⅰ类基因不稳定性可以扩展到爪蟾属中的非 MHC 样Ⅰb 基因[362,392,393]。

对少数表达的Ⅰ类和Ⅱ类基因的选择

仅有一些小片段Ⅰ类和Ⅱ类基因在基因组中是保守的，对每个核型来说一般是 1～3 个，其中一个表达水平最高[394]。在多倍体生物爪蟾属中，从 2～12 倍体生物中检测到的Ⅰ类和Ⅱ类基因很稳定(每个倍体基因组中，Ⅰ类基因 1 个，Ⅱ类基因 2～3 个[279,395])。MHC 基因的功能丧失既不马上发生也不影响生物的生存，因为实验培育的多倍体生物表达多倍的 MHC 基因[395]。与诸如遗传因素密度(呈递某一特定抗原肽的呈递分子的数目)和耐受性(要求 T 细胞对带有自身抗原肽的Ⅰ/Ⅱ类等位基因编码蛋白耐受[279,396])等选择压力的对抗应是进行过程中 MHC 基因保持稳定低数目的原因。

Ⅰ类和Ⅱ类分子结构相似和特定数目基因表达的保守性并不意味着 MHC 在进化过程中是稳定的。尽管Ⅰa类分子在多种生物中存在一定的共同的特征,这些基因即使在非常相近的种类之间也不是相同的[50](图 18.14)。Ⅱ类基因较为稳定,但同样相同基因在脊椎动物间很难检测到[147]。可能在与病原体作斗争的过程中,Ⅰ类和Ⅱ 类基因很大程度的扩增了,并受限于进化时间以便提高少数表达基因的多样性。然而,上述经典的特征也被选择保留了下来,并仍为 MHC 行使其功能所用,比如与肽和 TCR 的相互作用[394]。

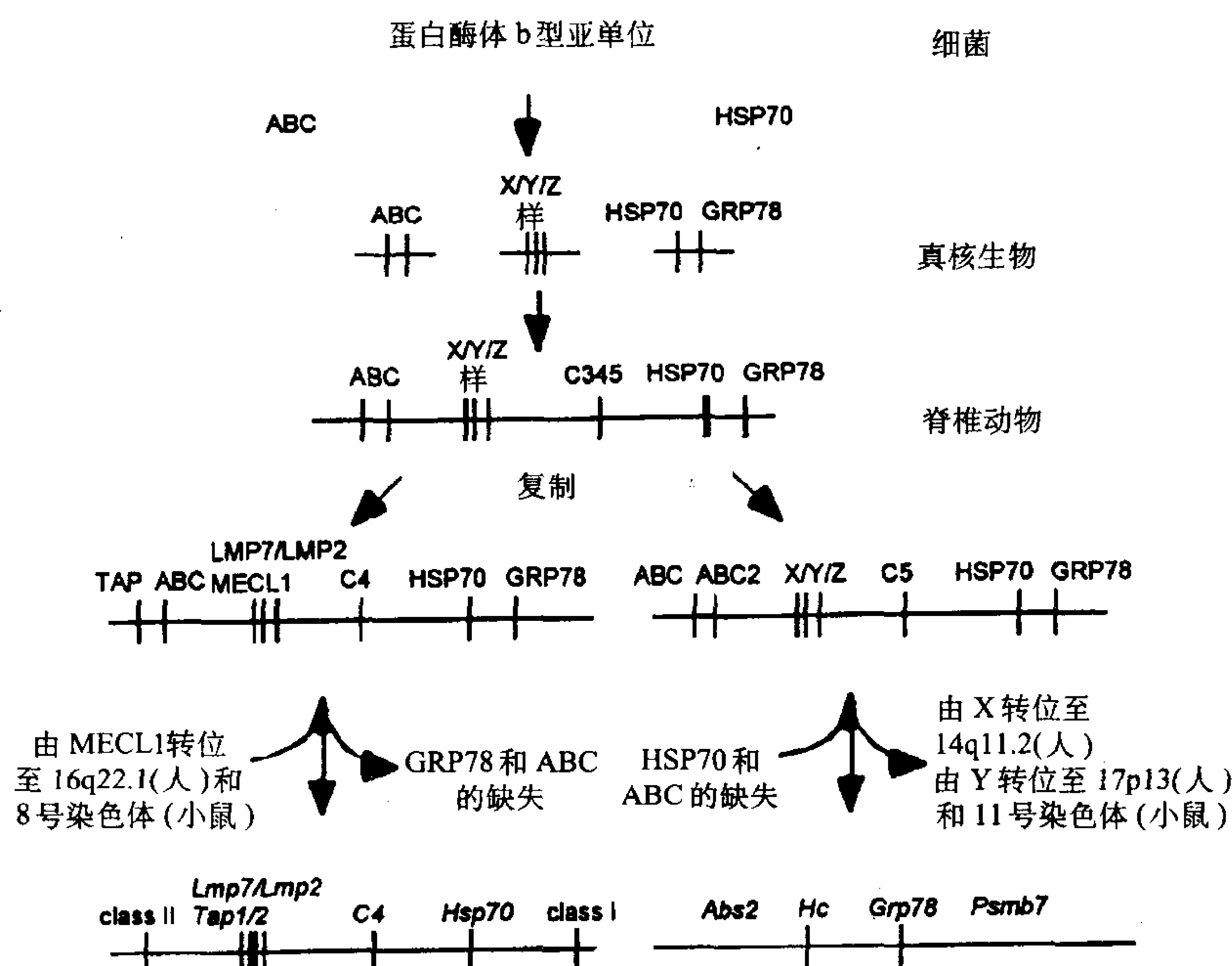


图 18.14 Kasahara 关于 MHC 进化生成的复制阻断模型[378]。前文中没有介绍到的基因:NECL1;三个与 MHC 不相关的蛋白酶体成分[592];X,Y,Z 分别组成型表达构成免疫蛋白酶体成分 lmp2,MECL1 和?[378]。ABC,与 ATP 结合盒子多药抗性蛋白相关的一类分子,TAP 是其中一个成员;GRP78,位于内质网组成型表达的 HSP70[591]。(经授权后引用。)

$β_2$ 微球蛋白

$β_2$ 微球蛋白是被确认的第二个 IgSF 分子。最初发现在肾脏病人的尿中含有很高水平的这种蛋白[397]。它几乎与所有Ⅰ类分子相关(人 M I C 蛋白除外)[398]。除哺乳动物外,$β_2$ 微球蛋白还已经在硬骨鱼系(鲤鱼[399]、鳟[400]和斑马鱼[401])和鸟类(鸡和火鸡[350])中克隆出。所有这些 $β_2$ 微球蛋白的基因都是单拷贝的,并不位于 MHC,而鳟例外,在这种生物,$β_2$ 微球蛋白是多倍复制的[400]。$β_2$ 微球蛋白由胸腺表达,其功能可能是对前 T 细胞起趋化诱导作用[402],但是 $β_2$ 微球蛋白基因敲除小鼠体内的胸腺细胞数目正常[403]。

补体系统

补体系统提供一种至关重要的非适应性免疫功能,并在适应性免疫应答调节中发挥着重要的作用[404]。因此,对补体系统进行进化研究可以分清哪些成分是基础的,这个系统最重要的功能是什么[405,406]。补体系统具有三大基本功能:包装病原体以便吞噬细胞进行吞噬(调理作用);通过刺激平滑肌收缩,扩张血管和对趋化白细胞以引发炎症反应;以在其生物膜表面打孔的方式融破细胞(图 18.16,参见第 29 章)。

在补体系统中,处于中心地位的是 C3,至今惟一认识的能与生物的外表发生共价连接的免疫识别分子(通过硫酯键)。C3 可能是现今发现的功能最为复杂的一种蛋白质分子,可以与另外至少 20 种以上的蛋白

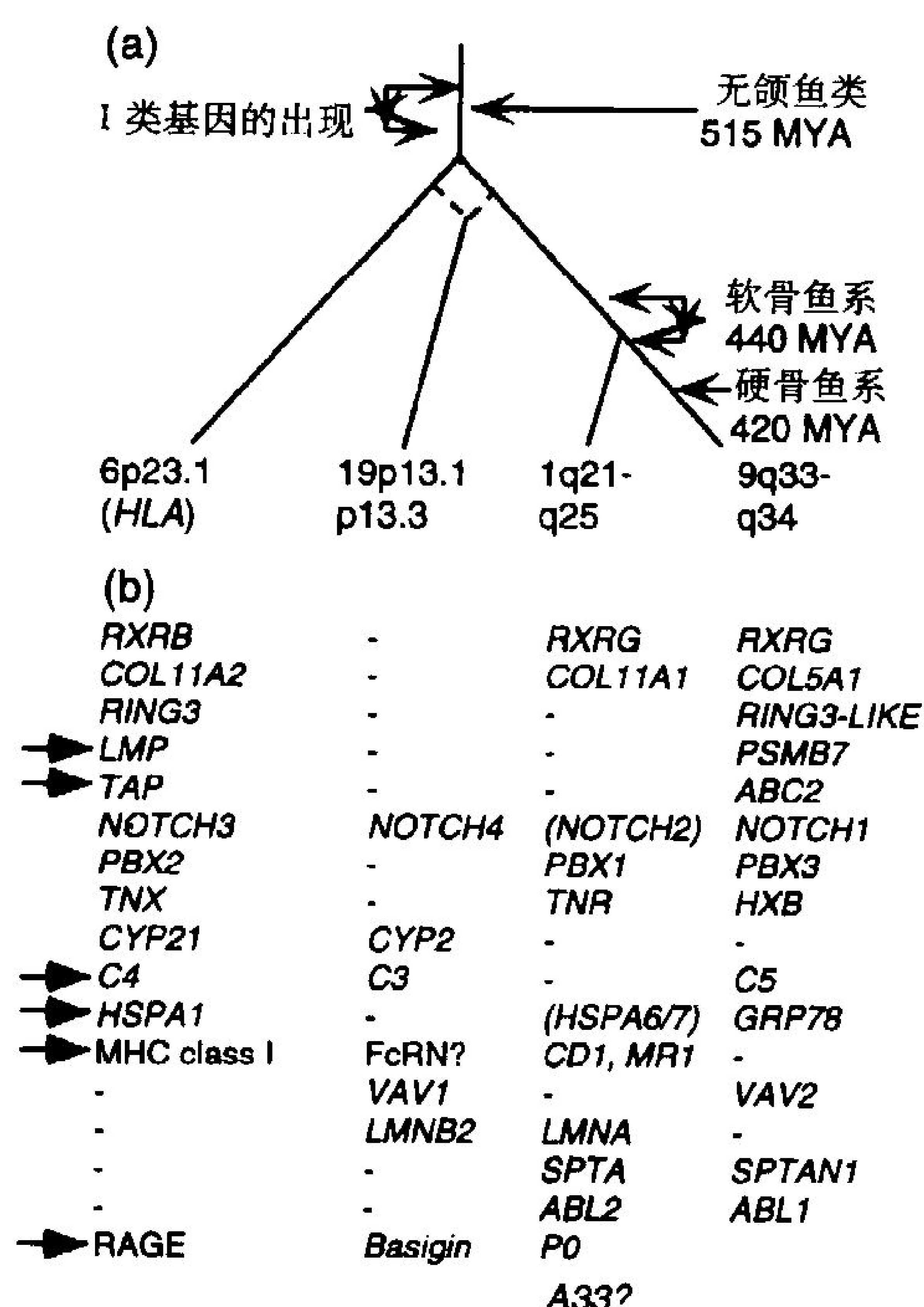


图 18.15 复制事件的起始假说引出的 MHC 样联系群的谬论。箭头指示了文中详细讨论的一些分子，FcRN 位于 19q，那么?。(经授权后引用并修改[118,377]。)

质发生作用，其中包括蛋白酶、调理素受体、补体激活剂和补体抑制剂。C3 具有非特异识别的功能[407]。C3 处在补体三种活化途径的交汇点(旁路途径、经典途径和凝集素途径)。结合在病原体表面的 C3 与蛋白酶 B 因子发生作用，B 因子(Bf)自身又可以被因子 D 裂解，因此产生一个使 C3 分子生成增多的环路(图 18.16)。共价连接的产物 C3b 是一种调理素，可能是这个系统中最基本的活化产物。支持这一观点的证据还有，C3 和 Bf 的 cDNA 已经从一种尚未进化带有适应性免疫系统的生物——海胆中克隆出(以有无 Ig/TCR/MHC 来划分的)[408,409]。在软骨鱼系出现之前，没有发现存在溶破途径的证据，表明调理作用才是这个系统最为根本的作用[410]。

另一个非适应性识别系统，凝集素途径，也显示出是在很早以前就进化生成了。MBL 的结合特性类似于 IgM，自己就可以结合到病原体表面的有机表面，并发挥调理作用[411]。MBL 的高亲和活性类似于 C1q，它是通过其 C 端的多个结合位点而实现的，但是，它明显不与 C1q 具有同源性。与 C1q 与一些丝氨酸蛋白酶 G1r 和 C1s 相互作用相似，它也是通过与 MBL 相关的丝氨酸蛋白酶(MASP)作用而发挥作用的。MBL 相关的丝氨酸蛋白酶与 MBL 作用不仅通过裂解 C4 和 C2(与 C1s 同样的功能)而活化经典途径，还可以通过裂解 C3，因而完全绕过经典途径。MASP－1 和 MASP－2 是 C1r 和 C1s 的同源分子，但是，它们之间的序列一致性又太低，不足以判断这四种蛋白质的种系发育关系[412]。在被囊动物中发现了 MBL 和 MASP 的存在[413]，因此，和 C3 一样，大大提前了适应性免疫系统进化出现的时间。

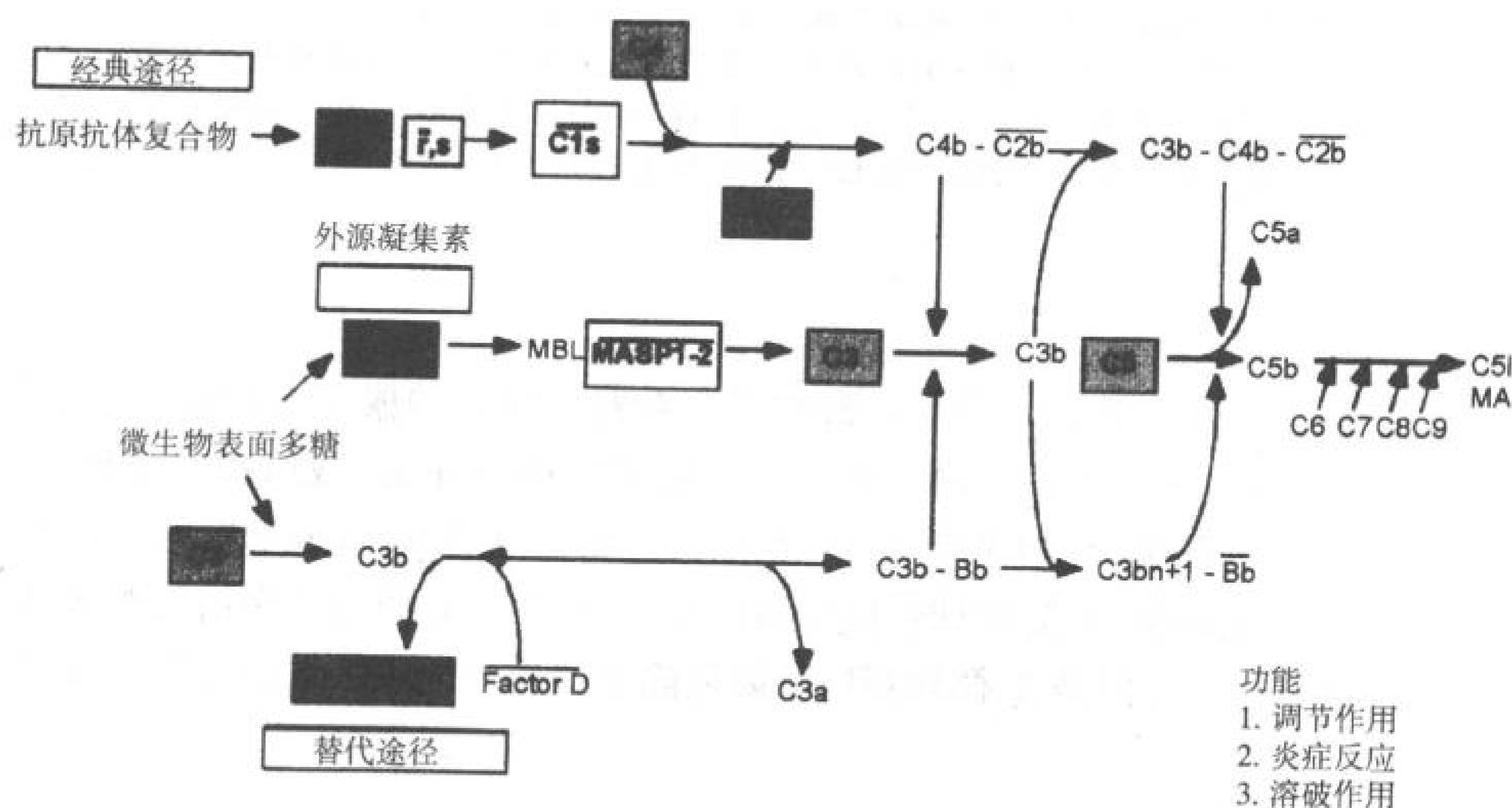


图 18.16 图示三种主要的能引起补体固定的免疫识别途径。以类似的方式显示的盒子标识近似性(C1q:MBL)或同功能性(C1rs:MASP1,2;C2:Bf;C3,C4,C5)。(经授权后修饰自参考文献[591]。)

C3 和 MBL 在脊椎动物迅发内在免疫应答中发挥着重要的作用。那么在无脊椎动物中又是怎样的呢?看来它们的基本作用很早就进化产生了，至少在后口动物祖先(肠体腔生物)出现的时候。第二步就是要确定，这种不仅在调理吞噬作用中重要，而且也对防御病原体入侵的其他作用系统起预警作用的同样的补体受

634

体是否也存在于冷血脊椎动物中呢[404]？从原生动物中分离这种分子的工作也将是很有意义的。

盲鳗和八目鳗的C3样基因被认为是C3/C4基因的前身，因为它们的序列提示两个作用位点（形成3链分子），与C4类似，但是C3样的properdin结合位点已经明显存在了[262,410,414]。然而，盲鳗这种蛋白仅由两条大小分别为115kDa和72kDa的链构成，和所有其他的真正的C3分子一样[415]。然而，海胆的C3序列只提示双链分子的存在，因为只有一个作用位点，这类似高等脊椎动物中的C3。硬骨鱼系的生物，它们的非适应性免疫系统异源性可能更明显[416]。

由抗原抗体复合物介导的经典途径，还有Ig和其他适应性免疫系统的标志物，最早出现在软骨鱼系[417]。然而，需要强调的是，MBL可以活化哺乳动物中的这条途径。然而，在无脊椎动物和无颌类鱼类，C4和C2基因没有检测到。我们强调的是，C2的同源物B因子在硬骨鱼系（虹鳟）的经典和旁路两条补体活化途径中都发挥作用[418]。

随着C5裂解产生C5a和C5b，形成膜攻击复合体（membrane attack complex，MAC）的裂解途径，看来同样在软骨鱼系以前的生物中是不存在的[405,406]。调理作用也或许是介导炎症反应可能是凝集素/补体途径最基本的功能。

同族蛋白

C3、C4、C5和α_2巨球蛋白（α_2M）是同族蛋白质。脊椎动物和无脊椎动物中都存在的α_2巨球蛋白可能是最古老的[419,420]。α_2巨球蛋白、C3和C4都含有内部硫酯键，而C5没有。分歧最早可能发生于α_2巨球蛋白和C3之间，而C5和C3分歧则较晚[421]。与俄亥俄多倍体脊椎动物研究结果相一致，C3、C4和C5分别位于哺乳动物中所发现的四个基因中的三个上面[333,378]（图18.15）。这样的结果与在软骨鱼系生物前的生物中缺乏真正的经典和裂解途径的看法相一致。小鼠的α_2巨球蛋白位于一个称为NK复合体的免疫基因复合体中[422]；然而，看起来MHC和NK复合体并没有什么真正的联系。

B_f/C2从一个共同祖先的分歧时间可能更近，可能在硬骨鱼系生物出现的时候，但在两栖纲生物出现之前[385]。据认为后来C2的出现并不代表经典途径在脊椎动物中出现较晚，因此B_f具有两重功能，如在鳟中即是如此。

脊椎动物免疫系统的细胞和器官（图18.17）

无颌类的淋巴细胞

因为七鳃鳗可以发生同源排斥，所以它们可能带有T细胞，但无颌类生物是否带有胸腺呢？在肌-缘膜复合体鳃区的淋巴结聚集区的淋巴细胞样细胞有时被认为是胸腺的等价体。但它们更像是一个骨骼肌的卫星细胞或结构上类似咽上皮细胞，功能是淋巴生成器官的血过滤作用[423]。尽管七鳃鳗血中出现形态学一致的淋巴细胞，且具有淋巴细胞生成的肠部和咽部，但其并无真正的淋巴器官。人们还认为盲鳗缺少脾，在固有层的主要淋巴生成器官是肾和小肠[424]。黏盲鳗的血细胞主要由小肠血管周围的造血巢生成，其原始主要作用是转移吸收的营养物资的。在七鳃鳗幼鳗中，血细胞和小淋巴细胞由与沿中动脉纵轴分布的静脉窦结密切相关的盲肠生成。在变态中的盲肠消失后，主要的淋巴血生成器官就转为肥大的体部，在这里可以找到大量的浆细胞[284~286]。盲鳗的肝和肠上皮也含有不变形的淋巴细胞。另外一个主要的淋巴生成位点是肠相关淋巴组织（GALT），在肠黏膜和咽部有大量的细胞聚集。

在对七鳃鳗幼鳗进行同源移植后，在移植物的载黑素体和脂肪层及肌肉中可以见到大量的白细胞浸润现象。载黑素体在20~60天内被破坏（平均时间为36±12天）。在移植后的第10~60天，多形性白细胞（PMN）和嗜酸性粒细胞浸润较明显，但在任何都没发现巨噬细胞。浆细胞浸润发生在第40到60天，而小淋巴细胞较少见。因此，是PMN而不是淋巴细胞，参与移植排斥并发挥主要作用。对SRBC免疫刺激后的七鳃鳗幼鳗的肠沟以电子显微镜观察结果显示：a，红细胞；b，颗粒细胞（具有一个叶状核和多种形状的膜包颗粒主要类型）；c，巨噬细胞（具有一级或二级溶酶体和长的微绒毛）；d，具有较大核浆比的淋巴细胞，带有微绒

毛，具有移动的功能；e，浆细胞，具有大量的粗面内质网，表明参与免疫应答[427]。

有颌类生物的淋巴细胞[320,428,429]

软骨鱼系

软骨鱼系是从咽囊进化到具有胸腺的最早生物。（和哺乳动物一样，它具有一个典型的皮髓质结构[430]，在这里，溶解酶和带有胸腺细胞突变变化的特征，可以被检测到；而且交叉反应抗血清也可以检测出核苷酸末端转移酶的存在[430]。这样，对T细胞分裂原的刺激能发生作用就很明显了，但没有MLR被引发。在层板鳃亚纲鱼类，GALT也很重要，以Leydig氏器和螺旋形瓣膜为最好的例子。脾和外性腺（与性腺相关）是生成血和淋巴的地方。这些器官主要生成颗粒细胞、淋巴细胞和浆细胞。在外性腺器官内，淋巴细胞可以形成小结[431]。狗鱼脑部的的巨噬细胞和淋巴细胞簇看来建立在特异的刺激之后，可以防止外源物质进入身体内部[432]。

在鲨的发育过程中，肝是最早的开始带上Ig的组织细胞，在受精后两月就行了，接着，约三个月之后，就是肾和小肠了。胸腺、脾和Leydig氏器在4个月之后出现，而性上腺和胃肠相关淋巴组织则是最后分化出现的。在孵化后，肾和胸腺的血细胞和淋巴细胞生成特性就已经消失了。然而其他的淋巴生成组织继续终生保持有淋巴生成的能力。孵化后，当胚胎遇到水溶抗原，淋巴鞘组织的结构发育程度已经很高了[401]。

635

硬骨鱼系[433,434]

硬骨鱼系生物淋巴组织和器官的叶、组织形式与软骨鱼系生物相比并无明显不同。和其他脊椎动物一样，硬骨鱼系的胸腺起源于咽囊，并且可以是单叶、双叶或三叶，依生物种类而异。胸腺是最先产生淋巴细胞的器官，而且它的结构也因种属不同而有差异。在一些种属，并不像两栖类那样存在明显的皮-髓质样结构，但却可见某些成分，至少在鳟[435]和海鲈[436]较明显。脾含有哺乳动物中可见的基本成分，血管、红质、白质，但红质和白质的分界不明显（白质发育较差）。脾的毛细血管，即终末毛细血管，带有一层上皮细胞[436]，并被覆有纤维网状结构，能聚集一些细胞，主要是巨噬细胞。附近还可以见到淋巴细胞的聚集，在免疫应答时尤为明显。这被认为是原始的生发中心，在鱼类中则不明显。红质是黑色巨噬细胞生发中心，在大血管分叉处可见群集的色素细胞。这些细胞可能可以发挥免疫调节的作用[437]。另外一个主要的免疫器官是头肾。

与哺乳动物类似的免疫细胞异源性[435]同亲存在于鳟[438]。胸腺细胞仅对T分裂原产生作用（Cona），肾脏淋巴细胞则仅对B细胞分裂原产生作用（LPS），而脾细胞对二者都产生作用。鳟鱼[439]、鲤鱼[440]、鲇鱼[441]的周围血白细胞可以在MLR被活化。它们的T细胞功能看来是高度温度敏感型的[442]。在海鲈鱼中，以单克隆抗体方法进行检测，功能性T细胞出现在孵出30天之后。同样的细胞在45天后可见于胃肠黏膜，脾，肾等。B细胞在80天左右可以检出[443]。对幼罗非鱼进行胸腺切除可以抑制移植排斥和抗体应答活性[444]。在免疫应答过程中，牙菌斑形成细胞可以在胸腺内检测到[445]，这与经过胸腺内注射的哺乳动物的研究结果很类似[446]。在多种生物，抗体形成细胞可以在脾脏或头肾区见到[445,447]。仅T细胞（表面Ig）可以在MLR发生反应，而T细胞、B细胞和巨噬细胞可以刺激反应，这表明它们表达的同样是MHCⅡ类分子。另外，一些单克隆抗体可以与一些特异的黏膜T细胞发生反应，并且可以在混有大量哺乳动物上皮细胞的情况下把γδ细胞辨认出来[449]。低温通过作用于T细胞抑制MLR。体外生产对一种半抗原的胸腺依赖抗体，需要巨噬细胞、T细胞和B细胞的参与。然而，对非胸腺依赖抗原，仅仅需要巨噬细胞和B细胞。这些实验为这种脊椎动物中T细胞、B细胞和巨噬细胞的关系提供了充分的证据支持[302,450,451]。盲鳗的抗原加工呈递是由B淋巴细胞和单核细胞来完成的[452,453]。

硬骨鱼系非特异性细胞毒性细胞（NCC）与人的NK细胞机能类似[454~457]。它们可以随机地使一些恶变的人细胞系溶破；对鱼类NK样细胞的单克隆抗体可以抑制这种溶破效应。NK细胞上的分子也是二聚体，但是与T细胞表面的抗原受体明显不同。因此，这种分子可能是NK细胞的抗原受体[458]。从腔肠动物头肾或外周血分离的细胞毒性细胞看来可以分为明显的亚群，行使功能性细胞的功能。一种溶破异源NK样细胞，一种主要溶破同源NK样细胞，另外，还发现另外一种细胞毒性效应分子主要是针对病毒感染的同源或是异源细胞的[459]。

两栖类生物

无尾目

淋巴生成的第一个器官，胸腺是由肠囊背侧上皮发育而来的(囊袋的数目因生物物种不同而异)。它们是由从中胚层外侧板和中部的细胞经头间叶细胞而来的前体细胞在受精后的5～7天内发育而来的。当上皮细胞开始表达MHCⅡ型抗原而不是经典的MHCⅠ型抗原时在体内这些前体细胞开始增生。到第8天，形成的皮-髓质结构就已经开始类似其他脊椎动物的了[460]。两栖动物的脾具有红白质结构[463]、GALT和一些小的结节(但是不是淋巴结)；同时，在肾、肝、肠膜和鳃部具有淋巴生成的功能。不同物种的淋巴器官的形态上差异很大，而且，还会随季节的变化而变化[464,465]。爪蟾属的脾白质被一外周层隔离开，而且白质滤泡的中央动脉终止在红质的增生区，一个胸腺依赖区。脾缺乏真正的生发中心。对海爪蟾的，淋巴囊内注射胶体炭颗粒显示被红质内的自由巨噬细胞吞噬掉，这些细胞然后转入白质的边缘区。巨大的，分叉的衍生的非巨噬细胞可以既出现在红质又出现在白质，可能是由树突细胞的前身[466]。爪蟾属的骨髓从组织学角度看来并不是一个主要的淋巴生成器官[467]，因为其带有RAG活性[129]。将有必要对是否是这一系列事件引起骨髓的淋巴细胞生成开始或者是这些事件只与前B或前T细胞内的重排机制相关呢？

胸腺切除[460]可以降低或消除同源移植排斥反应，对MLR和PHA的诱导反应，IgY抗体的合成，以及对所有胸腺依赖抗原的抗体反应。MLR反应性成熟早于初次免疫应答中IgY抗体的生成[468]。动物生后7天行胸腺切除术可以有效抑制同源排斥反应和消除IgY应答[460]，而较晚行胸腺切除术则仅消除抗体应答[469]。较晚行胸腺切除术将会很明显地影响外周血中的T细胞池，就如通过用对XTLA-1[470]、CD5[471]和CD8[369]的单克隆抗体进行检测显示的那样。T细胞的胸腺外发育看来在这种生物是不存在的，因为早期适当时机进行的胸腺切除术可以导致T细胞的完全缺如。然而，带有一些T细胞标志的其他类型的细胞可以在这些生物中检测到，对这些细胞是否能与NK T细胞发生反应将会显得很有意义[462]。

爪蟾属的胸腺细胞有助于引发移植物抗宿主反应，但是作用不大；而脾脏T细胞作用明显，是一个强有力的移植物抗宿主反应诱导剂。胸腺带有一些能够生成IgM的B细胞，以及将要发生类别转换生成IgY的记忆性细胞。体外实验中显示的其表现是被胸腺细胞下调的[472,473]。NMU可以消除T细胞，因此可以消除同源移植反应。但却没有消除异源排斥反应，这似乎表明它是由一种非胸腺依赖的机制发生作用的[474]。爪蟾属的B细胞体外反应可以受B细胞分裂原的影响，不是通过增生的方式，而是通过Ig合成的方式它们可以受佛波酯的刺激[475]，所报道的受LPS的刺激则是实验中被污染所致[476]。

636

体外铬[51]放射自显影，可从爪蟾属中检测出NK细胞[477]。从已经行胸腺切除术的1年龄蛙中提取的胸腺细胞可以随机地溶破那些缺失MHC抗原表达的胸腺肿瘤细胞[319,478]。这种功能在注入肿瘤细胞或是体外对这些胸腺细胞进行分裂原刺激后将会显得效应更强。这表明，淋巴因子可以活化这些杀伤性细胞。在鳐鱼，也已经发现有随机杀伤性细胞的存在[479]。

在两栖类生物中，已经弄清楚了一些种系限制性糖蛋白的存在。然而，下述的这些分子或是通过单抗或是通过基因分离的方法发现的：CD5[471]、CD8[369]、CD45[480]、XTLA1[470]和CTX[115]。

有尾目

有尾目生物的胚胎最初都生成5对胸腺叶瓣，最初出现的两对后来消失了。这样就形成了斑点美西螈中的三叶形胸腺，但是，在侧生螈和北螈中，仅形成了一叶。在这些胸腺的组织结构中，皮质和髓质分界并不明显。一般表现类似于哺乳动物或是蛙的胸腺的皮质区[481]。在这里至少存在三型基质上皮细胞[481]。蝾螈中没有淋巴生成功能的骨髓，而造血部位主要是脾和肝的外周区[482]。它的脾叶没有明显的分为白质和红质。

体外实验表明：斑点美西螈的淋巴细胞可以受多种分裂原的刺激而增生。无论是年幼还是成年的蝾螈，有一群B细胞专门受LPS(B细胞分裂原)的刺激而分裂增生[483]。在LPS存在的情况下，蝾螈的B细胞可以合成两种独特型抗体：IgM和IgY。T细胞对分裂原的反应及同基因决定簇的证据支持尚不多，但是，当培养皿中加入的是0.25%小牛血清蛋白而不是1%小牛血清时，成年(大于10个月)蝾螈的脾细胞和胸腺细胞能很好的与

PHA 发生反应[484]。活化的细胞是 T 细胞,就如体外单抗清除细胞实验和体内的胸腺切除实验证明的那样。在蝾螈的 T 细胞上发现存在特异的标记蛋白[485,486]。蝾螈的淋巴细胞和哺乳动物的淋巴细胞一样,在受 SEA 和 SEB 超抗原的刺激下可以增生[483]。在无足动物和无尾目生物中,脾结构类似鱼类的脾,白质、红质界限分明。

爬行动物

从对爬行动物的研究中发现,在所有爬行动物的胸腺中,皮质和髓质分界都很明显。脾的红质和白质界限分明,但是,还没有关于到底是生成 T 细胞还是 B 细胞却没有爪蟾属那么详细地描述过。锦龟属生物的脾实质可清楚地分为红质和白质。白质由两部分淋巴结构组成:包绕中央动脉的淋巴组织和称作椭球体的网状结构。甚至即使在旁节内注射疫苗后,在脾脏仍然找不到生发中心。脾红质由一套静脉窦和静脉索组成[487]。在蟒属生物的网状结构中,由免疫复合体引发的树突细胞可以被发现,并可能是哺乳类生物滤泡树突细胞的前身[488]。GALT 要比脾发育晚,可能是二级免疫器官,看来它并不等效于法氏囊[428]。曾经由类似淋巴结样结构的报道,尤其是在蛇和蜥蜴[489]。

爬行动物,鸟类和哺乳类的进化祖先,是一个关键性的群体,但是,遗憾的是,爬行动物淋巴细胞功能异源性却没有怎样的记载。这时可能已经出现了 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞异源性,因为抗胸腺细胞的抗血清可以改变胎生蜥蜴中依赖 T 细胞的一些功能。胚胎胸腺细胞能在发育的各个阶段都能以两种方式与 MLR 发生反应[490],但与 ConA 的反应仅发生在 36~37[490]天以后。才渐渐发育然后又消失了。在钝吻鳄属中,在经过玻璃毛线过滤以后,不黏附的外周血淋巴细胞可以与 PHA 发生反应但是不能与 LPS 反应,与从哺乳动物中获得的结果类似。在爬行动物中,细胞群体随着季节变化而改变明显[429,491]。

鸟纲[429,493]

鸡的从第三和第四咽囊发育而来的胸腺,带有两套七叶型结构。皮质和髓质分界明显。在受精后的第 11 天转变成淋巴器官。

脾的结构没有哺乳动物分化得那么分明。它在胚胎发育过程中没有淋巴细胞生成的功能。它带有生发中心(至今报道的最为原始的物种)和动脉周围淋巴鞘附近的 T 细胞依赖区。B 细胞聚集在生发中心的滤泡内,包绕毛细血管淋巴细胞鞘。浆细胞位于红质区。$\gamma\delta TCR^+$ T 淋巴细胞主要集中在窦结,而 $\alpha\beta^+$ 淋巴细胞主要在动脉周淋巴细胞鞘。IgM^+ B 细胞可以在受精后 12 天的脾检测到[494]。在发育过程中,B 细胞数目在孵化后迅速增长。淋巴结结构可以存在于水鸟,但是在鸡体内则没有。

鸟类的法氏囊是一个特异生成 B 淋巴细胞的器官。它是一个临时的免疫器官,在发育的第 5 天开始出现,在 4 周后开始逐渐消失。兔子的盲肠曾经被认为是哺乳动物中法氏囊的替身[495]。

在鸟类中,T-B 异源性已经很明显。的确,B 代表囊(bursa)。切除胸腺的效应,以及 T 细胞和 B 细胞间的相互作用和 MHC 分子对辅助细胞和杀伤细胞的严格限制,这一切都与温血脊椎动物非常相似,例如哺乳动物。

淋巴细胞的分化

637

淋巴细胞是免疫系统的特异分化的效应细胞。许多分子和作用机制仅表达于这类细胞(如:RAG、TdT)。要理解免疫系统的进化,我们不仅要知道这些受体分子的起源和它们基因作用的途径和方式,还要认识它们在进化中限制表达于哪些细胞。淋巴细胞起源于胚胎中胚层的腹侧和背旁侧。特异淋巴细胞群的形成靠一系列的转录因子的依此活化。从造血干细胞形成早期淋巴细胞系是由主要调控因子参与的。另外,在 B 细胞和 T 细胞,高度特异化的淋巴细胞基因被活化,如 RAG-1、RAG-2 重组酶和 TdT。再后来,B 细胞表达 Ig 需要控制转录并要增强子的参与。在免疫应答中,另一个 B 淋巴细胞酶活机制,转换重组复合体,可以完成重链类别转换。

主要调节因子

Ikaros 可能是一个主要的调节因子,它在哺乳动物中的作用是限制某些分子特异地由某类细胞表达。这

个基因在哺乳动物,鸟类、两栖类和硬骨鱼系生物中是保守的[496,497]。在哺乳动物中,对 Ikaros 的选择性剪切可以生成六种不同形式的分子,它的表达在鸟类和哺乳动物是保守的。在鳟中,分离出了另外一种形式的分子。在至今研究的所有种属的生物中,除了多倍体的爪蟾属之外,都似乎只含有一个 Ikaros 基因座。

其他的转录因子,比如 T 细胞因子 - 1 和 GATA 3(T 淋巴细胞特异)在温血脊椎动物和两栖类是相当保守的。

基因 *whn* 在小鼠的毛发转换和胸腺上皮的分化过程中是必需的。*whn* 的基因产物存在于人、硬骨鱼系、软骨鱼系、环口动物和头索动物的蜗牛中。它们在 DNA 结合区的氨基酸序列具有 80%的一致性。因为,在头索动物和无颌类生物中没有胸腺,很可能从有颌类生物开始,对这个基因的调控发生改变,从而赋予其新功能[499]。

RAG

在哺乳动物,RAG-1 和 RAG-2 是一对紧密连锁的基因,它们为 B 和 T 细胞中 V(D)J 的重排所必需。因为重排现象可以见于从软骨鱼类到哺乳动物的所有生物,在这些生物中可以检出 RAG-1 和 RAG-2 就不足为奇了[125,126,128,129,500]。

至今尚未从无颌类生物分离出 RAG 同源物,与检测不出抗体和 TCR 相一致。硬骨鱼系的 RAG-1 基因,与哺乳动物中的不同,鳟的 RAG-1 基因带有一个 666bp 的内含子,而斑马鱼的则有两个[126,500,501]。另外,这个 RAG-1 全长序列与其他种类的 RAG-1 分子序列上有 78%是一致的,从 417 位到 1042 位,这种一致性高达 89%。RAG-2 类基因与其他种属中 RAG-2 类基因的一致性是 75%。与哺乳动物中的相似,RAG-2 与 RAG-1 基因相邻,但却有不同的起始方向。这两个基因间的非翻译区的大小从硬骨鱼类到哺乳动物是递增的。在受精后 10 天的鳟鱼和受精后 4 天的斑马鱼,RAG-1 和 RAG-2 的表达都限定在淋巴细胞。

在爪蟾属生物中,这两个基因也是反向转录起始的,中间有一段 6kb 的序列隔开。爪蟾属的 RAG-1 与温血脊椎动物的 RAG-1 有 71%的一致性,在 392 位到 1012 位之间有 88%的一致性。RAG-1 和 RAG-2 的表达可以在胸腺,肝和脾检测到,甚至还可以在肾检测到低水平的表达[129]。在成年动物,胸腺和骨髓是主要的表达部位。这表明重排过程持续作用于生物的一生。

TdT

末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)是一个多聚酶,可以在重排过程中将非模板核苷酸加入到 DNA 片段的 3′端,结果形成 Ig 和 TCR 基因在 V-D 和 D-J 连接的 N 端多样性。

N 端多样性现象可以在所有具有重排机制的生物中检测到,从许多从硬骨鱼系生物到两栖纲和鸟纲的脊椎动物中分离的 TdT 具有结构保守性[126,500,502,503]。在受精 20 天后的鳟鱼的胸腺和肾中表达水平较高。与 RAG-1 一起,TdT 的表达有助于限制鳟鱼初级淋巴组织的形成[127]。采用抗 TdT 抗体的方法也在层板鳃亚纲鱼的胸腺中检出了阳性的细胞。

鳟和爪蟾属的 TdT 氨基酸序列与人、小鼠和牛中的同类分子序列间有 50%的一致性。爪蟾属 TdT mRNA 可以在胸腺检出而在脾、肾、小肠和肝中则没有发现。在种系进化过程中,蝌蚪变态高峰时 TdT 在胸腺表达水平较高。仅在发育的后期 TdT 才出现与幼蛙 Ig 重链序列缺失 N 区连接有关。鸡的 TdT RNA 仅表达于胸腺,无论在孵化的前后,骨髓和法氏囊都没有。因此,TdT 可能参与鸡 T 细胞受体基因的 N 区连接而不参与 Ig 基因的连接作用。

增强子

与哺乳动物不同,在鲶鱼重链的主要内含子位点,没有看到任何增强子。在包含 TM2 外在显子的 μ 基因的 3′端可以检出类似活性。B 细胞系较特殊,鲶鱼增强子并不位于小的中心区,且具有多倍和散在的特性[504]。5 个变异的同义八核苷酸序列(ATGCAAAT)是有功能的。这些变异的八核苷酸序列的种属特异性很明显,鲶鱼的 B 细胞(ATGTAAAT)(也可在爪蟾属 V_H 基因的上游出现[220])较其他八聚体活性更强。因此,在

脊椎动物进化过程中，Ig 重链增强子的相关功能改变很明显[505]。然而，鼠的 Ig 基因座调节成分可以引起转基因鳟的组织特异表达[506]。

总之，淋巴组织的组织形式可能是免疫系统内惟一显示复杂性的成分，可以被强加到脊椎动物生物进树上。圆口纲生物胸腺和脾的缺失与其一个重排的受体家族的缺失相关。当骨髓出现后，它就不是一个主要的淋巴生成器官。脊椎动物间脾的细胞组织形式变化很大。比如，在冷血脊椎动物见不到带有滤泡树突细胞的生发中心。因为缺乏这些细胞，只有在中心动脉周围采用一些保守的结构来确保较低的血流率，以便进行选择。NK 细胞[457]，在许多种类的生物可以检测到，并不需要 RAG-1 和 RAG-2 的活性作用[507]。它们并不杀死表达 MHC 分子的细胞因为它们可以通过特异地识别 MHC 的特异抑制性受体发挥作用[508]。

细胞因子

许多细胞因子和它们的受体，与免疫系统的许多分子一样，倾向于迅速进化。分离它们的基因和蛋白质并不是件很容易的事[509]。细胞因子的活性可以在 T 细胞、巨噬细胞和纤维母细胞刺激生长的上清液中检测。一些细胞因子的存在，包括干扰素（IFN）、白细胞介素（IL-1 和 IL-2）和转移生长因子（TGF）-β，都已经在鸟类、两栖类、鱼类中得到确认。尽管脊椎动物细胞因子的对应成分存在于无脊椎动物中，至今尚未克隆出基因来，给我们对细胞因子进化的认识留下了一大片空白。

白细胞介素-1（IL-1）

IL－1 存在于 LPS 刺激培养的巨噬细胞的上清液中，这一点是人们通过加入适量的 T 细胞分裂原浓缩液以检测胸腺细胞是否会被刺激增生时发现的。体腔液或冰融的棘皮动物（鲶鱼）体腔细胞融破液提取物含有一个 30kDa 的 IL-1 样蛋白，它具有刺激哺乳动物胸腺细胞和纤维母细胞增生的能力[510]。另外，流式细胞仪检测显示，一个人 IL-1 受体特异单抗可以和鲶鱼的轴器官细胞结合，可能识别的是一个 IL-1R 同源蛋白。在被囊动物[511]、软体动物[512]和甲壳纲动物[513]中也可以检出 IL-1 样活性。确定这些活性是很容易的，这一点与脊椎动物的 IL-1 具有很多功能，并且比较保守是相一致的[514]。然而，我们对是否是真正的 Il-1 在无脊椎动物中发挥相似的功能作用这一点的判断要持审慎的态度。

硬骨鱼系生物，从经过 LPS 处理的单核细胞培养液中的 IL-1 样分子，甚至是哺乳动物巨噬细胞培养液中的 IL-1，可以替代 T 细胞培养中的附属细胞。在鲶鱼细胞培养液中存在两种 IL-1 样蛋白：一种是 70kDa 的多聚体，它可能和其他分子一同刺激鲶鱼的生长但不能作用于鼠细胞。另一种 15kDa 的单聚体具有相反的活性[515]。IL-1b 已经在虹鱼中克隆出。与哺乳动物 IL-B 的一致性分布在 47%～57%之间（哺乳动物 IL-1a 和 IL-1b 之间的一致性约为 25%）并且其表达在鳟鱼的白细胞受 LPS 刺激之后上调。

在受 LPS 刺激的两栖类和鸟类的白细胞的培养液中存在 IL－1 样活性[517,518]。已经克隆的鸡 IL－1R 与鼠的同源分子具有 61%的一致性，但在胞质区一致性可高达 76%[519]。另外，它还有四个区与果蝇的 Toll 胞质区尾巴有着很高的同源性，建立了 IL-1R 和 Toll 的同源性关系（图 18.2）[79,520]。

总之，看来 IL-1 和它的受体在种系发育上是保守的：①这些分子刺激细胞生长不受种属限制；②对哺乳动物 IL-1 的抗血清经常可以和其他种类生物的蛋白发生交叉反应；③不同生物中的编码 IL-1 和 IL-1R 的基因具有相当高的相似性。因此，IL-1 和 IL-1R 样蛋白可能在脊椎动物和无脊椎动物免疫系统间架起了一座桥梁。

白细胞介素-2（IL-2）

像对白介素-1 进行的研究那样，对胸腺细胞进行的共刺激实验和以 T 细胞刺激上清液刺激培养的永生 T 细胞来检测 IL-2 或 T 细胞生长因子活性。与 IL-1 不同，IL-2 仅刺激相同种属生物中细胞的生长。因此，对有报道称对人 IL－2 的特异单抗可以结合海星的轴器官细胞[521]，尚需谨慎对待。对这些受结合的海星的轴器官细胞所表达的分子进行生化分析就很必要了。

从鱼类到鸟类,受刺激的 T 细胞培养液可以共刺激胸腺细胞的增生,或可以维持 T 细胞系的生长[522~524]。采用单抗筛选的方法发现了鸡的一个 IL-2R 样分子,它仅表达于活化的 T 细胞,约为 50kDa[525]。这种单抗阻断了鸡 T 细胞上清液中 IL-2 样分子的刺激生长活性,也降低了 T 细胞从上清液中摄取 IL-2 样分子的能力。

总之,在有颌类脊椎动物中可以发现所有哺乳动物 IL-2 和 IL-2R 的同样现象。将来要进行的实验研究将不仅使我们对 IL-2 结构进化认识深入,还将使我们对爬行纲生物中 T 细胞活性的季节变化[526],幼蛙或成蛙 T 细胞对 T 细胞生长因子的不同反应能力[527],以及突变型小鸡中 T 细胞的超刺激能力有所认识[528]。

干扰素

Ⅰ型 IFN 表达于白细胞(INF-α)和病毒感染的纤维母细胞(INF-β)并能使邻近细胞的病毒复制受限。相反,Ⅱ型 IFN(主要是 IFN-γ 免疫型 IFN)由活化的 T 细胞合成,活化巨噬细胞,上调Ⅰ类、Ⅱ类 MHC 分子、lmp 和 TAP 等的表达水平[529]。

在无脊椎动物中尚未检出 IFN,但是在双翅目果蝇的抗菌肽基因的启动子区发现有 IFN 一致应答序列成分(GAAANN)[530]。在抗鼠 IFN 调节因子Ⅰ型血清中,一种 45kDa 的蛋白质可以和该序列结合,表明其可能是特异表达于体腔和白细胞。

从病毒感染的鱼类纤维母细胞,上皮细胞和白细胞培养的上清液中可以检出抗病毒活性[509,531]。所有哺乳动物Ⅰ型 IFN 的生化活性(如对酸稳定,耐温度变化等)在这些鱼类的上清液中都存在,而且,这种假定的 IFN 还可以减低病毒再次感染同类细胞的致病性。体内实验,从已经被感染的鱼中转移其血清到未受感染的鱼中,可使其避免急性病毒致病[532]。在乌龟中也发现同样的现象[533]。鸡有 10 种以上的Ⅰ型 IFN 基因[534],与人类Ⅰ型 IFN 的序列一致性从 25%~80%不等,并且功能明显相似的基因的相似度较高。

Ⅱ型或免疫型 IFN 在低等脊椎动物较难检测。在鳟中,一个巨噬细胞活化因子(MAF)已经从 Con-A 活化纯化的 T 细胞中分离出[535]。它引起巨噬细胞吞噬、转移以及呼吸爆发和一氧化 氮生成。MAF 与Ⅱ型 IFN 是否一致尚不明确。鸡的Ⅱ型 IFN,是 T 细胞产物,具有很强的巨噬细胞活化能力,已经被克隆。它的基因与人Ⅱ型 IFN 有 35%的一致性,而与鸡的Ⅰ型 IFN 只有 15%的一致性。重组的鸡 IFN 刺激 NO 的产生和巨噬细胞的 MHCⅡ类分子的表达。

639

转化生长因子-β

TGF-β 是一个大家族,它明显能抑制不同种类生物的适应性免疫应答的能力[538]。TGF-β 和 IL-1 一样,能抑制鳟鱼中巨噬细胞的活化[539],还能抑制爪蟾属中 T 细胞的生长[540]。鳟鱼 TGF-β,与哺乳动物中 TGF-β1 和 β5 最相似(62%~66%的一致性),表达于淋巴结组织和脑,但在肝中不表达[509]。从爪蟾属生物中分离出了两种形式的 TGF-β,二者都作用于胚胎的外胚层,以诱生中胚层。重组的爪蟾属 TGF-β 与哺乳动物中的相似,可以抑制 IL-2 样生长依赖的脾细胞的分裂。

对非哺乳动物细胞因子及其受体的分离工作落后于对抗原受体和 MHC 的研究。然而,对许多种类生物的细胞因子系统和鱼类,两栖类和鸟类在病态情况下的分析研究表明大量重要的哺乳动物细胞因子可以在其他脊椎动物中找到。一个首要的问题就是:在适应性的免疫系统中,哪些细胞因子是特有的,哪些又是所有生命所共需的?例如,如果Ⅱ型 IFN 和 IL-2 仅在只有 T 细胞免疫的生物中发现的话,我们可以设想,其他的细胞因子为此免疫系统所需,如 IL-4 和 IL-12,限制表达于脊椎动物[541]。难道细胞因子的这种相应的序列保守性与它们在种系发生中的表达不相关吗?Ⅰ型 IFN 和 IL-1 似乎如此,但对Ⅱ型 IFN 和 IL-2 则是相反的情形。

结论

最近在比较免疫学领域的研究进展在脊椎动物和其他门类的生物之间架起了联系的桥梁,甚至发现脊

椎动物和植物之间也存在联系。在众多生物中，许多受体家族和可溶性效应分子以及基因表达的调控方面都具有不同程度的相同性。表现在无脊椎动物中 IgSF 家族成员的存在，在一些原生动物中存在与脊椎动物中类似的 Ig 或 TCR 等分子来识别异物，它们是通过识别非己而不是同源识别或识别自己的方式来发挥作用的。

一些现象可以说明脊椎动物免疫系统的形成是由体细胞重排机制的引入才开始的。如果人们接受"变异先于选择"的观点的话，就可以想像当 MHC 骨架还不具备Ⅰ类和Ⅱ类分别的时候，原始 TCR 是通过体细胞突变才引起受体的多样性的。它们储备在那里，以待选择。然而，为什么体细胞突变仅发生于此区而不是遍及整个基因组呢？或许具有体细胞突变能力的祖先受体就位于 MHC 区吧。在 MHC 区还存在其他 IgSF 成员的现象与此观点相一致(图 18.13)。

另一种可能是，Ⅰ类和Ⅱ类 MHC 基因，与肽结合受体一致，是在那里编码的，这个系统在体细胞突变体系引入后形成一个受体前体。然而，一些结构特征让我们认为第一个假说是正确的。MHC 和体细胞重排受体共用 C1 Ig 结构域，它们只表达于那些经体细胞重排的物种。假如 MHC 真的很原始，就应该更可能采用较原始的，在很多原始 IgSF 成员中可遇到的 C2 型 Ig 结构域。现认为一个与抗原受体相关的信号分子的确出现较早，其中的 C1 外显子转给了前 MHC。

在棘皮动物中，C′的发现显示了 B 细胞型免疫可能较早出现。

脊椎动物中，随着体细胞重排和突变机制的引进，大自然似乎宁愿使机体内大量的细胞被淘汰但却使整个生物体适应而得以存活下来。这种机制在同一种属的生物之间可能演进成决定生物个体优劣的标度。的确，最终的改进在于采用超突变机制，这仅见于温血脊椎动物，而在两栖类或鱼类则较少。有颌类生物免疫系统的适应性对于每个个体来说不是一个封闭的系统，而是一个具有体细胞突变能够产生大量不同受体的系统。即使在没有结合连接机制的生物，这种产生不同受体的能力也远远超过表达的能力。因此，至少是免疫系统的一部分在基因表达水平是不受选择控制的。但是这并不意味着这部分基因组不能进化(因 DNA 本身具有易位、转座不等交换和基因转变等的特性)。

在基因作图和 ohno 关于基因复制进化假说的确立，在种系间研究进化已经取得了新的进展，最为显著的成果是 MHC。带有或缺失Ⅰ类或Ⅱ类 MHC 同类区的发现，使新的关于此区进化的模型有了改进。这种同类现象也存在于 Ig 和 TCR 基因[542]。在有颌类生物的进化过程中，所有的哺乳动物免疫系统组分(RAG Ig TCR MHC)从一开始就具备了。这些基因的数目和组织方式或许存在着变化，但它们的功能一致性未变。淋巴结组织自身的变化较其他成分显著。它的结构进化与脊椎动物的进化相平行，可能在采取不同的分子机制方面发挥着一定的作用。

当人们对无颌类生物了解更多后会感到惊奇。至今，仅发现了补体的旁路途径和淋巴细胞的存在。在一个有效的免疫系统，补体系统发挥作用，甚至在一些脊椎动物还存在多重补体的现象，从而增强了识别能力的多样性。

至今我们讨论的主要是受体多样性增加的机制，但还存在一些机制来限制它，以避免发生自身免疫。发现阴性选择等现象也保守并不令人惊讶，这些现象是为了确保自身耐受。自身耐受是如此重要，以至于可能存在多种机制共同发挥作用。而且，在外周，从鱼类到哺乳动物，都存在一些机制使自身免疫在最后阶段被制止，使细胞毒性 T 淋巴细胞的生成受限或使自身抗体失去功能。[543]

适应性的免疫系统与内在免疫系统明显相关。通过进化的方法来研究这种关系将是另一章节的主题(参见昆虫免疫相关章节)[544~546]。

这些思索不应妨碍对单个组分 DNA 和氨基算序列进行分析研究的兴趣。这种研究将有助于认识这些分子的基本部分以及它们的进化历程。如果说理解这些序列保守或变异的意义相对容易的话，对这种组织形式性质的变化和其主要功能的认识就要难得多。或许我们考虑这些变化时应分开来看，毕竟，这种比较研究给我们展示的仅是漫漫进化历程的一瞬，基于基因组或增或减的变化，由于保持或去除某些基因同时还受自然选择及一些随机因素的影响，许多研究对象的存在仅是暂时的。

640

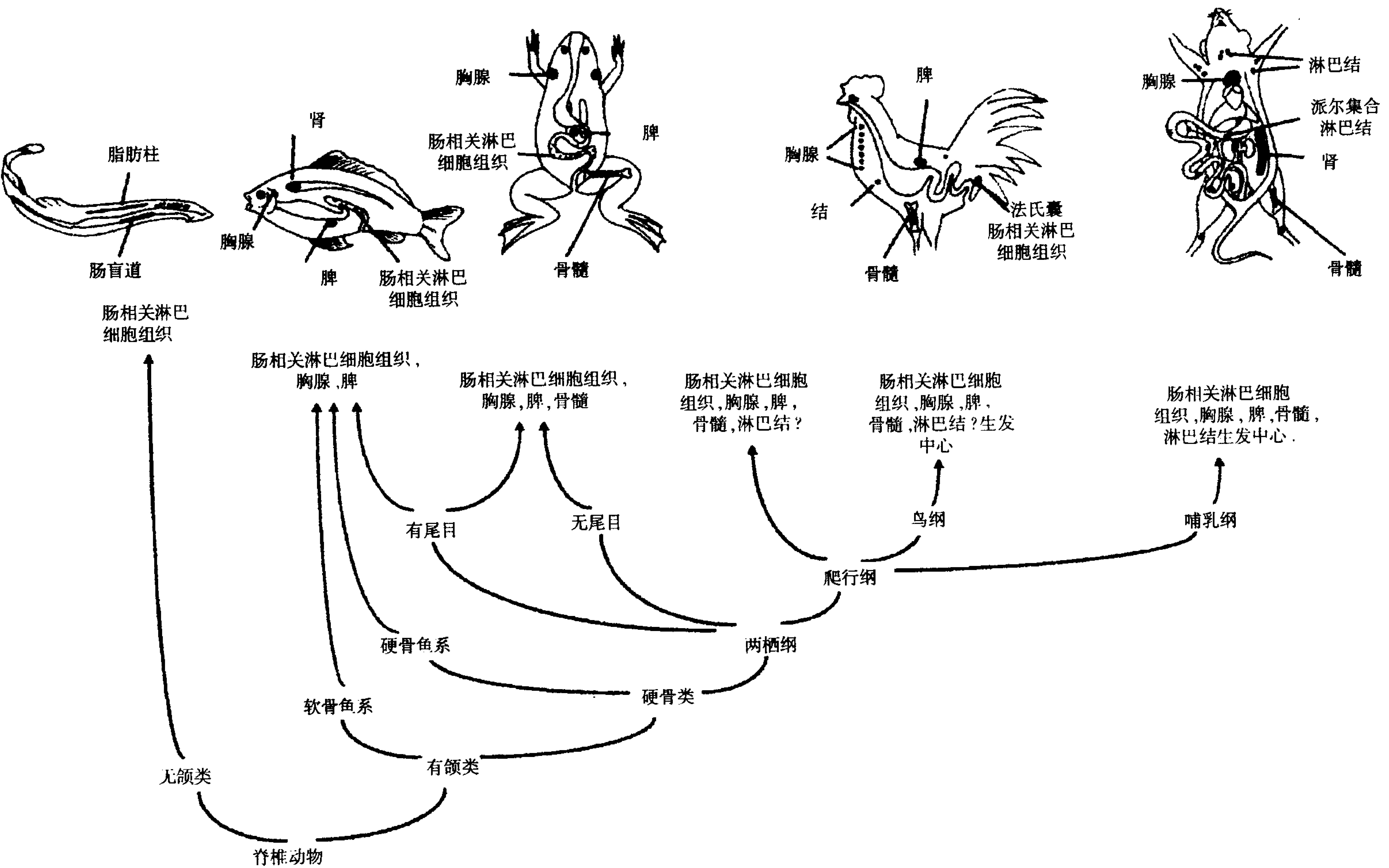


图18.17 淋巴样系统的进化。

致谢

我们感谢 Jim Kaufman 和 Jan Klein，他们允许我们使用了他们尚未发表的内容；也要感谢 John Lambris 和 Chris Secombes，我们曾一起对补体和细胞因子的进化进行了交流。我们还感谢 Charley Steinberg 对我们的手稿的编写给予的程序，交流以及文稿准备方面所做的努力。我们非常感谢 Erika Meier 和 John Hansen 对我们文稿进行的细致的审阅。还要感谢 Cynthia Geiger 和 Allan Brouwer 为我们所做的精美的编辑工作。贝赛尔免疫研究院由 F. Hoffmann-La Roche Ltd（贝赛尔，瑞士）创建和支持。

（谢耀新 译　刘　昕 校）

参 考 文 献

1. Sepkoski Jr. JJ, Bambach RJ, Raup DM, Valentine JW. Phanerozoic marine diversity and the fossil record. *Nature* 1981;293:435–437.
2. Gould SJ. *The Flamingo Smile*. London: Penguin, 1985.
3. Brusca RC, Brusca GJ. *Invertebrates*. Sunderland, Massachusettts: Sinauer Associates, 1990.
4. Rehorn KP, Thelen H, Michelson A, ·Reuter R. A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Dev Suppl* 1996;122:4023–4031.
5. Rittig MG, Kuhn KH, Dechant CA, et al. Phagocytes from both vertebrate and invertebrate species use 'coiling' phagocytosis. *Dev Comp Immunol* 1996;20: 393–406.
6. Pearson AM. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996; 8:20–28.
7. Ottaviani E, Franceschi C. The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. *Immunol Today* 1997;18:169–174.
8. Franc NC, Dimarcq JL, Lagueux M, Hoffmann J, Ezekowitz RA. Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic Cells. *Immunity* 1996;4:431–443.
9. Valembois P, Roch P. Identification par autoradiographie des leucocytes stimulés à la suite de plaies ou de greffes chez un ver de terre. *Biol Cell* 1977;28:81–82.
10. Cooper EL. Earthworm coelomocytes: Role in understanding the evolution of Cellular immunity. I. Formation of monolayers and cytotoxicity. In: Reh˘A0cek D, Blaskovic D, Hink WF, eds. *Proceedings of the III International Colloquium on Invertebrate Tissue Culture*, Bratislavia: Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, 1973;381–404.
11. Boieldieu D, Valembois P. Natural cytotoxicity of sipunculid leukocytes on allogeneic and xenogeneic erythrocytes. *Dev Comp Immunol* 1977;1:207–216.
12. Roch P, Valembois P, Du Pasquier L. Response of earthworm leukocytes to concanavalin A and transplantation antigens. *Adv Exp Med Biol* 1975;64:45–54.
13. Karp RD, Coffaro KA. Cellular defense systems of the Echinodermata. In: Cohen N, Sigel MM, eds. *The Reticuloendothelial System Vol. 3, Phylogeny and Ontogeny*, New York: Plenum, 1982, 257–282.
14. Raftos DA, Tait NN, Briscoe DA. Allograft rejection and alloimmune memory in the solitary urochordate, *Styela plicata*. *Dev Comp Immunol* 1987;11:343–351.
15. Seeger MA, Haffley L, Kaufman TC. Characterization of amalgam: a member of the immunoglobulin superfamily from *Drosophila*. Cell 1988;55:589–600.
16. Karlstrom RO, Wilder LP, Bastiani MJ. Lachesin: an immunoglobulin superfamily protein whose expression correlates with neurogenesis in grasshopper embryos. *Development* 1993;118:509–522.
17. Smith LC, Hildemann WH. Allograft rejection, autograft fusion and inflammatory responses to injury in *Callyspongia diffusa* (Porifera; Demospongia). *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1986;226:445–464.
18. Humphreys T, Reinherz EL. Invertebrate immune recognition, natural immunity and the evolution of positive selection. *Immunol Today* 1994;15:316–320.
19. van de Vyver G. Second set allograft rejection in two sponge species and the problem of an alloimmune memory. In: Manning MJ, ed. Phylogeny of immunological memory, Amsterdam: Elsevier North-Holland Biomedical Press, 1980, 15–21.
20. Smith LC, Hildemann WH. Alloimmune memory is absent in Hymeniacidon sinapium, a marine sponge. *J Immunol* 1984;133:2351–2355.
21. Smith LC, Hildemann WH. Allogeneic Cell interactions during graft rejection in Callyspongia diffusa (Porifera, Demospongia); a study with monoclonal antibodies. Proc R Soc Lond B Biol Sci 1986;226:465–477.
22. Fernandez-Busquets X, Kammerer RA, Burger MM. A 35-kDa protein is the basic unit of the core from the 2 x 10(4)-kDa aggregation factor responsible for species-specific Cell adhesion in the marine sponge Microciona prolifera. J Biol Chem 1996;271:23558–23565.
23. Yin C, Humphreys T. Acute cytotoxic allogeneic histocompatibility reactions involving gray Cells in the marine sponge, Callyspongia diffusa. *Biol Bull* 1996; 191:159–167.
24. Pancer Z, Gershon H, Rinkevich B. Polymorphism in the immunoglobulin-like domains of the receptor tyrosine kinase from the sponge Geodia cydonium. *Cell Adhes Commun* 1996;4:327–339.
25. Leddy SV, Green DR. Historecognition in the Cnidaria. In: Warr GW, Cohen N, eds. *Phylogenesis of Immune Functions*, CRC Press, 1991, 103–116.
26. Neigel JE, Avise JC. Clonal diversity and population structure in a reef-building coral, Acropora cervicornis: self-recognition analysis and demographic interpretation. *Evolution* 1983;37:437–453.
27. Hildemann WH, Raison RL, Cheung G, Hull CJ, Akaka L, Okamoto J. Immunological specificity and memory in a scleractinian coral. *Nature* 1977;270: 219–223.
28. Lubbock R. Clone-specific Cellular recognition in a sea anemone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:6667–6669.
29. Bigger CH. Interspecific and intraspecific acrorhagial aggressive behavior among sea anemones; a recognition of self and nonself. *Biol Bull* 1980;159: 117–134.
30. Theodor J. Distinction between "self" and "nonself" in lower vertebrates. *Nature* 1970;227:690–692.
31. Hauenschild C. Genetische und Entwicklungs-physiologische Untersuchungen über Intersexualität und Gewebeverträglichkeits-Eigenschaft bei Hydroidpolypen *Hydractinia echinata Flemm.* (Hydroz. Bourgainvill.). *Roux Arch Entwicklungsmechanik* 1954;147:1–41.
32. Hauenschild C. Über die Vererbung einer Gewebeverträglichkeits-Eigenschaft bei dem Hydroidpolypen *Hydractinia echinata Flemm.* (Hydroz. Bourgainvill.). *Z Naturforsch* 1956;11:132–183.
33. Du Pasquier L. The genetic control of histocompability reactions: phylogenetic aspects. *Arch Biol* (Brussels) 1974;85:91–103.
34. Ivker FB. A hierarchy of histo-incompatibility in *Hydractinia echinata*. *Biol Bull* 1972;143:162–174.
35. Buss LW, Moore JL, Green DR. Autoreactivity and self tolerance in an invertebrate. *Nature* 1985;313:400–402.
36. Langlet C, Bierne J. Immune characteristics of graft rejection in nemerteans of the genus Lineus. *Eur J Immunol* 1982;12:705–708.
37. Langlet C, Bierne J. Immunocompetent Cells are responsible for rejection of incompatible xenogeneic grafts in Lineus (Invertebrata, Nermertea). *Transplantation* 1982;34:8–12.
38. Langlet C, Bierne J. Immunocompetent Cells requisite for graft rejection in Lineus (Invertebrata, Nemertea). *Dev Comp Immunol* 1984;8:547–557.
39. Lackie M. Transplantation, the limits of recognition. In: Gupta AP, ed. *Haemocytic and Humoral Immunity in Anthropods*, London: Wiley, 1986, 191–223.
40. Dularay B, Lackie AM. The effect of biotic and abiotic implants on the recognition of Blatta orientalis cuticular transplants by the cockraoch *Periplanata americana*. *Dev Comp Immunol* 1987;11:60–77.
41. George JF, Karp RD, Rheins LA. Primary integumentary xenograft reactivity in the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Transplantation* 1984;37: 478–484.
42. Hartman RS, Karp RD. Short-term immunologic memory in the allograft response of the American cockroach. *Transplantation* 1989;47:920–.
43. Fletcher TC, Cooper-Willis CA. The Cellular defense systems of the Mollusca. In: Cohen N, Sigel MM, eds. *The Reticuloendothelial System*, Vol. 3, Phylogeny and Ontogeny, New York: Plenum, 1983, 141–166.
44. Sima P, Vetvicka V. Evolution of immune reactions. *Crit Rev Immunol* 1993;13: 83–113.
45. Ottaviani E, Vergine C. Allo-implant in the freshwater snail *Planorbarius corneus* (Li) (gastropoda, Pulmonata) I. Histological and histochemical study.

Zool Jb Physiol 1990;94:261–267.
46. Hoek RM, Smit AB, Frings H, Vink JM, de Jong-Brink M, Geraerts WPM. A new Ig-superfamily member, molluscan defence (MDM) from *Lymnaea stagnalis*, is down-regulated during parasitosis. *Eur J Immunol* 1996;26:939–944.
47. Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8691–8696.
48. Cooper EL. *Comparative Immunology*. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall, 1976.
49. Parry MJ. Survival of body wall autographs, allografts, and Xenografts in the earthworm *Eisenia foetida*. *J Invert Path* 1978;31:383–388.
50. Dale RP. The basis of graft rejection in the earth worms *Lumbricus vervestris* and *Eisenia foetida*. *J Invest Pathol* 1978;32:264–272.
51. Valembois P, Roch P, Boiledieu D. Cellular defence systems of the Platyhelminthes, Nemertea, Sipunculida and Annelida. In: Cohen N, Sigel M, eds. *The Reticuloendothelial System*. Phologeny and Ontogeny, vol. 3 New York: Plenum, 1982, 89–139.
52. Duprat P. Etude des homogreffes de paroi du corps chez le Lombricien *Eisenia foetida* SAv. Aspects histologiques et immunitaires de la prise de l'acceptation ou du refus des greffons. Doctoral thesis in Natural Sciences, University of Bordeaux, France.
53. Cooper EL. Specific tissue graft rejection in earthworms. *Science* 1969;166: 1414–1415.
54. Karp RD, Hildemann WH. Specific allograft reactivity in the sea star *Dermasterias imbricata*. *Transplantation* 1976;22:44–439.
55. Coffaro KA, Hinegardner RT. Immune response in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Science* 1977;197:1389–1390.
56. Bertheussen K. The cytotoxic reaction in allogeneic mixtures of echinoid phagocytes. *Exp Cell Res* 1979;120:373–381.
57. Oka H, Watanabe H. Colony specificity in compound ascidians as tested by fusion experiments (a preliminary report). *Proc Jpn Acad Sci* 1957;33:657–658.
58. Scofield VL, Schlumberger JM, West LA, Weissman IC. Protochordate allorecognition controlled by a MHC-like gene complex. *Nature* 1982;295: 499–500.
59. Tanaka K. Allogeneic distinction in *Botryllus primigenus* and other colonial ascidians. *Adv Exp Biol Med* 1975;64:115–124.
60. Sabbadin A. La basi genetiche della capacita di fusione para colonie *Botryllus scholsseri* (Ascidiacea). *Red Accad Nag Lincei* 1962;32:1031–1038.
61. Sabbadin A, Astovci C. Chimeras and histocompatibility in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev Comp Immunol* 1988;12:734–742.
62. Rinkevich B, Weissman IL. Incidents of rejection and indifference in Fu/HC incompatible protochordate colonies. *J Exp Zool* 1992;263:105–111.
63. Weissman IL, Saito Y, Rinkevich B. Allorecognition histocompatibility in a protochordate species: is the relationship to MHC somatic or structural? *Immunol Rev* 1990;113:227–241.
64. Buss LW. Somatic Cell parasitism and the evolution of somatic tissue compatibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:5337–5340.
65. Stoner DS, Weissman IL. Somatic and germ Cell parasitism in a colonial ascidian: possible role for a highly polymorphic allorecognition system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15254–15259.
66. Raftos DA, Cooper EL. Proliferation of lymphocyte-like cells from the solitary tunicate, styela clava, in response to allogeneic stimuli. *J Exp Zool* 1991;260: 391–400.
67. Rinkevich B, Weissman IL. Failure to find alloimmune memory in the resorption phenomenon of *Botryllus* cytomictical chimera. *Eur J Immunol* 1990;20: 1775–1779.
68. Hoffmann JA. Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol* 1995;7:4–10.
69. Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. Biological mediators of insect immunity. *Biological mediators of insect immunity* 1997;42:611–643.
70. Soderhall K, Cerenius L, Johansson MW. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence 1994;712:155–161.
71. Soderhall K, Thornqvist PO. Crustacean immunity—a short review. *Crustacean immunity—a short review* 1997;90:45–51.
72. Johansson MW, Soderhall K. The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates. *Prog Mol Sub Cell Biol* 1996;15:46–66.
73. Rizki TM, Rizki RM. The cellular defense syatem of *Drosophila melanogaster*. In: King RC, Akai H, eds. *Insect ultrastructure*, vol 2. Plenum, 1984, 579–604.
74. Sun SC, Lindstrom I, Boman HG, Faye I, Schmidt O. Hemolin: an insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science* 1990; 250:1729–1732.
75. Lanz-Mendoza H, Bettencourt R, Fabbri M, Faye I. Regulation of the insect immune response: the effect of hemolin on cellular immune mechanisms. *Cell Immunol* 1996;169:47–54.
76. Boman H. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:61–92.
77. Hoffmann JA, Janeway CA, Natori S, eds. *Phylogenetic Perspectives in Immunity: The Insect Host Defense*. Austin: R.G Landes Company, 1994.
78. Taniai K, Kadono-Okuda K, Kato Y, et al. Structure of two cecropin B-encoding genes and bacteria-inducible DNA-binding proteins which bind to the 5'-upstream regulatory region in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene* 1995;163: 215–219.
79. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973–983.
80. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CAJ. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394–397.
81. Sun SC, Lindstrom I, Lee JY, Faye I. Structure and expression of the attacin genes in *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem* 1991;196:247–254.
82. Hultmark D, Engstrom A, Andersson K, Steiner H, Bennich H, Boman HG. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J* 1983;2:571–576.
83. Kadalayil L, Petersen UM, Engstrom Y. Adjacent GATA and kappa B-like motifs regulate the expression of a *Drosophila* immune gene. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:1233–1239.
84. Steward R. Dorsal, an embryonic polarity gene in *Drosophila*, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, c-rel. *Science* 1987;238:692–694.
85. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol 1994*;12:141–179.
86. Wilson I, Vogel J, Somerville S. Signalling pathways: a common theme in plants and animals? *Curr Biol* 1997;7:r175–r178.
87. Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 1994;78:1101–1115.
88. Tang X, Frederick RD, Zhou J, Halterman DA, Jia Y, Martin GB. Initiation of plant disease resistance by physical Interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* 1996;274:2060–2063.
89. Zhou J, Tang X, Martin GB. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacteria speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J* 1997;16:3207–3218.
90. Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X. The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 1997;88:57–63.
91. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer Cells. *Annu Rev Immunol* 1996;14:619–648.
92. Lanier L. Natural killer Cells: from no receptors to too many. *Immunity* 1997;6:371–378.
93. Carretero M, Cantoni C, Bellon T, et al. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 1997;27:563–567.
94. Holmgren A, Branden CI. Crystal structure of chaperone protein PapD reveals an immunoglobulin fold. *Nature* 1989;342:248–251.
95. Holmgren A, Kuehn MJ, Branden CI, Hultgren SJ. Conserved immunoglobulin-like features in a family of periplasmic pilus chaperones in bacteria. *EMBO Journal* 1992;11:1617–1622.
96. Bateman A, Eddy SR, Chothia C. Members of the immunoglobulin superfamily in bacteria. *Protein Sci* 1996;5:1939–1941.
97. Muller WE, Muller IM, Gamulin V. On the monophyletic evolution of the metazoa. *Braz J Med Biol Res* 1994;27:2083–2096.
98. Benian GM, Kiff JE, Neckelmann N, Moermann DG, Waterston RH. Sequence of an unusually large protein implicated in regulation of myosin activity in c elegans. *Nature* 1989;342:45–50.
99. Nelson RE, Fessler LI, Takagi Y, et al. Peroxidasin: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *EMBO J* 1994;13:3438–3447.
100. Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily domains for Cell-surface recognition. *Ann Rev Immunol* 1988;6:381.
101. Barclay AN, Brown MH, Law SKA, McKnight AJ, Tomlinson MG, van der Merwe PA. *The leucocyte antigen facts book*. London, San Diego: Academic Press, 1997.
102. Bork P, Holm L, Sander C. The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol 1994;242:309–320*.
103. Li S, Sjogren HO, Hellman U, Pettersson RF, P. W. Cloning and functional characterization of a subunit of the transporter associated with antigen processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8708–8713.
104. Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, et al. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 1997;277: 1306–1309.
105. Harpaz Y, Chothia C. Many of the immunoglobulin superfamily domains in Cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. *J Mol Biol* 1994;238:528–539.
106. Pulido D, Campuzano S, Koda T, Modolell J, Barbacid M. Dtrk, a *Drosophila* gene related to the trk family of neurotrophin receptors, encodes a novel class of neural Cell adhesion molecule. *EMBO J* 1992;11:391–404.
107. Du Pasquier L, Chrètien I. CTX, a new lymphocyte receptor in Xenopus and the early evolution of Ig domains. *Res Immunol* 1996;147:218–226.
108. Thompson C. New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity* 1995;3:531–539.
109. Du Pasquier L, Chrètien I. Why is CTX all the RAGE? *Res Immunol* 1996;147: 261–266.
110. Littman DR, Gettner SN. Unusual intron in the immunoglobulin domain of the newly isolated murine CD4 (L3T4) gene. *Nature 1987;325:453–455*.

111. Sers C, Kirsch K, Rothbacher U, Riethmuller G, Johnson JP. Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 8514–8518.
112. Wang PL, O'Farrell S, Clayberger C, Krensky AM. Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T Cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J Immunol* 1992;148:2600–2608.
113. Miller MM, Goto R, Young S, Chirivella J, Hawke D, Miyada CG. Immunoglobulin variable-region-like domains of diverse sequence within the major histocompatibility complex of the chicken. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 4377–4381.
114. Kaufman J, Skjoedt K, Salomonsen J. The B-G multigene family of the chicken major histocompatibility complex. *Crit Rev Immunol* 1991;11:113–143.
115. Chrètien I, Robert J, Marcuz A, Garcia-Sanz JA, Courtet M, Du Pasquier L. CTX, a novel molecule specifically expressed on the surface of cortical thymocytes in *Xenopus*. *Eur J Immunol* 1996;26:780–791.
116. Katevuo K, Goebel T, Boyd RL, Dunon D, Koskinen R, Imhof B, Vainio O. Chicken thymocyte antigen, Cht1, is a new member of the igsf and is involved in T Cell differertiation. *Dev Comp Immunol* 1997;21:240.
117. Heath JK, White SJ, Johnstone CN, et al. The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad* 1997;94:469–474.
118. Chrètien I, Courtet M, Marcuz A, Katevuo K, Vainio O, Du Pasquier L. The Xenopus CTX thymocyte receptor defines a new family of receptors conserved and duplicated during the evolution of vertebrates. 1998:in preparation.
119. Chothia C, Novotny J, Bruccoleri R, Karplus M. Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J Mol Biol* 1985; 186:651–663.
120. Robert J, Chrètien I, Guiet C, Du Pasquier L. Cross-linking CTX, a novel thymocyte-specific moleucle, inhibits the growth of lymphoid tumor Cells in *Xenopus*. *Mol Immunol* 1997;34:133–143.
121. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, et al. Cloning and expression of a Cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 1992; 267.
122. Vlassara H, Valinsky J, Brownlee M, Cerami C, Nishimoto S, Cerami A. Advanced glycosylation endproducts on erythrocyteCellsurface induce receptor-mediated phagocytosis by macrophages. A model for turnover of aging Cells. *J Exp Med* 1987;166:539–549.
123. Imani F, Horii Y, Suthanthiran M, et al. Advanced glycosylation endproduct-specific receptors on human and rat T-lymphocytes mediate synthesis of interferon gamma: role in tissue remodeling. *J Exp Med* 1993;178:2165–2172.
124. Marchalonis JJ, Schluter SF. On the relevance of invertebrate recognition and defence mechanisms to the emergence of the immune response of vertebrates. *Scand J Immunol* 1990;32:13–20.
125. Bernstein RM, Schluter SF, Bernstein H, Marchalonis JJ. Primordial emergence of the recombination activating gene 1 (RAG1): sequence of the complete shark gene indicates homology to microbial integrases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9454–9459.
126. Hansen JD, Kaattari SL. The recombination activating gene 2 (RAG2) of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Immunogenetics* 1996;44:204–211.
127. Hansen JD. Characterization of rainbow trout terminal deoxynucleotidyl transferase structure and expression. TdT and RAG1 co-expression defines the trout primary lymphoid tissues. *Immunogenetics* 1997 in press.
128. Greenhalgh P, Steiner LA. Recombination activating gene 1 (Rag1) in zebrafish and shark. *Immunogenetics* 1995;41:54–55.
129. Greenhalgh P, Olesen CE, Steiner LA. Characterization and expression of recombination activating genes (RAG-1 and RAG-2) in *Xenopus laevis*. *J Immunol* 1993;151:3100–3110.
130. Hughes AL, Yeager M. Molecular evolution of the vertebrate immune system. *BioEssays* 1997;19:777–786.
131. Nonaka M, Namikawa-Yamada C, Sasaki M, Salter-Cid L, Flajnik MF. Evolution of proteasome subunits delta and LMP2: complementary DNA cloning and linkage analysis with MHC in lower vertebrates. *J Immunol* 1997;159: 734–740.
132. Kandil E, Namikawa C, Nonaka M, et al. Isolation of low molecular mass polypeptide complementary DNA clones from primitive vertebrates. Implications for the origin of MHC class I restricted antigen presentation. *J Immunol* 1996;156:4245–4253.
133. Namikawa C, Salter-Cid L, Flajnik MF, Kato Y, Nonaka M, Sasaki M. Isolation of *Xenopus* LMP-7 homologues. Striking allelic diversity and linkage to MHC. *J Immunol* 1995;155:1964–1971.
134. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986;319:675–678.
135. Karre K. How to recognize a foreign submarine. *Immunol Rev* 1997;155:5–9.
136. Reyburn H, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Sheu EG, Pazmany L, Davis DM, Strominger JL. Human NK. Cells: their ligands, receptors and functions. *Immunol Rev* 1997;155:119–125.
137. Matzinger P, Bevan MJ. Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell Immunol* 1977;29:1–5.
138. Kao TH, McCubbin AG. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 12059–12065.
139. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. On the semantics of immune recognition. *Res Immunol* 1996;147:208–214.
140. Hashimoto K, Nakanishi T, Kurosawa Y. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 6863–6867.
141. Flajnik MF, Canel C, Kramer J, Kasahara M. Which came first, MHC class I or class II? *Immunogenetics* 1991;33:295–300.
142. Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 1991;353:726–730.
143. Trowsdale J. "Both man & bird & beast": comparative organization of MHC genes. *Immunogenetics* 1995;41:1–17.
144. Salter-Cid L, Kasahara M, Flajnik MF. Hsp70 genes are linked to the Xenopus major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 1994;39:1–7.
145. Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:1968–1972.
146. Rippmann F, Taylor WR, Rothbard JB, Green NM. A hypothetical model for the peptide binding domain of hsp70 based on the peptide binding domain of HLA. *EMBO J* 1991;10:1053–1059.
147. Kasahara M, Flajnik MF, Ishibashi T, Natori T. Evolution of the major histocompatibility complex: a current overview. *Transplant Immunol* 1995;3:1–20.
148. Morshauser RC, Wang H, Flynn GC, Zuiderweg ER. The peptide-binding domain of the chaperone protein Hsc70 has an unusual secondary structure topology. *Biochemistry* 1995;34:6261–6266.
149. Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, et al. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 1996;272:1606–1614.
150. George JF, Cooper MD. Gamma/delta T Cells and alpha/beta T Cells differ in their developmental patterns of receptor expression and modulation requirements. *Eur J Immunol* 1990;20:2177–2181.
151. Rzepczyk CM, Anderson K, Stamatiou S, et al. Gamma delta T Cells: their immunobiology and role in malaria infections. *Int J Parasitol* 1997;27:191–200.
152. De Libero G. Sentinel function of broadly reactive human gamma delta T Cells. *Immunol Today* 1997;18:22–26.
153. Chien YH, Jores R, Crowley MP. Recognition by gamma/delta T Cells. *Annu Rev Immunol* 1996;14:511–532.
154. Grossberger D, Parham P. Reptilian class I major histocompatibility complex genes reveal conserved elements in class I structure. *Immunogenetics* 1992;36: 166–174.
155. Rast JP, Haire RN, Litman RT, Pross S, Litman GW. Identification and characterisation of T- Cell antigen receptor-related genes in phylogenetically diverse vertebrate species. *Immunogenetics* 1995;42:204–212.
156. Rast JP, Anderson MK, Strong SJ, Luer C, Litman RT, Litman GW. Alpha, beta, gamma, and delta T-Cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny. *Immunity* 1997;6:1–11.
157. Partula S, de Guerra A, Fellah JS, Charlemagne J. Structure and diversity of the TCR alpha-chain in a teleost fish. *J Immunol* 1996;157:207–212.
158. Fellah JS, Kerfourn F, Dumay AM, Aubet G, Charlemagne J. Structure and diversity of the T-cell receptor alpha chain in the Mexican axolotl. *Immunogenetics* 1997;45:235–241.
159. Göbel TWF, Chen C-L, Lahti J, et al. Identification of T-cell receptor a-chain genes in the chicken. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7856–7860.
160. Campbell KS, Bäckström T, Tiefenthaler G, Palmer E. CART: a conserved antigen receptor transmembrane motif. *Seminars in Immunol* 1994;6:393–410.
161. Rast JP, Litman GW. T-cell receptor gene homologs are present in the most primitive jawed vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9248–9252.
162. Hawke NA, Rast JP, Litman GW. Extensive diversity of transcribed TCR-b in a phylogenetically primitive vertebrate. *J Immunol* 1996;156:2458–2464.
163. Partula S, de Guerra A, Fellah JS, Charlemagne J. Structure and diversity of the T-cell antigen receptor beta-chain in a teleost fish. *J Immunol* 1995;155:699–706.
164. Hordvik I, Jacob ALJ, Charlemagne J, Endresen C. Cloning of T-cell antigen receptor beta chain cDNAs from Atlantic salmon (Salmo salar). *Immunogenetics* 1996;45:9–14.
165. Fellah JS, Kerfourn F, Guillet F, Charlemagne J. Conserved structure of amphibian T-cell antigen receptor b chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6811–6814.
166. Chrètien I, Marcuz A, Fellah J, Charlemagne J, Du Pasquier L. The T-cell receptor beta genes of *Xenopus*. *Eur J Immunol* 1997;27:763–761.
167. Arnaud J, Huchenq A, Vernhes MC, et al. The interchain disulfide bond between TCR alpha beta heterodimers on human T cells is not required for TCR-CD3 membrane expression and signal transduction. *Int Immunol* 1997;9: 615–626.
168. Tjoelker L, Carlson LM, Lee K, et al. Evolutionary conservation of antigen recognition: the chicken T-cell receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7856–7860.
169. Kerfourn F, Charlemagne J, Fellah JS. The structure, rearrangement, and ontogenic expression of Db and Jb gene segments of the mexican axolotl T-cell antigen receptor beta chain (TCRB). *Immunogenetics* 1996;44:275–285.
170. Davis MM, Patten P. Evolutionary features of T-cell antigen-receptor genes. In: Schulze GKDH, ed. *Evolution and Vertebrate Immunity*, Austin: University of Texas Press, 1987, 201–211.

171. Davis MM, Bjorkman PJ. T- Cell antigen receptor genes and T- Cell recognition [published erratum appears in *Nature* Oct. 20, 1988;335(6192):744]. *Nature* 1988;334:395–402.
172. Fellah JS, Kerfourn F, Charlemagne J. Evolution of TCellreceptor genes. Extensive diversity of Vb families in the Mexican Axolotl. *J Immunol* 1994;153: 4539–4545.
173. Six A RJ, McCormack WT, Dunon D, Courtois D, Li Y, Chen CH, Cooper MD. Characterization of avian T-cell receptor gamma genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15329–15334.
174. Hein WR, Dudler L. Divergent evolution of T-cell repertoires: extensive diversity and developmentally regulated expression of the sheep gamma delta T-cell receptor. *EMBO J* 1993;12:715–724.
175. Cahill RN, Kimpton WG, Washington EA, Walker ID. Origin and development of the gamma delta T-cell system in sheep: a critical role for the thymus in the generation of TcR diversity and tissue tropism. *Semin Immunol* 1996;8:351–360.
176. Göbel TW, Fluri M. Identification and analysis of the chicken CD3e gene. *Eur J Immunol* 1997;27:194–198.
177. Dzialo RC, Cooper MD. An amphibian CD3 homologue of the mammalian CD3 g and d genes. *Eur J Immunol* 1997;27:1640–1647.
178. Bernot A, Auffray C. Primary structure and ontogeny of an avian CD3 transcript. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2550–2554.
179. Göbel TW, Chen CL, Shrimpf J, et al. Characterization of avian natural killer Cells and their intra Cellular CD3 protein complex. *Eur J Immunol* 1994;24: 1685–1691.
180. Hsu E. The variation in immunoglobulin heavy chain constant regions in evolution. *Semin Immunol* 1994;6:383–391.
181. Atwell JC, Marchalonis JJ. Phylogenetic emergence of immunoglobulin classes distinct from IgM. *J Immunogenet* 1975;1:367–391.
182. Hsu E, Steiner LA. Primary structure of immunoglobulin through evolution. *Curr Op Struct Biol* 1992;2:422–431.
183. Wilson MR, Warr G. Fish immunoglobulin and the genes that encode them. *Ann Rev Fish Dis* 1992:in press.
184. Shankey TV, Clem LW. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. VIII. Intermolecular heterogeneity of shark 19S IgM antibodies to pneumococcal polysaccharide. *Mol Immunol* 1980;17:365–375.
185. Litman GW, Marchalonis JJ. Evolution of antibodies. In: Ruben LB, Gershwin ME, eds. *Immune Regulation*, New York: Marcel Dekker Inc., 1982, 29–60.
186. Fellah JS, Wiles MV, Charlemagne J, Schwager J. Evolution of vertebrate IgM: complete amino-acid sequence of the constant region of *Ambystoma mexicanum* g chain deduced from cDNA sequence. *Eur J Immunol* 1992;22:2595–2601.
187. Schwager J, Mikoryak CA, Steiner LA. Amino acid sequence of heavy chains from *Xenopus laevis* IgM deduced from cDNA sequences: implicaiton for evolution of immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 2245–2249.
188. Greenberg AS, Hughes AI, Avila D, McKinney CE, Flajnik MF. A novel "chimeric" antibody class in cartilaginous fish: IgM may not be the primordial immunoglobulin. *Eur J Immunol* 1996;26:1123–1129.
189. Du Pasquier L, Schwager J. Evolutions of the Immune System. In: Melchers F, et al., ed. *Progress in Immunology*; Proceedings of the 7th International Congress of Immunology Berlin 1989, vol VII Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong: Springer-Verlag, 1989, 1246–1255.
190. Wilson MR, Marcuz A, van Ginkel F, et al. The immunoglobulin M heavy chain constant region gene of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: an unusual mRNA splice pattern produces the membrane form of the molecule. *Nucl Acids Res* 1990;18:5227–5233.
191. Lee MA, Bengtén A, Daggfeldt A, Rytting A-S, Pilström L. Characterization of rainbow trout cDNAs encoding a secreted and membrane-bound Ig heavy chain and the genomic intron upstream of the first constant exon. *Mol Immunol* 1993; 30:641–648.
192. Bengtén E, Leanderson T, Pilstrom L. Immunoglobulin heavy chain cDNA from the teleost atlantic cod (*Gadus morhua* L): Nucleotide sequences of secretory and membrane form show an unusual splicing pattern. *Eur J Immunol* 1991;21: 3027–3033.
193. Wilson MR, van Ravenstein E, Miller NW, Clem LW, Middleton DL, Warr GW. cDNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two Holostean fish. *Dev Comp Immunol*, 1995;19:153–164.
194. Wilson MR, Ross DA, Miller NW, Clem LW, Middleton DL, Warr GW. Alternate pre-mRNA processing pathways in the production of membrane IgM heavy chains in holostean fish. *Dev Comp Immunol* 1995;19:165–177.
195. Greenberg AS, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney EC, Flajnik MF. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* 1995;374:168–173.
196. Ota T, Rast JP, Litman GW, Amemiya CT. Lungfish immunoglobulins and their evolutionary implications. *Dev Comp Immunol* 1997;21:159.
197. Kobayashi K, Tomonaga S, Kajii T. A second class of immunoglobulin other than IgM present in the serum of a cartilaginous fish, the skate, Raja kenojei: isolation and characterization. *Mol Immunol* 1984;21:397–404.
198. Kobayashi K, Tomonaga S. The second immunoglobulin class is commonly present in cartilaginous fish belonging to the order Rajiformes. *Mol Immunol* 1988; 25:115–120.
199. Harding FA, Amemiya CT, Litman RT, Cohen N, Litman GT. Two distinct immunoglobulin heavy chain isotypes in a primitive, cartilaginous fish, *Raja erinacea*. *Nucl Acids Res* 1990;18:6369–6376.
200. Kobayashi K, Tomonaga S, Teshima K, Kajii T. Ontogenic studies on the appearance of two classes of immunoglobulin-forming cells in the spleen of the Aleutian skate, *Bathyraja aleutica*, a cartilaginous fish. *Eur J Immunol* 1985;15:952–956.
201. Wilson M, Bengtén E, Miller NW, Clem LW, Du Pasquier L, Warr GW. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4593–4597.
202. Hsu E, Flajnik MF, Du Pasquier L. A third immunoglobulin class in amphibians. *J Immunol* 1985;135:1998–2004.
203. Schwager J, Hadji-Azimi I. Mitogen-induced B-cell differentiation in *Xenopus laevis*. *Differentiation* 1984;27:182–188.
204. Amemiya CT, Haire RN, Litman GW. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a third distinct *Xenopus* immunoglobulin heavy chain isotype. *Nucleic Acids Res* 1989;17:5388.
205. Haire RN, Shamblott MJ, Amemiya CT, Litman GW. A second *Xenopus* immunoglobulin heavy chain constant region isotype gene. *Nucleic Acids Res* 1989;17:1776.
206. Steiner LA, Mikoryak CA, Lopes AD, Green C. Immunoglobulins in ranid frogs and tadpoles. *Adv Exp Biol Med* 1975;64:173–183.
207. Warr GW, Ruben LN, Edwards BJ. Evidence for low molecular weight antibodies in the serum of a urodele amphibian, *Ambystoma mexicanum*. *Immunol Lett* 1988;4:99–102.
208. Fellah JS, Charlemagne J. Characterization of IgY-like low molecular weight immunoglobulin class inthe mexican axolotl. *Mol Immunol* 1988;25:1377–1386.
209. Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* 1995;16:392–398.
210. Du Pasquier L, Horton JD. Restoration of antibody responsiveness in early thymectomized *Xenopus* by implantation of major histocompatibility complex–mismatched larval thymus. *Eur J Immunol* 1982;12:546–551.
211. Mussman R, Du Pasquier L, Hsu E. Is Xenopus IgX an analog of IgA? *Eur J Immunol* 1996;26:2823–2830.
212. Fellah JS, Iscaki S, Vaerman JP, Charlemagne J. Transient developmental expression of IgY and secretory component like protein in the gut of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev Immunol* 1992;2:181–190.
213. Mussmann R, Wilson M, Marcuz A, Courtet M, Du Pasquier L. Membrane exon sequences of the three *Xenopus* Ig classes explain the evolutionary origin of mammalian isotypes. *Eur J Immunol* 1996;26.
214. Mussmann R, Courtet M, Schwager J, Du Pasquier L. Microsites for immunoglobulin class switching from *Xenopus* to mammals. *Eur J Immunol* 1997;27:2610–2619.
215. Hsu E. Canonical VH CDR1 nucleotide sequences are conserved in all jawed vertebrates. *Int Immunol* 1996;8:847–854.
216. Kokubu F, Litman R, Shamblott MJ, Hinds K, Litman GW. Diverse organization of immunoglobulin VH gene loci in a primitive vertebrate. *EMBO J* 1988;7: 3413–3422.
217. Ventura-Holman T, Ghaffari SH, Lobb CJ. Characterization of a seventh family of immunoglobulin heavy chain VH gene segments in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Eur J Immunogenet* 1996;23:7–14.
218. Roman T, Charlemagne J. The immunoglobulin repertoire of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): definition of nine IgH-V families. *Immunogenetics* 1994;40:210–216.
219. Roman T, Andersson E, Bengten E, et al. Unified nomenclature of Ig VH genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): definition of eleven VH families. *Immunogenetics* 1996;43:325–326.
220. Schwager J, Bürckert N, Courtet M, Du Pasquier L. Genetic basis of the antibody repertoire in *Xenopus*: analysis of the VH diversity. *EMBO J* 1989;8:2989–3001.
221. Hsu E, Schwager J, Alt FW. Evolution of immunoglobulin genes: VH families in the amphibian *Xenopus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8010–8014.
222. Haire RN, Amemiya CT, Suzuki D, Litman GW. Eleven distinct VH gene families and additional patterns of sequence variation suggest a high degree of immunoglobulin gene complexity in a lower vertebrate, *Xenopus laevis*. *J Exp Med* 1990;171:1721–1737.
223. Litman GW, Murphy K, Berger L, Litman R, Hinds K, Erickson BW. Complete nucleotide sequences of three VH genes in caiman, a phylogenetically ancient reptile: evolutionary diversification in coding segments and variation in the structure and organization of recombination elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:844–848.
224. Turchin A, Hsu E. The generation of antibody diversity in the turtle. *J Immunol* 1996;156:3797–3805.
225. Desravines S, Zhang M., Hsu E. 1997, extensive immunoglobulin Vh and Jh diversity in the turtle. *J Immunnol* 1997 (in press).
226. Reynaud C-A, Dahan A, Anquez V, Weill J-C. Somatic hyperconversion diversifies the single VH gene of the chicken with a high incidence in the D region. Cell 1989;59:171–183.
227. Schwager J, Bürckert N, Courtet M, Du Pasquier L. The ontogeny of diversification at the immunoglobulin heavy chain locus in *Xenopus*. *EMBO J* 1991;10: 2461–2470.
228. Hayman JR, Ghaffari SH, Lobb CJ. Heavy chain joining region segments of the channel catfish. Genomic organization and phylogenetic implications. *J Immunol* 1993;151:3587–3596.

229. Andersson F, Tormanen V, Matsunaga T. Evolution of a VH gene family in low vertebrates. *Int Immunol* 1991;3:527–533.
230. Schroeder HWJ, Hillson JL, Perlmutter RM. Structure and evolution of mammalian VH families. *Intl Immunol* 1990;2:41–50.
231. Ota T, Nei M. Divergent evolution and evolution by the birth-and-death process in the immunoglobulin VH gene family. *Mol Biol Evol* 1994;11:469–482.
232. Andersson E, Matsunaga T. Evolution of immunoglobulin heavy chain variable region genes: a VH family can last for 150–200 million years or longer. *Immunogenetics* 1995;41:18–28.
233. Rothenfluh HS, Blanden RV, Steele EJ. Evolution of V genes: DNA sequence structure of functional germline genes and pseudogenes. *Immunogenetics* 1995; 42:159–171.
234. Tanaka T, Nei M. Positive darwinian selection observed at the variable-region genes of immunoglobulins. Mol Biol Evol 1989;6:447–459.
235. Ota T, Nei M. Evolution of immunoglobulin VH pseudogenes in chickens. *Mol Biol Evol* 1995;12:94–102.
236. Greenberg AS, Steiner L, Kasahara M, Flajnik MF. Isolation of a shark immunoglobulin light chain cDNA clone encoding a protein resembling mammalian kappa light chains: implications for the evolution of light chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10603–10607.
237. Rast JP, Anderson MK, Ota T, et al. Immunoglobulin light chain class multiplicity and alternative organizational forms in early vertebrate phylogeny. *Immunogenetics* 1994;40:83–99.
238. Hohman VS, Schluter SF, Marchalonis JJ. Complete sequence of a cDNA clone specifying sandbar shark immunoglobulin light chain: gene organization and implications for the evolution of light chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 276–280.
239. Lobb CJ, Olson MO, Clem LW. Immunologlobulin light chain classes in a teleost fish. *J Immunol* 1984;132:1917–1923.
240. Daggfeldt A, Bengtén E, Pilström L. A cluster type organization of the loci of the immunoglobulin light chain in Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) indicated by nucleotide sequences of cDNAs and hybridization analysis. *Immunogenetics* 1993;38:199–209.
241. Ghaffari SH, J. LC. Structure and genomic organization of immunoglobulin light chain in the channel catfish. An unusual genomic organizational pattern of segmental genes. *J Immunol* 1993;151:6900–6912.
242. Partula S, Schwager J, Timmusk S, Pilström L, Charlemagne J. A second immunoglobulin light chain isotype in the rainbow trout. *Immunogenetics* 1996; 45:44–51.
243. Zezza DJ, Mikoryak CA, Schwager J, Steiner LA. Sequence of C region of L chains from *Xenopus laevis* Ig. *J Immunol* 1991;146:4041–4047.
244. Schwager J, Bürckert N, Schwager M, Wilson NM. Evolution of immunoglobulin light chain genes: analysis of *Xenopus* Ig L isotypes and their contribution to antibody diversity. *EMBO J* 1991;3:505–511.
245. Haire RN, Ota T, Rast JP, et al. A third Ig light chain gene isotype in *Xenopus laevis* consists of six distinct VL families and is related to mammalian l genes. *J Immunol* 1996;157:1544–1550.
246. Stewart SE, Du Pasquier L, Steiner LA. Diversity of expressed V and J regions of immunoglobulin light chains in *Xenopus laevis*. *Eur J Immunol* 1993;23:1980–1986.
247. Du Pasquier L, Courtet M, Robert J. A *Xenopus* lymphoid tumor Cell line with complete Ig genes rearrangements and T-cell characteristics. *Mol Immunol* 1995; 32:583–593.
248. Hsu E, Lefkovits I, Flajnik M, Du Pasquier L. Light chain heterogeneity in the amphibian *Xenopus*. *Mol Immunol* 1991;28:985–994.
249. Mikoryak CA, Steiner LA. Noncovalent association of heavy and light chains in *Rana catesbeiana* immunoglobulins. *J Immunol* 1984;133:376–383.
250. Mikoryak CA, Steiner LA. Amino acid sequence of the constant region of immunoglobulin light chains from *Rana catesbeiana*. *Mol Immunol* 1988;25: 695–703.
251. Saluk PH, Krauss J, Clem LW. The presence of two antigenetically distant light chains (k and l?) in alligator immunoglobulins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 133:365–369.
252. Reynaud C-A, Anquez V, Dahan A, Weill J-C. A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. *Cell* 1985;40: 283–291.
253. Grant JA, Sanders B, Hood L. Partial amino acid sequences of chicken and turkey immunoglobulin light chains. Homology with mammalian lambda chains. *Biochemistry* 1971;10:3123–3132.
254. Fazel S, Wiersma EJ, Shulman MJ. Interplay of J chain and disulfide bonding in assembly of polymeric IgM. *Int Immunol* 1997;9:1149–1158.
255. Parkhouse RME, Askonas BA, Dourmashkin RR. Electron microscopic studies of mouse immunoglobulin M; structure and reconstitution following reduction. *Immunology* 1970;18:575–584.
256. Hadji-Azimi I. Anuran immunoglobulins. A review. *Dev Comp Immunol* 1979;3: 233–243.
257. Mikoryak CA, Margolies MN, Steiner LA. J chain in Rana catesbeiana high molecular weight Ig. *J Immunol* 1988;140:4279–4285.
258. Hohman V, Willett CE, Stewart SE, Steiner LA. Sequence analysis and expression patterns of J chain in *Xenopus laevis*. *Dev Comp Imm* 1997;21:200.
259. Du Pasquier L, Hsu E. Immunoglobulin expression in diploid and polyploid interspecies hybrid of *Xenopus*: evidence for allelic exclusion. *Eur J Immunol* 1983;13:585–590.
260. Hinds KR, Litman GW. Major reorganization of immunoglobulin VH segmental elements during vertebrate evolution. *Nature* 1986;320:546–549.
261. Litman GW, Rast JP, Hulst MA, et al. Evolutionary origins of immunoglobulin gene diversity. In: Gergely J, ed. *Progress in Immunology*, vol VIII Hungary: Springer-Verlag, 1993, 107–114.
262. Ishiguro H, Kobayashi K, Suzuki M, Titani K, Tomonaga S, Kurosawa Y. Isolation of a hagfish gene that encodes a complement component. *EMBO J* 1992;11: 829–837.
263. Schwager J, Grossberger D, Du Pasquier L. Organization and rearrangement of immunoglobulin M genes in the amphibian *Xenopus*. *EMBO J* 1988;7: 2409–2415.
264. Lundqvist M, Bengten E, Stromberg S, Pilström L. Ig light chain gene in the siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *J Immunol* 1996;157:2031–2038.
265. Mussmann R. B-cell development in the amphibian *Xenopus*, University of Basel, 1996.
266. Magor KE, Higgins DA, Middleton DL, Warr GW. One gene encodes the heavy chains for three different forms of IgY in the duck. *J Immunol* 1994;153: 5549–5555.
267. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993;363:446–448.
268. Hadji-Azimi I, Schwager J, Thiébaud C. B-lymphocyte differentiation in Xenopus laevis larvae. *Dev Biol* 1982;90:253–258.
269. Du Pasquier L, Wilson M, Greenberg A, Flajnik MF. Somatic mutation in ectothermic vertebrates. In: Kelsoe G, Flajnik MF, eds. *Curr Top Microbiol Immunol*, vol 229 Heidelberg: Springer, 1997, 199–216.
270. Hsu E, Du Pasquier L. Ontogeny of the immune system in *Xenopus*. I. Larval immune response. *Differentiation* 1984;28:109–115.
271. Desravines S, Hsu E. Measuring CDR3 length variability in individuals during ontogeny. *J Immunol* Methods 1994;168:219–225.
272. Hsu E, Du Pasquier L. Ontogeny of the immune system in Xenopus II. Antibody repertoire differences between larvae and adults. *Differentiation* 1984;28:116–122.
273. Reynaud CA, Dahan A, Weill JC. A gene conversion program during the ontogenesis of chicken B cells. *Trends Genet* 1987;3:248–251.
274. Weill J-C, Reynaud C-A. Early B-cell development in chickens, sheep and rabbits. *Curr Op Immunol* 1992;4:177–180.
275. Weill J-C, Reynaud C-A. The chicken BCellcompartment. *Science* 1987;238: 1094–1098.
276. Becker ES, Knight KL. Diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits. *Cell* 1990;63:987–997.
277. Reynaud C-A, Mackay C, Müller RG, Weill JC. Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer's patches. Cell 1991;64:995–1005.
278. Butler JE, Sun J, Kacskovics I, Brown WR, Navarro P. The VH and CH immunoglobulin genes of swine: implications for repertoire development. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;54:7–17.
279. Kobel HR, Du Pasquier L. Genetics of polyploid *Xenopus*. *Tr Genet* 1986;12: 310–315.
280. Hordvik I, Voie AM, Glette J, Male R, Endresen C. Cloning and sequence analysis of two isotypic IgM heavy chain genes from Atlantic salmon, *Salmo salar L*. *Eur J Immunol* 1992;22:2957–2962.
281. Raison RL, Hull CJ, Hildemann WH. Production and specificity of antibodies to strptococci in the Pacific hagfish *Eptatretus stoutii*. *Dev Comp Immunol* 1978; 2:253–262.
282. Nonaka M, Fujii T, Kaidoh T, et al. Purification of a lamprey complement protein homologous to the third component of the mammalian complement system. *J Immunol* 1984;133:3242–3249.
283. Fujii T, Nakamura T, Sekizawa A, Tomonaga S. Isolation and characterization of a protein from hagfish serum that is homologous to the third component of the mammalian complement system. *J Immunol* 1992;148:117–123.
284. Hagen M, Filosa MF, Youson JH. Immunocytochemical localization of antibody-producing cells in adult lamprey. *Immunol Letters* 1983;6:87–92.
285. Zapata A, F˘84nge R, Mattisson A, Villena A. Plasma Cells in adult Atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*. *Cell Tissue Res* 1984;235:691–693.
286. Zapata A, Ardavin CF, Gomariz RP, Leceta J. Plasma Cells in the ammocoete of *Petromyzon marinus*. *Cell Tissue Res* 1981;221:203–208.
287. Makel˘84 O, Litman GW. Lack of heterogeneity in anti-hapten antibodies of a phylogenetically primitive shark. *Nature* 1980;287:639–640.
288. Litman GW, Scheffel C, Makelä O. Immunoglobulin diversity in the phylogenetically primitive shark *Heterodontus francisci*. Comparison of fine specificity in hapten binding by antibody to p-azobenzenearsonate. *Immunol Lett* 1980;1: 213–215.
289. Kehoe JM, Sharon J, Gerber-Jenson B, Litman GW. The structure of immunoglobulin variable regions in the horned shark, *Heterodontus francisci*. *Immunogenetics* 1979;7:35–40.
290. Clem LW, McLean WE, Shankey V. Quantitative and qualitative aspects of the antibody library of sharks. *Adv Exp Med Biol* 1975;64:231–239.
291. Kokubu F, Hinds K, Litman R, Shamblott MJ, Litman GW. Extensive families of constant region genes in a phylogenetically primitive vertebrate indicate an additional level of immunoglobulin complexity. *Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:*

5868–5872.
292. Hinds-Frey KR, Nishikata H, Litman RT, Litman GW. Somatic variation precedes extensive diversification of germline sequences and combinatorial joining in the evolution of immunoglobulin heavy chain diversity. *J Exp Med* 1993;178: 815–824.
293. Anderson M, Amemiya C, Luer C, et al. Complete genomic sequence and patterns of transcription of a member of an unusual family of closely related, chromosomally dispersed Ig gene clusters in Raja. *Int Immunol* 1994;6:1661–1670.
294. Rast J, Amemiya CT, Litman RT, Strong S, Litman GW. The immunoglobulin heavy chain genes of a modern representative of a major independent lineage of the cartilaginous fish provide insight into the evolution of rearranging immune receptor genes. *Immunogenetics* 1997:in press.
295. Machulla HKG, Richter RF, Ambrosius H. Study of antibody heterogeneity of carp (Cyprinus carpio, L). The idiotypic specificity of anti-DNP antibodies. *Immunol Lett* 1980;1:329–334.
296. Richter RF, Ambrosius H. Antibodies of IgM-type produced in carp (Cyprinus carpio, L.). *Eur J Immunol* 1979;9:578–580.
297. Vilain C, Wetzel MC, Du Pasquier L, Charlemagne J. Structural and functional analysis of spontaneous anti-nitrophenyl antibodies in three cyprinid fish species: carp (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Carassius auratus*) and tench (*Tinca tinca*). *Dev Comp Immunol* 1984;8:611–622.
298. Wetzel MC, Charlemagne J. Antibody diversity in fish. Isoelectrofocalisation study of individually-purified specific antibodies in three teleost fish species: tench, carp and goldfish. *Dev Comp Immunol* 1985;9:261–270.
299. Arkoosh MR, Kaattari SL. Development of immunological memory in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). I. An immunochemical and Cellular analysis of the B cell response. *Dev Comp Immunol* 1991;15:279–293.
300. Zhang H, Khor, I.W., Evans, D.A., and Kaattari, S.L. Characterization of affinity maturation in trout. *Dev Comp Immunol* 1997;21:100.
301. Cossarini-Dunier M, Desvaux FX, Dorson M. Variability in humoral responses to DNP-KLH of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comparison of antibody kinetics and immunoglobulin spectrotypes between normal trouts and trouts obtained by gynogeneis or self fertilization. *Dev Comp Immunol* 1986;10:207–217.
302. Clem LW, Miller NW, Bly JE. Evolution of lymphocyte subpopulations, their interactions and temperature sensitivities. In: Warr G, Cohen N, eds. *Phylogenesis of immune functions*, Boca Raton FL: CRC Press, 1991, 191–213.
303. von Ginkel FW, Miller NW, Lobb CJ, Clem LW. Characterization of anti-hapten antibodies generated in vitro by channel catfish peripheral blood lymphocytes. *Dev Comp Immunol* 1992;16:139–154.
304. Lobb CJ. Preferential expression of catfish light chain immunoglobulin isotypes in anti-dinitrophenyl antibodies. *J Immunogenet* 1986;13:19–28.
305. Gonzalez R. Natural anti-TNP antibodies from rainbow trout interfere with viral infection in vitro. *Res Immunol* 1989;140:675–684.
306. Michel C, Gonzalez R, Bonjour E, Avrameas S. A concurrent increasing of natural antibodies and enhancement of resistance to furunculosis in rainbow trout. *Ann Rech Vet* 1990;21:211–218.
307. Magnadottir B, Gudmundsdottir S, Gudmundsdottir BK. Study of the humoral response of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*), naturally infected with *Aeromonas salmonicida* ssp. achromogenes. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 49:127–142.
308. Miller NW, Rycyzyn MA, Wilson MR, Warr GW, Naftel JP, Clem LW. Development and characterization of channel catfish long term BCelllines. *J Immunol* 1994;152:2180–2189.
309. Charlemagne J. Antibody diversity in amphibians. Non-inbred axolotls used the same unique heavy chain and a limited number of light chains for their anti-2,4-dinitrophenyl antibody responses. *Eur J Immunol* 1987;17:421–424.
310. Du Pasquier L. Antibody diversity in lower vertebrates_why is it so restricted? *Nature* 1982;296:311–313.
311. Brandt DC, Griessen M, Du Pasquier L, Jaton JC. Antibody diversity in amphibians: evidence for the inheritance of idiotypic specificities in isogenic *Xenopus*. *Eur J Immunol* 1980;10:731–736.
312. Du Pasquier L, Schwager J. Immunoglobulin genes and B cell development in amphibians. *Adv Exp Med Biol* 1991;292:1–9.
313. Wilson M, Hsu E, Marcuz A, Courtet M, Du Pasquier L, Steinberg C. What limits affinity maturation of antibodies in *Xenopus*—the rate of somatic mutation or the ability to select mutants? *EMBO J* 1992;11:4337–4347.
314. Wabl MR, Du Pasquier L. Antibody patterns in genetically identical frogs. *Nature* 1976;264:642–644.
315. Du Pasquier L, Wabl MR. Antibody diversity in amphibians: inheritance of isoelectric focusing antibody patterns in isogenic frogs. *Eur J Immunol* 1978;8: 428–433.
316. Wilson M, Marcuz A, Du Pasquier L. Somatic mutations during an immune response in *Xenopus* tadpoles. *Dev Immunol* 1995;4:227–234.
317. Wagner SD, Milstein C, Neuberger MS. Codon bias targets mutation. *Nature* 1995;376:732.
318. Wilson M, Marcuz A, Courtet M, Du Pasquier L. Sequences of C m and the VH1 family in LG7, a clonable strain of *Xenopus*, homozygous for the immunoglobulin loci. *Dev Immunol* 1992;3:13–24.
319. Du Pasquier L, Robert J. In vitro growth of thymic tumor Cell lines from *Xenopus*. *Dev Immunol* 1992;2:295–307.
320. Du Pasquier L. Phylogeny of B-cell development. *Curr Opin Immunol* 1993;5: 185–193.
321. Grey HM. Phylogeny of the immune response. Studies on some physical, chemical and serologic characteristics of antibody produced in the turtle. *J Immunol* 1963;91:819–825.
322. Ivanyi J, Moreno C. Isoelectric spectra of antibodies in chicken following recovery from immunological tolerance or bursectomy. In: Solomon J, Horton JD, eds. *Developmental Immunology*, Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 1977.
323. Kubo RT, Rosenblum IY, Benedict AA. The unblocked N-terminal sequence of chicken IgG l-like light chains. *J Immunol* 1970;105:534–536.
324. Wasserman RL, Kehoe JM, Capra JD. The VH III subgroup of immunoglobulin heavy chains: phylogenetically associated residues in several avian species. *J Immunol* 1974;113:954–957.
325. Voss EW, Watt RH. Comparison of the microenvironment of chicken and rabbit antibody active site. *Adv Exp Med Biol* 1977;88:391–401.
326. Yamaga K, Benedict AA. Class, amounts and affinities of anti-dinitrophenyl antibodies in chickens. I. Production of 7S and 17S antibodies of equal affinity by intravenous injection of antigen. *J Immunol* 1975;115:750–758.
327. Yamaga K, Benedict AA. Class, amounts, and affinities of anti-dinitrophenyl antibodies in chickens. II. Production of a restricted population of high affinity 7S antibodies by injection of antigen emulsified in adjuvant. *J Immunol* 1975; 115:759–764.
328. Arakawa H, Furusawa S, Ekino S, Yamagishi H. Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers. *EMBO J* 1996;15: 2540–2546.
329. Weinstein PD, Anderson AO, Mage RG. Rabbit IgH sequences in appendix germinal centers: VH diversification by gene conversion-like and hypermutation mechanisms. *Immunity* 1994;1:647–659.
330. Croix DA, Samples NK, Vandeberg JL, Stone WH. Immune response of a marsupial (*Monodelphis domestica*) to sheep red blood cells. *Dev Comp Immunol* 1989;13:73–78.
331. Klein J. Natural history of the histocompatibility complex. New York: John Wiley & Sons, 1986.
332. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 1974;248:701–702.
333. Kasahara M, McKinney EC, Flajnik MF, Ishibashi T. The evolutionary origin of the major histocompatibility complex: polymorphism of class II alpha chain genes in the cartilaginous fish. *Eur J Immunol* 1993;23:2160–2165.
334. Bartl S, Weissman IL. Isolation and characterization of major histocompatibility complex class IIB genes from the nurse shark. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 262–266.
335. Bartl S, Baish M.A, Flajnik MF, Ohta Y. Identification of class I genes in cartilaginous fish, the most ancient group of vertebrates displaying an adaptive immune system. 1997: *J Immunol* 159: 6097–6104 .
336. Kaufman J, Volk H, Wallny HJ. A "minimal essential Mhc" and an "unrecognized Mhc": two extremes in selection for polymorphism. *Immunol Rev* 1995; 143:63–88.
337. Sammut B, Laurens V, Tournefier A. Isolation of Mhc class I cDNAs from the axolotl *Ambystoma mexicanum*. *Immunogenetics* 1997;45:285–294.
338. Sammut B, Calin-Laurens V, Tournefier A. Evolution of the MHC: Isolation of Class II chain cDNAS from the urodele Ambystoma mexicanum. Abstracts 9th Int Cong Immunol San Francisco 1995.
339. Sammut B. *Caractérisation des gènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité de deux Amphibiens urodèles du genre ambystoma*, Ambystoma mexicanum *et* Ambystoma tigrinum, Université de Bourgogne, Dijon, 1997.
340. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987;329:506–512.
341. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993;364:33–39.
342. Kaufman J, Salomonsen J, Flajnik M. Evolutionary conservation of MHC class I and class II molecules—different yet the same. *Semin Immunol* 1994;6: 411–424.
343. Sultmann H, Mayer WE, Figueroa F, O'Huigin C, Klein J. Zebrafish Mhc class II alpha chain-encoding genes: polymorphism, expression, and function. *Immunogenetics* 1993;38:408–420.
344. Kelly AP, Monaco JJ, Cho SG, Trowsdale J. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* 1991;353:571–573.
345. Cho SG, Attaya M, Monaco JJ. New class II-like genes in the murine MHC. *Nature* 1991;353:573–576.
346. Figueroa F, Ono H, Tichy H, O'Huigin C, Klein J. Evidence for insertion of a new intron into an Mhc gene of perch-like fish. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1995;259:325–330.
347. Guild BC, Erikson RL, Strominger JL. HLA-A2 and HLA-B7 antigens are phosphorylated in vitro by rous sarcoma virus kinase (pp60v-src) at a tyrosine residue encoded in a highly conserved exon of the intra cellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2894–2898.
348. Guild BC, Strominger JL. Human and murine class I MHC antigens share conserved serine 335, the site of HLA phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 1984; 259:9235–9240.

349. Cosson P, Bonifacino JS. Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules. *Science* 1992;258:659–662.
350. Kaufman J, Anderson R, Avila D, et al. Different features of the MHC class I heterodimer have evolved at different rates. *J Immunol* 1992;148:1532–1546.
351. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 1991; 353:321–325.
352. Shum BP, Avila D, Du Pasquier L, Kasahara M, Flajnik MF. Isolation of a classical MHC class I cDNA from an amphibian. Evidence for only one class I locus in the *Xenopus* MHC. *J Immunol* 1993;151:5376–5386.
353. Parham P. The rise and fall of great class I genes. *Semin Immunol* 1994;6: 373–382.
354. Klein J, O'Huigin C. The conundrum of nonclassical major histocompatibility complex genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6251–6252.
355. Calabi F, Milstein C. A novel family of human major histocompatibility complex-related genes not mapping to chromosome 6. *Nature* 1986;323:540–543.
356. Por Celli S, Morita CT, Brenner MB. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* 1992;360:593–597.
357. Wang CR, Loveland BE, Lindahl KF. H-2M3 encodes the MHC class I molecule presenting the maternally transmitted antigen of the mouse. *Cell* 1991;66: 335–345.
358. Watkins DI, Chen ZW, Hughes AL, Evans MG, Tedder TF, Letvin NL. Evolution of the MHC class I genes of a New World primate from ancestral homologues of human non-classical genes. *Nature* 1990;346:60–63.
359. Simister NE, Mostov KE. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* 1989;337:184–187.
360. Burmeister WP, Gastinel LN, Simister NE, Blum ML, Bjorkman PJ. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature* 1994;372:336–343.
361. Araki T, Gejyo F, Takagaki K, et al. Complete amino acid sequence of human plasma Zn-alpha 2-glycoprotein and its homology to histocompatibility antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:679–683.
362. Kasahara M, Kandil E, Salter-Cid L, Flajnik MF. Origin and evolution of the class I gene family: why are some of the mammalian class I genes encoded outside the major histocompatibility complex? *Res Immunol* 1996;147:278–285.
363. Hughes AL, Nei M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* 1988;335: 167–170.
364. Plachy J, Pink JR, Hala K. Biology of the chicken MHC (B complex). *Crit Rev Immunol* 1992;12:47–79.
365. Kaufman J, Wallny HJ. Chicken MHC molecules, disease resistance and the evolutionary origin of birds. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;212:129–141.
366. Jaffe L, Robertson EJ, Bikoff EK. Distinct patterns of expression of MHC class I and beta 2-microglobulin transcripts at early stages of mouse development. *J Immunol* 1991;147:2740–2749.
367. Flajnik MF, Kaufman JF, Hsu E, Manes M, Parisot R, Du Pasquier L. Major histocompatibility complex-encoded class I molecules are absent in immunologically competent *Xenopus* before metamorphosis. *J Immunol* 1986;137: 3891–3899.
368. Flajnik MF, Du Pasquier L. MHC class I antigens as surface markers of adult erythrocytes during the metamorphosis of *Xenopus*. *Dev Biol* 1988;128:198–206.
369. Du Pasquier L, Flajnik MF. Expression of MHC class II antigens during *Xenopus* development. *Dev Immunol* 1990;1:85–95.
370. Rollins-Smith L, Blair P. The expression of class II major histocompatibility complex antigens on adult T Cells in *Xenopus* is metamorphosis dependent. *Dev Immunol* 1990;1:97–104.
371. Kaufman J, Skjoedt K, Salomonsen J. The MHC molecules of nonmammalian vertebrates. *Immunol Rev* 1990;113:83–117.
372. Rodrigues PNS, van Maanen A, Taverne-Thiele A, Rombout JHMW, Egberts E, Stet JM. Cell surface expression of MHC class I and 2-microglobulin in carp (*Cyprinus carpio L.*) lymphoid tissues during ontogeny. *Dev Immunol* in press.
373. Monaco JJ, McDevitt HO. Identification of a fourth class of proteins linked to the murine major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79: 3001–3005.
374. Brown MG, Driscoll J, Monaco JJ. Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* 1991; 353:355–357.
375. Deverson EV, Gow IR, Coadwell WJ, Monaco JJ, Butcher GW, Howard JC. MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* 1990;348:738–741.
376. Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 1990;348:741–744.
377. Kasahara M, Nakaya J, Satta Y, Takahata N. Chromosomal duplication and the emergence of the adaptive immune system. *Trends Genet* 1997;13:90–92.
378. Kasahara M, Hayashi M, Tanaka K, Inoko H, Sugaya K, Ikemura T, Ishibashi T. Chromosomal localization of the proteasome Z subunit gene reveals an ancient chromosomal duplication involving the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9096–9101.
379. Trachtulec Z, Hamvas RM, Forejt J, Lehrach HR, Vincek V, Klein J. Linkage of TATA-binding protein and proteasome subunit C5 genes in mice and humans reveals synteny conserved between mammals and invertebrates. *Genomics* 1997; 44:1–7.
380. Spring J. Vertebrate evolution by interspecific hybridisation6are we polyploid? *FEBS Lett* 1997;400:2–8.
381. Du Pasquier L, Courtet M, Chrétien I. Conservation and variation in CTX gene organization and duplication from amphibians to mammals. 1998:in preparation.
382. Ohno S. *Evolution by gene duplication*. New York: Springer, 1970.
383. Nonaka M, Namikawa C, Kato Y, Sasaki M, Salter-Cid L, Flajnik MF. Major histocompatibility complex gene mapping in the amphibian *Xenopus* implies a primordial organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5789–5791.
384. Bingulac-Popovic J, Figueroa F, Sato A, et al. Mapping of mhc class I and class II regions to different linkage groups in the zebrafish, *Danio rerio*. *Immunogenetics* 1997;46:129–134.
385. Kato Y, Salter-Cid L, Flajnik MF, et al. Isolation of the *Xenopus* complement factor B complementary DNA and linkage of the gene to the frog MHC. *J Immunol* 1994;153:4546–4554.
386. Nakamura T, Sekizawa A, Fujii T, Katagiri C. Cosegregation of the polymorphic C4 with the MHC in the frog *Xenopus laevis*. *Immunogenetics* 1986;23:181–186.
387. Mo R, Kato Y, Nonaka M, Nakayama K, Takahashi M. Fourth component of Xenopus laevis complement: cDNA cloning and linkage analysis of the frog MHC. *Immunogenetics* 1996;43:360–369.
388. Guillemot F, Billault A, Pourquie O, et al. A molecular map of the chicken major histocompatibility complex: the class II beta genes are closely linked to the class I genes and the nucleolar organizer. *EMBO J* 1988;7:2775–2785.
389. Koch C. A genetic polymorphism of the complement component factor B in chickens not linked to the major histocompatibility complex (MHC). *Immunogenetics* 1986;23:364–367.
390. Hansen JD, Strassburger P, Du Pasquier L. Conservation of an alpha 2 domain within the teleostean world, MHC class I from the rainbow trout Oncorhynchus mykiss. *Dev Comp Immunol* 1996;20:417–425.
391. van Erp SH, Egberts E, Stet RJ. Evidence for multiple distinct major histocompatibility complex class I lineages in teleostean fish. *Eur J Immunogenet* 1996; 23:371–381.
392. Flajnik MF, Kasahara M, Shum BP, Salter-Cid L, Taylor E, Du Pasquier L. A novel type of class I gene organization in vertebrates: a large family on non-MHC-linked class I genes is expressed at the RNA level in the amphibian *Xenopus*. *EMBO J* 1993;12:4385–4396.
393. Du Pasquier L, Flajnik. unpublished.
394. Klein J, Ono H, Klein D, O'Huigin C. The accordion model of MHC evolution. In: Gergely J, Petranyi G, eds. *Progress in Immunology*, Heidelberg: Springer-Verlag, 1993, 137–143.
395. Du Pasquier L, Miggiano VC, Kobel HR, Fischberg M. The genetic control of histocompatibility reactions in natural and laboratory-made polyploid individuals of the clawed toad *Xenopus*. *Immunogenetics* 1977;5:129–141.
396. Bevan MJ. High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunology Today* 1984;5:128–130.
397. Cunningham BA, Berggard I. Structure, evolution and significance of beta2-microglobulin. *Transplant Rev* 1974;21:3–14.
398. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:6259–6263.
399. Dixon B, Stet RJ, van Erp SH, Pohajdak B. Characterization of beta 2-microglobulin transcripts from two teleost species. *Immunogenetics* 1993;38:27–34.
400. Shum BP, Azumi K, Zhang S, et al. Unexpected beta 2-microglobulin sequence diversity in individual rainbow trout. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 2779–2784.
401. Ono H, Figueroa F, O'Huigin C, Klein J. Cloning of the beta 2-microglobulin gene in the zebrafish. *Immunogenetics* 1993;38:1–10.
402. Dargemont C, Dunon D, Deugnier MA, et al. Thymotaxin, a chemotactic protein, is identical to beta 2-microglobulin. *Science* 1989;246:803–806.
403. Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R. Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature* 1990;344: 742–746.
404. Fearon DT, Carter RH. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:127–149.
405. Lambris JD, Mavroidis M, Sunyer JO. Phylogeny of third component of complement, C3. In: Erdei A, ed. *New Aspects of Complement Structure and Function*, 1994, 15–34.
406. Dodds AW. Molecular and phylogenic aspects of the complement system. In: Hoffmann JA, Janeway CA, Jr., Natori S, eds. *Phylogenic perspectives in immunity: the insect host defense*, Austin: R. G. Landes Company, 1994, 143–155.
407. Kinoshita T. Biology of complement: the overture. *Immunol Today* 1991;12: 291–295.
408. Smith LC, Chang L, Britten RJ, Davidson EH. Sea urchin genes expressed in activated coelomocytes are identified by expressed sequence tags. Complement homologues and other putative immune response genes suggest immune system homology within the deuterostomes. *J Immunol* 1996;156:593–602.
409. Smith CL. Sea urchin coelomocytes specifically express a C3 complement compontent and a complement receptor or regulatory protein. *Devel Comp Immunol* 1997;21:143.
410. Nonaka M, Takahashi M. Complete complementary DNA sequence of the third

component of complement of lamprey. Implication for the evolution of thioester containing proteins. *J Immunol* 1992;148:3290–3295.
411. Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996;17:532–540.
412. Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 1997;386: 506–510.
413. Ji X, Azumi K, Sasaki M, Nonaka M. Ancient origin of the complement lectin pathway revealed by molecular cloning of mannan binding protein-associated serine protease from a urochordate, the Japanese ascidian, *Halocynthia roretzi. Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6340–6345.
414. Hanley PJ, Hook JW, Raftos DA, Gooley AA, Trent R, Raison RL. Hagfish humoral defense protein exhibits structural and functional homology with mammalian complement components. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7910–7914.
415. Fujii T, Hook JW, Remedios ND, Raison RL. Complement-like protein form hagfish is homologous to the third component of the mammalian complement system. *Devel Comp Immunol* 1997;21:149.
416. Sunyer JO, Zarkadis IK, Sahu A, Lambris JD. Multiple forms of complement C3 in trout that differ in binding to complement activators. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8546–8551.
417. Jensen JA, Festa E, Smith DS, Cayer M. The complement system of the nurse shark: hemolytic and comparative characteristics. *Science* 1981;214:566–569.
418. Sunyer OJ, Zarakdis. I., Lambris, J.D. Structural and functional characterization of Bf/C2 complement molecules in teleost fish. *Dev Comp Immunol* 1997;21: 147.
419. Armstrong PB, Quigley JP. Limulus alpha 2-macroglobulin. First evidence in an invertebrate for a protein containing an internal thiol ester bond. *Biochem J* 1987;248:703–707.
420. Farries TC, Atkinson JP. Evolution of the complement system. *Immunol Today* 1991;12:295–300.
421. Hughes AL. Phylogeny of the C3/C4/C5 complement-component gene family indicates that C5 diverged first. *Mol Biol Evol* 1994;11:417–425.
422. Brown MG, Scalzo AA, Matsumoto K, Yokoyama WM. The natural killer gene complex: a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity. *Immunol Rev* 1997;155:53–65.
423. Zapata A. Phylogeny of the fish immune system. *Bull Inst Pasteur* 1983;81: 165–186.
424. Tomonaga S, Hirokame T, Awaka K. The primitive spleen of the hagfish. *Zool Mag* 1973;82:215–219.
425. Tanaka Y, Saito Y, Gotoh H. Vascular architecture and intestinal hematopoietic nests of two cyclostomes, Eptatretus burgeri and ammoncoetes of Entosphenus reissneri: a comparative morphological study. *J Morphol* 1981;170:71–93.
426. Fujii T, Hayakawa I. A histological and electron-microscopic study of the cell-types involved in rejection of skin allografts in ammocoetes. *Cell Tissue Res* 1983;231:301–312.
427. Fujii T. Electron microscopy of the leucocytes of the typhlosole in ammocoetes, with special attention to the antibody-producing cells. *J Morphol* 1982;173: 87–100.
428. Cohen N. Phylogenetic emergence of lymphoid tissues and cell. In: Marchalonis JJ, ed. *The lymphocyte structure and function* Part I, New York: Marcus Dekker, 1977, 149–202.
429. Zapata AG, Varas A, Torroba M. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunol Today* 1992;13:142–147.
430. Luer CA, Walsh CJ, Bodine AB, Wyffels JT, Scott TR. The elasmobranch thymus: anatomocal histological, and preliminary functional characterization. *J Exp Zool* 1995;273:342–345.
431. Fange R, Pulsford A. Structural studies on lymphomyeloid tissues of the dogfish, *Scyliorhinus canicula L. Cell Tissue Res* 1983;230:337–351.
432. Torroba M, Chiba A, Vicente A, et al. Macrophage-lymphocyteCellclusters in the hypothalamic ventricle of some elasmobranch fish: ultrastructural analysis and possible functional significance. Anat Rec 1995;242:400–410.
433. McCumber LJ, Sigel MM, Trauger RJ, Cuchens MA. RES structure and function of the fishes. In: Cohen N, Sigel MM, eds. *The Reticuloendothelial System: Phylogeny and Ontogeny*, vol. 3. New York: Plenum Press, 1982, 393–422.
434. Van Muiswinkel WB, Lamers CH, Rombout JH. Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. *Res Immunol* 1991;142:362–366.
435. Chilmonczyk S. The thymus in fish:development and possible function in the immune response. *Ann Rev of Fish Diseases* 1992;2:181–200.
436. Romano N, Abelli L, Mastrolia L, Scapigliati G. Immunocytochemical detection and cytomorphology of lymphocyte subpopulations in a teleost fish *Dicentrarchus labrax. Cell Tissue Res* 1997;289:163–171.
437. Ardavín CF, Zapata A. Ultrastructure and changes during metamorphosis of the lympho-hemopoietic tissue of the larval anadromous sea lamprey *Petromyzon marinus. Devel Comp Immunol* 1987;11:79–93.
438. Estepa A, Coll JM. Mitogen-induced proliferation of trout kidney leucocytes by one-step culture in fibrin clots. *Vet Immunol Immunopathol* 1992;32:165–177.
439. Kaastrup P, Nielsen B, Hoerlyck V, Simonsen M. Mixed lymphocyte reactions (MLR) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sibling. *Dev Comp Immunol* 1988;12: 801–808.
440. Caspi RR, Avtalion RR. The mixed leukocyte reaction (MLR) in carp: bidirectional and undirectional MLR responses. *Dev Comp Immunol* 1984;8:631–637.
441. Miller NW, Deuter A, Clem LW. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the Cellular requirements for the mixed leucocyte reaction with channel catfish. *Immunol* 1986;59:123–128.
442. Bly JE, Clem LW. Temperature and teleost immune functions. *Fish and Shellfish Immunol* 1992:159–171.
443. Scapigliati G, Mazzini M, Mastrolia L, Romano N, Abelli L. Production and characterisation of a monoclonal antibody against the thymocytes of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) (Teleostei, Percicthydae). *Fish & Shellfish Immunol* 1995;5:393–405.
444. Sailendri K. Studies in the development of lymphoid organs and immune responses in the teleost *Tilapia mossambica.* PhD thesis, Madurai University, India, 1973.
445. Sailendri K, Muthukkaruppan VR. The immune response of the teleost, *Tilapia mossambica* to soluble and cellular antigens. *J Exp Zool* 1975;191:371–382.
446. Blau JN, Waksman BH. Immunological responses following injections of antigens in Freund's adjuvant into thymus and other tissues. *Immunology* 1964;191: 371–382.
447. Smith AM, Potter M, Merchant ER. Antibody forming cells in the pronephros of the teleost *Lepomis macrochirus. J Immunol* 1967;99:876–882.
448. De Luca D, Wilson M, Warr GW. Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. *Eur J Immunol* 1983;13: 551–555.
449. Rombout JH. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinuscarpio L.*): an immunocytochemical analysis. *Dev Comp Immunol* 1993;17:55–66.
450. Miller NW, Clem LW. Temperature-mediated processes in Teleost immunity: differential effects of temperature on catfish in vitro antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent antigens. *J Immunol* 1984;133: 2356–2359.
451. Vallejo AN, Miller NW, Clem LW. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. *Annu Rev Fish Dis* 1992;2:73–89.
452. Vallejo AN, Miller NW, Jorgensen T, Clem LW. Phylogeny of immune recognition: antigen processing/presentation in channel catfish immune responses to hemocyanins. *Cell Immunol* 1990;130:364–377.
453. Vallejo AN, Miller NW, Clem LW. Phylogeny of immune recognition: processing and presentation of structurally defined proteins in channel catfish immune responses. *Dev Immunol* 1991;1:137–148.
454. Hinuma S, Abo T, Kumagai K, Hata W. The potent activity of freshwater fish kidney Cells in cell killing. I. Characterization and species distinction f cytotoxicity. *Dev Comp Immunol* 1980;4:653–666.
455. Moody CE, Serreze DV, Reno PW. Non-specific cytotoxic activity of teleost leukocytes. *Dev Comp Immunol* 1985;9:51–64.
456. Graves SS, Evans DL, Cobb D, Dawe DL. Nonspecific cytotoxic Cells in fish (Ictalurus puntatus) I. Optimum reqirement for target cell lysis. *Dev Comp Immunol* 1983;8:293–302.
457. Evans DL, McKinney C. Phylogeny of cytotoxic Cells. In: Warr GW, Cohen N, eds. *Phylogenesis of Immune Functions*, CRC Press, 1991, 215–240.
458. Harris DT, Jaso-Friedmann L, Devlin RB, Koren HS, Evans DL. Identification of an evolutionarily conserved, function-associated molecule on human natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3009–3013.
459. Hogan RJ, Stuge TB, Clem LW, Miller NW, Chinchar VG. Anti-viral cytotoxic Cells in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol* 1996;20: 115–127.
460. Manning J, Horton JD. RES structure and function of the amphibia. In: Cohen N, Sigel MM, eds. *The Reticuloendothelial System: Phylogeny and Ontogeny*, vol. 3. New York: Plenum, 1982, 423–459.
461. Manning MJ. Histological organization of the spleen: implications for immune functions in amphibians. *Res Immunol* 1991;142:355–359.
462. Horton JD, Horton TL, Ritchie P. Immune system of *Xenopus*: T cell biology. In: Tinsley RC, H.R.Kobel, eds. *The Biology of* Xenopus, Oxford: Clarendon Press, 1996.
463. Alvarez R. An ultrastructural study of the spleen of the ranid frog Rana perezi. *J Morphol* 1990;204:25–32.
464. Miodonski AJ, Bigaj J, Mika J, Plytycz B. Season-specific thymic architecture in the frog, *Rana temporaria*: SEM studies. *Dev Comp Immunol* 1996;20:129–137.
465. Plytycz B, Mika J, Bigaj J. Age-dependent changes in thymuses in the european common frog, *Rana temporaria. J Exp Zool* 1995;273:451–460.
466. Garcia Barrutia MS, Leceta J, Fonfria J, Garrido E, Zapata A. Non-lymphoid cells of the anuran spleen: an ultrastructural study in the natterjack, *Bufo calamita. Am J Anat* 1983;167:83–94.
467. Hadji Azimi I, Coosemans V, Canicatti C. Atlas of adult *Xenopus* laevis laevis hematology. *Dev Comp Immunol* 1987;11:807–874.
468. Flajnik MF, Hsu E, Kaufman JF, Du Pasquier L. Changes in the immune system during metamorphosis of *Xenopus. Immunol Today* 1987;8:58–64.
469. Gravenor I, Horton TL, Ritchie P, Flint E, Horton JD. Ontogeny and thymus-dependence of T cell surface antigens in *Xenopus*: flow cytometric studies on monoclonal antibody-stained thymus and spleen. *Dev Comp Immunol* 1995;19: 507–523.
470. Nagata S. A cell surface marker of thymus dependent lymphocytes in *Xenopus* laevis is identifiable by mouse monoclonal antibody. *Eur* J Immunol 1985;15: 837–841.
471. Jurgens JB, Gartland LA, Du Pasquier L, Horton JD, Göbel TW, Cooper MD.

Identification of a candidate CD5 homologue in the amphibian *Xenopus laevis*. *J Immunol* 1995;155:4218–4023.
472. Hsu E, Julius MH, Du Pasquier L. Effector and regulator functions of splenic and thymic lymphocytes in the clawed toad *Xenopus*. *Ann Immunol* 1983;3:277–292.
473. Blomberg B, Bernard CC, Du Pasquier L. In vitro evidence for T-B lymphocyte collaboration in the clawed toad, *Xenopus*. *Eur J Immunol* 1980;10:869–876.
474. James HS, Knowles KR, Clothier R, Groves CJ, Balls M. Effects of early thymectomy or exposure to N-methyl-N-nitrosaurea on immune responses in *Xenopus laevis*. In: Vago C, Matz G, eds. Comptes rendus du 1er colloque international de pathologie des reptiles et des amphibiens, Angers: University of Angers, 1982, 157–162.
475. Hsu E, Leanderson T, Franklin RM. Mitogenic effects of phorbol myristate acetate (PMA) on amphibian cells. *Ann Inst Pasteur Immunol* 1985;136d: 105–118.
476. Du Pasquier L, Schwager J, Flajnik MF. The immune system of *Xenopus*. *Annu Rev Immunol* 1989;7:251–275.
477. Horton TL, Ritchie P, Watson MD, Horton JD. NK-like activity against allogeneic tumour cells demonstrated in the spleen of control and thymectomized *Xenopus*. *Immunol Cell Biol* 1996;74:365–373.
478. Robert J, Guiet C, Du Pasquier L. Lymphoid tumors of *Xenopus* laevis with different capacities for growth in larvae and adults. *Dev Immunol* 1994;3:297–307.
479. Klempau AE, Cooper EL. T-lymphocyte and B-lymphocyte dichtomy in anuran amphibians. III. Assessment and identification of inducible killer T lymphocytes (IKTL) and spontaneous killer T lymphocytes (SKTL). *Dev Comp Immunol* 1984;8:649–661.
480. Barritt LC, Turpen JB. Characterization of lineage restricted forms of a *Xenopus* CD45 homologue. *Dev Comp Immunol* 1995;19:525–536.
481. Tournefier A, Lesourd, M., Gounon, P. The axolotl thymus: Cell types of the microenvironment. *Cell Tissue Res* 1990;262:387–396.
482. Jordan H, Speidel,C.C. Studies on lymphocytes. granulocytopoiesis in the Salamander with special references to the monophyletic theory of blood Cell origin. *Am J Anat* 1924;33:485–505.
483. Salvadori F, Tournefier A. Activation by mitogens and superantigens of axolotl lymphocytes: functional characterization and ontogenic study. *Immunology* 1996;88:586–592.
484. Koniski AD, Cohen N. Reproducible proliferative responses of salamander (*Ambystoma mexicanum*) lymphocytes cultured with mitogens in serum-free medium. *Dev Comp Immunol* 1992;16:441–451.
485. Kerfourn F, Guillet F, Charlemagne J, Tournefier A. T- Cell-specific membrane antigens in the mexican axolotl (urodele amphibian). *Dev Immunol* 1992;2: 237–248.
486. Kerfourn F, Guillet F, Charlemagne J, Tournefier A. Characterization of a multimeric polypeptide complex on the surface of thymus-derived cells in the mexican axolotl. *Scand J Immunol* 1993;38:381–387.
487. Kroese FG, van Rooijen N. The architecture of the spleen of the Red-eared Slider, *Chrysemys scripta elegans* (Reptilia, Testudines). *J Morphol* 1982;173: 279–284.
488. Kroese FG, Leceta J, Dopp EA, Herraez MP, Nieuwenhuis P, Zapata A. Dendritic immune complex trapping cells in the spleen of the snake, *Python reticulatus*. *Dev Comp Immunol* 1985;9:641–652.
489. Muthukkaruppan VR, Borysenko M, E. Ridi R. RES structure and function of the reptile. In: Cohen N, Sigel MM, eds. *The Reticuloendothelial System: Phylogeny and Ontogeny*, vol. 3. New York: Plenum, 1982, 461–508.
490. el Deeb S, Saad AH. Ontogeny of con A responsiveness and mixed leucocyte reactivity in the lizard, Chalcides o Cellatus. *Dev Comp Immunol* 1987;11:595–604.
491. El Ridi R, Zada S, Afifi A, et al. Cyclic changes in the differentiation of lymphoid cells in reptiles. *Cell Differ* 1988;24:1–8.
492. Glick B. RES structure and function of the aves. In: Cochen N, Sigel MM, eds. *The Reticuloendothelial System* vol. 3: Phylogeny and Ontogeny, vol. 3. New York: Plenum, 1983, 509–540.
493. Le Douarin N. The microenvironment of T and B lymphocyte differentiation in avian embryos. *Curr Top Dev Biol* 1986;20:291–313.
494. Jeurissen SH. Structure and function of the chicken spleen. *Res Immunol* 1991; 142:352–355.
495. Weinstein PD, Mage RG, Anderson AO. The appendix functions as a mammalian bursal equivalent in the developing rabbit. *Adv Exp Med Biol* 1994:249–253.
496. Liippo J, Lassila O. Avian Ikaros gene is expressed early in embryogenesis. *Eur J Immunol* 1997;27:1853–1857.
497. Hansen JD, Strassburger, P. Du Pasquier, L. Conservation of a master switch gene during vertebrate evolution: isolation and characterization of Ikaros from teleost and amphibian species. *Eur J Immunol* 1997;27:3049–3058.
498. Zon LI, Mather C, Burgess S, Bolce ME, Harland RM, Orkin SH. Expression of GATA-binding proteins during embryonic development in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10642–10646.
499. Schlake T, Schorpp M, Nehls M, Boehm T. The nude gene encodes a sequence-specific DNA binding protein with homologs in organisms that lack an anticipatory immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3842–3847.
500. Hansen JD, Kaattari SL. The recombination activating gene 1 (RAG1) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cloning, expression, and phylogenetic analysis. *Immunogenetics* 1995;42:188–195.
501. Willett CE, Cherry JJ, Steiner LA. Characterization and expression of the recombination activating genes (rag1 and rag2) of zebrafish. *Immunogenetics* 1997;45: 394–404
502. Lee A, Hsu E. Isolation and characterization of the *Xenopus* terminal deoxynucleotidyl transferase. *J Immunol* 1994;152:4500–4507.
503. Yang B, Gathy KN, Coleman MS. T-cell specific avian TdT: characterization of the cDNA and recombinant enzyme. *Nucleic Acids Res* 1995;23:2041–2048.
504. Magor BG, Wilson MR, Miller NW, Clem LW, Middleton DL, Warr GW. An Ig heavy chain enhancer of the channel catfish Ictalurus punctatus: evolutionary conservation of function but not structure. *J Immunol* 1994;153:5556–5563.
505. Magor BG, Ross DA, Middleton DL, Warr GW. Functional motifs in the IgH enhancer of the channel catfish. *Immunogenetics* 1997;46:192–198.
506. Michard-Vanhée C, Chourrout D, Strömberg S, Thuvander A, Pilström L. Lymphocyte expression in transgenic trout by mouse immunoglobulin promoter/enhancer. *Immunogenetics* 1994;40:1–8.
507. Alt FW, Oltz EM, Young F, Gorman J, Taccioli G, Chen J. VDJ recombination. *Immunol Today* 1992;13:306–314.
508. Colonna M. Specificity and function of immunoglobulin superfamily NKCellinhibitory and stimulatory receptors. *Immunol Rev* 1997;155:127–133.
509. Secombes CJ. Phylogeny of Cytokines. *Cytokine Handbook*, 3rd ed., 1998.
510. Beck G, Habicht GS. Isolation and characterization of a primitive interleukin-1-like protein from an invertebrate, *Asterias forbesi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:7429–7433.
511. Beck G, Vasta GR, Marchalonis JJ, Habicht GS. Characterization of interleukin-1 activity in tunicates. *Comp Biochem Physiol B* 1989;92:93–98.
512. Hughes TK, Jr., Smith EM, Barnett JA, Charles R, Stefano GB. LPS stimulated invertebrate hemocytes: a role for immunoreactive TNF and IL-1. *Dev Comp Immunol* 1991;15:117–122.
513. Granath WO, Jr., Connors VA, Tarleton RL. Interleukin 1 activity in haemolymph from strains of the snail *Biomphalaria glabrata* varying in susceptibility to the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*: presence, differential expression, and biological function. *Cytokine* 1994;6:21–27.
514. Beck G, Habicht GS. Primitive cytokines: harbingers of vertebrate defense. *Immunol Today* 1991;12:180–183.
515. Clem LW, Miller NW, Bly JE. Evolution of lymphocyte subpopulations, their interactions and temperature sensitivities. In: Warr GW, Cohen N, eds. *Phylogenesis of Immune Functions*, CRC press, 1991, 241–268.
516. Zou J, Cunningham C, Secombes CJ. Rainbow trout recombinant interleukin 1b: expression, renaturation and determination of the biological activities. *Devel Comp Immunol* 27 1997:192.
517. Watkins D, Parsons SC, Cohen N. A factor with interleukin-1-like activity is produced by peritoneal Cells from the frog, *Xenopus laevis*. Immunology 1987;62: 669–673.
518. Hayari Y, Schauenstein K, Globerson A. Avian lymphokines, II: interleukin-1 activity in supernatants of stimulated adherent splenocytes of chickens. *Dev Comp Immunol* 1982;6:785–789.
519. Guida S, Heguy A, Melli M. The chicken IL-1 receptor: differential evolution of the cytoplasmic and extra cellular domains. *Gene* 1992;111:239–243.
520. Schneider DS, Hudson KL, Lin TY, Anderson KV. Dominant and recessive mutations define functional domains of toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 1991;5:797–807.
521. Legac E, Vaugier GL, Bousquet F, Bajelan M, Leclerc M. Primitive cytokines and cytokine receptors in invertebrates: the sea star *Asterias rubens* as a model of study. *Scand J Immunol* 1996;44:375–380.
522. Caspi RR, Avtalion RR. Evidence for the existence of an IL-2-like lymphocyte growth promoting factor in a bony fish, *Cyprinus carpio*. *Dev Comp Immunol* 1984;8:51–60.
523. Watkins D, Cohen N. Mitogen-activated *Xenopus laevis* lymphocytes produce a T-cell growth factor. *Immunology* 1987;62:119–125.
524. El Ridi R, Wahby AF, Saad AH, Soliman MA. Concanavalin A responsiveness and interleukin 2 production in the snake *Spalerosophis diadema*. *Immunobiology* 1987;174:177–189.
525. Schauenstein K, Kromer G, Hala K, Bock G, Wick G. Chicken-activated-T-lymphocyte-antigen (CATLA) recognized by monoclonal antibody INN-CH 16 represents the IL-2 receptor. *Dev Comp Immunol* 1988;12:823–831.
526. Hussein MF, Badir N, El Ridi R, Akef M. Lymphoid tissue of the snake, *Spalerosophis diadema*, in the different seasons. *Dev Comp Immunol* 1979;3: 77–88.
527. Haynes L, Cohen N. Further characterization of an interleukin-2-like cytokine produced by *Xenopus laevis* T lymphocytes. *Dev Immunol* 1993;3:231–238.
528. Kroemer G, Gastinel LN, Neu N, Auffray C, Wick G. How many genes code for organ-specific autoimmunity? *Autoimmunity* 1990;6:215–233.
529. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997;15:749–795.
530. Georgel P, Kappler C, Langley E, et al. Drosophila immunity. A sequence homologous to mammalian interferon consensus response element enhances the activity of the diptericin promoter. *Nucleic Acids Res* 1995;23:1140–1145.
531. Rogel-Gaillard C, Chilmonczyk S, de Kinkelin P. in vitro induction of interferon-like activity from rainbow trout leucocytes stimulated by Egtved virus. *Fish & Shellfish Immunol* 1993;3:383–394.
532. De Kinkelin P, Dorson M, Hatenberger-Baudouy AM. Interferon synthesis in trout and carp after viral infection. *Dev Comp Immunol* 1982;2:167–174.

533. Mathews JH, Vorndam AV. Interferon-mediated persistent infection of Saint Louis encephalitis virus in a reptilian cell line. *J Gen Virol* 1982;61:177–186.
534. Sick C, Schultz U, Staeheli P. A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons. *J Biol Chem* 1996;271:7635–7639.
535. Graham S, Secombes CJ. The production of a macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Immunology* 1988;65:293–297.
536. Lowenthal JW, Digby MR, York JJ. Production of interferon-gamma by chicken T cells. *J Interferon Cytokine Res* 1995;15:933–938.
537. Digby MR, Lowenthal JW. Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene. *J Interferon Cytokine Res* 1995;15:939–945.
538. Jang SI, Hardie LJ, Secombes CJ. Effects of transforming growth factor beta 1 on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity. *Dev Comp Immunol* 1994;18:315–323.
539. Jang SI, Hardie LJ, Secombes CJ. Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage-derived supernatants. *J Leukoc Biol* 1995;57:943–947.
540. Haynes L, Cohen N. Transforming growth factor beta (TGF beta) is produced by and influences the proliferative response of *Xenopus laevis* lymphocytes. *Dev Immunol* 1993;3:223–230.
541. O'Shea JJ. Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: are we there yet? *Immunity* 1997;7:1–11.
542. Lundin L. Evolution of the vertebrate genome as reflected in paralogous chromosomal regions in man and the house mouse. *Genomics* 1993;16:1–19.
543. Flajnik M, Du Pasquier L. T- Cell differentiation in lower vertebrates. Progress in immunology 1989;7:274–281.
544. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9:4–9.
545. Vasta GR, Ahmed H, Fink NE, et al. Animal lectins as self/non-self recognition molecules. Biochemical and genetic approaches to understanding their biological roles and evolution. *Ann NY Acad Sci* 1994;712:55–73.
546. Ezekowitz RAB, Hoffmann JA. Innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:1–2.
547. Hildemann WH, Thoenes GH. Immunological responses of Pacific hagfish. I. Skin transplantation immunity. *Transplantation* 1969;7:506–521.
548. Kasahara M, Vasquez M, Sato K, Chruchill-McKinney E, Flajnik MF. Evolution of the major histocompatibility complex: isolation of class II A cDNA clones from the cartilaginous fish. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6688–6692.
549. Okamura K, Otoktake M, Nakanishi T, Kurosawa Y, Hashimoto K. The most primitive vertebrates with jaws possess highly polymorphic class I genes comparable to those of human. *Immunity* 1997;7:777–787.
550. Hildemann WH. Tissue transplantation immunity in the goldfish. *Immunology* 1958;1:46–53.
551. Miller NW, Sizemore RC, Clem LW. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the Cellular requirements for in vitro antibody responses of channel leukocytes. *J Immunol* 1985;134:2884–2888.
552. Dixon B, van Erp SH, Rodrigues PN, Egberts E, Stet RJ. Fish major histocompatibility complex genes: an expansion. *Dev Comp Immunol* 1995;19:109–133.
553. Klein D, Ono H, O'Huigin C, Vincek V, Goldschmidt T, Klein J. Extensive MHC variability in cichlid fishes of Lake Malawi. *Nature* 1993;364:330–334.
554. Hordvik I, Grimholt U, Fosse VM, Lie O, Endresen C. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding the MHC class II beta chain in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics* 1993;37:437–441.
555. Takeuchi H, Figueroa F, O'Huigin C, Klein J. Cloning and characterization of class I Mhc genes of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Immunogenetics* 1995;42:77–84.
556. Grimholt U, Hordvik I, Fosse VM, Olsaker I, Endresen C, Lie O. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics* 1993;37:469–473.
557. Betz UA, Mayer WE, Klein J. Major histocompatibility complex class I genes of the coelacanth *Latimeria chalumnae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11065–11069.
558. Flajnik MF, Du Pasquier L. The major histocompatibility complex of frogs. *Immunol Rev* 1990;113:47–63.
559. Flajnik MF, Ferrone S, Cohen N, Du Pasquier L. Evolution of the MHC : antigenicity and unusual tissue distribution of *Xenopus* (frog) class II molecules. *Mol Immunol* 1990;27:451–462.
560. Kaufman JF, Flajnik MF, Du Pasquier L, Riegert P. *Xenopus* MHC class II molecules. I. Identification and structural characterization. *J Immunol* 1985;134:3248–3257.
561. Sato K, Flajnik MF, Du Pasquier L, Katagiri M, Kasahara M. Evolution of the MHC: isolation of class II beta-chain cDNA clones from the amphibian *Xenopus laevis*. *J Immunol* 1993;150:2831–2843.
562. Flajnik MF, Kaufman JF, Riegert P, Du Pasquier L. Identification of class I major histocompatibility complex encoded molecules in the amphibian *Xenopus*. *Immunogenetics* 1984;20:433–442.
563. Flajnik MF, Taylor E, Canel C, Grossberger D, Du Pasquier L. Reagent specific for MHC I antigens of *Xenopus*. *Amer Zool* 1991;31:580–591.
564. Cohen N. Salamanders and the evolution of the major histocompatibility complex. In: Marchalonis JJ, Cohen J, eds. *Current topics in immunology*, vol 9 New York: Plenum Press, 1980, 109–140.
565. Kaufman J, Ferrone S, Flajnik M, Kilb M, Volk H, Parisot R. MHC-like molecules in some nonmammalian vertebrates can be detected by some cross-reactive monoclonal antibodies. *J Immunol* 1990;144:2273-2280.
566. Farag MA, el Ridi R. Mixed leucocyte reaction (MLR) in the snake *Psammophis sibilans*. *Immunology* 1985;55:173-181.
567. Farag MA. A contribution to the study of the major histocompatibility complex in snakes. PhD thesis, University of Cairo, Egypt, 1987.
568. Farag MA, el Ridi R. Functional markers of the major histocompatibility gene complex of snakes. *Eur J Immunol* 1990;20:2029-2033.
569. Houssaint E, Torano A, Ivanyi J. Split tolerance induced by chick embryo thymic epithelium allografted to embryonic recipients. *J Immunol* 1986;136:3155-3159.
570. Toivanen A, Toivanen P. Histocompatibility response for cellular cooperation in the chicken: generation of germinal centers. *J Immunol* 1977;118:431-436.
571. Kaufman J. unpublished.
572. Miller MM, Goto R, Bernot A, et al. Two Mhc class I and two Mhc class II genes map to the chicken Rfp-Y system outside the B complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4397–4401.
573. Juul-Madsen HR, Zoorob R, Auffray C, Skjodt K, Hedemand JE. New chicken Rfp-Y haplotypes on the basis of MHC class II RFLP and MLC analyses. *Immunogenetics* 1997;45:345–352.
574. Briles WE, McGibbons WH, Irwin MR. On multiple alleles affecting cellular antigens in the chicken. *Genetics* 1950;35:633–652.
575. Goto R, Miyada CG, Young S, et al. Isolation of a cDNA clone from the B-G subregion of the chicken histocompatibility (B) complex. *Immunogenetics* 1988;27:102–109.
576. Kaufman J, Salomonsen J. B-G: we know what it is, but what does it do? *Immunol Today* 1992;13:1–3.
577. Kaufman J. Personal communication.
578. Liu Y and Flajnik MF. Unpublished.
579. Hardee JJ, Godwin U, Benedetto R, McConnell TJ. Major histocompatibility complex class II A gene polymorphism in the striped bass. *Immunogenetics* 1995;41:229–238.
580. Klein J, Figueroa F, Klein D, Sato A, O'hUigin C. Major histocompatibility complex genes in the study of fish phylogeny. In: Kocher TD, Stepien CA, eds. *Molecular Systematics of Fishes*, San Diego, California: Academic Press, 1997, 271–283.
581. Ono H, O'HUigin C, Vincek V, Stet RJ, Figueroa F, Klein J. New beta chain-encoding Mhc class II genes in the carp. *Immunogenetics* 1993;38:146–149.
582. Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse Cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3352–3356.
583. Dohring C, Samaridis J, Colonna M. Alternatively spliced forms of human killer inhibitory receptors. *Immunogenetics* 1996;44:227–230.
584. Miyauchi T, Kanekura T, Yamaoka A, Ozawa M, Miyazawa S, Muramatsu T. Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen. *J Biochem Tokyo* 1990;107:316–323.
585. Schacke H, Rinkevich B, Gamulin V, Müller IM, Müller WE. Immunoglobulin-like domain is present in the extra cellular part of the receptor tyrosine kinase from the marine sponge *Geodia cydonium*. *J Mol Recognit* 1994;7:273–276.
586. Patel NH, Snow PM, Goodman CS. Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* 1987;48:975–988.
587. Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 1991;219:277–319.
588. Takami K, Zaleska-Rutczynska Z, Figueroa F, Klein J. Linkage of LMP, TAP and Ring 3 with MHC class I rather than class II genes in the zebrafish. *J Immunol* 1997;159:6052–6060.
589. Hisamatsu H, Shimbara N, Saito Y, et al. Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *J Exp Med* 1996;183:1807–1816.
590. Haas IG, Wabl M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 1983;306:387–389.
591. Lambris J. personal communication.

第五篇　免疫应答的调节

第19章　免疫原性与抗原结构

Jay A. Berzofsky, Ira J. Berkower①

抗体识别的抗原决定簇的本质

半抗原

651 在抗原抗体的结合反应中,抗体结合位点通常不适应于整个抗原。而抗原中与抗体结合的靶结构通常称为抗原决定簇,而且每个抗原分子可以有一个或更多的抗原决定簇。一些同单个抗原决定簇结合的小的功能集团称为半抗原。例如,一些有机化合物如三硝基苯酚(TNF)、砷酸苯、单糖或寡糖如葡萄糖或半乳糖或是寡肽如五赖氨酸 。尽管这些半抗原能与抗体结合,但是除少数外,用半抗原免疫动物通常不产生抗体[1]。将半抗原与大分子通过共价交联,通常可以使半抗原产生免疫原性,这个大分子就是载体。载体本身具有免疫原性,当半抗原-载体共轭物免疫动物时,能产生同时针对半抗原和载体的抗体。然而,半抗原的特异性抗体可以通过纯半抗原(没有与载体结合)的平衡透析实验来研究,或是通过与其他载体结合(载体间无交叉反应)的半抗原进行免疫共沉淀实验来研究,或是通过抑制游离半抗原沉淀的实验来研究。

这些技术最早是由 Landsteiner[2] 提出,这有助于阐述与抗原决定簇结合的抗体所具有的特异性的细微结构。例如,预备用来针对琥珀酸-血清蛋白共轭物,并且具有一定结合亲和力的抗体却表现出对马来酸类似物有显著的特异性,而马来酸与延胡羧酸相比,在于它是顺式结构[3]。因此可以推断出,琥珀酸的免疫原性结构为顺式结构。在随后的研究中又将重点放在利用抗体区分顺式和反式构象的能力来衡量抗体对马来酸和琥珀酸共轭物的相对亲和力[4](表 19.1A)。表 19.1B 说明了抗体对 p-砷酸偶氮苯与牛丙种球蛋白交联物的特异性最高[5]。因为半抗原通过 p-偶氮基团与载体的芳香族氨基酸偶联结合后,半抗原侧面会含有大量

① J. A. Berzofsky: Molecular Immunogenetics and Vaccine Research Secthon, Metabolism Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892. I. J. Berkower: Laboratory of Immunoregulation, Office of Vaccines, Center for Biologics, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20892.

的替代基团,从而与具有免疫性的抗原非常相似。实际上,p-甲基化砷酸苯比未甲基化的砷酸苯有更高的结合亲和力。然而,在苯环的其他地方甲基化将降低其亲和力,可能是干扰了半抗原进入抗体结合位点。因此,甲基化对抗原抗体结合能力有正面还是负面的影响主要取决于甲基取代的部位。表 19.1C 显示了与纤维二糖相比,抗半乳糖抗体对半乳糖的特异性[6]。这些二糖结构的区别仅仅在于其与 C4 羟基相连的第一个糖基位于已糖环的上方或下方。表中的三个例子以及其他的例子都表明针对顺式-反式,正位-间位-邻位以及立体异构的抗原决定簇的抗体有显著的特异性。

表 19.1　抗半抗原抗体特异性的细微结构

半抗原	结构	以下物质特异性的抗体 Kral	
A		马来酸(顺式)	延胡羧酸(反式)
马来酸盐		1.0	<0.01
延胡羧酸盐		<0.01	1.0
B		侧基取代的砷酸苯	
砷酸苯		1.0	
o-甲基-砷酸苯		0.2	
m-甲基-砷酸苯		0.8	
p-甲基-砷酸苯		1.9	
C		半乳糖	
半乳糖	βgal (1-4) glu	1.00	
纤维二糖	βglu (1-4) glu	0.0025	

A 部分来自参考文献[4]; B 部分来自参考文献[5]; C 部分来自参考文献[6]。

尽管抗体有显著的异质性,但是通过半抗原结合比较实验却可以显示抗体的特异性。不象针对多种抗原决定簇的抗体,针对半抗原单个决定簇的特异性抗体在总量上相对而言是有限的,这主要由于一定结构约束的半抗原才能进入抗原结合位点。然而,抗血清的特异性主要取决于所有抗体聚集在一起的特异性,这又取决于各种抗体结合位点结构的特异性。当研究存在交叉反应的半抗原类似物时,发现一些半抗原能与所有的抗体结合,但是其 K_a 值会降低。其他半抗原类似物与抗体的结合却可上升达到稳定水平,因为这些半抗原能较好地适合一些抗体结合位点,但不适合其他的结合位点(见第 4 章有关交叉反应的讨论)。不同动物来源的抗体与相关的半抗原会发生不同的交叉反应。即使在同一动物中,在某种条件下,抗体的亲和力和特异性也会随着免疫时间的增加而增加[7]。因此,影响两种半抗原交叉反应性的各种状态既能反映影响抗原抗体结合的半抗原的结构差异,也能反映在既定的一种血清中的各种抗体结合位点的结构差异。

652

糖类抗原

许多有生物学重要性的物质的抗原决定簇都含有糖类,通常是一些糖脂或糖蛋白。如前者包括细胞壁的抗原和主要的血型抗原,而后者主要包括一些少见的血型抗原如 Rh。另外,大量自发出现的骨髓瘤蛋白也表现出糖类抗原的特异性,同时也反映了一个事实,即糖类是一种普遍的环境抗原。在杂交瘤技术尚未发现之前,这种糖类特异性的骨髓瘤蛋白为研究抗原与单克隆抗体的结合提供了一个重要的模型。

经验表明,多糖的优势表位通常含有较短的寡糖链(1~5 个糖链长),这些寡糖多位于多聚糖链的非降解端[8]。这个位置类似于含有糖残基的半抗原与一个无免疫原性的多糖骨架连接的位置。多糖的残基对多糖的免疫原性非常重要,就如同载体分子对半抗原一样。除此之外,多糖结构中的分支点可以允许多个抗原决定簇与相同的大分子接触。这对通过晶格形成进行免疫共沉淀非常重要,这一点在第四章中曾讨论过。随后将给出一些阐述多糖抗原结构的例子。

被广泛用来分析多糖表位的技术称为半抗原抑制[8]。在这个方法中,抗原和抗体的沉淀反应通过加入短的寡糖链而被抑制。这些寡糖链有足够的长度,从而具有与多糖相同的结合亲和力和特异性,而且它们都是单体,不是沉淀聚集形式。当更多的寡糖抑制剂加入抗体中时,抗体中发生沉淀反应的结合位点就会剩余很少。使用单个抗原决定簇的特异性抗血清通常能够完全阻断沉淀反应,这种作用主要是通过多糖非降解

端的一段短的寡糖链来完成。此实验结果除了说明糖链非降解端的免疫优势性外，还说明了多糖表位的结构取决于糖链的序列和连接方式，而不是糖链的构象。为使半抗原抑制完全，抗原抗体系统必须对单个表位具有特异性；为使灵敏度最佳，使用的抗原抗体必须等价。

我们将以三个经典的例子来仔细阐述多糖抗原，这三种多糖抗原分别为：沙门氏菌 O 抗原、血型抗原以及骨髓瘤蛋白的葡聚糖。

沙门氏菌 O 抗原的免疫化学特征

各种沙门氏菌的抗原多样性在于作为细胞膜外成分的脂多糖(LPS)的结构差异[9]。这些分子是抗沙门氏菌抗体结合的主要靶标。多糖部分包含有抗原决定簇，而脂类部分是形成内毒素反应的结构。LPS 的化学结构可以分为三个区域(图 19.1)。区域Ⅰ包含 O 抗原的特异性多糖，通常是重复的多糖单位，并且在不同的菌株中均不同。区域Ⅱ包含各种不同菌株都有的一个"核心"多糖。当区域Ⅱ的多糖合成障碍或不能与区域Ⅰ的多糖完全结合时，会产生 R(粗糙)突变体，R 突变体有粗糙型菌落形态学并且缺乏 O 抗原。区域Ⅲ是脂质成分，称为脂质 A。脂质 A 是所有沙门氏菌都有的成分，并且能将 LPS 锚定在细胞膜外。早期用免疫学方法区分不同沙门氏菌 O 抗原的尝试中，发现不同菌株之间存在大量的交叉反应。用一种沙门氏菌的抗血清与另一种菌株的细菌混合可以看到这种现象。每一个交叉反应决定簇都代表一个个体，并且每一个菌株都是以一系列 O 抗原决定簇(总和即为菌株的血清型)为特征，这也是菌株具有交叉反应性的基础。根据菌株间共享一个较强的 O 决定簇将菌株分型。例如，A 型菌株共享决定簇 2，而 B 型菌株共享决定簇 4(表

653

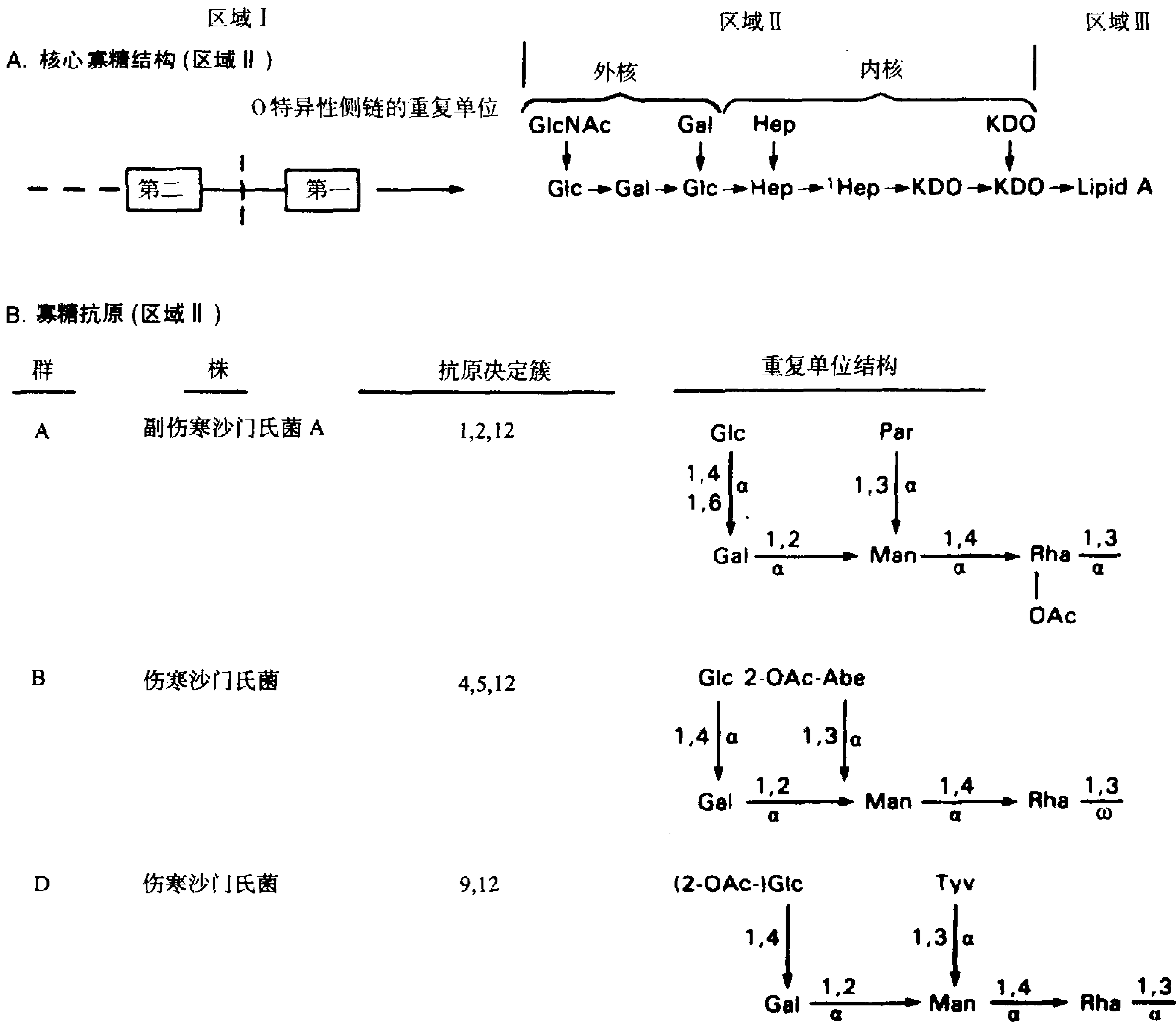


图 19.1 沙门氏菌脂多糖结构。区域Ⅰ含独特的 O 抗原决定簇，其组成内含寡糖重复单位。这些通过核心多糖联附到脂质部分。三种寡糖单位示例见参考文献[9]。A、B 部分数据来自参考文献[8]、[9]。

19.2)。然而,在同一型中,每一个菌株也有其他的O决定簇,从而使同一型中的每个菌株相互区别。因此,决定簇2能和决定簇1和12共存于副伤寒沙门氏菌A中。因各亚型共享一个亚型的抗原决定簇而导致的交叉反应性的问题常常出现在复杂的抗原抗体反应中。这个问题可以通过制造对单个抗原决定簇特异性的抗体而解决。因此抗体必须经吸收处理,以除去不相关的特异性,或是选择的交叉反应菌株必须与具有免疫性的菌株仅有一个决定簇相同。每个决定簇与特异性的抗体反应可以作为一个抗原抗体反应系统。因此,对于表19.2所列的菌株中,伤寒沙门氏菌的抗血清(含抗9和抗12的抗体)能与副伤寒沙门氏菌A结合以除去抗12抗体,从而剩余抗原9的特异性抗体(表19.2)。而未被吸收的抗血清与副伤寒沙门氏菌B(其作为免疫原只有12抗原)结合后也可以被用来研究12抗原与抗12抗体的反应系统。因为副伤寒沙门氏菌B的其他决定簇在具有免疫性的菌株中缺失,所以抗血清中也就没有它们的抗体。 654

表19.2　沙门氏菌O抗原的血清学分型

沙门氏菌株		血清群	O抗原性决定簇
副伤寒沙门氏菌A		A	1,2,12
副伤寒沙门氏菌B		B	1,4,5,12
伤寒沙门氏菌		D	9,12
抗血清	被吸收菌株	测试的菌株	测到的单一决定簇
抗伤寒沙氏门菌	-	副伤寒沙门氏菌B	12
抗伤寒沙氏门菌	副伤寒沙门氏菌A	伤寒沙门氏菌	

经允许复制自参考文献[8]。

一旦抗原抗体反应具有对单一决定簇的特异性时,在反应系统中可以加入各种寡糖进行半抗原抑制作用的测试。由于O抗原包含重复的寡糖单位,因此通常可以通过较弱的化学试剂或用酶降解LPS多糖链来得到模式寡糖。一旦最具有抑制作用的寡糖找到后,其化学结构就可以确定。我们可以选择一系列的人工合成的单糖、二糖、三糖以及寡糖进行半抗原沉淀抑制试验。如表19.3所示抗原1-抗1抗体的沉淀反应可以被α-甲基-*D*-葡萄糖抑制。因此对含有α-*D*-葡萄糖结构的各种二糖进行测试,发现α-*D*-葡萄糖$^{(1\to6)}$-*D*-半乳糖是沉淀反应最强的抑制剂。接着对含有α-*D*-葡萄糖$^{(1\to6)}$-*D*-半乳糖结构的各种三糖进行测试,结果表明抗1抗体所识别的决定簇的序列和大小是含有α-*D*-葡萄糖结构的二糖。测试的序列可以通过对脂多糖多糖链降解产物的分析进行推测,这些降解产物包括*D*-Glu-*D*-Gal-*D*-Man-*L*-Rham四聚体结构。表19.3中的结果同时也表明决定簇1'和决定簇19之间的不同在于每个决定簇的特异性抗体识别的寡糖链长度不同。支持这个假说的事实是:在某些菌株中有决定簇1,而在其他一些菌株中却没有,然而,决定簇19通常和决定簇1同时出现在一些菌株中。正如表19.3所示,决定簇19需要完整四糖结构,当然包括编码决定簇1的序列,以对半抗原产生最大的抑制作用。这些结果除了确定抗原结构外,还显示多糖抗原决定簇在大小上的差异。 654

表19.3　通过半抗原抑制实验对沙门氏菌O抗原结构的分析

被半抗原的最大抑制百分数/%	抗原系统	
	1,抗1抗体	19,抗19抗体
D-Glu	-	0
Me-α-*D*-Glu	35	10
α-*D*-Glu(1→6)-*D*-Glu	80	25
Glu.Gal.Man	80	70
Glu.Gal.Man.*L*-Rham	>70	>70
被降解的结构	α-*D*-Glu(1→6)-*D*-Glu	α-*D*-Glu-*D*-Man-Rham

经允许复制自参考文献[8]。

溶原性噬菌体对沙门氏菌多糖抗原影响的遗传学研究[10]表明,对多糖的非降解端的序列进行化学修饰会导致细菌血清型呈阶梯式的改变(表19.4)。因此,噬菌体E15能使鸭沙门氏菌O抗原的从表位3,10变为3,15,而随着噬菌体E34的溶解作用可以使O抗原变成表位34。半抗原抑制作用的研究表明三种O抗原是

完全不同的三种形式。首先通过溶解作用移去末端的乙酰半乳糖，从而使二糖的连接从 α(1→6)变为 β(1→6)，这样就移去了表位 10，却加入了表位 15。随之的溶解作用是使用 β-*D*-Gal 作为受体与附加 *D*-Glu 结合，从而移去 O 抗原的表位 15，但加入了表位 34。在每一种情况下，移去一个乙酰基团就会改变第一个二糖的连接方式，或是加入了一个另外的单糖，从而改变了 O 抗原的表位，因为末端的单糖区是免疫优势区域。由噬菌体诱导的生物学改变很可能是由于一种转糖酶的产生而加入了新的单糖造成。这种酶可能是由噬菌体基因编码或是由抑制的内源性细菌基因编码。

表 19.4　由噬菌体溶解作用引起的沙门氏菌血清型阶梯式变化代表的非降解端的连续变化

产生 50%抑制作用的半抗原浓度/(mmol/L)	被测试的抗原抗体系统		
	10，抗 10 抗体	15，抗 15 抗体	34，抗 34 抗体
AcO-Gal Man *L*-Rham	0.013	ND	ND
Gal-Man *L*-Rham	>1.6	0.005	0.16
Gal-Man	–[a]	0.027	≫0.2
Man *L*-Rham	–[a]	0.083	≫0.2
Glu-Gal-Man	–[a]	0.027	0.05
Glu-Gal	–[a]	1.0	0.10
被降解的结构			
抗原 10	AcO-Galα(1→6)Manα(1→4) *L*-Rham		
Phage E15 ↓			
抗原 15	Galβ(1→6)Manα(1→4) *L*-Rham		
Phage E34 ↓			
抗原 34	α-*D*-Gluα(1→4)Galβ(1→6) Man		

经允许复制自参考文献[10]。
ND：没有做。
[a] 在任何测试浓度下都不会抑制。

血型抗原

血型抗原 A 和 B 最早是在个体的血清中检测到的。个体缺乏这两种决定簇之一时会使它们所在的红细胞丧失凝集的能力[8,11-13]。而 O 型血的人会有 H 抗原决定簇，这种决定簇在 A 型或 B 型血中均检测不到。而且存在这三种血型的人可能还会有其他的决定簇如 Lewis (Le)抗原。尽管 ABH 和 Le 抗原决定簇位于糖基部分，但是糖类会以不同的生物学形式存在。在细胞表面，糖类或是以在细胞内合成的糖脂形式存在(AB 和 H 抗原)，或是以从血清中摄取的糖蛋白的形式存在(Lewis 抗原)。在分泌的黏液中如唾液，它们以糖蛋白的形式存在。奶、卵巢囊肿液以及胃黏膜是可溶性寡糖的来源，这些寡糖具有血型反应性。另外，这些抗原经常出现在其他种属中，包括肠道大约一半的正常菌群中[11]。血型抗原的广泛存在可以用来解释人血清中广泛存在的抗 AB 反应性，即使是在那些以前从未通过输血或怀孕接触人血型物质的人群。

655

这些抗原的免疫化学性质的研究因可用抗原性寡糖作半抗原抑制试验而得以简化。例如 A 型抗原的寡糖可以通过抗 A 抗体来抑制 A 型血细胞的凝集。A 型抗原的寡糖还可以通过抗 A 抗体来抑制 A 型抗原糖蛋白的免疫沉淀效应。因为这些寡糖是单体，它们与抗体的反应不会形成沉淀，但是却能封闭抗体结合位点。

来源于囊液的抑制性寡糖经过纯化后发现包含 *D*-半乳糖、*L*-岩藻糖、*N*-乙酰半乳糖胺以及 *N*-乙酰葡糖胺。每个抗原中最具有抑制性的寡糖已在图 19.2 中得以描述。从图 19.2 中可以发现，ABH 和 Le 抗原都有一个共同的寡糖核心序列，而抗原之间通过糖链末端或分枝点的个别连续单糖的不同而相互区别。除了半抗原抑制试验外，其他生物化学数据也说明了这些不同决定簇之间的联系。通过酶消化 A、B 或 H 抗原可以从这些抗原中得到一个共同的核心寡糖。核心寡糖能与肺炎球菌 XIV 型多糖特异性抗血清发生交叉反应，肺炎球菌 XIV 型多糖含有与血型决定簇相同的结构，如图 19.2 最下方所示。而且从卵巢囊肿液中可以分离出这种含有前体细胞物质的结构。

656

从前体物质开始，H 决定簇的产生是由于在半乳糖上添加了 *L*-岩藻糖，而 Le^a 决定簇的产生是由于在 *N*-乙酰葡糖胺上添加了 *L*-岩藻糖，而 Le^b 的产生是在两种糖上添加了 *L*-岩藻糖 。将 *N*-乙酰半乳糖胺添加

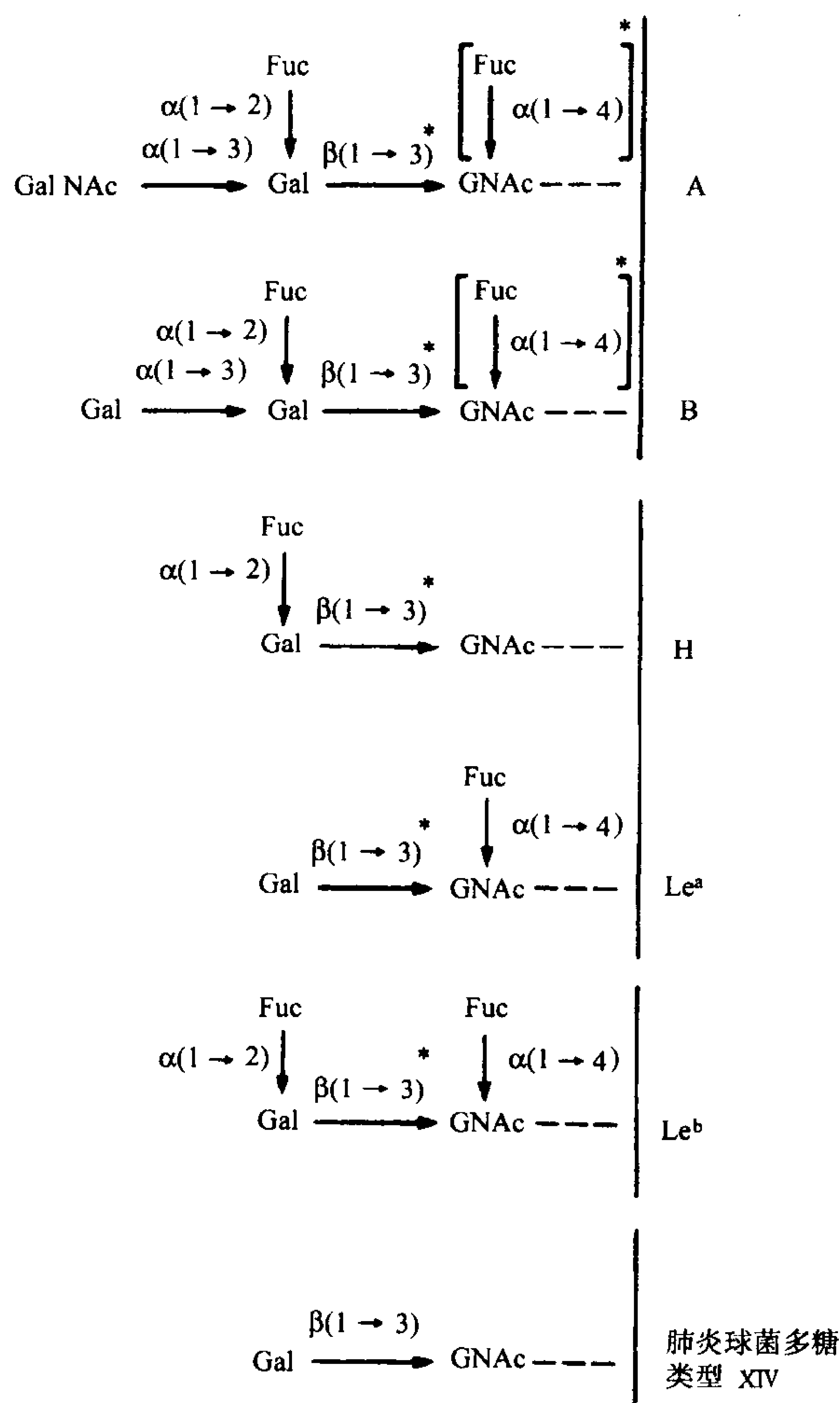


图 19.2 寡糖链特异性。用半抗原抑制研究法确定的 ABH 和 Le 血型抗原的结构[8,12]。每个决定簇有 2 个可变链。其中,1 型的 Gal-GNAc 连接是 β(1→3),而 2 型的 Gal-GNAc 连接是 β(1→4)。而且,如果 Le 海藻糖连接到 GNAc,则 A、B 抗原具有异质性。在含额外海藻糖的分子中,当 Gal-GNAc 连接是 β(1→3)(1 型)时,海藻糖必须是连接的 α(1→4),而 Gal-GNAc 连接是 β(1→4)的 2 型分子中,则含 α(1→3)连接的海藻糖。星号表示连接中这种变异性的位点。

到 H 物质上产生 A 决定簇,而将半乳糖添加到 H 物质上产生 B 决定簇,两种情况下都可以封闭 H 决定簇的反应性。

通过转糖酶顺续增添单糖试验可以解释 ABH 和 Le 抗原的遗传学特点。在 H 决定簇的基础上添加 *N*-乙酰半乳糖胺或半乳糖或者什么也不加,可以来解释 AB 抗原等位基因的性质。有一种罕见的遗传性状(孟买表现型)即人体缺乏从前体物质合成 H 决定簇的能力,这种性状也可以阻断 A 和 B 抗原的表达,因为 A 和 B 抗原转移酶缺乏一种受体底物。但是,Lewis^{a}抗原(Le^a)在红细胞表面的出现不依赖于 H 抗原的合成。Le^a 抗原的结构如图 19.2 所示,可以直接来源于前体物质而不需要 H 抗原作为中介。通过对不同个体的比较可以发现,Le^{a}抗原在红细胞表面的出现与它在唾液中的存在有联系,因为 Le^a 并不是细胞膜内部的组成成分,必须从血清糖蛋白中经吸收得到,而糖蛋白又是依靠分泌而存在。除了有独立的合成途径外,Le^a 抗原还不依赖于 ABH 抗原分泌的处理过程。因此,如果存在不能分泌 ABH 抗原的唾液性分泌物时(发生在约 20%的人群中),如果分泌物中包含由 Le 基因编码的岩藻糖转移酶,则也可以分泌 Le^a 抗原。相反,ABH 抗原的唾液性分泌物也能通过 H 抗原特异性岩藻糖转移酶对 Le^a 抗原的作用,并随着 ABH 抗原分泌系统而产生 Le^a 抗原。由于 Le^a 抗原是其他生化步骤的基础,因此如果 Le^a 抗原减少,那么在血细胞上就检测不到 ABH 以及 Le^b 抗原的分泌物。相反,Le^b 仅存在于 ABH 抗原的分泌物中。

葡聚糖结合性骨髓瘤蛋白

由于多糖是一种普遍的环境抗原,因此经常发现随机诱导产生的骨髓瘤蛋白具有特异性的多糖也就不

奇怪了。对这些单克隆抗体的精细研究能支持抗体多样性的克隆扩增模型：异种抗血清就如同许多具有亲和力和特异性的抗体克隆的总和。IgA K 型的骨髓瘤蛋白 W3129 和 W3434 都对包含 α-葡萄糖(1→6)葡萄糖接点的葡聚糖有特异性[13]。对一系列单糖或逐渐增加的多糖链进行半抗原抑制试验表明，与一个葡萄糖反应产生的能量为总结合能的 75%，与两个葡聚糖反应产生的能量为总的 95%，与三个葡聚糖反应产生的能量为总的 95%～98%，与四个葡聚糖反应产生的能量为 100%。这表明抗葡聚糖抗体和葡聚糖最主要的结合能来自末端的单糖残基，而且 4～6 个单糖组成的寡糖链通常就可以填充抗体结合位点。人抗葡聚糖抗血清的性质很相似，其四聚体寡糖几乎对 95% 的结合能作出贡献。这些实验第一次测量出了一个抗原决定簇大小：4～6 个单糖残基[14,15]。除此之外，从抗血清中所观察的现象可知，骨髓瘤蛋白的结合亲和力对末端单糖的变化高度敏感，而且对 α(1→6)葡糖接点而非 α(1→3)有高度的特异性。然而在半抗原对骨髓瘤蛋白或抗血清与葡聚糖反应的抑制实验中，改变寡糖的第三或第四单糖对该实验的影响很小。

对其他葡聚糖结合性骨髓瘤蛋白[16]的研究表明：并非所有的抗多糖单克隆抗体对非降解端的寡糖有特异性，如 QUPC52 就是如此。对单糖或多糖的竞争性抑制作用表明与其他骨髓瘤蛋白相比，这种骨髓瘤蛋白，不足 5% 的结合能来自单糖或二糖，72% 来自三糖，88% 来自四糖，而 100% 来自六糖。骨髓瘤蛋白 QUPC52 第二个显著的特点就是：它通过一条包含 200 个残基的糖链与直链葡聚糖发生沉淀反应。直链葡聚糖只有一个非降解端，而骨髓瘤蛋白也只有一种特异性，因此骨髓瘤蛋白与葡聚糖非降解端结合形成网状构象的可能性也不大。因此，QUPC 52 似乎对内部寡糖单位中包含 3～7 个单糖残基的糖链具有特异性。W3129 对末端的决定簇有特异性，而且也不与直链葡聚糖发生沉淀反应。能与直链葡聚糖发生沉淀反应的抗体也可以在 6 种人类抗葡聚糖血清中检测到，血清中包含 48%～90% 的分支葡聚糖抗体。因此抗葡聚糖抗体可以分为两类，一类对末端寡糖具有特异性，一类对内部寡糖具有特异性；两种类型的单克隆抗体都非常有用，并且都存在于人免疫血清中。Cisar[16]等推测 W3129 或 QUPC 52 对末端或内部寡糖的特异性结合位点的分布不同。末端和内部寡糖的化学结构几乎相同，不同之处在于其羧基接的是羟基还是糖苷键。也许 W3129 末端寡糖的特异性应归功于抗体结合位点的形状(仅仅容纳一个末端的窝洞)然而 QUPC52 内部寡糖的结合位点是位于抗体表面的凹槽，能允许多聚体的其他部分从在两端伸出。进一步的确定需要依赖 X 射线晶体衍射技术对单克隆抗体的结合位点进行研究，这种单克隆抗体通过与抗原结合位点相互作用而得到其特异性的确切位置。

随着杂交瘤技术的发展，任何特异性的单克隆抗体的产生都成为可能。用直链多聚糖(QUPC52 最好的抗原)免疫小鼠，然后通过融合和(利用直链葡聚糖)筛选得到葡聚糖结合性抗体，产生 12 个杂交瘤细胞，每一个对 QUPC 52 均有相似的特异性。寡糖对 12 个单克隆杂交瘤的抑制实验表明，当寡糖为六糖时，杂交瘤与寡糖的亲和力明显的增加，而与二糖的亲和力很小，而只有 49%～77% 的结合能来自三糖[18]。第二，这 12 个单克隆杂交瘤都对内部 α(1→6)糖苷键的葡聚糖有特异性，因为它们都可以沉淀直链葡聚糖。第三，11 个 BALB/c 单克隆杂交瘤中有 9 个具有与 QUPC52 发生交叉反应的独特型，却没有与 W3129 发生反应的独特型[19]。这些数据均能支持该设想，即：不同的抗体有相同的特异性，而且相同的凹槽型结合位点可能来源于包含 QUPC52 独特型的胚系 V_H 基因家族[19]。

大量的环境糖类抗原以及对每种糖类抗原应答而产生的高水平的特异性抗体表明，各种不同的抗体分子都是非常有用的，因为一些抗体可以被选来对付各种可能的抗原结构。为了调节这个多样的系统，科学家提出了网络学说，在这个学说中，抗体自己可以当作抗原而被识别[20](见第 3、4 章)，对链球菌多糖发生的免疫应答就是一个很好的例子，在此应答中，抗独特型抗体能调节对抗原的免疫应答[21]。

657

最近对 17 株抗 α(1→6)糖苷键葡聚糖的单克隆杂交瘤的研究[22,23]表明，这些关系密切的抗体的结合位点可能来源于重链和轻链的一小段可变区基因，也可能是相同特异性的抗体来自序列高变的可变区基因。每个单克隆杂交瘤都有凹槽样的位点，通过各种不同长度寡糖的抑制免疫沉淀实验发现，除一个例外，其余的凹槽样位点都能容纳 6～7 个单糖残基。因此，不像那些抗半抗原蛋白的单克隆，它们的表位的精确特征已得以确定而且所有类型都非常相似。

对 V_κ 序列的研究发现，这些杂交瘤中仅存在 3 种 V_κ 亚型。将每一个 V_κ 亚型与特殊的抗原交联来免疫动物，不管是线性葡聚糖还是短的寡糖，用相同方法免疫小鼠得到的单克隆株中有 10 株都使用相同的 V_κ 亚型。

相反，17 个单克隆杂交瘤的 V_H 链至少来自 5 种不同的胚系基因，而这些胚系基因又来自于 3 种不同的 V_H 基因家族[24]。2 个常用的胚系 V_H 基因是分别在第 7 和第 5 个单克隆株中发现的，其较小的变化可以用体细胞突变来解释。V_H 基因的应用与用来免疫动物的抗原的大小是相关的，尽管每个互补决定区（CDR）的长度与凹槽形结合位点的大小无关。经实验得到了一个显著的发现，就是各种不同的 V_H 链（序列上大约有 50%的同源性）能与相同的 V_κ 结合并产生大小、形状、抗原特异性以及亲和力等几乎都相同的抗体结合位点。当序列不同的 V_H 和不同序列的 V_κ 结合时也可以发生同样的现象，产生性质非常相似的抗体。这些现象的产生主要是由于葡聚糖的结合需要抗原能与进入凹槽中并且与组成凹槽侧面和底部的单糖残基相互作用。这些结果也表明可变区的各种分支序列，包括决定簇互补区内外的区域，都能折叠形成相似的结合位点结构，从而导致其免疫化学特点非常的相似。在其他抗原抗体系统如苯基噁唑酮（phenyloxazolone）中也报道过相似的结果[25]。

最近，这方面的研究扩展到对 34 个凹槽型抗 $\alpha(1\rightarrow6)$糖苷键葡聚糖单克隆杂交瘤株的研究[26]。其中 10 株使用重链 V_H19.1.2，11 株使用 V_H9.14.7。以这些不同的 V_H 基因开始研究，发现这两株单克隆杂交瘤提供了有关每个 V_H 基因和不同的轻链 V_κ 和 J_κ 基因结合力的特点，以及产生凹槽型特异性结合位点的重链 D 和 J_H 基因的特点。在这 12 株单克隆株中，使用着相同的轻链 V_κ-Ox1 基因，而 V_H19 家族仅使用单一的 J_κ 序列（J_κ2），而 V_H9 家族则使用包括所有具有活性的四个 J_K 片段（J_κ1，2，4，5）。同样，V_H19 家族的重链 J_H 序列仅使用一种序列类型（J_H3），而 V_H9 家族的重链 J_H 序列则使用 3 种序列类型（J_H1，2 和 3）。两种家族均使用一个 D 区域（DFL16.1），但是 V_H-D 和 D-J_H 之间的连接序列却不同，V_H19 仅允许连接序列发生很小的变化，而 V_H9 则允许连接序列变化很多，其变化主要依赖其连接的 J_H 基因的大小。尽管这两种 V_H 基因在氨基酸序列上有 73%的同源性，但是它们却使用不同的方法达到大小相同、特异性相同的凹槽结合位点。该结果表明两种重链可变区，可能主要归功于其构象，能将各种不同的结构约束插入微基因组成成分从而成功地形成特殊的位点。产生抗体特异性的两种方法很明显，即使两个家族使用相同的 V_κ 和 D 微基因。就 V_H19 家族而言，CDR2 的点突变使其产生对 $\alpha(1\rightarrow6)$糖苷键葡聚糖的特异性，而剩余的其他结构仍保持完整。对 V_H9 家族而言，J_H、J_κ、V_H-D、D-V_H 的广泛的多样性则被用来产生凹槽形结合位点。这两种构建结合位点的蓝图也反映了产生抗体多样性的胞内途径。

蛋白质和多肽抗原决定簇

如同蛋白质本身，蛋白质的决定簇也是由氨基酸残基组成的特殊的三维结构。那些与抗原抗体结合部位的互补决定区残基接触的残基称为接触残基。为了便于接触，这些残基必须暴露在蛋白质的表面，而不应该埋藏在疏水的核心。由于抗体高变区互补决定簇的跨度为 30～40Å × 15～20Å × 10Å（D.R. Davies 的个人交流稿），因此包含这些抗原性表位的接触残基将覆盖蛋白表面很重要的一段区域，就如同现在通过 X 射线技术观测到的一些抗原抗体复合物所见到的[27～30]。从另一种观念来看，可以利用长度逐渐增加的合成多肽如低聚赖氨酸，来估计结合位点的大小。用这种方法的一系列精细的研究表明，结合位点可以容纳的最长肽链为 6～8 个氨基酸残基，与以前讨论过的、早期发现的寡糖链非常相似[14,15]。

各种类型的相互作用形成结合能。许多直接接触溶剂的、位于蛋白质表面的氨基酸残基应该是亲水的。它们很可能通过极性作用与抗体接触残基发生作用。例如，阴离子谷氨酸的羧基能与抗体分子上互补的阳离子赖氨酸结合，反之亦然；或是谷氨酰胺的侧链能形成二硫键与抗体结合。然而疏水作用也发挥着主要的作用。表面存在太多疏水残基的蛋白质不能以稳定单体形式存在于水溶液中。同理，这些位于蛋白表面的疏水残基对蛋白与抗体的结合也发挥着作用。当疏水性残基位于蛋白质的抗原决定簇内，或是位于糖类的

决定簇内[8]，并且与抗体结合位点相应的疏水性残基发生相互作用时，以前同它们接触的水分子就会被排除在外。一篇有关抗原抗体结合的化学特征的全面的综述将在其他地方给出[34]。

映射表位：构象与序列

定义一个蛋白质的抗原决定簇除了其包含的氨基酸残基外，还包括其他的部分如这些残基以怎样的方式进行三级结构的排列。因为这些残基位于蛋白质的表面，我们可以将这个部分当作抗原决定簇的局部"地形图"。Sela[35]将蛋白质的抗原决定簇分为两类：序列和表位决定簇，这种分类主要取决于基本序列或三维构象哪一个对结合贡献最大。另一方面，因为抗体结合位点在天然抗体上都一个优势结构，因此可以推断出一个特殊多肽序列的某些构象可能比其他的构象更适合，并且更积极的参与抗体结合。因此构象或局部结构在抗原决定簇的组成中发挥着一些作用。

658

而且，当我们观察一个蛋白质表面的空间充填模型时，我们可能不敢确定主链的方向或螺旋的位置（比较图 19.3 和图 19.4）[36-40]。我们也很难鉴别两个肩并肩，位于蛋白表面的氨基酸残基是位于多肽主链的邻近位置，还是由来自不同部位的序列通过分子折叠而组合在一起的。如果一个蛋白质在与抗体结合时能保持其天然构象，那么抗体将很难区分通过共价作用直接连接的残基和通过大量多肽插入而相连的残基。因

图 19.3　天然三维构象的抹香鲸多肽骨架的呈递。α 螺旋自 A-H、从 N 端到 C 端标记。除两个参与与亚铁血红蛋白的 His 环(F8 和 E7)外，其他侧链忽略。55Met 和 131Met 是 CNBr 的裂解位点，使肌红蛋白被裂解为三个片段。天然构象的多数螺旋性和其他特征在分子被裂解时丢失。构象中一个较不显著的改变是通过去除亚铁血红素形成脱辅基肌红蛋白而产生的，原因是亚铁血红素与几个螺旋相互作用，并稳定其他（相互对应）的位置。其他标记的残基（Glu4、Lys79、Glu83、Lys140、Ala144、Lys145）是已经发现的参与被单抗识别的抗原决定簇的那些残基[36]。CNBr 产生的裂解将 Lys79 与 Glu4 分离开，将 Glu83 与 Ala144 和 Lys145 分离开。Koketsu 和 Atassi 确定的顺序决定簇（15～22 氨基酸残基）位于肘部，右下，自 A 螺旋结束至 B 螺旋开始[38]。

此,天然球状蛋白的抗原决定簇的一级结构仅由一段连续的氨基酸序列组成的可能性很小。即使大部分决定簇都是由连续的序列组成,附近部位的其他残基可能也发挥一定作用。即使在抗体产生之前蛋白质就已经被分解为片段,也没有任何办法来证实连接的序列。

Barlow 等已经分析和证实了这个概念[41],他们分析了蛋白质表面给定的一些不同半径的原子。随着原子半径的增加,球体所包含的原子形成相同的连续蛋白序列片段的可能性会下降的很快。相对的,部分表面原子也会位于球体的中心,球体中心来自相同连续片段的残基也会随着球半径的增加而显著减少。例如,溶菌酶半径为 8Å,少于 10% 的表面残基存在于表面这个"连续的碎片"上,而这仅是组成表面突起的基本区域。当半径为 10Å 时,几乎没有任何表面残基存在于这个"连续的碎片"的核心中。因此,通过 X 射线晶体衍射技术对溶菌酶抗体复合物分析发现,对于一个面积大约为 20×25Å 的接触区域,抗原性位点几乎没有任何完全连续的片段(图 19.5)。

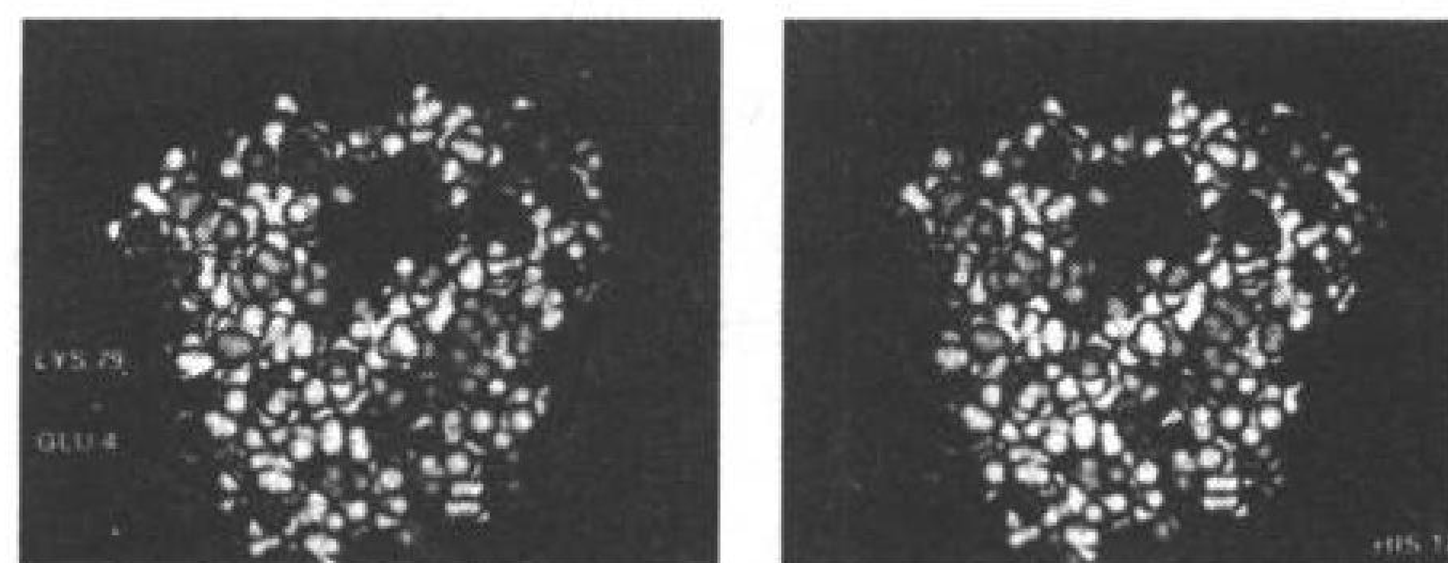


图 19.4 基于 Takano X 射线衍射坐标[39]的抹香鲸肌红蛋白分子计算机模拟立体图象。对应图 3 的图示方位是前视图。计算机辅助方法由 Feldmann 等介绍[40]。亚铁血红素和芳香环碳显示最黑色,接着是羧基氧,然后是其他氧,然后再是氨基基团,再然后是其他氮,最后是脂肪族氨基酸残基的侧链。非脂肪族氨基酸残基的骨架和侧链,除功能基团外,以白色显示。请注意,与图 3 中骨架不同的是,在表面,螺旋的方向不明显。残基 Glu4、Lys79 和 His12 据认为是被肌红蛋白单克隆抗体识别的 X 射线晶体衍射抗原决定簇的一部分[36]。该立体对可用并不昂贵的立体透视仪(如立体显微镜)进行三维透视[36]。

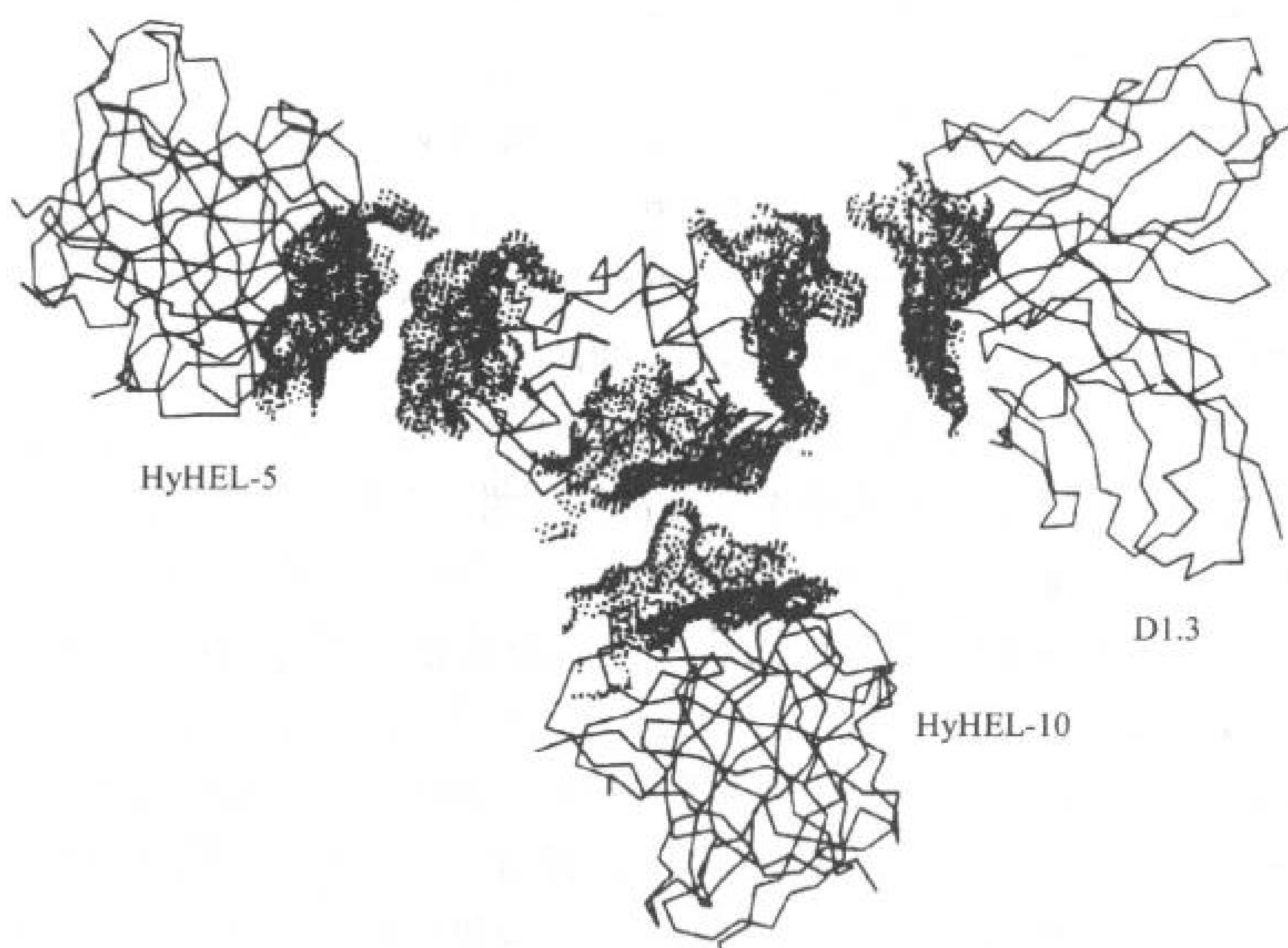


图 19.5 用三种非交迭单克隆抗体足迹法显示的溶酶的组装形态学位点。图示中央部分为溶酶的 α 碳骨架,和三种抗溶酶多克隆抗体(D1.3、HyHEL-5 和 HyHEL-10)的 Fv 部分。抗体在溶酶上和溶酶在抗体上的足迹,即它们间相互作用表面,通过点图像表示。请注意,三种抗体,每种都与溶酶的一种以上的连续环相作用,并因此定义组装的形态学位点[30]。

组成抗原性位点的氨基酸残基广泛的分布于蛋白质一级结构的序列中,但是当蛋白质形成它的天然构象,又称为"局部组装结构"位点时,这些残基就都集中在蛋白质分子的表面了[42,43]。因为这些位点的组装来自不同部位的序列,而且仅存在于天然分子表面的局部区域。相反,仅由一段连续的蛋白序列组成的位点称为"节段性"抗原性位点[42,43]。

同 T 细胞识别的、经处理后保持一级和二级结构的多肽片段相比,强有力的证据表明,当天然蛋白质作为免疫原时,产生的大多数抗体都是针对蛋白质的天然构象的。例如天然葡萄球菌核酸酶抗体对天然蛋白的亲和力大约是所分离出来的多肽的 500 倍(多肽的分离通过将肽与琼脂糖结合)[44]。一个更为明显的例子是由 Crumpton[45] 所证实的肌红蛋白或脱辅基肌红蛋白的天然抗体。含三价铁的天然肌红蛋白抗体能与肌红蛋白产生红褐色的沉淀。这表明血红素仍位于蛋白质原来的位置,至少存在于其天然的环境中。这种抗体却不能与脱辅基肌红蛋白很好的结合,因为脱辅基肌红蛋白的构象有轻微的差别,它没有血红素。另一方

面，脱辅基肌红蛋白抗体与肌红蛋白混合时能产生白色沉淀。这些抗体非常“偏爱”脱辅基肌红蛋白的这种构象，血红素被排除在这种构象之外，以至这些抗体能陷入蛋白分子中，这些蛋白分子向构象方向运动，并且将平衡状态改变为脱辅基状态。因此我们可以认为抗体将血红素从肌红蛋白中“挤出”来。从热力学的观点来看，蛋白部分具有优势构象的抗体与天然形式相比，其具有的自由能比血红素与肌红蛋白结合的自由能要多。因此，一般来讲，作为免疫原蛋白产生的抗体对蛋白的构象具有特异性。

许多方法被用来确定与某种蛋白特异性抗体结合的抗原决定簇。通过抗体与来自蛋白序列的多肽片段或合成的短肽结合是最常用的一种方法。通过传统的液相合成多肽的方法合成多肽[46]，或设计一种方法合成大量的多肽并进行筛选。在一种方法中，大量同时存在于丙烯酰胺网状“茶叶袋”结构的被分离多肽，可以通过测序的通用步骤，仅在不同氨基酸的偶联步骤得到分离[47]。在另一种方法中，合成的多肽位于96孔板板底的塑料钉上，用这种方法可以做抗体液相结合分析而不用将多肽从塑料支持板上分开[48]。这两种方法可以用来研究大量的不同的天然序列，从而确定抗体结合的关键残基。通常，肽越长，其特异性结合序列的确定越有把握，因为仅6~8个氨基酸残基的短肽通常表现出无任何特异性的结合序列[49]。如果根据蛋白质抗原序列合成多肽，这种方法非常普遍，那么使用的多肽就限制在仅能确定对片段性抗原位点特异性结合的多肽结构。

为了确定组装的局部结合位点，需要许多复杂的方法。早期使用各种不同的拥有已知氨基酸取代的天然蛋白质抗原，在这种蛋白抗原中进化变异也存在[42]。因此蛋白质天然构象中各种不同的氨基酸取代形式可以得到检测。用这种方法仅限于研究同种蛋白质，即有多种形态的蛋白质的不同功能。这种多样性通过使用定点突变也可以扩展到其他的残基上。第二种方法是使用抗体与天然蛋白结合以保护抗原性位点不被改变[50]或被酶降解[51]。这是一个有用但敏感性不高的方法，能利用与其他抗体的竞争性[52~54]。第三种方法是利用在液相表面合成上千种多肽的能力来进行直接结合分析[48]，从而研究单克隆抗体与每种6个氨基酸结合体的结合能力[48]。如果组装的局部位点可以被6个氨基酸的结合体所模仿的话，那么我们就可以用一个模拟位(mimotope)来定义该抗体的特异性，而这6个氨基酸并不是来自任何连续的蛋白序列的片段，而是来自于组装一部分蛋白表面结构的序列[48]。

肌红蛋白是研究抗原决定簇多样性范围的较好模型，研究的范围从天然情况下较连续的抗原决定簇到在没有天然构象的蛋白中几乎不存在的抗原性决定簇(表19.3)。第一个较好的例子就是多数片段型决定簇位于分子氨基末端15~22个氨基酸残基部分。Crumpton 和 Wilkinson[55]第一次发现糜蛋白酶降解片段中包含15~29个氨基酸残基的片段对由天然蛋白或脱辅基肌红蛋白产生的抗体具有抗原活性。根据15~22序列合成的多肽通过与抹香鲸肌红蛋白产生的抗体结合可以分为两类[37,56]，尽管这些合成多肽只有7~8个氨基酸残基长度。这个长度的多肽形成天然蛋白中相应的构象不会花很多的时间(在溶液中)。另一方面，这种合成多肽对抗体的亲和力比在天然蛋白中该多肽对抗体的亲和力要低几百倍。因此，即使大多数抗原决定簇包括15~22这个连续的序列，抗体对这个序列的天然构象比随机构象更具有特异性。而且现在也没有证据排除其他残基参与抗原决定簇的组成，这些残基位于肌红蛋白的表面，但不是15~22这段序列[57~60]①。

关于二级结构重要性的一个较好的例子就是鸡蛋白溶菌酶的多肽环(残基序列64~80)[61]。蛋白的环状结构是二硫键连接位于残基64的半胱氨酸和残基80的半胱氨酸形成的，这个结构是溶菌酶抗体最主要的抗原决定簇。包含环状结构的独立多肽60-83与抗体的结合亲和力很高，但是通过切断二硫键将环打开，则会破坏抗溶菌酶抗体的抗原活性[61]。

对构象要求的另一个极端就是这么一些决定簇，它们包含的残基在一级结构中位置相差很远，在蛋白折叠形成三级结构时却聚集在天然蛋白分子表面。肌红蛋白也为这些决定簇提供了一个较好的例子，这些决

---

① 这是由多个研究小组所确证的惟一的一个肌红蛋白片段性抗原决定簇。Crumpton 和 Wilkinson[55]测定了胰蛋白酶水解片段147~153的抗原活性，该片段覆盖了一个已报道的其他的顺序决定簇[57]。但是，有两个已报道的其他的顺序决定簇，56~62残基和94~100残基，当用其他抗血清检测时是不可重复性的(即使是同一种群来源)[58]。关于相关研究，读者可参考其他文献[59]、[60]。

定簇称为组装的局部表位[42,43]。Berzofsky 等对抹香鲸肌红蛋白的 6 个单克隆抗体进行了研究[36,62]，发现没有一个抗体能与肌红蛋白溴化氰裂解的三个片段结合，这三个片段合起来几乎囊括了整个分子的序列。因此这些单克隆抗体（它们对蛋白的亲和力均在 $2\times10^8\sim2\times10^9$ L/mol）对蛋白的天然构象具有很高的特异性。通过对一系列种属天然肌红蛋白相对亲和力的研究发现，这些种属的肌红蛋白都有已知的氨基酸序列。根据肌红蛋白在研究中的作用，这种方法也可以用来确定与三个这种抗体结合的一些残基。研究结果非常引人注目，发现这三个单克隆抗体中有两个能识别局部决定簇，如前面所得到的结构。其中一个能识别包含 4 位的谷氨酸和 79 位的赖氨酸决定簇，它们分 别位于肌红蛋白的 A 螺旋和 E-F 转角，2 个氨基酸的距离在 2Å 以内，并且在天然分子中形成盐键（图 19.4）。另一个抗体识别的抗原决定簇包括位于肌红蛋白 E-F 转角的第 83 位谷氨酸以及 H 螺旋的第 144 位的丙氨酸和第 145 位的赖氨酸（图 19.3）。再次说明一下，这些氨基酸在一级结构中位置相差很远，但是在分子折叠形成天然构象时，这些氨基酸的距离都在 12Å 以内。在人肌红蛋白和溶菌酶的单克隆抗体中也报道了同样的例子[30,52]。其他构象依赖抗原决定簇是一些常规的蛋白抗血清，这些蛋白包括：胰岛素[64]、血红蛋白[65]、烟草花叶病毒[66]、细胞色素 c[67]等。而且，溶菌酶-抗体[27,29,30]和神经酰胺酶-抗体复合物[28]的晶体结构清楚的表明：这两种抗体结合的表位是局部的组装表位。与溶菌酶不重复位点结合的三个单克隆抗体中发现（图 19.5）这三个抗体结合位点覆盖不止一个多肽环，并且包含一个组装的局部位点[30]。这个结果很理想地阐述了下面这个概念：大多数抗体结合位点必须与多个多肽环相互作用，从而很好地定义了组装的局部位点[41]。

当检查常规抗血清时，与结合连续序列的抗血清相比，局部决定簇的特异性抗血清出现的频率是多少？Lando 等[68]研究了这个问题，他将山羊、绵羊以及兔的抗抹香鲸肌红蛋白抗血清过柱，柱中填料为琼脂糖交联的肌红蛋白溴化氰片段，这些片段覆盖了肌红蛋白的整个序列。这些抗血清连续分别过三个柱子中的一个，至到没有抗体为止。虽然如此，经过这种处理后，仅存的抗体仍为抗血清中的 30% ~ 40%。这些抗体仍然以很高的亲和力与天然肌红蛋白分子结合，但是通过放射免疫测定发现，这些抗体不与任何存在于溶液中的肌红蛋白片段结合。因此，对 4 种抗肌红蛋白血清的检测中，60% ~ 70% 的抗体能与多肽结合，30% ~ 40% 的抗体仅能与具有天然构象的蛋白质结合。

以此为基础还进行了一些研究，表明蛋白表面很多地方具有抗原性[42,69]，而且这些表面还可以被分成许多抗原性区域[36,59,60,63]。每个区域都包含了许多被不同抗体识别的重叠决定簇。

从上面的研究可以得到一些有关局部型蛋白抗原决定簇的其他的有意思的观点。如果检查包含抹香鲸肌红蛋白残基 83、144 和 145 的局部决定簇，如图 19.3 所示，会发现它们存在于蛋白质表面一个深的裂隙或凹面的唇状结构。有可能（但是现在还没有证实）抗体结合位点的一些互补的凸起区域会插入这个凹槽。在对结合了半抗原或糖类的肌红蛋白的研究中，我们会习惯地认为抗原会被吸入抗体表面的凹槽或裂隙中[70]。然而，在球形蛋白抗原与球形抗体的结合中，这些结合的位点在结构上非常的对称（而且抗原抗体结合能的热动力学也很对称）。因此，抗体表面的一个凸面插入抗原表面一个的凹面能够成为可能，正如抗原表面的一个凸面插入抗体表面的一个凹面这个常规发生的模型一样。现在由于蛋白抗原特异性的单克隆抗体的使用，这两种情况都会遇到。图 19.3 中所描叙的决定簇就是这种情况。从三种已公开发表的抗原抗体蛋白复合物的晶体结构中，我们可以发现接触表面非常宽广，在两个分子的表面都存在局部互补的一对凹面和凸面区域[27~30]。然而，当我们以短肽限制性定义抗原表位时[41,71]，短肽可以用来确定抗原表面突出的位点，我们很可能会发现这个位置会偏向抗原凸面和抗体表面的凹面。

有关这一章更多的信息在一些综述中得到阐述，包括 Sela[35]、Crumpton[45]、Reichlin[72]、Kabat[70]、Benjamin 等[42]、Berzofsky[43]、Getzoff 等[34]以及 Davies 等[30]的综述。

蛋白质和肽抗原决定簇的构象均势

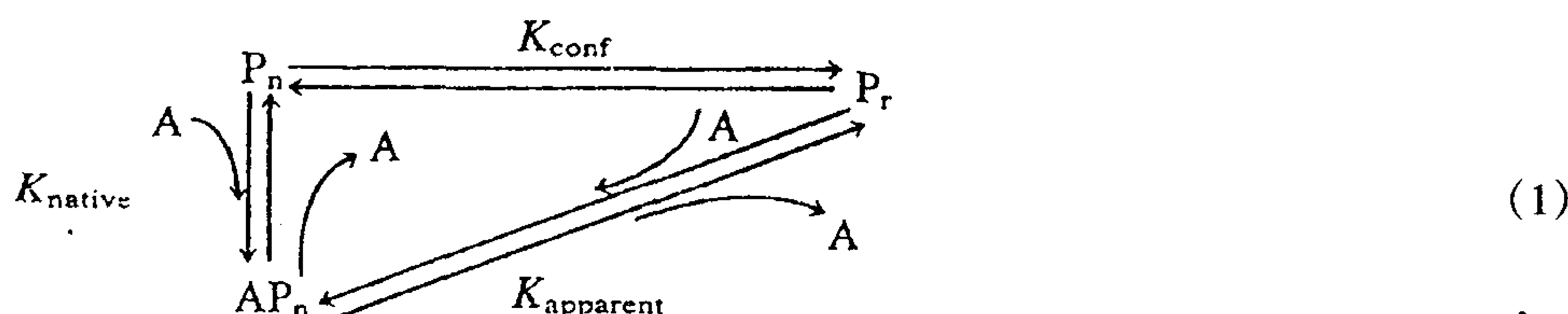
我们发现，抗体对天然构象的天然蛋白质比对其他片段的构象及变性的分子有更高的亲和力。相似的是，针对某一片段或变性分子产生的抗体比针对天然构象产生的抗体有高的亲和力。本部分将讨论亲和力

不同的可能机制,探讨如何用这些来促进有关蛋白质和肽构象均势的研究。

有几种可能的机制解释为什么一个天然蛋白质特异性的抗体对随机构象的肽片段有较低的亲和力。当然,这些肽不可能包括抗原决定簇中所有接触到的残基,因此结合能量较低。但是对于所有决定簇残基位于肽中的情况,仍存在几种其他的机制。第一,亲和力可能较低,因为与天然构象相比,肽中这些残基的局部结构可能不会产生一个互补的、合适的抗体结合位点。第二,外观上的亲和力可能降低,因为仅有一小部分的肽分子在任何时候都具有天然样的构象。这一模型认定抗体仅结合天然构象的肽分子。由于相应于肽的构象均势常数的因素,肽的浓度比总肽的浓度要低,因此外在的亲和力也低。这一模型与别位异构模型相似。第三,中间假想将认为肽和非天然构象的最初的结合有亚互补性,随后是肽分子内构象的变化,通过假定的一个天然样的构象以达到能量最低。这第三种假设与诱导适合模型相应。亲和力减低是由于能量被用来改变肽的构象,反过来相应于有关构象均势常数的第二种学说。在一定程度上,这些模型存在动力学方面的区别,因为与第二种假设相比,第一种假设认定快速的“结合”和快速的“解离”率[73]。

662

尽管解释这些数据有多种机制,但第二种假说由于提供了一种预测蛋白质和多肽的结构均势的方法,因而非常有用[44,74]。该方法表达如下,它假定了第二种假说的成立。



(1)

上式中,A 是抗体,Pn 是天然肽,Pr 是随机结合肽。

$$K_{apparent} = K_{conf} K_{native} \tag{2}$$

因此,肽的表现相关常数和测得的天然分子相关系数之比应为肽的结合均势常数。注意这里隐藏着一个假定,即肽的总浓度可以近似为[Pr]。由于大多数蛋白质的片段已被证实很少存在天然构象,上述假定可认为是符合实际的。即,$K_{cont} = [P_n]/[P_r] \ll 1$。还要注意到,如果在一定程度上发生了第一个假说或者第三个假说的情况,此方法得到的 K_{conf}将会偏高;相反,如果由于肽缺少某些决定性的接触残基以至肽的亲和力降低的话,此方法得到的 K_{conf}将偏低(由于假定了所有的亲和力差异来自于其结构)。在某种程度上,上述二种错误可被忽略。用该方法来测定金葡菌核酸酶的 K_{conf}其值为 2×10^{-4}[44]。类似的,使用了针对肽片段的抗体后,就可以估量当时呈非天然结构的天然核酸酶[74],如此会发现 K_{conf}有 3000 倍的可能倾向于呈天然构象。

与天然蛋白相结合于特定位点抗肽抗体

通过相应多肽的试验,人们研究了天然蛋白与肽之间的结构差异,并且观察了抗体和天然蛋白之间的 K_{conf}因子,令人们或多或少感到惊讶的是,抗合成肽的抗体和天然蛋白质之间存在广泛的交叉反应性[75,76]。这二种交叉反应可被认为通过二种相反的机制产生:抗蛋白抗体和肽的结合是不充分的,而抗肽抗体与蛋白质之间的结合非常充分且显而易见。这个发现非常有用,在自动固相肽合成变得简易可行后,它在三个领域尤其有用:利用重组 DNA 方法得到的蛋白质序列;制备位点特异性的抗体;以及尝试研究有主要生物学功能但无免疫原性的单一蛋白位点的免疫应答。本节重点讲解交叉反应及其应用以及其用在免疫原性研究的潜在局限。

基本假想在于多肽引起的抗体处于一种未折叠的结构,能结合在折叠成天然结构的蛋白质上的相应位点上[76]。这个假说并不是显而易见成立的,因为抗体结合上抗原是抗原进入结合位点后的直接结果,亲和力是抗体和抗原之间相互符合好坏的直接后果,而抗体特异性来自于其他抗原对相同位点的不能占据。那么抗多肽抗体何以能克服 K_{conf}效应,以很好的特异性和亲和性结合在天然蛋白上呢?整个过程取决于抗体

结合位点形成的三维空间以及抗原以一种符合能量法则的方法进入。

由于多肽是随机折叠的，很少呈天然构型，所以它们不太可能引起针对一种它们不能维持的结构的抗体。如果某些抗体对一种变性了的结构特异，那么，与肌球蛋白分子结合抗体后变性成为去肌球蛋白相似，交叉反应可能依赖于天然蛋白呈现不同构型状态的能力[45]。如果天然蛋白很活泼，那么它表现为某种随机构型的可能性很小。但如果它是一个稳定的三维弹簧，那么其局部的折叠和展开随时都在发生。蛋白质片段的局部展开可能使其得以与抗肽抗体发生交叉反应，因为一个灵活的局部片段能象随机折叠的多肽一样采取多种构型[76]。

相反，蛋白质的晶体化能力（该特性使 X 射线晶体结构学研究其结构成为可能）长期被作为蛋白质刚性的证据[77]。此外，异构酶存在散在的功能状态为蛋白质存在多种稳定状态提供了又一证据[78]。最后，抗体能区分蛋白质，如血红蛋白的天然形式和其完整蛋白质的变性形式已为众人所知[45]。

然而，蛋白质晶体在某种意义上是一种人为的状态，因为晶格的形成对各个组成部分有影响，每一部分都要处于局部能量最小状态，因而很大程度上失去了随机性。因此，晶体结构可能含有人为的活性，比溶液中的蛋白分子实际活性高。相反的，我们可以将培育蛋白质晶体中的某些巨大困难归之于天然构型中的无序性。其次，变构机制可以被二种未经特别活化的、分散的不同构型来解释。最后，产生构型特异性的抗蛋白抗体的能力并不排除无构型特异性的抗多肽抗体的存在，所有的抗体都可能对抗原的某一构型特异。为了让那些天然构型较松散的蛋白质或蛋白质片段能产生明显亲和力的抗体，该构型无须是晶体学上的天然构型。

抗多肽抗体已被证实为一种非常有用的试剂。当和基因测序的重组 DNA 方法结合后，通过 DNA 序列，可以预测蛋白质序列，构建合成肽，连上合适的载体分子——然后用来免疫动物[76,79]。所产生的多克隆抗体可以用肽包被的 ELISA 来检测。它们可被用来免疫沉淀^{35}S 标记的细胞溶解产物的天然蛋白，以此来确定这些细胞中新生基因的表达量。抗肽抗体还可用来分离纯化新的基因以前未经证实的产物。位点特异性抗体在后转录过程的检测中同样有用，因为只要前体和产物中含有该位点，它们即可结合上去。此外，由于这些抗体只结合与肽相对应的位点，它们在研究结构-功能关系上也很有用，也可用于阻断底物和酶的结合或者病毒和其细胞受体的结合。

663

蛋白质和肽的免疫原性

到现在为止，我们一直关注的是抗体和作为抗原的蛋白质或多肽之间的反应能力。但免疫原性指的是这些化合物在免疫后引起抗体产生的能力。理论上，一个球蛋白的近乎整个表面应该都能产生抗体，尤其当我们同时要得到拓扑特异性抗体和片段特异性的抗体时[42]。然而，多种因素影响蛋白不同区域的免疫原性。它们可分为蛋白质结构自身内部的因素和抗原外部的因素，后者与反应宿主有关且随不同动物、不同物种而不同[43]。此外，当肽被用于疫苗设计时，其免疫原性被认为有其特性。

对内在因素的研究开始于用天然蛋白免疫动物并且分析产生的抗体。对于多克隆抗血清，有必要比较每一位点或一类位点产生的抗体的相对量：免疫决定域位点是那些能产生绝大部分抗体的位点。单克隆抗体使我们得以能研究分散位点的免疫原性。蛋白质结构上的特性，包括位点表面可及性、柔性、亲水性以及与 Th 细胞识别位点的相似性，可能可以解释这些结果。

随着对蛋白的 X 射线晶体结构和抗原性结构的了解，毫不奇怪，人们发现结合同一分子（如流感病毒的神经酰胺酶）的一系列单克隆抗体均结合于该蛋白暴露在外的头部上的重叠位点上[80]。神经酰胺酶的茎部无免疫原性，显然是因为其几乎全部被糖类覆盖住。

除了像糖这类可能会干扰抗体与蛋白质结合的物质外，表面可及性显然是抗原决定簇被天然构型特异性抗体结合的必要条件，该结构无须任何展开[43]。测量这种可及性的方法已经提出了几种，所有的方法都需要知道 X 射线晶体学提供的三维结构。有些通过在蛋白表面滚动一个水分子残基球体来测量对溶剂的可及性[81,82]。有人认为对水的可及性并不代表对抗体的可及性的测量，他们提出一个更好的修正方式，即通

过滚动一个抗体结合域残基的球体[83]。另一个基于可接触性原则来预测抗原性位点的方法是检查蛋白表面的突出程度[71]。这可通过将蛋白质的主体模建为一个椭圆,来检查哪些氨基酸残基暴露在椭圆外来实现。可发现大部分突出残基都是抗体结合位点的成分,但这些位点通常都是用短合成肽来检测,因此在天然状态下是片段状。正如上面提到的,对于单一连续的一种蛋白序列中的抗原性位点而言,此位点可能需突出表现,否则序列中其他部分残基可能会掉入抗体结合域中[41]。

由于绝大部分蛋白质的三维结构还不清楚,人们提出了预测大多数抗原的暴露程度的方法。例如,亲水性位点倾向于在蛋白质暴露于水的方向上找到,可作为抗体合适的靶点。因此,亲水性被作为免疫原性的第二个代表指标[84~86]。这种模型已被用来分析含有已知抗原位点的几种蛋白质。每一种蛋白质中最亲水的位点确实是抗原性位点之一,然而,它的局限性在于以下事实:相当一部分蛋白质的表面残基是非极性的[81,82],并且已发现几种疏水氨基酸参与了抗原性位点[35,66,87,88]。抗体的特异性结合很可能依赖于表面互补性引起的亲水性结合和极性结合以及范德华力[89],而疏水力以及水从蛋白接触表面被排除可能提供了大部分结合能,只是它们是非特异的[89]。

第三个可能在蛋白质表位的免疫原性中起作用的是运动性。对天然蛋白的运动性的测量很大程度上依赖于高解析度的晶体结构。因此,它的实用性局限于一小部分蛋白质。此外,目前只研究了其对片段抗原性位点的抗体特异性。因此,它可能并不适合应用在装配好的拓扑位点所诱导的大片段抗体。对运动性的研究有二个方面。我们已经讨论了抗肽抗体的情况,与天然蛋白质上较高运动性的片段相应的肽段所产生的抗体更有可能与天然蛋白结合[76,90]。这并不仅仅被认为是活动性较高的片段更有机会到表面上去从而更可能暴露出来的结果。因为在以肌红蛋白为模型的研究中,天然蛋白质的二个暴露程度相同但运动性较低的区域几乎不与相应抗肽抗体结合[91]。然而,正如早期讨论所明确那样,这个结果适用于针对短肽的抗体,因此并不能直接反映天然蛋白质部分的免疫原性。相反,它偏重抗肽抗体与天然蛋白之间的交叉反应,因此对在抗肽抗体一节中勾勒出的意图有着巨大实用价值。

另一个方向的研究,即研究天然蛋白引起的抗体可能会与天然蛋白各部分的免疫原性这一问题在定义上更相关。Westhof 等[92]用一系列多肽来检测天然烟草花叶病毒引起的抗体特异性,发现七种与天然蛋白抗体相结合的肽中有六种与天然蛋白中运动性峰值较高的部位相对应。这种相关性较好,不能仅仅归之于可及性,因为三种与暴露在外但活动性一般的区域相对应的肽未能结合天然蛋白引起的抗体。然而,当用较长的肽(20 个氨基酸残基)来检测时,发现同一份抗血清同样存在与活动性较差区域相对应的抗体[93]。只是它们未能被结构较不稳定的短六肽检测到。因此,免疫原性较好的区域并不是理所当然的存在于活动性较好的区域,而是那些针对它们的抗体更易被短肽探针检测到。另一个针对肌球蛋白的试验为这一事实提供了证据[92]。抗原性位点和天然蛋白的活动区域有着类似的良好相关性,用 6~8 个残基的短肽确定了 9 个位点中的 7 个[57]。但这个结论被用来说明肽和天然蛋白之间的交叉反应性,而不是天然蛋白的免疫原性。参见综述[94,34]。

664

为了说明运动性在免疫原性中的作用,有人尝试定量分析肌红蛋白上不同位点的抗体特异性的相对系数[95]。前提是尽管蛋白质的整个表面是免疫原性的,但部分区域可能由于比其他区域能产生更多的抗体而被认为是免疫决定区或者至少是免疫原性强烈的区域。由于试验所用的是蛋白序列上长度为 6~14 个残基的合成肽,故其局限于对片段性位点特异的部分抗体。其中,已清楚发现免疫原性最强的位点处于表面那些最易运动、形状凸出、常带负电的区域。已有文献综述了上述参数的作用[34]。

这些结果有着重要的理论和实际意义。首先,为了利用肽通过亲和层析来分离抗蛋白抗血清,应该尽可能选择天然蛋白中活动性高的区域相对应的肽。如果不知道其晶体结构,也可以用氨基端或羧基端的肽或者是内外分界部的肽,因为它们有着更高运动性的可能性较大[90]。其次,这些结果可用来解释为什么巨大而有限的 B 细胞库何以能针对自然界中任何抗原,甚至天然条件下从未接触过的人工抗原产生应答。蛋白质中灵活的片段可能会通过“诱导适应”结合到通常情况下其天然结构并不能完全互补的抗体结合位点上[34,43]。事实上,来自抗原抗体复合物晶体结构的证据表明[96~98],抗体结合位点的运动性和抗原上的一样,

可以使两种反应物相互适应，采取更加互补的结构相结合，这就是所谓的“双向诱导适应”。肌红蛋白抗体的研究是一个很好的例子[97]。其数据表明，最初抗原暴露在外的侧链与抗体结合引起局部位移，有利于抗原暴露和结合以前隐藏着的残基。这些隐藏于天然晶体结构中的重要氨基酸侧链可能参与了抗体结合位点，而不是用来稳定某种特定构象。只有当抗原通过“诱导适应”发生构象变化，这些残基暴露在外才可能发生[34,97]。在另一个关于“诱导适应”的非常清楚的例子中，抗体运动性对肽结合位点的作用得到了证实[98]。制备已经得到的结合位点含(或不含)肽的晶体结构的流感血凝素的长度在 75 ~ 100 长度肽段的单克隆抗体，利用 X 射线分析得到了“诱导适应”的证据[98]。尽管肽的活动性较好，抗体结合位点可能不能结合肽——如果不在重链 CD3 发生构型改变的话。在该区域，抗体的一个天冬酰胺残基发生旋转，使另一个酪氨酸残基得以进入抗体的结合域中[98]。

谈到宿主限制方面的因素，免疫原性显然要受到自身耐受的限制。因此哺乳动物蛋白抗原如肌球蛋白或细胞色素 c 由于与宿主的内源性肌球蛋白或细胞色素共享大多数氨基酸而可以简化其抗原性位点库。将老鼠、大羊驼或者马的细胞色素 c 注射给兔后，免疫原和兔细胞色素 c 之间的不同在免疫沉寂残基背景上可被视为免疫原性位点[42,67,99]。在另一个例子中，制备了多种物种抗牛肌球蛋白抗体[101]。兔和狗抗体能几乎完全一样地与牛或羊的肌红蛋白相结合。然而羊抗体能结合牛肌球蛋白，但不能结合羊肌球蛋白，虽然这两种肌球蛋白有六个氨基酸不同。因此羊的免疫系统能消除可能与羊肌球蛋白发生自身反应的克隆。

宿主 IR 基因可能在个体产生某种特异性抗原的抗体的调节中起重要作用[101]。这些抗原特异性调节基因位于 MHC 基因中，该基因编码移植抗原。结构突变基因转染实验以及生化研究均显示 IR 基因确实是 MHC 抗原的结构基因[101]。MHC 抗原的作用机制表现在其可以影响辅助性 T 细胞。简单地说，T 细胞只有在蛋白质结合上 MHC 抗原，形成一个复合分子后，才能与之产生应答。在其通过扩充抗原特异性的 B 细胞克隆以及分化这些细胞成抗体分泌性细胞以辅助 B 细胞之前，T 细胞必须活化。这样一个过程受到约束，即一个给定特异性的 T 细胞将辅助哪一个 B 细胞[102,103]，也即 T-B 细胞交互作用[104]。那么如果 IR 基因控制了辅助性 T 细胞的特异性，它们又将会限制哪一个 B 细胞被活化，也导致相应抗体的产生。

多肽抗原的免疫原性也受内部及外部因素的影响。如果我们不考虑产生的抗体与天然蛋白的交叉反应，内部因素例如亲水性，表面可及性并不是难题，更大的难题在于蛋白质结构外部与宿主相关的因素。每个小肽必须含有非己结构特性来克服自身耐受。此外，肽段必须含有能同时被辅助性 T 细胞和 B 细胞识别的位点。如果没有 T 细胞位点，以下一些方法可能有辅助作用：移植一个 T 细胞位点、将肽段连上一个蛋白质载体，或者利用多种免疫因子如 IL-2 来克服 T 细胞对现有结构的不应答。

疟疾疟虫芽孢的环孢子蛋白上的天冬氨酸-丙氨酸-脯氨酸(asparagine-alanine-asparagine-proline，NAAP)重复单位，是一个免疫原性很弱但生物学上很重要的多肽，对疟疾的研究表明，利用放射致死的芽孢来免疫机体可阻断芽孢的感染[105]，利用环孢子蛋白的单克隆抗体，可以在小鼠中复制疟疾感染效用。该抗体对 CS (circum sporozoite)蛋白重复单位有特异性[106]。因此人们很想利用疟疾疟虫$(NANP)_n$来制备疟疾疫苗，然而在所有实验的小鼠中只有一个 MHC 型($H\text{-}2^b$)能针对$(NANP)_n$产生应答[107,108]。一种克服其局限的方法是将$(NANP)_n$连上一个可被 T 细胞识别的位点，可以是像破伤风类毒素一类的载体蛋白[109]。在人的实验中，该复合物免疫原性很低，只有部分的保护作用，此外，利用这种方法产生的辅助性 T 细胞对无关的载体有特异性。第二次免疫或免疫记忆应答就不能只针对该致病原产生。

665

另外一种选择可能是鉴定 CS 蛋白本身表面的一个 T 细胞位点，然后将两个合成的肽段偶联，形成一个完整的免疫原，CS 蛋白表面鉴定的 Th2R 表位，将可能增加反应的鼠 MHC 的类型，从一种增加到既包含 $H\text{-}2^K$，又包含 $H\text{-}2^b$[110]，这种方法在提高机体的免疫状况，更好地与子孢子抗体反应等方面具有潜在优势。因为疫苗能诱导出 CS 特异的 T、B 细胞，自然的暴露于抗原有助于 整个暴露过程中维持免疫水平。

另外一种增加肽疫苗免疫原性的策略是人为的加入 IL-2，肌球蛋白的结果显示，适量的 IL-2 可以克服遗传性的不反应[111]。疟疾蛋白衍生的肽段实验中发现同样的效应[112]。还不清楚这种效应是否基于免疫 T 细胞还是由于对 B 细胞的直接效应而克服了 T 细胞的低反应性。在前一例中，对于那些有反应的个体，激活

的免疫能力甚至出现一过性的特异性T、B细胞克隆增多。

肽抗原最重要、最可能的用途之一就是用来合成疫苗,然而,尽管可能用合成的疫苗诱导出几乎针对流感血凝素的每一部分的抗流感抗体[75],却不能用合成疫苗诱导出针对流感病毒的中和抗体,这可能反映了抗体本身的结合并不能导致病毒的灭活。只有当抗体影响到病毒生命周期的某一步时,病毒才能被灭活,这包括与病毒表面的受体的结合、内化、脱衣壳等过程。显然,抗体能与病毒暴露的大部分表面结合而不影响其功能,只有当抗体结合到某些特定的中和位点时,在能使病毒灭活。特定的中和位点只发现存在于天然蛋白,热变性蛋白上并不存在[113]。因此,不仅结合的位点,而且抗体与之结合的空间构象对抗体灭活病毒都是很重要的,这些位点常常是拓扑位点,序列的肽段是不能模拟其特性的,可能是抗体结合到这样的位点上,它不仅改变了其组成中一些位点的相对位置,发生变构中和效应。同时,抗体与这些位点结合也可以阻止某些维持病毒活性的蛋白质的必需的构象变化。

一种定位中和位点的方法是基于对中和单克隆抗体的应用。将病毒培养于中和浓度的单克隆抗体环境中,挑选出那些具有克服抗体抑制活性的突变株,对他们进行测序,结果显示突变株由于改变了结合活性位点,避开了抗体的抑制作用。这种方法用来定位流感血凝素和脊髓灰质炎病毒衣壳蛋白VP1的中和位点[114,115],没有变异的流感病毒聚合在一起形成拓扑位点,而与基本血凝素序列有一定距离的突变株却由于天然蛋白的三维折叠而聚拢,起初认为中和效应是病毒细胞表面受体的血凝素结合位点的空间位阻效应的结果[116]。但是,用脊髓灰质炎做的相同工作显示,结合在组装好的拓扑位点上的能灭活病毒的中和抗体的数目比化学计量的受体的数目少,大约有一半的位点没有与抗体结合[117]。中和抗体都会导致病毒构想的改变,这些病毒的等电点在pH7~pH4之间变化[115,118]。无中和效应的抗体与病毒的结合没有这种转变发生,因此,对抗体介导的中和效应的一种解释就是病毒自身破坏的启动。至于中和抗体的簇集存在于结合位点周围的理由,可能是这些点被模拟一般结合于细胞受体而产生的抗体所占据,使得病毒不成熟地启动其细胞的进入机制。但是,为了传递生理信号,抗体需要与结合原始构象的病毒衣壳蛋白相结合(特别是与积聚的拓扑位点相结合)。这是抗肽抗体无法办到的。抗体的这种特异性与细胞表面的病毒受体具有相似性。已克隆和表达了一些病毒受体,只是没有可溶性蛋白作为跨膜区。脊髓灰质炎[119]和HIV[120~122]的这些可溶性重组受体在体外显示了与病毒较高的亲和力和有效的中和活性。在杂交蛋白CD4-Ig中,HIV-1的受体CD4与人免疫球蛋白的重链结合,CD4-Ig能自发的形成二聚体并形成单克隆抗体[123],这种抗体的结合位点与HIV-1的受体结合位点是相同的,在这些重组体中,高亲和力的结合以依赖于病毒被膜蛋白gp120的天然构象。

对HIV-1而言,已经鉴定的两种类型的中和抗体,第一种类型结合于连续的或是片段性的决定簇。Gp120氨基酸序列的296~331之间的V3环区[124~126]。针对这些位点的抗肽抗体能耐中和病毒[124],但是,由于这些位点位于被膜的高变区,因此,只能中和有限范围的变异的病毒株。第二种中和抗体结合在gp120的CD4受体结合位点上或在其附近[127~129],这些中和抗体经常在被感染的病人的血清中发现,针对较大范围的HIV-1具有特异性,这可能是因为CD4结合位点周围的保守序列[130]。由于通用的中和抗体决定簇是依赖该蛋白天然构象的聚集的拓扑位点[131],未来gp120疫苗将需要这一天然构象,从而使其诱导产生该抗体。

T细胞识别的抗原决定簇

抗原结构定位

T细胞对抗原特异性的研究是受对蛋白抗原的免疫反应在T细胞水平受到调节这一事实所激励的。本身并非抗原的半抗原只有与能在体内诱导T细胞反应的蛋白偶联以后才能产生抗体。蛋白组分这种结合并能使半抗原具有免疫原性的能力即为载体效应。包括B细胞在内的特异的辅助性T细胞对载体识别而产生抗体。因此,参与较好的T细胞反应的因子似乎也能控制B细胞的反应。

无反应的动物显示了抗原特异性的对蛋白质抗原的T细胞无反应性和抗体应答的无反应性。对每一种抗原的高反应性是可以遗传的,通常是显性遗传。通过近交系小鼠发现,控制免疫反应的基因与MHC基因

紧密地连接在一起[101,132]，有结果显示，MHC 连接的免疫反应性依赖于 T 细胞识别与 APC 上的 MHC 分子相结合的抗原，对与 B 细胞的 MHC 分子相结合的抗原的识别对载体特异的 T 细胞增生是必需的。它为 B 细胞提供辅助信号，使得 B 细胞克隆增生，形成抗体产生细胞。

与抗体识别的抗原的范围相比较，虽然像酪氨酸偶氮苯砷盐这样一些小分子物质存在[133]，但辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞识别的物质范围大大局限于蛋白和多肽抗原，这种局限的机制不是很清楚，但似乎与需要结合的 MHC 分子的一个凹槽有关。

如果被 T 细胞识别的蛋白抗原决定簇能被鉴定的话，就可能更好得理解免疫原性，理解免疫反应基因，甚至可以通过改变部分抗原的 T 细胞反应来增强针对另一生物学上相关抗原的抗体反应性。

多克隆 T 细胞应答

对体外 T 细胞增生的重视使得对 T 细胞特异性的理解取得巨大进展，培养的抗原特异性细胞的克隆增生模拟了发生在体内的抗原特异性克隆的阳性选择。这一增生反应只需要两种细胞，抗原特异性 T 细胞和 APC，APC 通常为巨噬细胞、树突细胞或者是 B 细胞。根据新生成的 DNA 中掺入的 ^{3}H-胸腺嘧啶脱氧核苷酸的量对培养的 T 细胞进行测量，在合适的条件下，随着抗原浓度的增加，掺入的 ^{3}H-脱氧嘧啶核苷酸会随之增加，这种分析方法允许不同的 APC 进行替换，在定义 MHC 和 APC 的抗原处理需求方面是非常有用的。

最初运用这种方法的时候，采取了几种不同的方法来对 T 细胞表位进行定位。首先，通过比较刺激和非刺激天然蛋白发生的变异体的序列的方法，来确定某些替换后能影响 T 细胞交互活性的蛋白序列位置。例如，可以用不同序列的同源蛋白的替代品。这种方法常能对蛋白的抗体表位进行正确的定位[134~136]，但是，我们脑海中应有较广泛的抗原呈递的概念。同时，这种方法能聚焦那些正确的分子区域，而不界定某位点界限，或是确定所有所有关键残基因为其局限于检测那些正常情况下发生氨基酸序列突变的区域。因此，某位点导致的突变，可以增加这种分析方法的通用性。第二种方法利用蛋白质序列的短肽片段，利用的是 T 细胞对可溶性抗原的特异性是片状的抗原位点，而非组装的拓扑位点[101,137~141]。可以通过对天然蛋白化学或酶促的裂解反应得到这些片段[139~147]，或是通过固相肽合成技术[146,148~151]，或者是通过表达的克隆的基因或是基因片段进行 DNA 重组而得到[152]。在 MHC Ⅰ类分子限制的细胞毒性 T 细胞研究中，就应用了缺失突变后仅部分表达基因产物的病毒基因[153~155]。

例如，在两种高反应 MHC 类型（H-2^s 和 H-2^d）小鼠中分析 T 细胞对鲸精球蛋白的应答，当 H-2^s 小鼠用鲸精球蛋白进行免疫时，培养的 T 细胞发生应答，其活性大约为测试的其他 12 种哺乳动物球蛋白的一半[135]，但它对另外的各系球蛋白或是马球蛋白并不发生应答（表 19.5）。相反，当用马球蛋白免疫小鼠的时候，T 细胞对马球蛋白有应答，球蛋白应答的模式与用鲸精球蛋白免疫动物时的 T 细胞应答作用是相互的。每一种刺激 T 细胞的球蛋白并不刺激鲸精蛋白特异的 T 细胞，反之亦然。而球蛋白的交互刺激作用很强，和用球蛋白免疫小鼠相当。这提示在那些对 T 细胞活化极为重要的表位中，较少有公用的残基，大多数的替代物并不对重要表位带来什么影响，比较那些在刺激球蛋白中较为保守的氨基酸残基和那些非刺激球蛋白中被替换的氨基酸残基，结果可以解释上述模式。所有的交叉激活鲸精球蛋白免疫相关 T 细胞的球蛋白，其第 109 位都含有 Glu，而所有激活马相关 T 细胞的球蛋白在第 109 位均含有 Asp，没有哪一组中的所有物质能刺激供体的由另外一组球蛋白免疫的 T 细胞，这提示 T 细胞识别的决定表位主要集中在第 109 位上，而与氨基酸是否被替换无关。通过利用刺激 T 细胞的肽段 102～118 完成了这种定位[150,156]。其他组诱导产生的 T 细胞能识别这一位点的 Glu 或是 Asp。用细胞色素 c 进行实验，也能得到相似的结论。T 细胞识别细胞色素 c 的结合位点位于各变异株 c 端大约 100 个残基处[134]，而且，细胞色素 c 肽段 81～104 的反应性与对整个分子的反应能力一样强，提示 24 个氨基酸的肽段具有 T 细胞识别的全部位点。随后用合成的肽段进行的研究表明，T 细胞能够区别 99 位是 Lys 还是 Gln 的肽段，尽管两者与相同的 MHC 分子结合具有免疫原性[157~159]，这个残基决定了 T 细胞的记忆效应和特异性，因此，可以推测是该残基介导了其与 T 细胞受体（TCR）的作用。

表 19.5　B10.S T 细胞应答血球蛋白的增殖反应

刺激用肌红蛋白	残基数目																				T 细胞应答	
	1	4	9	12	15	21	27	28	34	35	45	66	67	74	109	118	122	132	140	151	马	抹香鲸
1.马	G	D	Q	N	G	I	E	V	T	G	K	T	V	G	D	K	N	T	N	F	11 580	72
2.小牛			A			V						N	T		—			S			11 305	ND
3. 大须鲸	V		L		A	V	D	I	K			N	T		—	R	D	N	K		20 922	1205
4.小须鲸	V		L		A	V	D	I	K			N	T		—	R	E	N	K		13 604	3694
5.鹅喙鲸		E	L	H	A	L		I	K			H	T		—	R	D		K		10 373	1500[a]
6.狗			I			L			K	N		N	T		—		D	K			6863	610[a]
7.加利福尼亚海狮			L			L			K			K	T		E		D	K			683	6869
8.斑海豹			L			L			K	S		N	T		E		E	K			3132	9592
9.虎鲸			L			L	D	I	K			N	T	A	E	R	E	N	K		2568	16 745
10.海豚		E	L			L	D		K			N	T	A	E	R	E	N	K		1759	7653
11.抹香鲸	V	E	L	H	A	V	D	I	K	S	R	V	T	A	E	R	D	N	K	Y	3500	18 593
对照																					1164	611

[a] 重复实验的标准化结果。

667

自肌红蛋白的 109 位残基可得到一个相似的结论。但是这种类型的分析需要谨慎使用。当在 109 位进行多种替换以检测 T 细胞识别及 MHC 结合时,发现 109 位残基对二者均有作用[160]。相应于完全的鸡蛋白溶菌酶(HEL)最终应用合成肽分析 T 细胞识别肽段的阶段性位点是合成一系列完整的肽,每个肽与前一个相差一个氨基酸,[161]。围绕每个免疫优势位点,可发现几个刺激性肽成簇存在。最小的核心顺序仅由存在于一簇中的所有抗原性肽共有残基组成,而同一簇中横跨所有刺激性肽段的全序列定义了决定簇的外包装。这两种决定抗原性位点的方法不同,其中解释之一是每个核心序列相应于一个 MHC 结合位点,而决定簇外包装包括 T 细胞识别结合于 MHC 分子的同一肽段的多种途径。

在各种情况下,多克隆 T 细胞应答将可以被定位于单个的优势性抗原表位。这种结果与每个蛋白抗原有一个有限数量的免疫优势位点(可能一个)被 T 细胞以与高应答型 MHC 分子相联系的形式识别是一致的。如果没有抗原性位点与 APC 上的 MHC 分子相关联,那么该株将是对这种抗原低应答者。该抗原将不能刺激 T 细胞,结果是没有或仅有微弱的免疫原性。

单克隆 T 细胞

对 T 细胞位点的定位进一步研究有赖于对克隆 T 细胞系的分析。用 Kimoto 和 Fathman[162] 的方法可以得到抗原特异性的 T 细胞系,而用 Kappler 及其助手[163] 的方法可以得到 T 细胞杂交瘤。前一种方法,T 细胞在抗原和 APC 的作用下增殖,待静息后再刺激。刺激后,通过有限稀释法从 T 细胞繁殖体中得到单克隆,并在 IL-2 的存在时生长。这种抗原特异性的 T 细胞系用抗原和 APC 通过标准的增殖检测实验得到证实。在第二种方法中,抗原特异性 T 细胞的扩增是通过将 T 细胞与对药敏感的 T 细胞肿瘤融合,融合细胞通过它们在药物存在的条件下的生长能力进行筛选。这样每个抗原特异性的融合细胞就可以确定出来。在一个肿瘤细胞系中,确定一个抗原特异性 T 细胞系的关键,是 T 细胞杂交瘤在特异性抗原刺激下能导致 IL-2 释放甚至连续增殖。由这两种方法产生的 T 细胞,通过检测它们与 MHC 分子的结合以及研究抗原处理的抗原需要量可以用来定义表位。

单克隆 T 细胞对确定众多蛋白质中来自病原体的蛋白质非常有用,这些蛋白质对 T 细胞应答非常重要。例如 Young 和 Lamb[164] 发展了一种筛选蛋白质的方法,这些蛋白质首先通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳得到分离,然后转到 NC 膜上以刺激 T 细胞, 结核分枝杆菌抗原就是通过这种方法确定的[165]。Mustafa 等[166] 甚至

用T细胞克隆对重组DNA表达文库进行筛选并确定出M麻风相关抗原。用T细胞来定位表位对确定肿瘤抗原非常重要[167~172]。

这些发现可以用于概括大量被T细胞识别的、来源于多种蛋白抗原的表位的特征(表19.6)[173~188]。在每一种情况下,整个表位都包含一个短肽。MHCⅠ类分子限制的抗原也遵循这个原则[189],即使蛋白抗原在感染细胞表面正常表达时。这个原则也适用于病毒的糖蛋白,如流感的血凝素,血凝素抗原经过抗原处理后,通常被细胞毒性T细胞识别[190](见下文"抗原处理")。

表19.6 与MHCⅡ类分子相关联而被识别的免疫优势性T细胞表位[188]

蛋白质	T细胞抗原表位(参考文献)	两性片段
抹香鲸肌红蛋白	69~78[139]	64~78
	102~118[150]	99~117
	132~145[146]	128~145
鸽子细胞色素c	93~104[149)]	92~103
牛细胞色素c	11~25[183]	9~29
	66~80[184]	58~78
流感	109~119P[177]97~120	
血凝素	130~140[178]	—
A/PR/8/34	302~313[178,179]	291~314
猪胰岛素	B5~16[148]	4~16
	A4~14[180]	1~21
鸡溶菌酶	46~61[176]	—
	74~86[175]	72~86
	81~96[175]	86~102
	109~119[136]	—
鸡卵白蛋白	323~339[144]	329~346
口蹄疫病毒VP1	141~160[182]	148~165
乙型肝炎病毒		
Pre-S	120~132[181]	121~135
主要表面抗原	38~52[185]	36~49
	95~109[185]	—
	140~154[185]	—
λ抑制蛋白CI	12~26[186]	8~25
狂犬病病毒糖蛋白前体	32~44[187]	29~46

集中在免疫优势表位的T细胞应答的顺序步骤

我们发现,与同整个天然蛋白表面分子结合的抗体相比[42](见"蛋白质和多肽抗原决定簇"部分),通过免疫天然蛋白诱导产生的T细胞,通常由一个或一些免疫优势位点产生[191,192]。不管是使用哺乳动物模型还是鸟类蛋白如细胞色素c[140]、肌红蛋白[139,141]、溶菌酶[143,176,193,194]、胰岛素[148,180]及卵白蛋白[144]或是细菌、病毒以及来自病原体的寄生蛋白如血凝素[178]、核蛋白[189]、葡萄球菌核酸酶[195]或疟虫的环孢子蛋白[110,196]等,这种情况始终存在。由于后面的一系列蛋白质与哺乳动物没有很明显的同源性,因此,一些免疫优势位点并不能简单的以对其他蛋白的耐受为标志,主要是由于存在同源宿主蛋白的自身耐受。而且,免疫优势表位并不仅仅是对单个优势T细胞克隆具有优先权,因为据研究发现,免疫优势表位主要对各种不同的T细胞克隆产生的多克隆应答发挥作用,这些T细胞克隆能识别抗原位点中的重复亚位点,或是对位点中某些氨基酸取代后有不同的敏感性[143,144,149,150,161,175,176,197]。

668

免疫优势抗原位点在本质上似乎与其他位点不同。例如,在肌红蛋白中,通过天然蛋白免疫动物得到的许多针对不同表位的细胞克隆可以通过有限稀释法来定量,据研究发现,对蛋白和高应答个体的MHCⅡ类分子复合物应答的表位,主要集中在一个单一的位点包含102~118位残基[156](图19.6)。也存在特异性针对其他表位的T细胞,但是这些T细胞的数量从未达到特异性针对免疫优势表位的T细胞的数量水平。而

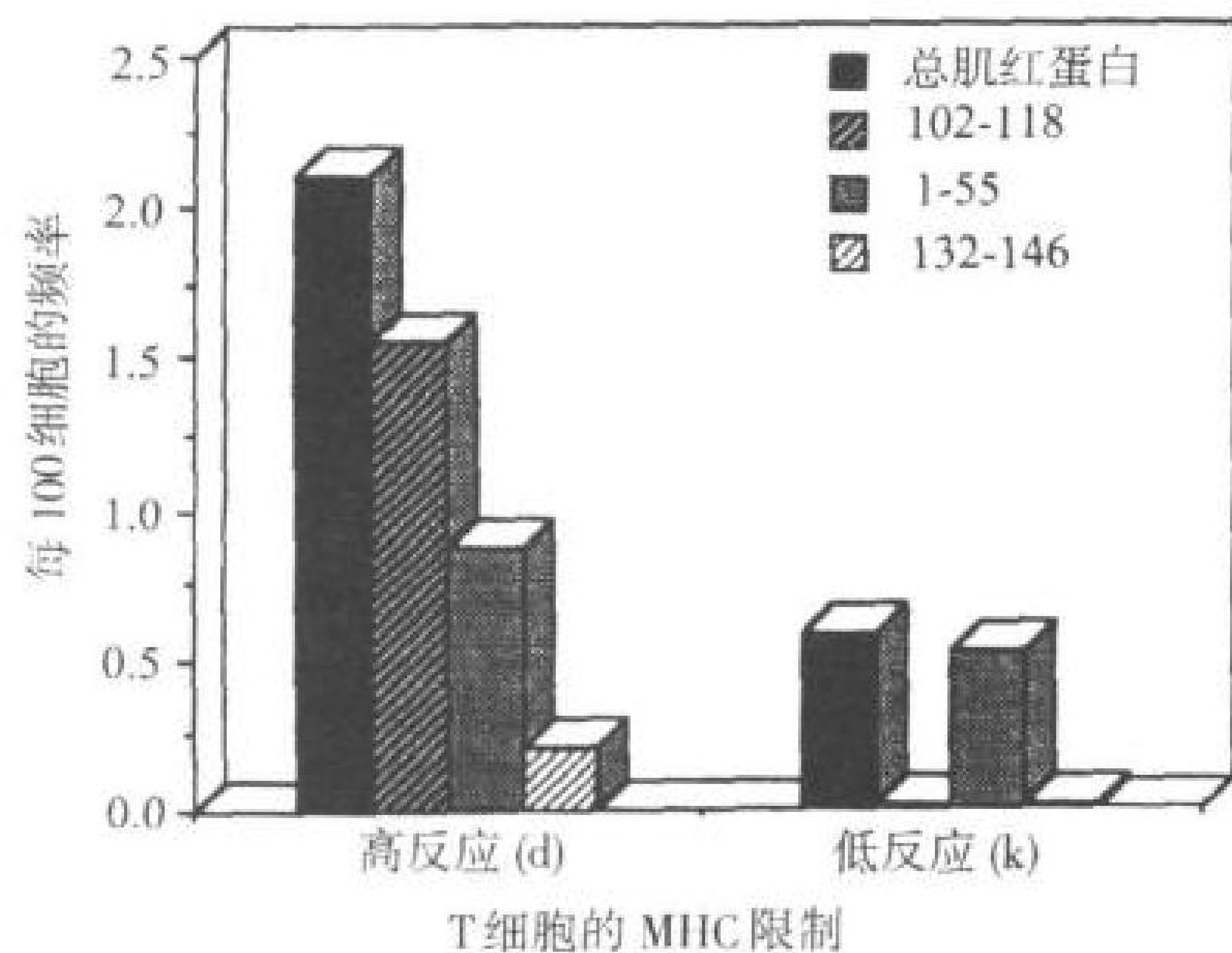


图 19.6 F_1 杂合体中,高/低反应性 MHC-限制 T 细胞的频率。高反应性可能是通过应答一个单独的免疫优势表位得到的。来自用整个肌红蛋白免疫的[低反应性(H-2^k)×高反应性(H-2^d)]小鼠的淋巴结 T 细胞,以不同的有限稀释浓度铺于微孔细胞培养板中,同时加入高反应/低反应递呈细胞和肌红蛋白作为抗原。每孔的细胞用于检测对整个肌红蛋白和对肌红蛋白不同表位肽的反应性。每种特异性和 MHC 限制性的 T 细胞频率用 Poisson 统计法进行计算,并在坐标上标出。高/低反应限制类型(实心条)间 T 细胞特异性的大多差别可能是因为存在对 102~118 位残基间的免疫优势性位点反应的 T 细胞,说明与低反应 MHC 限制的 T 细胞类型的缺失相反,存在 2/3 以上的高反应肌红蛋白特异性 T 细胞。

且,将对蛋白和低应答个体的 MHC Ⅱ 分子复合物具有特异性的 T 细胞(通过对 F_1 杂交小鼠采取相同的免疫方法得到)同上述 T 细胞比较,会发现对非免疫优势位点的应答与对受高应答个体 MHC Ⅱ 类分子限制的位点的应答在数量上是相同的。主要的不同在于缺乏对免疫优势位点和低应答个体 MHC 分子复合物的特异性应答(图 19.6)。在两种不同的高应答个体和两种不同的低应答个体的 MHC 单体型中存在类似的现象[156]。因此,即使所有的 MHC 单体型都对一些抗原位点产生应答,Ir 基因控制的应答性的高或低,可以用存在或缺乏对免疫优势位点的应答来解释。为什么对其他位点的应答在低应答个体中不能对免疫优势位点应答的缺乏作出补偿? 看来,免疫优势表位确实有一些特别之处。免疫优势位点特异性 T 细胞出现较高的频率,一部分应归因于各种不同的 T 细胞克隆通过不同的方法识别该位点,如前所述,但是这又将问题推回到以前的水平。为什么免疫优势位点是这么多不同 T 细胞克隆的焦点呢? 这个问题的答案并不依赖于任何特殊的 T 细胞,而必须依赖于其他的因素,主要涉及 APC 对抗原处理以及呈递。

我们也发现一些多肽本身也具有免疫原性,但是它们诱导的 T 细胞应答仅对多肽有特异性,而且并不与天然蛋白发生交叉反应[198~200]。相反,当天然蛋白作为免疫原时,并非所有多肽具有的免疫原性都来自免疫原性位点[198~200],这些多肽称为隐匿决定簇[200]。存在这种差异的原因主要是由于天然蛋白被处理后产生的片段与实验中合成的多肽不同,但是这些片段包括合成的多肽或者与合成多肽存在重叠的地方,而且蛋白中与相同的 MHC 分子结合的位点也存在着竞争,如下一节要深入讨论的问题。为了理解这些优势表位和隐匿表位,我们必须明白抗原在刺激 T 细胞应答前需要经历的步骤。

不像 B 细胞,T 细胞识别抗原依赖其他细胞的作用,即 APC 细胞[201]。抗原在有效的呈递给 T 细胞前,必须经过许多胞内的小室以及处理和转运步骤。抗原在细胞内(如一个病毒感染的细胞)合成后,或抗原通过吞噬作用、胞饮作用或其他如受体介导的内吞作用被摄取后,接下来的步骤包括:①部分降解(或被处理)为不连续的、能被 T 细胞识别的抗原性片段;②这些片段被转运到一个细胞内的小室中,在此处抗原性片段会与 MHC 分子结合;③ MHC 与抗原性片段结合并组装形成一个稳定的多肽-MHC 分子复合物;④T 细胞识别多肽-MHC 分子复合物。在每一步中,任何潜在的表位都可能有在处理过程中丢失的危险,例如抗原被过度的降解或不能满足下一步转运的结合要求。因此,仅有一些克服了四种选择障碍的多肽能够被证实对 T 细胞有抗原性。我们仍然必须对每一步进行详尽的了解,因为这每一步在 T 细胞对蛋白抗原应答的强度和特异性都作出了贡献。

抗原的处理

MHC Ⅱ 类分子限制的 T 细胞抗原的处理过程

我们很早就知道像在体迟发型超敏反应、外源蛋白作用下的 T 细胞增殖反应等 T 细胞应答,这些应答不仅能在天然蛋白的刺激下产生,还能在变性蛋白[137]及天然蛋白片段[180]的刺激下产生。事实上,该特征以

及在抗原识别中与 MHCⅡ分子结合的要求能区别 T、B 细胞应答。在许多情况下,T 细胞克隆识别的位点位于一条不连续的合成多肽中,这个多肽与蛋白一个片段的一级结构序列相符合。有关这方面的例子包括胰岛素[148,180]、细胞色素 c[149]、溶菌酶[143,175]及肌红蛋白[139,146,180]。在每种情况下,作为刺激物的多肽必须包含所有的有关抗原呈递和刺激 T 细胞的信息。当天然蛋白的构象缺乏时,虽然一些抗原性多肽可能具有足够的长度来形成重要的二级结构(α 螺旋或 β 折叠)[202~205]。构象特异性的缺失并不表明 TCR 特异性的缺乏。相反,抗原在与 TCR 结合前,由于抗原被处理成多肽片段从而破坏了构象造成差异。完成这个过程的一种途径就是通过抗原的处理,抗原处理包括蛋白抗原部分降解为多肽片段(图 19.7)。抗原性多肽的一级结构作为 T 细胞对天然蛋白和变性蛋白识别的通用分子信号。

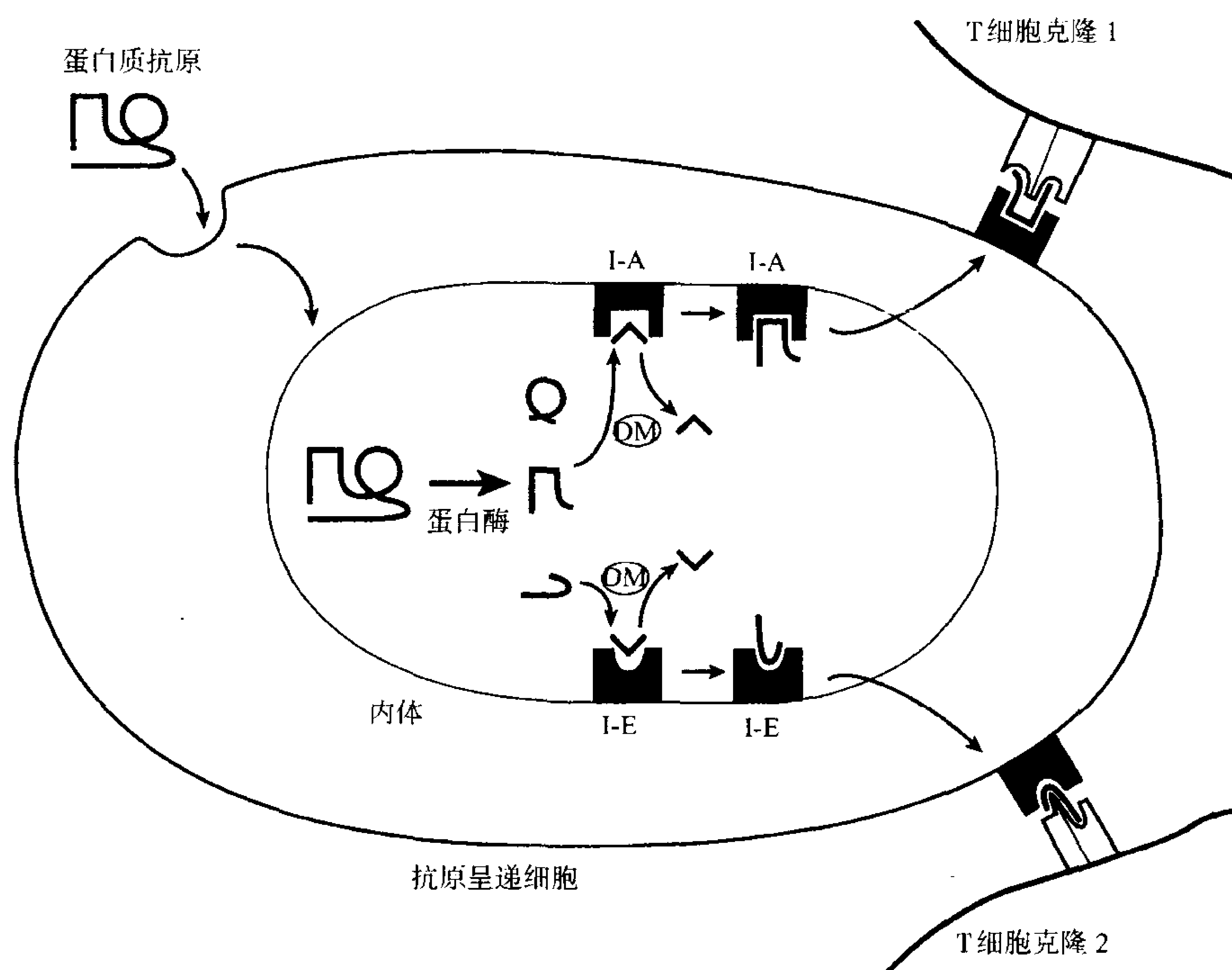


图 19.7　MHCⅡ类分子呈递抗原的步骤。可溶性抗原通过胞吞、胞饮作用,或受体介导的内吞作用进入 APC,并在内体内被酸依赖性蛋白酶部分降解为肽片段。抗原肽与 MHCⅡ类分子(小鼠为 I-A 或 I-E)关联,形成转运至细胞表面的抗原复合物。一个 MHCⅡ分子在结合肽抗原之前,必须自其结合槽内释放出固定链的 CLIP 肽片段,这由 HLA-DM 催化。T 细胞受体结合到 MHC-肽复合物可触发 T 细胞增殖,导致抗原特异性 T 细胞的克隆扩增。

抗原处理的信息来自于下列事实:单个蛋白抗原能够刺激 T 细胞对不同表位产生应答,每一个 T 细胞对不同的 MHC 抗原都有特异性。例如对一系列肌红蛋白特异性 T 细胞克隆同时进行抗原特异性和 MHC 限制性的测试时,有 6 个 T 细胞克隆对一个以 109 位谷氨酸为中心的位点具有特异性,而且这 6 个 T 细胞克隆识别的抗原都与 $I\text{-}A^d$ 结合。其他的另外 9 个 T 细胞克隆仅对一个以 140 位赖氨酸为中心的表位具有特异性,而且表位受一个不同的 MHC 抗原($I\text{-}E^d$)限制。因此,抗原可能被分成不同的表位,每一个表位都有它们各自与 MHC 结合的能力[173]。

T 细胞识别处理抗原被该事实所证实:抗原处理抑制剂可以阻断抗原的呈递。Ziegler 和 Unanue[206]的研究表明,处理过程依赖细胞内具有降解作用的内体,因为一些能提高内体中 pH 值的药物如氯喹和 NH_4Cl,能阻断抗原的处理过程。然而蛋白在处理前降解为多肽片段也能触发 T 细胞应答(即使在处理过程中存在这些抑制物[207])。例如 T 细胞克隆 14.5 识别的肌红蛋白 140 位赖氨酸位点位于抗原性多肽内(132~153 位残基),如同存在于天然蛋白表面一样(图 19.8)。这两种形式的抗原的差异在抑制剂存在时就能分辨出来。

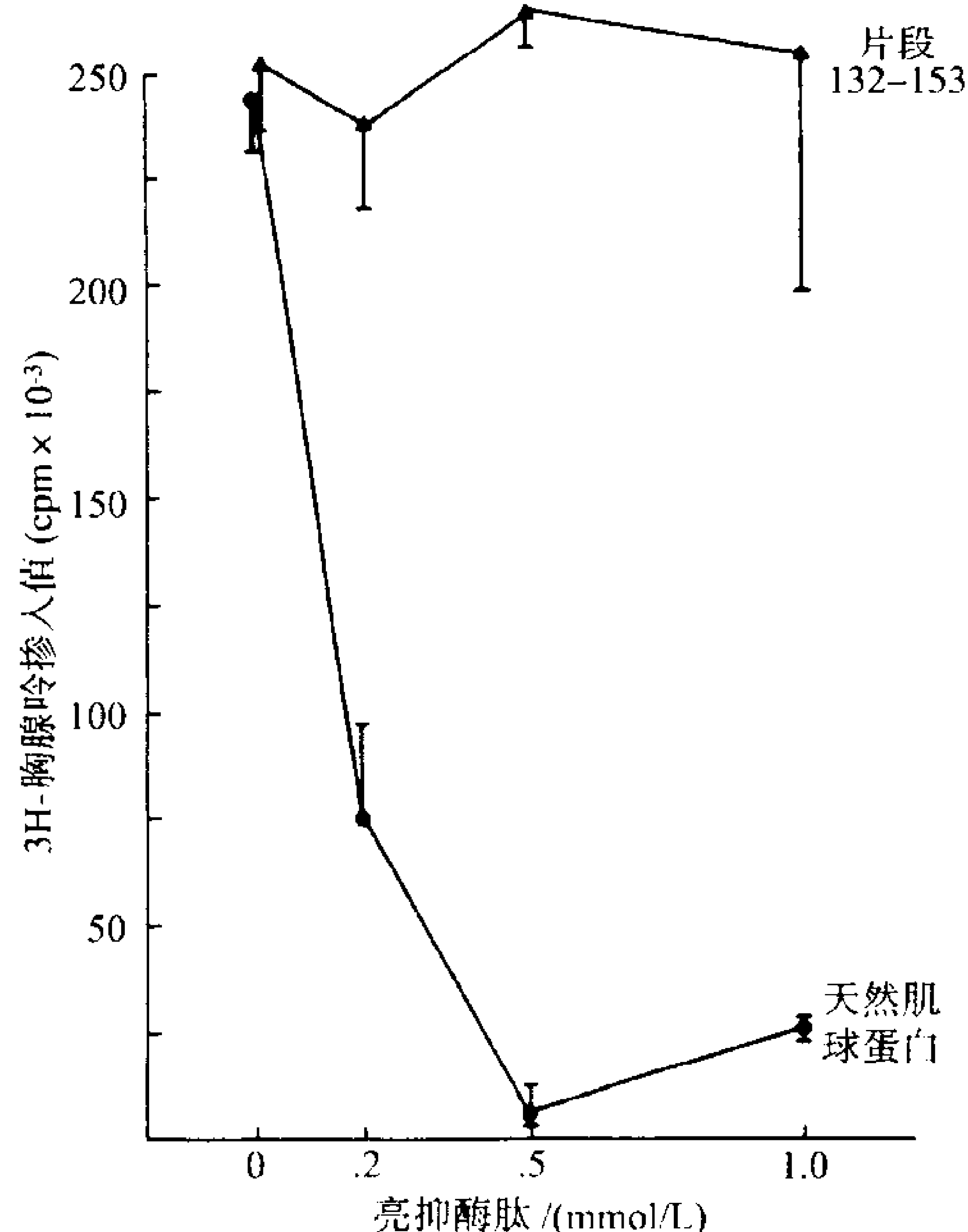


图 19.8 抗原呈递被蛋白酶抑制剂亮抑酶肽抑制：天然肌红蛋白的同一表位对呈递的不同效果，或肽 132 ~ 153 对同一单克隆 T 细胞群的不同影响结果。脾脏细胞来自未免疫的 B10.D2 小鼠，作为一种 APC 的来源，在与 2μ 天然肌红蛋白或 1μ 肽片段接触前和接触中，与亮抑酶肽共孵育 15 分钟，洗，照射，以 400 000 个细胞/孔与克隆 14.5 T 细胞（10 000 个）共培养；4 天后检测胸苷掺入值[208]。

670

例如亮抑酶肽(leupeptin)能抑制溶酶体的水解作用，进而阻断 T 细胞对原始肌红蛋白的应答，但是不能阻断 T 细胞对多肽(132 ~ 153 位残基)的应答。因此，原始肌红蛋白不进行进一步的处理就不能刺激 T 细胞，然而多肽却只需要进行很少(或不需要)额外的处理就能刺激 T 细胞[208]。

为什么抗原的处理是必需的呢？对 MHC Ⅱ 类分子而言，实验表明对抗原的处理能暴露出埋藏在原始蛋白结构中的功能性位点。例如有一种完整肌红蛋白，这种蛋白质通过化学改变后只发生了部分折叠，这种蛋白质就如同肌红蛋白的一条多肽，即使在水解抑制剂或完全阻断原始肌红蛋白呈递的药物氯喹的存在时都能被 APC 呈递[208]。变性的溶菌酶不经过处理也可以呈递给一个 T 细胞克隆[145]。这个结论表明，抗原处理的要求仅是一个不太重要的要求，也就是说处理的过程仅是暴露两个位点以便在抗原和 MHC 分子之间、以及抗原和 TCR 之间形成一个三分子复合物。因此，蛋白解折叠就足够了，不必进行水解，而水解也仅仅是完成一个解折叠的类似物，如同亚历山大解决难题的方法一样。

抗原解折叠对 T 细胞识别的重要性以及解折叠能绕过抗原处理，不仅可以应用到小分子蛋白如肌红蛋白和溶菌酶，还可以应用到从短肽到大分子蛋白等各种大小范围的蛋白。在一个极端，Lee[209] 等发现，即使是分子质量为 340 kDa 的血纤维蛋白原，如果识别的表位位于一条链的羧基末端时，就不需要进行处理，因为羧基末端在天然蛋白中通常是不折叠的。在另一个极端，即使是一个仅有 18 个氨基酸残基的短肽——蜂毒明肽(apamin)也需要进行处理，除非维持天然构象的二硫键人为地打断而解折叠[210]。因此，大分子的蛋白质并不总是需要处理，而小分子的蛋白质也不是总能回避处理的需要，至少需要 MHC Ⅱ 分子的呈递。蛋白质大小范围的普遍特点似乎对解折叠是必需的。这个证据连同解折叠的肌红蛋白和溶菌酶的一些数据可以支持这么一个结论：解折叠，而非分子大小的减少，是抗原处理的基本目标，而且不管是 MHC 分子呈递的抗原或是 TCR 识别的抗原，通常需要一些氨基酸残基的暴露，而不是那些通常暴露在天然蛋白分子表面的残基。最近对 MHC Ⅱ 类分子洗脱下来的多肽进行的研究也可以支持这个结论，而且在 MHC Ⅱ 类分子-肽复合物的晶体结构的研究中发现，较长的多肽可以将其两末端伸到 MHC 分子的凹槽外从而与 MHC 分子结合[211 ~ 213]。(见下文“抗原与 MHC 分子的相互作用”。)

MHC Ⅰ 类分子限制性 T 细胞所识别抗原的加工、处理

671

与 MHC Ⅱ 类分子限制性 T 细胞相反，曾经普遍认为 MHC Ⅰ 类分子限制性 T 细胞，如病毒感染特异性细胞毒性 T 细胞(CTL)，主要针对表达于病毒感染细胞表面的、未经处理的病毒糖蛋白起反应。例如流感病毒感染时，在细胞表面可检测出血凝素，也能检测到血凝素特异性 CTL。然而，几乎在同时，出现了一些相反的事实，证明对于 MHC Ⅰ 类限制性 T 细胞所识别的抗原存在加工、处理过程。例如，尽管流感核蛋白(nucleoprotein, NP)仅可在核中而不能在细胞表面检测到，但其仍然是流感病毒特异性 CTL 的主要靶抗原[214]。故人们推测，MHC Ⅰ 类分子所呈递的抗原可能存在某种加工处理形式。

Townsend[153] 等利用 NP 基因转染 L 细胞，发现 NP 蛋白经不同方式的处理后，甚至缺乏可将其导向到细

胞表面的引导序列时，仍具有被 CTL 识别的靶分子功能。此外，他们使用一系列 NP 基因平端连接构建物，发现 CTL 可溶破表达 NP 片段 1～386 位氨基酸残基的细胞，但不能溶破表达 NP 片段 1～327 氨基酸位残基的细胞，故推测抗原性位点可能位于 327～386 位残基[153]之间。另外，摄取了人工合成 NP 多肽 366～379 位氨基酸的靶细胞可被 NP-特异性 CTL 溶破的现象也可证实这一点[189]。以上结果证实了被 MHC I 类分子呈递的相关抗原需要经过某种处理，成为一些具有抗原性的小片段；而且，人工合成的多肽可致敏 CTL 识别的靶细胞，为预测及研究 CTL 表位提供了有力手段。

另外有人用血凝素做试验，其目的在于证实完整糖蛋白在细胞表面的表达是否真正为 MHC I 类分子限制性 CTL 识别所必需。他们将删除了引导序列的血凝素基因插入牛痘病毒中，使得该蛋白只能在转染细胞的胞质中表达，而不能被转运至细胞表面。结果是，表达引导序列缺失血凝素的细胞与表达完整血凝素的细胞具有相同的血凝素特异性 CTL 溶破率[190]。在运用锚点缺失性突变子的相似实验中得到了相同的结论[215]。因此，天然蛋白的表面表达并不是产生抗原性所必需的，提示激活 T 细胞应答的抗原是经过某种加工处理的。事实上，近来有关有(或无)引导序列的 HIVgp160 基因的研究提示：去除引导序列后可增加存留于胞质中的蛋白量，使得这些蛋白可经过 MHC Ⅰ类抗原呈递途径得以呈递[216]。其原因可能是信号肽可使新产生的肽链进入内质网(ER)，而无信号肽时，蛋白分子可在胞质中组装并滞留，在此处，它们可进入 MHC Ⅰ类抗原呈递途径。

MHC I 类抗原呈递途径与内体途径(MHC Ⅱ类抗原呈递途径)完全不同。与内体途径不同的是，非内体途径对氯奎、氯化氨以及亮抑酶肽不敏感。在某些情况下，同一抗原的不同形式有惟一的一种加工方式。例如，紫外光(UV)灭活的流感病毒通过内体途径呈递，而活病毒却不经该途径处理[217]。接触过 UV 灭活病毒的细胞可被 MHC Ⅱ类分子限制性 T 细胞识别，而接触过活病毒的细胞可被 MHC I 类分子限制性 T 细胞识别。人们设想：内源性病毒蛋白经过非内体途径加工处理，产生的肽与 MHC I 类分子形成复合物呈递于细胞表面；外源性蛋白却不能经过该途径呈递[217]。故呈递途径可有效地决定 MHC 限制性。

在这种简单的抗原呈递模式中，每一步都是密切相关的，不存在交叉呈递现象。但事实上，细胞表面呈递的抗原肽可来源于内源性或外源性蛋白，而且细胞内同时存在两种呈递途径，另外，MHC Ⅰ、Ⅱ类分子均可与肽结合，这两种呈递途径在理论上可能存在八种方式的结合。然而，这种单一模式只承认存在两种结合方式：外源性抗原在内体中降解成肽，后者直接与 MHC Ⅱ类分子结合，或者内源性抗原在非内体中降解，生成的肽再与 MHC Ⅰ类分子结合。随着时间的推移，人们逐渐发现还存在另外至少四种结合方式，作为这两种主要方式的补充。 *672*

第一，外源性抗原，如 UV 灭活的流感病毒来源的抗原在病毒神经氨酸苷酶被抑制时可进入非内体途径，被 MHC Ⅰ类分子呈递[218]，其原因可能是抗原进入细胞以及抗原结合增强。该效应在酸性 pH 条件下增强[219]。在流感血凝素的膜融合活性被激发时，病毒可直接穿过细胞膜，使得该效应增强[220]。因此，病毒直接进入胞质，可使外源性抗原进入非内体(MHC Ⅰ类)抗原呈递途径。同样，在 HBsAg 特异性人 T 细胞克隆的研究中发现，外源性 HBsAg 颗粒可进入非内体途径，使得该颗粒可能成为一种有效的 HBsAg 疫苗。另一个证据是：在高渗性条件下，卵白蛋白被细胞摄取后，紧接着在等渗重摩降低时，进入胞质的胞饮小泡溶破，里面的卵白蛋白释放至胞质，直接进入非内体抗原呈递途径，最终细胞将卵白蛋白肽片段－MHC Ⅰ类分子复合物呈递到细胞表面供 $CD8^+$ CTL 识别[222]。以上这些结果提示：进入非内体途径需要抗原进入胞质，而并不取决于抗原的合成位置。

第二种结合方式，即外源性抗原经内体途径与 MHC Ⅱ类分子结合。但研究发现，内源性 HBsAg 可进入内体呈递途径，最终产生供 $CD4^+$ T 细胞克隆识别的 MHC Ⅱ类分子-肽复合物[221]。Weiss 与 Bogen 试验发现，内源性 λ 轻链可被 MHC Ⅱ类分子限制性 T 细胞识别[223,224]。Eisenlohr 和 Hackett 同样发现了流感病毒神经氨可被 MHC Ⅱ类分子限制性 T 细胞杂交瘤识别[225]。这些情况可解释为表达在细胞表面的抗原再次进入内体，从而由内体途径加工处理。但 Polydefkis 等[226]报道内源性 HIVgp160 的非分泌形式可被 MHC Ⅱ类分子限制性 T 细胞识别，而非处理及分泌型。相类似的有，Jaraquemada 等[227]报道内源性流感病毒 M1 矩阵蛋白的

非分泌型经内体途径处理后，可被 MHCⅡ类限制性 T 细胞识别。在某些情况下，转染携带目的基因的重组牛痘病毒的细胞可表达相应内源性抗原[228]。利用纯化病毒，以及 UV 灭活病毒可阻断转染细胞中的抗原呈递的现象，可排除在准备病毒时污染外源性抗原的可能性。

第三种存在较多争议的新结合方式，是外源性蛋白经过非内体途径加工处理后被 MHCⅡ类分子呈递。例如，Nuchtern 等[219]研究发现，流感病毒矩阵蛋白抗原性片段经过非内体途径处理后可被 MHCⅡ类分子限制性 CTL 识别，该过程对布雷菲德菌素 A（brefeldin A，一种高尔基运输阻断剂）敏感，而对氯奎不敏感。Jacobson 等[229]报道 MHCⅡ类分子限制性 CTL 对于麻疹病毒蛋白的抗性是氯奎非敏感的；Y. Jin 和 I. J Berkower（结果未公开发表）发现一些 MHCⅡ类限制性 T 细胞克隆可识别经非内体途径呈递的外源性 HBsAg（对氯奎和亮抑酶肽不敏感）。应注意第三种结合方式与经典的外源性抗原 MHC Ⅱ类呈递途径间的惟一区别是：对于氯奎阻断效应的抗性。第四种可能的结合方式（即内源性 HBsAg 经非内体途径加工后最终由 MHCⅡ类分子呈递）在对同一 HBsAg 特异性 T 细胞克隆的研究中发现。尽管存在许多异议，但仍然需要一种新的模式来解释抗原在两种呈递系统中的进出机制，及其产生的抗原肽如何被 MHCⅠ、Ⅱ类分子呈递。与内源性蛋白合成相比，蛋白质进入胞质是经非内体抗原呈递途径更为普遍的前提。外源性蛋白的胞吞作用利于蛋白质进入内体途径，尽管一些抗原可逸出内体进入非内体抗原呈递途径。病毒可利用位于病毒蛋白分子上的特殊信号如膜融合肽，逃出内体，从而影响定位及呈递。细胞内存在多种蛋白，它们在抗原加工处理完后，可引导肽产物进入 MHCⅠ、Ⅱ类分子的肽结合槽中。

显然，尽管有许多证据证实在 MHCⅠ、Ⅱ类抗原呈递途径中存在交叉现象，但将这些途径分开是有道理的。MHCⅠ类分子将抗原呈递给 $CD8^+$ T 细胞，后者通常显示出细胞毒效应，在免疫监视中起重要作用，如破坏内源性表达异常蛋白（病毒蛋白、突变蛋白及肿瘤抗原）的细胞。相反，MHCⅡ类分子将抗原呈递给 $CD4^+$ T 细胞，后者主要使与其接触的细胞活化，如促进 B 细胞产生抗体，或促进巨噬细胞的溶胞作用。与辅助性 T 细胞被活化相比，如果仅依赖于 B 细胞接触抗原并产生抗体，由于 B 细胞可将抗原呈递给 CTL，最终 B 细胞被 CTL 杀死，这对机体无益。同样，病毒感染的细胞仅将病毒抗原呈递给辅助性 T 细胞，前者在后者刺激下将产生更多的病毒，而不能被 CTL 杀死，同样达不到预期目的。这种二分法可解释为何存在两种不同的 MHC 分子，以及两种相辅相成的抗原呈递途径。

有趣的是，MHC 自身编码Ⅱ类区附近的两种低分子质量蛋白，LMP-1 与 LMP-7，它们对胞质呈递途径，尤其对于蛋白酶体作用环节十分重要。这些 LMP 与其他 14 个 LMP 聚合成约 580kDa 的高分子复合体。由于这两种多态性的 LMP 可与 MHC 结合，抗 MHC 的多克隆抗血清可与 LMP-2 及 LMP-7 结合，使全部与 MHC 连接和非连接的蛋白复合体沉淀出来[230]。最初描述该复合体的是 Tanaka 等[231,231]及 Arrigo 等[233]，他们发现一种分子质量为 650kDa、与胞质内 ER 有关的颗粒，该颗粒有 5 种不同的酶活性，分别定位于不同位点。蛋白酶体具有桶状结构，里层有蛋白酶活性，未折叠的蛋白质一端进入该桶状结构内，从另一端离开时便成为小肽段。这些不同的蛋白酶优先切断芳香族或支链氨基酸（胰蛋白酶样活性）、支链氨基酸（主要是脂肪族）、碱性氨基酸（胰岛素样活性）、酸性残基（谷氨酸盐优势性）、或小的中性氨基酸残基[234,235]。在阻断蛋白错误折叠时（如衰老蛋白或在感染过程中产生的病毒蛋白），蛋白酶活性增强，用人造氨基酸合成的蛋白质更易被蛋白酶体降解。蛋白酶的降解产物为 9 个氨基酸的肽，该长度正好适合与 MHC 分子结合。胰酶和胰酶样活性对于产生抗原性肽尤为重要，因为许多可与 MHC 分子结合的肽段末端为疏水性或碱性氨基酸残基[236]。

673

LMP 蛋白与蛋白酶体关系密切，因为抗 LMP 复合体的抗血清与抗蛋白酶体的抗血清存在交叉反应[237]，虽然其变化范围取决于使用何种抗血清。所有 LMP 复合体含蛋白酶体蛋白，但仅 5% ~ 10% 的蛋白酶体含 LMP-2 及 LMP-7。

蛋白酶体是非内体抗原呈递途径的主要加工处理机制。这点可由蛋白酶体抑制剂对 MHCⅠ类分子组装及抗原呈递的影响，和 LMP-2 与 LMP-7 突变对抗原加工的影响得以证实。蛋白酶体抑制剂家族成员由长度为 3 ~ 4 个氨基酸的短肽组成，末端为醛基。如 Ac-Leu norLeu-al、苯氧羧基-Leu Leu norVal-al[235]，或非肽类物质如乳裂胱氨酸[239]。尽管这些肽直接作用于胰蛋白酶样的蛋白酶活性（如伪底物），实际上它们可抑制所

有三种蛋白酶活性。它们可能通过占据一个蛋白酶的催化位点，从而阻断蛋白酶体水性通道，同样也阻止其他蛋白质通过。蛋白酶体的降解作用是进行性的，需要一种从一个位点到下一个位点的有序过程，或同时在不同位点裂解，因此抑制一个酶位点将阻断所有酶活性。

这些抑制剂通过阻断抗原加工处理，从而导致 MHC Ⅰ类分子表达降低，以及使其不能将抗原呈递给 MHC Ⅰ类限制性 CTL[235]。由于 MHC Ⅰ类分子重链不能抵抗内源性糖苷酶 H(后者产生于高尔基体内)活性，故认为其位于 ER 中[240]。由于缺乏肽段，MHC Ⅰ类分子重链也不能与 β_2 微球蛋白形成稳定的复合体。这些效应对于蛋白酶活性是特异的，因为抑制剂不能阻断人工合成多肽的呈递，合成多肽还可促进 MHC Ⅰ类分子的表达，因为当抑制剂去除后整个阻断效应可恢复。这些结果提示，蛋白酶体是为 MHC Ⅰ类分子提供抗原性肽的主要供应者。然而，这些抑制剂同样可抑制其他潜在参与抗原加工呈递的酶。当进入 ER 的蛋白的信号肽被去除时，这些疏水性肽可与 MHC Ⅰ类分子结合[241]。尤其对于人白细胞抗原 HLA-A2，更易与疏水性序列结合，肽酶将是抗原性肽在不依靠蛋白酶体及 TAP-1、TAP-2 转运(详见“转运子”部分)的情况下的重要来源。

LMP-2 和 LMP-7 的功能尚不完全清楚，但它们可改变蛋白酶体对特定序列的优先裂解，导致不同肽片段产生[242~244]。LMP-2 缺失的蛋白酶体与末端为疏水性或碱性氨基酸的序列间的亲和力没有变化，但裂解率降低。此效应对于这些蛋白水解位点是特异性的，原因是其确实提高了对含酸性氨基酸的序列的裂解活性[243]。除特异性释放肽的变更外，在 LMP-7 敲除动物中[244]，MHC Ⅰ类分子表达的总体水平只有轻微降低，而在 LMP-2 敲除动物中，MHC Ⅰ类分子表达的总体水平未有变化。但是在这些基因敲除动物中，雄性 H-Y 抗原或流感核蛋白的特异性表位的呈递降低了 3~5 倍。

与蛋白酶体关联的另一个蛋白质是组装到 11S 结构的 PA28[245]。如同 LMP-2、7[242]，PA28 可被 IFN-γ 诱导，其诱导产生还引起蛋白酶体功能的转换，可导致不同抗原表位的产生。例如，可设计合成底物以检测蛋白酶体产生真正的 MHC 结合肽的活性。这些底物含 MHC 结合配体(其侧翼为原始蛋白的天然顺序)。

为产生 MHC 结合配体，蛋白酶体必须两次切割底物[246]。20S 蛋白酶体本身能够产生单裂解片段，如果加入 PA28，则会优先产生二次切割片段。因此，PA28 有助于抗原表位的产生，可能是通过将肽保持在蛋白酶体内，直至处理过程结束。而且，PA28 可协同两个临近位点的蛋白水解活性，以产生正好合适 MHC 结合槽的二次切割肽(8~9 个残基)。这些临近位点间的距离将决定所产生肽的大小。

该蛋白酶体抗原处理系统的特异性决定了精选那些可成为 CTL 表位(通过选择性产生某些富余量的片段和破坏掉其他片段)的蛋白片段的数量的首要步骤。因此，蛋白酶体裂解产生的 C 端残基常常作为结合 MHC 分子的锚残基，或者所产生肽的长度最适合与 MHC Ⅰ类分子的结合，这些或许不仅仅是巧合[242,247]。

抗原呈递对表达 T 细胞库的影响

一些证据表明，抗原的处理对决定 T 细胞识别的潜在抗原性位点起着重要的作用，从而决定用一个蛋白抗原进行免疫时，体内表达何种类型的 T 细胞库。因为 T 细胞并不能识别天然蛋白，仅识别抗原处理后的产物，而显然这些产物本质上至少可以确定被 T 细胞识别的潜在表位。

存在这样一条证据，即抗原处理在 T 细胞库的表达中发挥着主要的作用。这个证据来自对多肽和天然蛋白分子的免疫原性的比较，分别以肌红蛋白[198]和溶菌酶[199]为例。在肌红蛋白这个例子中，用天然肌红蛋白免疫 H-2^k 小鼠时，马肌红蛋白的一个位点(102~118 位残基)不能诱导免疫应答的产生。然而当用多肽免疫小鼠时，却发现这个位点具有免疫原性[198]。因此，在天然肌红蛋白免疫的小鼠内，针对这个位点的免疫性很低，既不是因为 Ir 基因经典结构缺失，换句话说即 T 细胞库中存在一个漏洞，也不是因为这个位点不能与这种小鼠的 MHC 分子相互作用。然而，用多肽刺激的 T 细胞在体外对天然肌红蛋白的应答很低。因此，多肽和天然蛋白不会发生交叉反应。这个问题并不是由于不能将天然蛋白处理为产生表位的分子这么简单，因为(H-2^k × H-2^s)F1 呈递细胞能将天然肌红蛋白的这个表位呈递给 H-2^s T 细胞，却不能将这个表位呈递给 H-2^k T 细胞。而且这个结论也适合各种不同的 T 细胞克隆，这些 T 细胞克隆不会被抑制细胞抑制，因此这些 674

T细胞克隆不能对天然分子发生应答显然不是由天然分子产生的抑制细胞所造成的。在B10.A小鼠中,对鸡溶菌酶多肽(74~76位残基)的应答研究中也发现了同样现象[199]。是该多肽,而不是天然分子,能诱导产生该表位特异性的T细胞,这些T细胞并不与天然蛋白发生交叉反应。排除了以上各种可发生改变的机制后,我们可以得出这样一个结论:合适多肽的产生与合成的多肽不同,它的产生是因为位于微弱抗原性位点外的一个隐藏位点干扰含有某种MHC分子的抗原呈递细胞的的呈递作用。

有关这个机制进一步的证据来自Shastri[248]等的研究,他发现包含溶菌酶74~96区域的各种表位,当使用不同的免疫原时,在$H-2^b$小鼠中都是免疫优势表位。当鸡的天然溶菌酶作为免疫原时,对这个区域具有特异性的T细胞都对74~90片段发生应答,但是对81~96片段却不产生应答,而以溴化氰片段(13~115)为免疫原时,诱导的T细胞仅对81~96片段应答,对74~90片段不发生应答。如果胰蛋白酶的74-96片段作为免疫原时,能诱导两种类型T细胞的产生。

另一些证据来自对单个T细胞克隆精细特异性的研究。Shastri等[249]发现鸡肌红蛋白特异性的$H-2^b$ T细胞克隆对环颈雉肌红蛋白的敏感性比对鸡肌红蛋白的敏感性要高100倍。然而,这些T细胞克隆对包含这两种溶菌酶抗原性位点的溴化氰切割片段有着相同的敏感性。因此这些位于微弱抗原性位点外、能被溴化氰切割除去的区域很可能干扰了鸡溶菌酶相应位点的呈递和识别,或是干扰了产生这些位点的天然蛋白的处理过程。相同的,抹香鲸肌红蛋白,而不是马肌红蛋白的特异性T细胞克隆能对来源于这两个种属的合成多肽的微表位产生应答[198]。当然,马和抹香鲸肌红蛋白的真实位点外的残基是不同的。因此,很可能马肌红蛋白的处理过程与抹香鲸肌红蛋白的处理过程不同,以致包含表位的片段产生很少。然而有一种F1呈递细胞,这种细胞能准确的将这个表位呈递给其他的T细胞,用这种细胞做实验表明问题并不在于鸡溶菌酶[199]或马肌红蛋白[198]不能产生适当的片段。因此,这些例子表明,位于微弱抗原性位点外的结构能够干扰多肽与特定的MHC分子结合的呈递。

Grewal[250]等通过研究精确地确定出了这种干扰结构。他们比较了C57BL/6小鼠和C3H.SW小鼠中多肽HEL的呈递,这两种小鼠都有$H-2^b$,但是在非MHC基因中存在不同。当用整个溶菌酶分子免疫小鼠时,发现在C3H.SW小鼠中存在对肽46~61强烈的T细胞应答,而在C57BL/6中则也不存在。因为这两个种属中的F_1杂合子发生了应答,而在另一种小鼠中缺乏这种应答主要是由于由于自身耐受而在T细胞库中出现一个漏洞。据研究发现多肽46~60能直接与$I-A^b$ MHCⅡ类分子结合,但是多肽41~60却不能,这表明羧基端61位的精氨酸阻碍了结合的发生。有证据表明在抗原处理过程中C3H.SW小鼠的非MHC分子连接的不同能将这个精氨酸从多肽46~61去除,因此这个多肽在C3H.SW小鼠中是免疫优势位点,但在C57BL/6中却不是,因为多肽是隐含的。抗原在处理过程中的差异导致HEL腹腔免疫小鼠的淋巴细胞对HEL不发生应答,原因在于缺乏对优势表位46~61的应答。

即使是不需要处理的小肽也可能被APC处理,而且多肽处理的过程可能会影响多肽与MHC分子的相互作用。Fox等[251]发现用酪氨酸取代细胞色素c多肽93~103的第95位的异亮氨酸能提高$E\beta^b$对抗原的呈递,但是$E\beta^k$对抗原的呈递减少,实验中使用的是活的APC细胞,而不是不能呈递抗原的、被固定的APC细胞。因此,酪氨酸残基并不直接与不同的APC相互作用,但是却影响多肽的呈递方式,从而影响多肽与MHC分子的相互作用。

除了以上所提到的这些机制外,Gammon[199]和Sercarz[252]等认为,与相同抗原处理片段结合的不同MHC结构(抗原识别位)也存在着竞争的可能。如果部分解折叠的片段首先通过其暴露位点与MHC分子结合,则下一步的抗原处理过程就会停止,而其他能与MHC发生结合的潜在结合位点也就永远失去了结合的可能。在相同呈递细胞的不同MHC分子中也存在这种竞争[199]。例如,同时表达A^d和E^d的BALB/c小鼠,能对鸡溶菌酶108~120片段,而不是13~35片段产生特异性的应答[199],而且这种应答受E^d的限制。然而,当用溶菌酶免疫仅表达A^d的B10.GD小鼠,则会对溶菌酶19~35片段产生很好的应答。BALB/c小鼠显然也表达A^d分子,所以APC分子呈递13~35这个表位的失败可能是由于来自E^d分子的竞争,E^d分子以很高的亲和力优先与108~120段位点结合,从而阻止了13~35位点与A^d结合。不同多肽与相同的MHC分子的结合的

竞争也会发生。

所有这些结果综合在一起表明，抗原的处理不仅促进抗原位点与 MHC 分子或 TCR 的相互作用，同时也影响这些相互作用的特异性，从而影响了所诱导出的 T 细胞库的特异性。

转运到细胞内的小腔中并在此与 MHC 分子结合

潜在表位需要克服的第二障碍，就是表位必须被转运至细胞内的小室中并与 MHC 分子结合。早期就发现，在 MHC Ⅰ、Ⅱ类分子中，这些小腔都不同。

MHC Ⅰ 类分子呈递的转运途径

有关由 MHC Ⅰ类分子呈递的抗原如何进行处理的重要信息，可以从表达低水平的 MHC-Ⅰ分子的突变鼠 RMA-S[253] 和人 B 细胞系 721.174 和 721.134[254] 的研究中得到。MHC Ⅰ 类分子在内质网中合成，而且内陷于内质网中，不经过适当的糖基化作用就不能与 β_2 微球蛋白结合，只会很快的发生降解。正如 Townsend 等[255] 所发现的，这些细胞不能呈递由 MHC Ⅰ类分子通过内源性途径表达的、供 CTL 识别的病毒抗原。然而，当这些细胞与Ⅰ类分子结合多肽共同孵育时，MHC 的表达和 CTL 的识别这些功能能得到恢复。 675

对这些突变体进行基因分析显示，接近 DR 区域的 MHC Ⅱ类分子的部分区域的纯合子大量或小部分缺失，表明Ⅱ类分子区域的功能码能控制细胞表面分子的表达和Ⅰ类蛋白的功能。对这个区域的 DNA 进行分子克隆表明至少有 12 个新基因，其中有两个被称为 TAP-1 和 TAP-2，存在一段编码转运蛋白的典型序列[256~258]。然而这中间的其他两个（LMP-2 和 LMP-7），是蛋白酶体处理抗原机制中的一部分。TAP 基因编码 2 个 70kDa 的蛋白，其特征是包含 6 个跨膜结构域和一个胞质 ATP 结合区域，其序列与其他多肽的转运蛋白如沙门氏菌的 Opp D 以及多耐药蛋白和人囊性纤维化转运蛋白等存在同源性。它们的作用就是将处理过的多肽从胞质转运到内质网。多肽一旦进入内质网后，通过 TAP 与新形成的 MHC Ⅰ类分子结合并且与 β_2 微球蛋白形成稳定的三聚体。接着这个复合体就被转运到细胞表面，并进行抗原呈递。当没有多肽的转运体时，空的 MHC Ⅰ类分子和 β_2 微球蛋白的二聚体形式非常的不稳定。如 Townsend[255] 和 Schumacher[259] 等的研究所示，过多的游离多肽能稳定寿命很短的空复合物从而使 MHC Ⅰ类分子能到达分子表面。即使是未感染的细胞也需要一定量的 MHC-自身结合多肽来产生稳定的 MHC Ⅰ 类分子复合物，并且维持细胞表面正常的 MHC 分子水平。通过重组每个转运蛋白突变细胞的克隆性基因对 TAP 蛋白的功能进行了研究。将 TAP-2 转染入 RMA-S260 细胞发现能恢复细胞抗原呈递的功能，然而将 TAP-1 转染入 721.134 细胞能恢复细胞抗原呈递的功能。而突变体 721.174 由于同时缺失了 TAP-1 和 TAP-2，所以如果仅有一个 TAP 基因，也不能恢复正常的抗原呈递作用。TAP-1 和 TAP-2 蛋白在体内可能以二聚体形式存在，因为对其中一种蛋白有特异性的抗多肽抗体之间会发生共沉淀[261,262]。

在已感染的细胞中，只要病毒抗原一产生，由蛋白酶体产生的多肽片段就会与 TAP-1 和 TAP-2 转运蛋白结合（图 19.9），转运蛋白再将多肽片段转运至内质网，并与 MHC Ⅰ 分子结合，MHC Ⅰ类分子会将这些多肽片段转运到细胞表面来呈递抗原，这个过程需要 30 分钟。事实上，发现 TAP 与新生的Ⅰ类分子重链/β_2微球蛋白的结合表明，多肽可能是直接由 TAP 转运给新生成的 MHC 分子，而不是以游离的状态存在于溶液中[263,264]。从而，MHC 连锁基因中编码蛋白酶解、多肽转运以及在细胞表面呈递功能的蛋白能确定下来。实际上，MHC 看起来似乎编码一个包含大量元件的复杂系统，这些元件对异种抗原决定簇在感染细胞表面快速呈现起着重要的作用。通过对蛋白合成结构合成出的样品进行连续采样，发现这个系统能允许 CTL 在感染病毒释放以前快速识别和破坏感染细胞。

因为 TAP 蛋白在非内体性抗原处理区域（胞质）和内质网之间形成了联系，因此 TAP 蛋白在 MHC 的功能中发挥着重要的作用。如果 TAP 转运效率很高的话，那么产生的大部分多肽都可以被转运，而非内体性抗原的处理与 MHC Ⅰ类分子紧密相连。如果 TAP 转运效率不太高，那么一些非内体性多肽将与 MHC Ⅱ 类分子结合。相反，如果 TAP 的转运具有高度的选择性的话，那么一些胞质多肽将不能进入内质网与 MHC Ⅰ 类 676

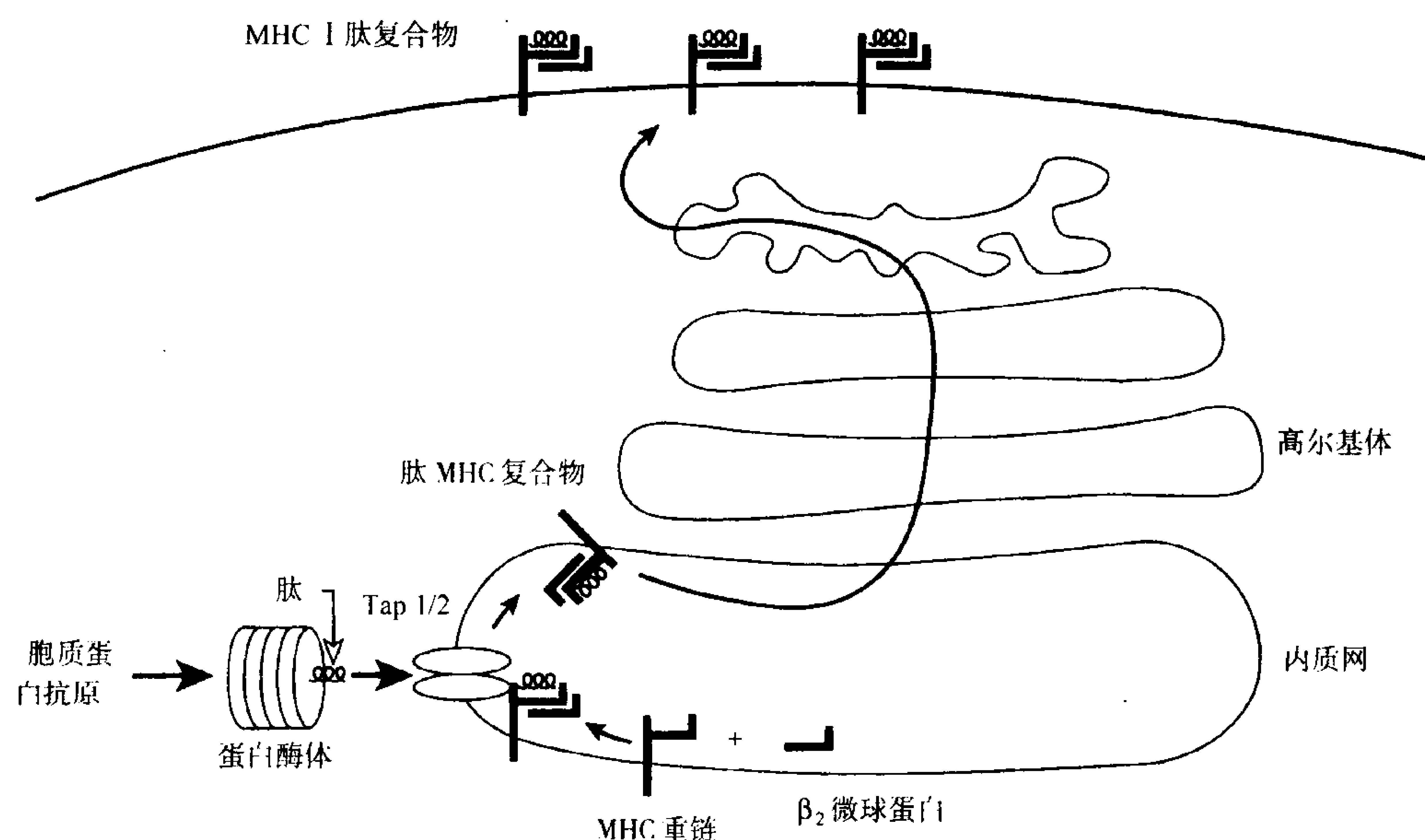


图 19.9 胞质抗原的处理途径到 MHC Ⅰ类分子的呈递。胞质抗原在蛋白酶体内降解成为多肽片段，多肽片段通过 TAP 转运体转运至内质网中，并与 MHC Ⅰ类分子的重链和 β_2 微球蛋白形成稳定的复合物，该复合物继续被转运，经过体时被糖基化而成熟，最后到达细胞表面，呈递给 MHC Ⅰ类分子限制性 T 细胞。

分子结合而被呈递，但是如果 TAP 的转运是随机的，那么一些最好被切除而不被呈递的多肽也会被转运，如一些造成自身免疫疾病的多肽。

有观点认为：一些蛋白可能控制着多肽与 MHC Ⅰ 类分子多肽结合位点的可及性。该观点最初来源于对两种有相同 MHC 型(RT1.A^a)大鼠的研究，这两种大鼠尽管不存在组织不相容，但是 CTL 细胞却能识别出这两种大鼠存在的差异[265]。这种 MHC Ⅰ类分子修饰的差异[通常称为 cim(class Ⅰ modification)效应]的发生是因为不同的多肽与两种大鼠中相同的 MHC 分子结合[266,267]。大鼠中有两个等位基因供多肽转运体将多肽提供给 MHC 分子。一个是 TAP2A，转运的多肽特异性的与 RT1.A^a 匹配，并且将一系列范围较宽的多肽呈递给 MHC 分子结合。另一个转运体等位基因为 TAP2B，能提供一系列不同的多肽，并且这些多肽与 RT1.A^{a}不匹配，因此 MHC 结合缓慢，从而只有很少类型的多肽发生结合。尽管 RT1.A^{a}较喜欢与第 9 位是精氨酸的多肽结合，但是它还必须接受一些由 TAP2B 提供的含疏水性残基的多肽[268]，因此就可以对明显的组织相容性差异作出解释。因此，TAP 转运的特异性为限制潜在的 CTL 表位库提供了一个选择步骤。

为了衡量 TAP 在其他种类中的特异性，一个包含 *N*-糖基化位点的可转运多肽通过链球菌溶血素的渗透作用加到细胞中。如果多肽被 TAP 转运，那么它将进入内质网和顺面高尔基体中，并在此发生糖基化[269~271]。糖基化作用的范围是衡量 TAP 作用的一种方法。当同时将竞争多肽加入细胞中，则 TAP 介导的对信息多肽的转运减少，这表明多肽的结合位点已饱和。用这种方法可以测试一系列相关多肽与 TAP 的竞争结合和转运能力，从而确定 TAP 结合和转运所需要的条件。

TAP 结合和转运很大程度上依赖于多肽的长度[271,272]。小鼠 TAP 显示出对 9 个或更长残基的多肽具有优先性。对人 TAP 而言，在不考虑序列的情况下，长度小于 7 个氨基酸的多肽都不能被转运[271]。长度为 8～11个氨基酸的多肽几乎都能被转运，只是在结合的亲和力上存在一些差异，这些差异主要取决于多肽的序列。TAP 对长度为 14～21 个氨基酸的多肽选择性地进行转运，但是那些长度大于 24 个氨基酸的多肽则不能被完整的转运。因此，在不考虑序列的情况下，人 TAP 不转运长度小于 7 个氨基酸或长度大于 24 个氨基酸的多肽。

尽管 TAP 能够而且必须转运范围很广的各种多肽，但它仍然优先以最高的效率转运一些多肽，优先提供给某种类型的 MHC 分子所需的多肽。例如，一种自身多肽，天然情况下与 HLA B27 结合，经过细微的修饰后产生一个 *N*-I 糖基化位点，从而产生序列 RRYQNSTEL[271]。可以用这种糖基化的多肽来衡量转运，此同源性多肽的 50%抑制浓度小于 1μ 时，TAP 就会发生饱和。而其他包含非相关序列的多肽也会被抑制，而且通常与 TAP 有很高的亲和力。不仅天然 HLA 结合多肽会发生竞争，而且那些第 2 位和第 9 位缺乏 MHC 结合基序的各种多肽也会发生竞争。相同，如果氨基端和羧基端的残基被丙氨酸取代，对转运也不会有影响，而且整个序列都可以被其他的氨基酸来取代而不会对转运造成很大的影响。显然，与不同 MHC 分子结合的多肽可以被相同的 TAP 蛋白转运，甚至是与小鼠 MHC 分子结合的多肽都可以被人的 TAP 来转运。在另一个例子中，应用大鼠 TAP 蛋白研究发现第 2、6 或 9 位为脯氨酸的多肽是一个参照多肽的很弱的转运竞争物[270]。

在另一种方法中，在杆状病毒系统的微球蛋白中过度表达 TAP 蛋白，TAP 结合亲和力取决于各种范围广泛的合成多肽，从而允许一系列重要残基的定位[273,274]。不像 MHC Ⅰ类分子，TAP 上没有特异性氨基酸所需要的锚定位点。然而，也有一些位置当用错误的氨基酸取代时，多肽与 TAP 的结合会显著减少。在一个典型的与 MHC Ⅰ类分子结合的 9 聚物中，发现最强烈的替代反应发生在第 9 位(P9)，其次是发生在 P2 和 P3 位置的取代，接着是 P1。在羧基端 P9 位置，最常见的残基是酪氨酸和苯丙氨酸(以及精氨酸和赖氨酸)，然而当用谷氨酸取代时，将会使结合反应呈 3 倍对数级减少。同样的，取代 P2 位的脯氨酸，同首选的残基精氨酸、缬氨酸、异亮氨酸相比，会使多肽与 TAP 的结合反应减少 1.5～2 倍的对数级。TAP 的优先权可以选择性的将一些多肽从胞质转运到内质网。

有趣的是这些优势残基都很相同并组成了 MHC Ⅰ类分子结合的基序(P2 和 P9)。然而，由于 MHC 的结合基序不同个体之间都有差异，因此 TAP 不可能优先与所有的 MHC 分子匹配。例如 TAP 的优势残基：P2 位的精氨酸和 P9 位的苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸、精氨酸、赖氨酸同 HLA-B27 的结合基序存在着重叠，因此 TAP 会优先转运这些类型的 MHC 分子的多肽配体。而在 P9 位不含有酪氨酸或苯丙氨酸等优势残基的 B＊2709 却与自身免疫疾病无关，而这种自身疾病却常发生在 HLA-B27 个体中。相反，HLA-B7 的 P2 位则需要一个脯氨酸，从而大大减少多肽与 TAP 的结合。相同，一些能与 HLA-A2 结合的多肽由于含有疏水性残基却不适合与 TAP 结合，这表明 TAP 与大多数普通的 HLA-I 类分子的等位基因存在着较好的兼容性。对一系列与 HLA-A2 和 B27 结合的天然呈递多肽的测试表明，TAP 蛋白对 B27 多肽的亲和力比对 A2 多肽的亲和力平均要高 240 倍，而且一些 A2 多肽几乎根本就不与 TAP 结合(van Endert，个人交流)。这些低亲和力的多肽是如何呈递给 MHC 分子的呢？有一种假说即：HLA-A2 和 B7 的多肽配体在转运过程中是作为一个包含正确氨基酸的前体蛋白而转运的，这个前体蛋白再经过修剪后就能适合 MHC 分子的凹槽。作为一种选择，这些多肽中的一些可能来自信号肽并以非 TAP 依赖方式进入内质网。对多肽选择性转运的意义可能在于其限制了对自身多肽的免疫。如果 HLA-B27 和特异性的 TAP 匹配的很好的话，那么它将会和 HLA-B27 一起导致自身免疫疾病发病率的增加[273]。

TAP 蛋白在抗病毒免疫中的重要性可以从下列了解到，某些疱疹病毒以 TAP-1 的功能为目标来干扰 APC 将抗原呈递给 $CD8^+$ CTL。细胞一旦感染了单纯疱疹病毒(HSV-1)或巨细胞病毒(CMV))[275,276]，细胞表面新的 MHC Ⅰ类分子的表达就会减少，而且这些分子不能呈递病毒或结合了 MHC Ⅰ类分子的抗原[277～279]。这些细胞有其细胞的典型表型如 TAP 缺陷型突变体，这种细胞不能将抗原性多肽转运到内质网中：正常的 MHC Ⅰ类分子重链合成了，但是不能与 β_2 微球蛋白形成复合物，从而只能内陷于内质网中。由于这些 MHC 分子没有通过高尔基体因此这些分子不能得到成熟的寡糖，也可以简单的解释为这些 MHC 分子不能抵抗内切糖苷酶 H 的作用。感染细胞不能呈递 HSV-1 抗原给 CTL，而且它们呈递其他病毒抗原(如 CMV 或自身抗原)给抗原特异性 CTL 的功能也被封闭。引起阻滞的 HSV 病毒蛋白称作 ICP47，是一种早期病毒蛋白，约 12kDa，它独自发挥作用，通过结合到 TAP 而抑制其功能。

677

作为一种逃避免疫监视的方式，该策略有助于病毒在慢性感染过程中的持续存在，及在回归性疾病中病毒的活动，这常见于 HSA-1、HSV-2 病毒。一个慢性感染病人应该有足够的病毒特异性 CTL，以抑制或限制疾

病的复发。但是，关闭抗原呈递，HSV 可能再度活化，而不必触发免疫应答。这些发现同时也提高了制备减毒 HSV 活疫苗(ICP47)的可能性，该疫苗可能比天然感染更加具有免疫原性，因为抗原呈递会保持原始未动状态。

这种模式的一个例外见于黄病毒，如登革热和日本脑炎病毒，它们能通过绕开 TAP-1/-2 途径以向 ER 内的 MHC 结合提供额外肽抗原而提高(不是降低)MHC 表达[280]。如此，增高的病毒抗原呈递，虽然不用于隐藏病毒，但可以通过提高感染细胞的溶破、甚至可能通过克服自身耐受而加重细胞病理。

导致 MHCⅡ类分子递呈的转运途径

与将多肽分子呈递给 MHC 的 MHCⅠ类途径不同，MHCⅡ类途径将 MHC 分子转运至内体区域内，在那里，抗原肽被处理。在转运中，肽结合槽必须是空闲的。如果需要，细胞应用一种叫固定链的蛋白及其处理后的片段 CLIP，以阻断结合位点，应用另一种蛋白(HLA-DM)促进 CLIP 肽释放及其与抗原肽段的交换。

MHCⅡ类分子在 ER 内组装，在此处，α、β 链与固定链组成复合物[281~283]。固定链结合 MHC 并阻断肽结合槽，所以转运至 ER 的内源性多肽(例如通过 TAP)不能进行结合[282,284~289]。α、β 链与固定链组成的复合物共有九个多肽链[290]，通过高尔基体转运，并通过固定链上的信号导入内体和内体样滤泡(称为 MHCⅡ类分子室)内。这些室内含有消化外源蛋白成为抗原肽的酸活化蛋白酶。而且，它们还能降解固定链成为 CLIP 片段(80~103 位氨基酸残基)。如果 CLIP 长期占据肽结合槽，则抗原肽不能结合，所以 CLIP 释放率限制着 MHC 分子摄取抗原肽的能力。

肽载荷可通过其对 MHC 分子结构的影响而进行检测。当一个 MHCⅡ类分子结合一个肽后，它的构型就会改变，而且还有一些单抗是肽结合构象特异性的[291]。而 α/β 链复合物在肽结合之后变得更加稳定，这可将 MHC 分子通过 SDS 电泳凝胶(非变性)而检测出来。肽结合构型在凝胶中是大的 α/β 二聚体，而未结合构型(仍结合着 CLIP)在该类情况下不稳定，并会分为 α、β 链的单体形式[292]。

突变细胞株在 6 号染色体上缺失 HLA-DP 和 HLA-DQ 之间的基因[291,293~295]。这些细胞表达正常水平的 MHCⅡ类结构的蛋白分子 HLA-DP 和 DQ，但不能呈递蛋白抗原[295]。有些 MHCⅡ类结构的蛋白表达在细胞表面，但更多的是滞留于 MHCⅡ类分子室内。但在生化学上，它们仍结合着 CLIP 肽[296]，而不是肽抗原，它们也未达到肽结合的 MHCⅡ类复合物的构象和 SDS 稳定性[291,297]。该缺陷的发现是因为它们丢失 HLA-DM(近年得到研究)的两个链中的一条，而该表型能通过加入丢失的基因而得到纠正[298]。有正常 HLA-DM 存在时，MHC 释放 CLIP 并结合抗原肽，呈递给 T 细胞。

应用纯化的 MHCⅡ类分子和生物素标记的多肽进行体外试验，结果发现，HLA-DM 能累积外源肽载荷，进入 HLA-DR 结合位点[299,300]。例如髓磷脂碱性蛋白片段 90~102 可在 9 分钟内用 HLA-DM 完成，而无 HLA-DM 时，则需要 60 分钟(表 19.7)。其他多肽也可以相同比率负载，提示比率限速步骤对解离 CLIP 肽以暴露 HLA-DR 上的肽结合位点都是相同的。最适动力学效果介于 pH4.5~5.8，这是 HLA-DM 发挥作用的典型内体/溶酶体环境。HLA-DM 不影响亲和力(最大半量结合法检测)，但对结合动力学却有显著影响。

表 19.7　HLA-DM 对肽与 HLA-DR1 结合的结合/解离比率的影响效果

肽	HLA-DM	结合半寿期	解离半寿期
CLIP(80~103)	-	60min	11h
	+	9min	0.3h
MBP(90~102)	-	62min	86h
	+	9min	1h
HA(307~319)	-	67min	144h
	+	10min	144h

本表依据 Sloan 等的数据[299]改编。源自纯化的可溶性 HLA-DR1 的生物素标记肽的结合/解离比率在存在或不存在 HLA-DM 时，用荧光分析法检测。在有 DM 存在时，三个肽的结合比率升高相同，或许反映了固定链中结合 CLIP 片段的比率限制性解离。相反，一旦肽有了结合反应，解离比率因亲和力的不同而不同。因此，HLA-DM 催化更弱结合肽的释放，并允许高亲和力肽的稳定结合。无论怎样，这都是 HLA-DM 的编辑功能。

相反，如果用生物素标记肽过夜饱和 HLA-DR 结合位点，再除去游离多肽，则随着时间的推移可检测解离率[299,300]。如表 19.7 所示[299]，不同多肽的解离率可在有(或无)HLA-DM 时进行比较。加入 HLA-DM，CLIP 肽的半寿期从 11 小时降低为 20 分钟。这可以解释其他多肽的负载增高现象，因为它们必须等待 CLIP 肽先行解离。对抗原肽而言，髓磷脂碱性蛋白 90～112 在 DM 存在时，其解离比不存在时快 80 倍。但另一肽(流感红细胞凝集素 307～319)，则根本不受影响。对上述抗原肽影响效果的差异提示：HLA-DM 可能在决定哪个肽在 MHC 上停留时间足够长以被递呈、而哪个肽需被解离方面发挥潜在作用[299]。通过优先释放 MBP 而非 HA 肽，HLA-DM 能有利于稳定 MHC-HA 结合及其呈递。每个肽的亲和力由肽与 MHC 结合槽间的适合度、而非 HLA-DM 来决定。但 DM 能通过促进低亲和力肽解离、使高亲和力肽保留，而放大对亲和力差异的影响(即信噪比)。该编辑功能对确定哪个肽能被呈递并诱发 T 细胞应答、而哪个肽不能被呈递并诱发 T 细胞应答有重要影响。HLA-DM 能通过释放低亲和力竞争肽而提高某个以高亲和力结合 MHC 的肽的免疫优势。作为选择，HLA-DM 能在自身低亲和力肽诱导自身反应性 T 细胞之前使其释放，从而有利于自身耐受。 678

MHC 结合及一个稳定的 MHC-肽复合物的组装

抗原与 MHC 分子的相互作用

一个潜在的抗原性位点必须通过的选择步骤，可能就是与合适的 MHC 分子以足够高的亲和力进行结合。

T 细胞对 APC 或靶细胞上的抗原的应答给我们许多提示，即抗原直接与 APC 上的 MHC 分子相互作用。首先，编码某一特殊抗原的免疫应答特性的可遗传基因与 MHC-编码细胞表面分子的基因的遗传是紧密相联的[101,132]。其次，已明确 T 细胞对抗原的识别也是 MHC 限制性发生的步骤[101,140,180,301]。例如，人们发现，对小蛋白和多肽抗原的体外 T 细胞应答平行于 Ir 基因控制的体内应答，而且 T 细胞对 APC 上 MHC 抗原的差异在抗原识别功能方面极其敏锐。该发现具有很重要的先进性，因为这使我们将 T 细胞上的 MHC 与 APC 上的 MHC 区分开来成为可能。T 细胞对胰岛素每条链上的抗原决定簇的应答依赖于 APC 上的 MHC 分子。这当(A×B)F1T 细胞对 A 或 B 双亲 MHC 类型的 APC 呈递的抗原产生应答时变得特别明显[180,302]。没有双亲 APC 能刺激等位基因应答，而且对抗原的应答不仅被 APC 上的 MHC、而且还被 T 细胞特异性所限制。APC 的该项能力限制那些可能被呈递给 T 细胞的物质，称为“优势选择”[180,302]。很明显，即使在一个(A×B)F1 动物体中，也存在不同亚群的抗原特异性 T 细胞，它们对每个抗原决定簇只以 MHC A 型或 B 型相关联方式产生应答[303]。

对抗原特异性 T 细胞克隆特异性的试验提示，APC 上的 MHC 能以更精细的方式，远非只是允许或抑制方式，而影响 T 细胞应答。优势选择提示，一个处理过的肽应当同时含一个 MHC 相互作用的位点和一个独特的 TCR 结合的功能位点。其逻辑性结果是：自同一个蛋白处理而来的不同多肽，因其不同的 MHC 关联位点而可能有不同的 MHC 限制性，这与独立的 Ir 基因控制对同一蛋白上的每个抗原决定簇的应答相一致[142]。例如，肌球素特异性 T 细胞克隆对肌球素不同多肽片段上的多种抗原决定簇产生应答[173]：那些一种表位特异性的 T 细胞克隆总是 I-A 限制的，而那些其他表位特异性的 T 细胞克隆总是 I-E 限制的。对此最简单的解释是每个抗原肽含一个 I-A 或 I-E 相互作用的 Ia 相关位点。在 Ir 基因水平上，缺乏一个功能 I-E 分子的小鼠品系只能对这些位点中的一个应答，那些不含能够结合任何肌球素肽的 I-A、I-E 分子的鼠系可能对肌球素呈低反应性。

肽抗原上一个不连续 MHC 相关位点的有关证据源于对鸽子细胞色素 c 的研究。小鼠 T 细胞对鸽子细胞色素 c 及其 C 端肽[81～104]的应答依赖 APC 上的 I-E 分子[140]。而合成肽抗原上独特的结构位点可能形成两个功能位点：一个结合 TCR 的表位位点，和一个与 APC 上的 MHC 分子相互作用的“托位”[agretope，(antigen-restriction-tope，即抗原限制性表位)]位点[140,157～159]。多肽上第 99 位氨基酸替换为赖氨酸会破坏其刺激该肽特异性 T 细胞克隆的能力，而缬氨酸与第 103 位氨基酸缺失之间的差异决定了 T 细胞激活与某些 MHC 抗原

相关联，独立于T细胞的特异性。而且，用第99位氨基酸替换后的多肽免疫动物能诱发新的T细胞克隆，该克隆对替换后的肽产生应答，而对原来的肽则不产生应答，并且显示出相同形式的遗传限制性，而且也像原来的肽特异性的克隆那样，与第103位氨基酸残基相关。这些结果意味着第99位氨基酸替换并未影响MHC关联位点，但却独立地改变了直接与TCR相作用的抗原亚位点。相反，第103位点是MHC相互作用的可能的亚位点，它不改变TCR结合位点。对此的解释见图19.10的模型。

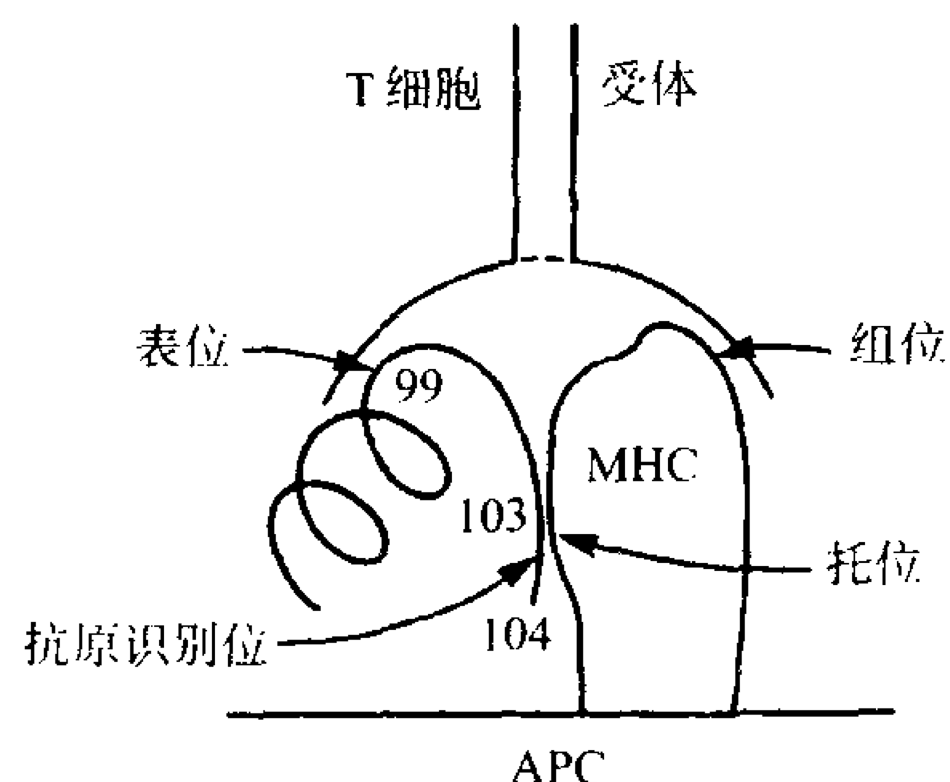


图19.10 三分子复合物形式模型，显示抗原、APC上的MHC编码产物、T细胞上的受体之间的相互作用。图中抗原是鸽子细胞色素c片段81~104。氨基酸残基99、103或104表示有研究证明它们可能分别是该抗原表位(epitope)和抗原限制位(agretope)的部分[157]。

679

不含任何其他细胞表面蛋白的MHC分子是否足以呈递处理后的肽抗原仍待证实。这从两方面显示。首先，Watts等[304]发现，用含纯化I-A分子的脂质包被的载玻片能将一种卵清蛋白肽呈递给卵清蛋白特异性T细胞杂交瘤。该结果说明除抗原呈递和MHC关联之外，无需其他特殊的步骤。同样，Walden等[305]用只含抗原和MHC分子的脂质体特异性地激活了T细胞杂交瘤。其次，Norcross等[306]用I-Aα、β链的基因转染小鼠L细胞，将不表达自身MHCⅡ类分子的纤维母细胞转换为了I-A表达细胞。这些细胞能够向I-A限制性T细胞克隆和杂交瘤呈递几种抗原[306]，并能将类似的I-E转染物呈递给I-E限制的T细胞[173]。这样不论何种处理酶都已存在于纤维母细胞中，另外抗原呈递功能仅需的就是I-A或I-E抗原的表达了。

平面膜技术已经用于确定诱导T细胞活化所需的每个APC上MHC-抗原复合物的最小数目[307]。在用抗原刺激呈递细胞后，研究细胞的抗原呈递活性，一些细胞被溶解以产生含MHC-抗原肽的纯化物。这些MHC-肽复合物被用于重建平面膜，其能量和参考MHC(以高肽浓度体外刺激制备并认为肽已完全负载)相比较。以该种方式，对应各水平抗原呈递的MHC结合位点上肽的相对占有率可以得以确定。对B细胞和巨噬细胞，触发T细胞所必需的抗原负载阈值是0.2%I-E^{d}分子被肽占有，对应为约200个MHC-肽复合物/APC。对人工呈递细胞，如I-E^{d}转染的L细胞，该阈值为23倍多，或4.6%的MHC分子被肽占有。相同，当直接检测MHC-肽结合时，用同位素标记的肽来确定触发T细胞所需的MHC-肽复合物的最低水平，B细胞能以每个APC 200~300个MHC-肽复合物的数量呈递抗原[308]。有报道，对CD8$^+$细胞毒性T细胞识别而言，每个细胞需要相类似数目的MHCⅠ-肽复合物[309]。这些结果可解释新生肽抗原如何能够与其他细胞抗原竞争，因为较低水平的MHC占有率就足够了。而且，该抗原呈递的阈值可以解释多价蛋白质抗原(如病毒颗粒，每个有100~200个蛋白质拷贝)比相应单体的抗原性高1000倍以上[310]。后续研究在塑胶上滴定肽和充足可溶性MHCⅠ分子，提示3~5个特异性MHC-肽复合物相互作用足以触发T细胞[311,312]。由于10个以上T细胞能围绕一个APC形成玫瑰花结，该结果与每个APC上几百个复合物的阈值相一致，并不是所有复合物都与同一T细胞相作用。

关于处理后的肽与MHC分子间直接相关的生化学证据，首先是基于多肽间抗原递呈的竞争研究[186,313~316]，其次更直接地基于平衡透析[317]、分子筛色谱[318]或亲和力标记[319]等研究方法。平衡透析是先将溶剂稳定型的MHCⅡ类分子与荧光标记或放射标记的抗原肽共孵育，然后对大量缓冲液透析。缺乏MHCⅡ类分子结合时，标记的肽会在透析室内外均匀分布。而当将合适的MHCⅡ类分子加入到透析室内后，过量的多肽分子就会因形成难以透过半透膜的很大的复合物而滞留在内部。以该种方式，抗原与MHC分子的直接结合可得以显示，其亲和力常数也能得以确定[317,318]。

第二个途径是在48小时后形成抗原-MHC复合物，然后快速通过Sephadex G50柱。结合肽因MHCⅡ类分子的体积较大(约58kDa)而不能结合到柱上，游离肽(约2kDa)则包含到柱中(图19.11)[318]。竞争结合试验表明，相同MHC限制性的不同肽抗原结合到MHCⅡ类分子的同一位点[320,321]。例如，表19.8显示公认与d或k单体型的I-A或I-E抗原一起被呈递的肽抗原的结果。我们发现肽Ova323~339(与I-A^{d}一起被呈递)也很好地结合纯化的I-A^d，而未标记的肽竞争该I-A^{d}分子的抗原结合位点。相同，另一I-A^{d}限制性肽：肌凝

素 106 ~ 118，与 Ova323 ~ 339 竞争同一位点。而肌凝素 132 ~ 153（非 I-A^d 限制性）不竞争该位点，但竞争 I-E^d（其自己本身的限制元件）。相同，鸽子细胞色素 c 竞争其自己的限制性元件 I-E^k 的功能最好，明显好于 I-A^k 或 I-E^d（它们不呈递细胞色素）。相反，重组 Eβ 基因已用于绘制一个 MHC Ⅱ 类分子上结合肽抗原和 TCR 的位点的定位[322]。

用这两种生化学方法，可以解释因氨基酸替代而使肽在对表位或托位功能的副作用方面，肽抗原性的主要缺失。例如，用一套合成肽得以确定两个卵清蛋白特异性 T 细胞克隆定位至肽 325 ~ 335。在该片段，每个氨基酸做 5 个替代，然后对所得 55 个不同的肽刺激该 T 细胞克隆的能力逐一进行检测[323]。可能那些不能刺激 T 细胞克隆的肽的一个表位或托位功能位点有缺陷。实际上，对与 MHC 的相互作用，只有两个氨基酸（Val327 和 Ala332）是必需的，这些位点中任何一个的改变都会导致对该 T 细胞克隆的免疫原性的缺失。有 7 个其他氨基酸是 T 细胞激活的关键，但不影响 MHC 结合。因此，它们肯定是功能表位的一部分。有意思的是，某些对 His328、Ala330 和 Glu333 的替代对 MHC 结合有影响，而其他替代对 T 细胞激活有影响，但不影响 MHC 结合。这些氨基酸可能同时参与了表位和托位的功能位点，或者说，氨基酸替代可能影响肽结合构象，从而间接地影响 T 细胞识别[324]。11 个氨基酸中 9 个氨基酸的替代可以耐受，不会影响 MHC 结合，这与优势选择假说在多抗原肽能与同一 MHC 分子上相同抗原结合位点相互作用方面是一致的。

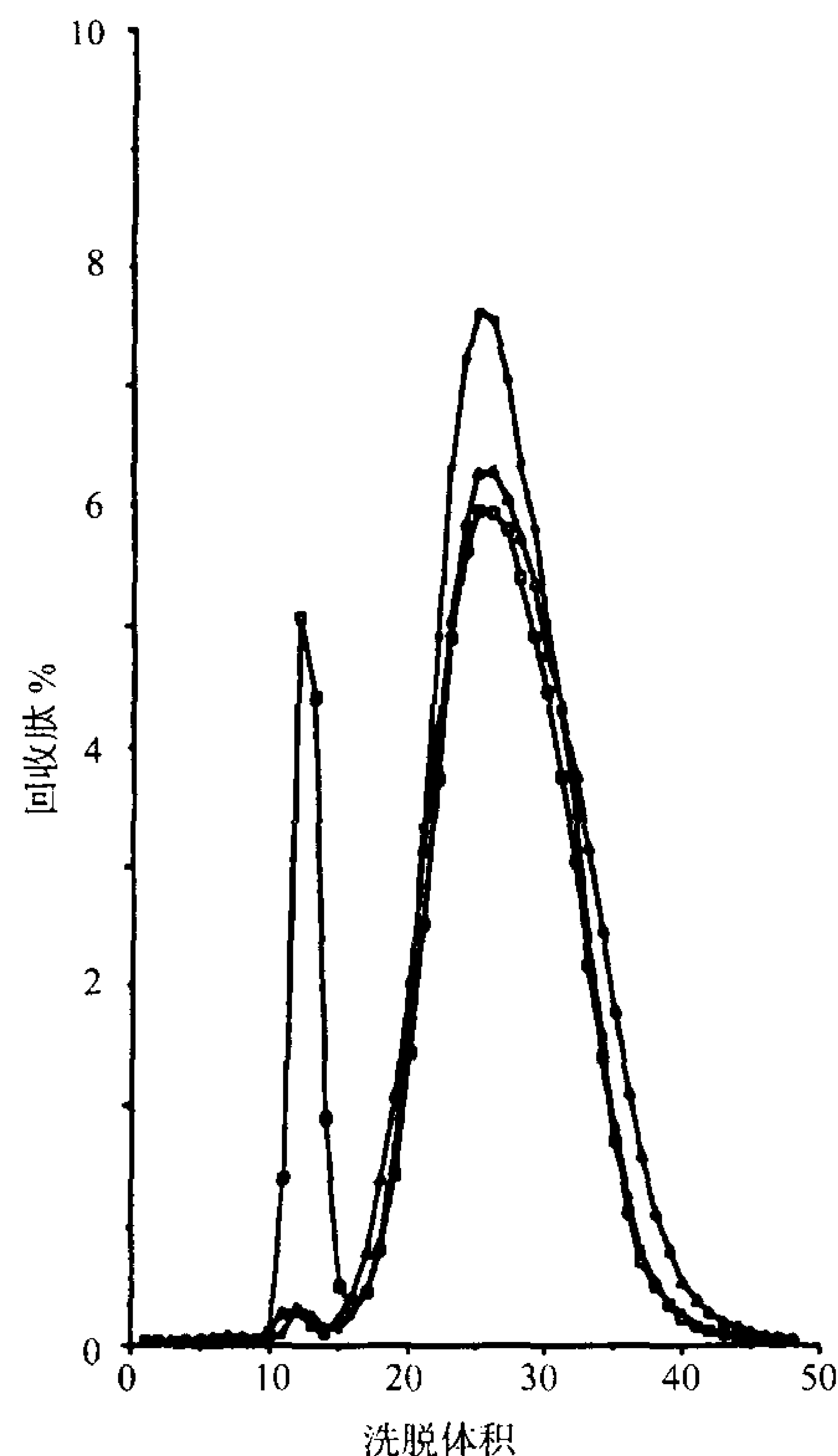


图 19.11　OVA323-339/Ia 复合物的凝胶筛选。去污剂溶液中纯化的 I-A^d 和 I-E^d（或明胶）与[^{125}I] OVA323 ~ 339 室温孵育 2 天，然后过 Sephadex G50 柱。收集洗脱体积为 1ml，检测放射性[318]。

表 19.8　MHC 限制与 MHC 结合之间的相关性

竞争肽		Ova + A^d	Myo + E^d	HEL + A^K	Cyto + E^K
Ova	323-339	+ + + +	–	+ +	+
Myo	106-118	+ + + +	–	+ +	+ / –
Myo	132-153	–	+ + + +	–	+ +
HEL	46-61	+	+	+ + + +	+
细胞色素 c	88-104	+ +	+ / –	+ +	+ + + +

Buus 等提供数据[321]。

相似地，通过应用 HEL52-61 肽特异性的 T 细胞克隆，每个氨基酸的替代后，其结合到 I-A^k 并激活该 T 细胞克隆的能力得到分析[325]。11 个氨基酸残基中 4 个氨基酸残基是静默的，而 3 个位置的替代可导致与 I-A^k 的结合力降低。剩余 3 个位置的氨基酸残基替代则会导致 T 细胞激活增强，而不影响与 MHC 的关联。该表位对替代非常敏感，即使是保守性的变化，如 Leu56→Ile（非 Leu 或 Val）。这些研究的结果通过竞争结合试验证实，MHC 分子含一个单独的、可饱和的肽结合位点。该位点肯定能结合较为广泛的抗原肽。抗原肽可能通过结合 MHC 分子而变得有导向性，并折叠一种有续的、能被 TCR 识别的结构。

有意思的是，以该种方式研究的 T 细胞的一种一级抗原结构根本不是肽，而应该是小分子酪氨酸-偶氮苯胂酸盐（Tyr-ABA）[133]。该分子是 T 细胞仅识别肽抗原而非碳水化合物或半抗原的规律的一个例外。实际上，其他半抗原，如三硝基苯，只有连到肽上才可以结合 MHC 分子[326]。而 Tyr-ABA 结构似乎与下述的肽有些共同点。在经典结构-功能研究中用的是一系列有机同源物。结构中经定位分析认为是可被 TCR 识别的“表位”的部分，经确定是胂酸盐负离子基团和酪氨酸部分的氨基酸两性离子（NH^{3+}，COO^-）。定位分析认

为,与 MHCⅡ类分子相互作用的部分是含两个酪氨酸苯环和苯胂酸盐、以偶氮基相连的平面结构。这样,这个非肽抗原结构是两性分子性质的。其中,平面苯环结构能与某些苯环链(富集在 MHC 分子的肽结合槽底部)相互作用[212,213,327-332]。因此,虽然目前尚没有一系列能解释抗原呈递和 T 细胞识别特异性的通用法则、原理,但上述这些研究,结合 MHC 分子[176,212,213,322,327~334](见第 8、9 章)和 TCR[335~341](见第 10 章)的抗原相互作用部分的补充性结构研究,将最终使我们彻底了解这类通用原理和法则。

这类结构-功能研究的一个发现是,一个肽能以不止一种方式结合到一个 MHCⅡ类分子上,这可通过不同定位、不同构象的不同 T 细胞来发现[324,342]。该结论来自下述研究:用单个氨基酸替代的一系列肽与同一个 MHCⅡ类分子,以两个不同的 T 细胞克隆来识别,再用非活性肽与野生型肽竞争与 MHC 分子的结合。当用两个不同 T 细胞克隆分析时,有几个氨基酸残基令人迷惑地逆转其与 TCR、MHC 分子的结合作用[324]。提示我们不能定义不依赖所应答 T 细胞而总是结合 MHC 分子的肽抗原的一个独特部分,但该肽抗原被不同 T 细胞克隆所识别时,该作用可能由不同的残基所发挥。

用完全不同类型的试验可得到相同的结论,该试验将突变引入 MHC 分子。不能直接与 TCR 相互作用的 MHC 分子肽结合槽底部的突变,能影响肽被一个 T 细胞克隆而非另一个克隆的识别[343~345]。在一个研究得非常透彻的试验中,已明确肽结合的定量水平未被突变所影响,但肽结合槽底部的变化改变了肽上的构造,而影响了被不同 T 细胞的识别[345]。如果 TCR 不能检测到 MHC 分子的突变(除非间接通过它对肽构象的影响作用),则我们可能要得出这样的结论,即不同 T 细胞对结合到同一 MHC 分子的同一肽抗原的不同的构象突变具有优势性。

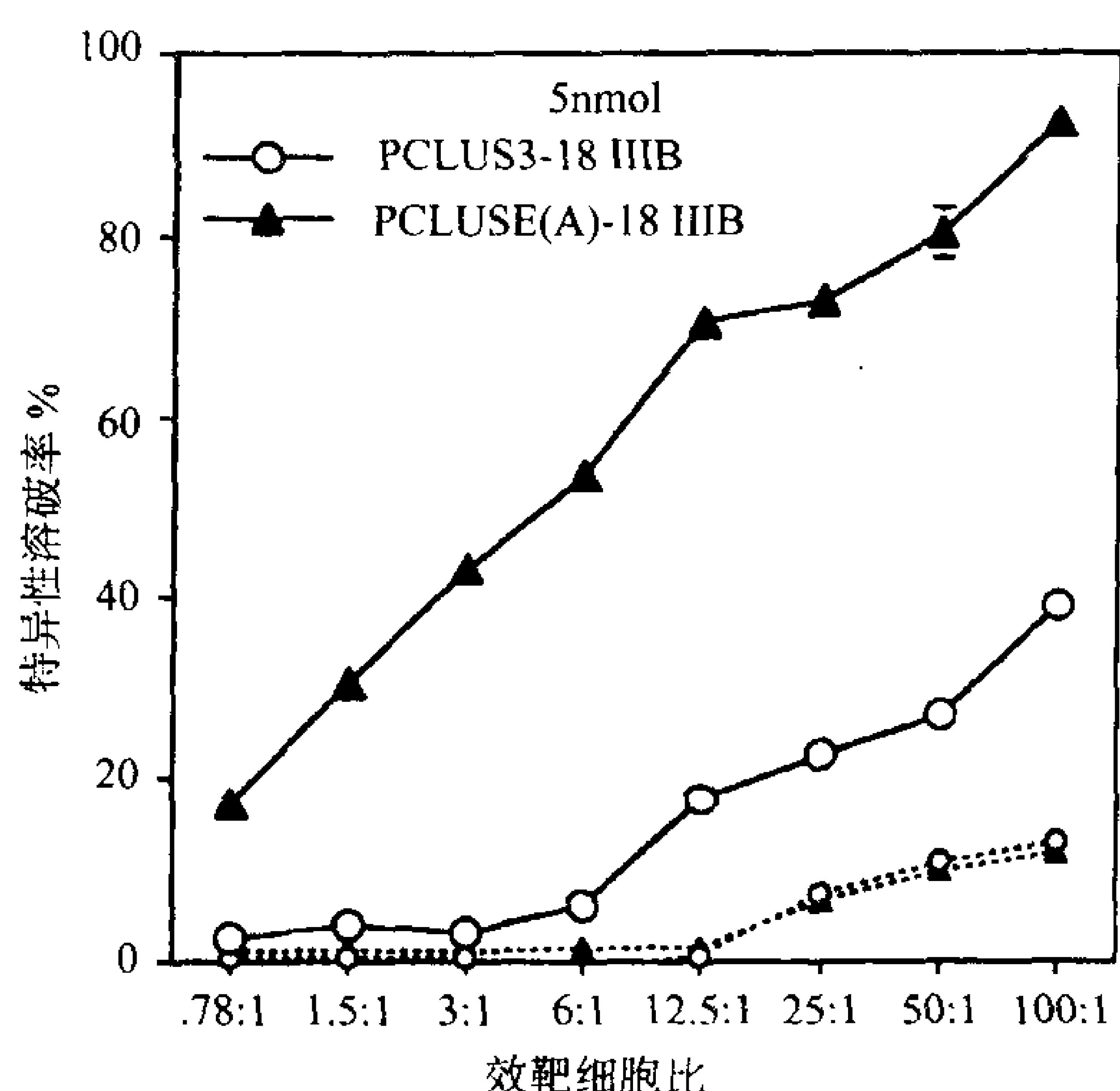


图 19.12 通过肽 MHCⅠ类分子结合部分的修饰,提高 $CD4^+$ T 细胞辅助,而提高肽疫苗诱导 MHCⅠ类分子限制性 CTL 的免疫原性。肽苗 PCLUS3-18ⅢB 含一个 MHCⅡ类分子结合辅助区,含一簇 HIV-1 包膜蛋白 gp100 中的交叠表位和一个 MHCⅠ类分子结合的 CTL 表位 P18ⅢB。通过用 Ala 置换 Glu 残基修饰辅助性表位,以去除一个不利的负电荷,可提高与 MHCⅡ类分子的结合[346]。在此,引入辅助性表位的相同修饰,制备 PCLUS3(A)-18ⅢB,结果可极大地提高 MHCⅠ类分子结合的 P18ⅢB 部分体内诱导 CTL 的免疫原性。用 5nmol 的任一种疫苗构建物与褐煤酸盐 ISA51 佐剂一起免疫 A.AL 小鼠,所得脾脏细胞用 P18ⅢB 体外培养、刺激一周时间,用修饰的二代疫苗免疫的小鼠和用天然顺序的原始构建物免疫的小鼠进行比较,前者产生的 CTL 可对 P18ⅢB 包被的靶细胞特异性溶破多 33 倍的溶破单位。因此,MHCⅡ类分子限制性的 $CD4^+$ T 细胞辅助对诱导产生 MHCⅠ类分子限制性 CTL 有重要影响,这种提高表位免疫原性的过程可用于制备比天然病毒抗原更有效的疫苗。靶细胞:BALB/c 3T3 纤维母细胞,用(或不用)P18ⅢB 包被[355]。

自此类研究中得到的另一个发现是,通过引入优势负相互作用或干预基团,氨基酸替代经常影响 MHC 的呈递和 T 细胞的识别,而只有很少残基对肽结合实际上很关键[346]。对Ⅰ类[350]和Ⅱ类[346~349] MHC 的结合,只要很少一些关键氨基酸残基保留,则大多数残基虽被 Ala(或有时 Pro)所替代,也不会丢失 MHC 结合力。当然,T 细胞识别可能需要保持其他残基。如果许多氨基酸侧链对与 MHC 分子的结合并非必需,则可以推测:非关键氨基酸的侧链在某些情况下只有通过直接或间接干预结合而对构象发生深远影响。这正是我们在 HIV-1 包膜蛋白的辅助表位所观察到的现象,该不规则变化肽(能比相应的野生型肽抗原低很多的浓度激活 T 细胞)是通过将一个负电荷 Glu 替换为 Ala 或 Gln(它们分子质量相同,但没有电荷)而得到的[346]。Asp 带负电荷,但分子质量较小,行为像 Glu。因此该残基对与 MHCⅡ类分子的结合不是必需的,但一个带负电荷的侧链可干预与 MHC 分子的结合,这可用于竞争试验研究。这些结果对 MHC-肽相互作用的化学和对设计更有效的合成肽疫苗有重要提示意义。对能干预结合的氨基酸残基的了解使我们精练了 MHC 结合肽的顺序片段,并更有助于可靠的预测 MHC-肽的结合。

该观测数据也提供了一个通过表位增强而设计更有效的疫苗的新方式,即修饰表位的内部顺序,以使它们更有效(例如通过提高对 MHC 分子的亲和力)、或更有能力更加广

681

泛地诱导一种病毒的多种病毒株特异性的交叉反应性 T 细胞[352~355]。最近得到了用该方式能设计出更有效的肽疫苗的证据[355]。上述提到的[346]HIV-1 包膜蛋白的修饰后的 T 细胞表位(Ala 替换为 Glu),在体内免疫中可比野生型 HIV-1 肽以低 10~100 倍的剂量诱导野生型肽特异性的 T 细胞增殖反应。而且,当一个用该辅助表位与一个 CTL 表位连接[356~358]而构建的肽疫苗再进行相同的 Glu→Ala 替换修饰后,它能比原疫苗更加有效地诱导该 CTL 表位特异性的 $CD8^+$ CTL,并能多诱导 33 倍的 CTL 溶破单位[355](图 19.12)。通过用表达相同 MHC Ⅰ类分子的小鼠递呈 CTL 表位和相同背景的基因论证效应的 MHC Ⅱ类分子联接性,表明上述构建疫苗的效应提高是因为其与递呈辅助表位的 MHC Ⅱ类分子的相互作用[而不是一些非特异性效应(如肽稳定性)]得以提高,但其 MHC Ⅱ类分子有所不同。对照组小鼠 MHC Ⅱ类分子可较好地呈递野生型和修饰后辅助肽,并且两类构建疫苗的效应未表现出不同[355]。因此,MHC Ⅱ类分子限制的辅助作用在诱导 MHC Ⅰ类限制的 CTL 方面产生许多不同,而且表位增强可使我们构建更有效的疫苗。通过病毒或肿瘤肽顺序的修饰而提高肽抗原免疫原性的其他例子也有一些[359,360]。

在 MHC Ⅰ类分子,关于定义顺序结合基序的研究得到下述结论:即只有很少一些关键的锚残基决定了肽与 MHC分子结合的特异性(表19.9)[236,350,361~365]。这些基序是通过下述试验而定义的:通过对一种肽-

表 19.9 MHC Ⅰ、Ⅱ类分子结合的肽基序示例

MHC 分子	氨基酸残基数目								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ⅰ类									
H-2K^d		Y							I,L,V
H-2D^b					N				M,I
H-2K^b					F,Y			L,M	
H-2L^d		P			(philK,R)				M,L,F
H-2D^d		G	P		K,R				L
H-2K^k		E						I	
HLA-A2.1		L,M							V
HLA-A3		L	(F)						Y,K
HLA-B27	K.R	R	I,Y						K,R
	G		F,W						
Ⅱ类									
DRB1 * 0101	Y,V			L,A		A,G			L,A
	L,F								
I,A	I,A								
DRB1 * 0301	L,I			D		K,R			Y,L
	F,M					E,Q			F
	V								
DRB1 * 0401	F,Y			no		N,S	pol		pol
(DR4Dw4)	W			R,K		T,Q	chg		ali
						ali			K
DRB1 * 0402	V,I		no			N,Q	R,K		pol
(DR4Dw10)	L,M			D,E		S,T	H,N		ali
						K	Q,P		H
DRB1 * 1501	L,V			F,Y			I,L		
(DR2b)	I			I			V,M		
							F		
DQA1 * 0501	F,Y				V,L		Y,F		
DQB1 * 0301	I,M				I,M		M,L		
	L,V				Y		V,I		

注:pol:极性; chg:荷电; ali:脂肪族的; phil:亲水性的。
数据来自参考文献[236]、[350]、[361]~[365]。

MHC 系统的详细研究[363];通过自 MHC Ⅰ类分子上洗脱下的天然肽的混合物测序并发现在该顺序的某些位置,同一个氨基酸残基被大多数该类肽所共享[361];通过分离、测序自 MHC Ⅰ类分子上洗脱下的个别天然肽并发现在该顺序的某个位置存在一个保守性残基[362]。后两种试验同时也发现,自 MHC Ⅰ类分子上洗脱下的天然肽长度基本相同(8~9 个氨基酸残基),这通过对自 HLA-A2 分子上洗脱下的更多的肽的顺序质谱分析结果而得到进一步证实[364]。该发现与其他试验结果相一致,都揭示九肽比更长的肽更能有效地被 MHC Ⅰ类分子递呈给 T 细胞[366,367]。这种长度的保守性对成功测序自 MHC Ⅰ类分子上洗脱下的肽混合物是非常关键的[361],因为这样一种方法需要那些保守性的氨基酸锚残基到肽的 N 端都应是相同距离。Edman 降解法测序是自 N 端顺序开始的。在许多无关肽的混合物中,在大多位置都有望发现近 20 种不同的氨基酸,无一例外,这正是在混合物的大多数位置可发现的现象。而 Falk 等[361]在某个位置可发现一个单独氨基酸(如自 K^d 洗脱下的肽的位置 2 发现的 Tyr),不仅提示大多数甚至所有的结合到 K^d 的肽都有一个可联接的 Tyr,同时也提示肽在联接之前已经结合到 MHC 分子上,而且每个肽只以一个残基 N 端联接到 Tyr。该结果意味着肽的 N 端残基位置是固定到 MHC 分子的(即使其侧链可变化),并且提示处理过的肽必须修饰到合适大小,以使不会有其他部分(至少其 N 端)漏出 MHC 的肽结合槽。正是该现象使我们可更直接地确定 MHC Ⅰ类分子的结合基序,但不能确定 MHC Ⅱ类分子的结合基序。

该结论可被 MHC Ⅰ-肽复合物的 X 射线晶体学数据所印证、解释[330~332]。N 端 α 氨基基团和 C 端羧基基团固定于 MHC 结合槽两端的口袋内,与何种氨基酸占据这些位置无关,剩余的其他氨基酸则以一种或多或少的扩展构象跨越这些固定点。可跨越这些口袋之间的距离的最小氨基酸长度是 8 个残基,但 9 或 10 个氨基酸残基长度可在肽的中部形成微小的弯曲或 β 转角,这可解释氨基酸长度的较窄的限制性。这些末端之间,结合槽中一个或两个口袋能容纳一个氨基酸的侧链,通常或者在位置 2 结合于 B 口袋内,或者在位置 5 结合于 C 口袋内,取决于特定的 MHC 分子。C 端残基的一个额外的侧链可结合于结合槽末端的口袋内。固定于口袋内的这些残基正对应于锚残基,在位置 2 或 5、8 或 9,由顺序基序定义,而且可能是肽结合特异性的首要决定因素,因为其他的相互作用大多是与肽骨架的原子之间,包括 α 氨基基团和羧基基团,所以与顺序特异性无关。该发现可解释能够与一个 MHC 分子结合的肽的范围,因为大多数该类结合仅涉及所有肽都有的肽骨架原子;也可解释结合的精确特异性是由决定 Ir 基因控制反应性的锚残基所确定的。

相反,自 MHC Ⅱ类分子上洗脱下的天然自身肽[211,368]的长度是多变的,13~18 个残基不等,而且发现同一肽的几个不同变异体是因为在一端或另一端有不同长度的额外顺序存在。该发现提示,与 MHC Ⅰ类分子不同,MHC Ⅱ类分子肽结合槽的两端都是开放的,所以额外长度的肽的任一端都可漏在结合槽外,而且对它的修饰也不是极为精确的。但可推论,自 MHC Ⅱ类分子上洗脱下的肽,其基序可能不是天然连接的,这也是研究所发现的。虽然自小鼠 MHC Ⅱ类分子 I-A^d 上洗脱下的肽,与以前基于已知的结合到 I-A^d 的抗原肽所定义的基序[369]相符,但该基序不象在 MHC Ⅰ类分子中那样得到清楚定义和高度保守,而且需要人工操作连接顺序以确定基序[368]。结合人 MHC Ⅱ类分子的一些肽基序已得到定义[236,370~375]。一种结合人 MHC Ⅱ类分子的肽(DR1)的晶体结构表明,结合槽的末端是开放的,而且该肽可以任何两个方向延伸到结合槽外[212,213,376]。骨架氮氨基化合物和羰基基团提供了可供结合的保守位置,而不是固定在 MHC Ⅰ类分子结合槽内的末端,而且固定于已定义 MHC 口袋内的锚残基也像 MHC Ⅰ类情况那样保证了特异性,并说明了结合基序。

T 细胞受体识别

作为潜在的抗原决定簇,所必须克服的最后一个障碍是被反应系统中的 TCR 所识别。与抗体不同,如果 TCR 缺乏体细胞突变,该反应系统可被基因组(该基因组能组合在一起形成适当的受体)中的 V、D、J 基因组合的有效性所限制[337,377],还可被胸腺或外周阴性选择所介导的自身耐受所限制,或者被胸腺中对存在自身 MHC-肽复合物的阳性选择系统的限制所限制。有效的系统也可能因预先暴露于交叉反应性抗原而受到影响。总之,在该系统中发现漏洞是非常困难的[378]。而且,比较小鼠和人的 TCR 系统对 HLA-A2.1 呈递的肽的识别表明,它们都能识别相同系列的肽抗原[379]。源自丙型肝炎病毒(HCV)蛋白的 11 个肽,每个皆含一

个结合 HLA-A2.1 的基序,用于检测 HLA-A2.1 转基因小鼠和人 HLA-A2.1-阳性 HCV 感染病人的 CTL 对它们的识别。被小鼠 T 细胞识别的 4 个肽也同样被人 T 细胞所识别,而其他肽皆不被小鼠和人 T 细胞很好地识别。至于哪个肽被选择识别,似乎是由结合到 HLA-A2.1 分子所确定,而非 T 细胞的可用性。因此,虽然小鼠和人的 TCR 基因不同,但 TCR 系统却是可塑性的,如果一个肽抗原克服了其他三个障碍(处理、转运和与 MHC 分子的结合),则 T 细胞可被诱导对任何一种物种的肽产生应答[379]。

另一方面,研究证明,MHC 结合并不是故事的全部。Schaeffer 等[380]用 MHC Ⅱ 类分子检测了覆盖葡萄球菌核酸酶序列的 14 种交叠肽,构建了 54 个不同的 MHC-肽组合。很明显,MHC 结合发挥了重要作用,因为 13 个免疫原性肽中有 12 个是 MHC 分子的高度或中度亲和力的结合物,而 37 个较差亲和力的结合物中只有 1 个是有免疫原性的。5 个高亲和力结合物都是有免疫原性的。但是 12 个中度亲和力的 MHC 结合肽中,只有 7 个是有免疫原性的。因此,单纯 MHC 结合本身不足以保证免疫原性。T 细胞库可能是一个限制免疫原性肽谱的因素。

在 TCR 系统水平的筛选是有一些例证的。Moudgil 等[381]介绍了一个特别好的例证,即由 I-A^k 呈递的小鼠溶酶体肽 46~61 被表达 I-A^k 和 I-E^k 的 CBA/J 和 B10.A 小鼠的 T 细胞所识别,但不能被只表达 I-A^k 的 B10.A(4R)小鼠的 T 细胞识别,虽然 B10.A(4R)小鼠的 APC 也能将肽呈递给其他鼠系的 T 细胞。B10.A(4R)小鼠的 T 细胞能对 46~61 变异肽(C 端 Arg 被替换为 Ala、Leu、Phe、Asn 或 Lys)产生应答,提示 C 端精氨酸阻碍了 T 细胞识别,但不与 I-A^k 结合,而且该种情况下,也不处理肽,因为 B10.A(4R)小鼠的 APC 能递呈该肽。说明上述 T 细胞识别阻滞妨碍了 B10.A(4R)小鼠 TCR 的识别,但不妨碍 CBA/J、B10.A 或[B10.A(4R)×CBA/J])F_1 小鼠的 TCR 识别。由于 B10.A 小鼠与 B10.A(4R)小鼠基因同源,该差异不是非 MHC 连锁的基因(如 TCR 结构基因)或产生自身耐受的非 MHC 自身抗原。而且,由于 F_1 小鼠也产生应答,所以该差异不是因为 B10.A(4R)小鼠的自身抗原对 T 细胞库产生漏洞所致。结论是 CBA/J 和 B10.A 小鼠含一个额外的 TCR 系统,在 I-E^k 水平或可能在 H-2D/L MHC Ⅰ 类水平阳性选择,能够不管 C 端 Arg 而识别 46~61 肽。另一个解释是,表达 I-E^k 或 D^k 或 D^d/L^d 的小鼠存在一个额外的 TCR 系统,该系统在 I-A^k 水平阳性选择,该 I-A^k 呈递从胸腺内的其他 MHC 分子处理得到的自身抗原。后种解释的优势在于,TCR 系统基于 I-A^k 进行阳性选择,而不是 I-E^k 或 MHC Ⅰ 类分子,所以它更可能识别 I-A^k 呈递的其他肽。该例证表明,TCR 的微细变化(可能通过阳性选择引起)能导致对那些已经通过了处理、转运和 MHC 结合的抗原决定簇的反应性或无反应性。

表位图谱

T 细胞对含完整抗原决定簇的抗原肽片段应答,这使绘制 T 细胞识别的抗原位点的精细定位图谱成为可能。一系列交叠肽可用于浏览整个蛋白质序列,以发现抗原性位点。然后将肽在任一端截断,最小的抗原肽就可确定下来。例如肌凝素蛋白,其一个关键的氨基酸残基(例如 Glu109 或 Lys140)的发现,就是通过比较激活性或非激活性的肌凝素变异体序列和 CNBr 大切割片段序列[174],然后将一系列含关键氨基酸残基的肽截断,分别合成不同长度的交叠肽[146,150]。由于肽固相合成是固定 C 端,向 N 端延伸,所以可在不同的位置停止合成,以产生一系列不同长度的肽。以该种方式,发现两个 Glu109 特异性的 T 细胞克隆对 102~118 合成肽和 106~118 肽应答,而对 109~118 肽不产生应答[150]。一个克隆对肽 108~118 产生应答,而另一克隆产生不应答。因此,被一个克隆识别的肽的 N 端是 Ser108,而另一克隆需要 Phe106 和(或)Ile107。相同的精细特异性差异也在下述一些肽特异性 T 细胞克隆中发现:HEL 的肽 52~61 和 74~96[143,175,176]、鸡卵清蛋白肽 323~339[144]、和鸽子细胞色素 c 肽 81~104[149];被几种 T 细胞克隆识别的表位是交叠的,但也是明显不同的。而且,有 9 个 T 细胞克隆还识别肌凝素的一种抗原决定簇(定位于 Lys140 周围),每个都对溴化氰切割片段132~153 产生应答[173]。用一系列合成肽(肽 135~146、肽 136~146、肽 137~146)进行深入研究表明,激活功能序列包含于肽 136~146,而对用羧基肽酶 B 和 A 处理过 C 端的肽的研究表明,Lys145 是必需的,Tyr146 虽然是抗原有效性所需的[146],但在此处并非必需。这些及其他一些关于 T 细胞识别表位的试验所得出的结论是:它们是片段性的抗原决定簇,含 12~17 个氨基酸残基(MHCⅡ类),或 8~10 个氨基酸残基(MHFCⅠ类)。在这种长度内,它们

684

必须包含所有的必需信息，以被 APC 处理后仍可存活，与 MHC 抗原关联并结合到 TCR。

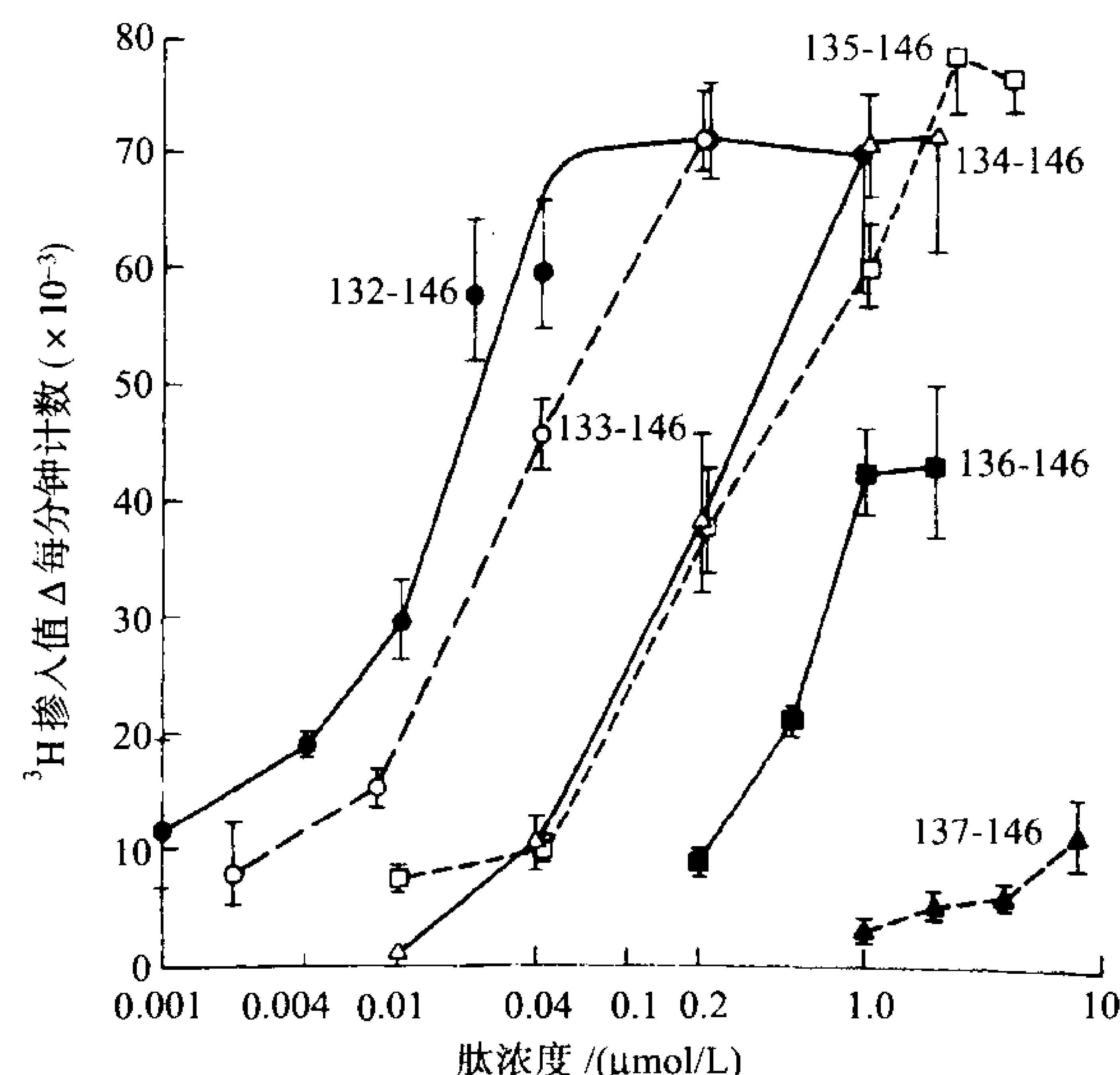


图 19.13 T 细胞克隆 14.5 对抹香鲸肌凝素 132～146 顺序的一系列合成肽的增殖反应。对这些只有 N-端一个氨基酸不同的肽的应答的比较表明，Lys133 对有效性非常重要，但在不是抗原性的关键；Glu136 对抗原性是关键的。增殖反应背景是每分钟计数 5561[146]。

氨基酸替代法定位和改变肽配体的效应

一旦抗原肽得以确定，下一步就是通过构建一系列不同的肽，这些肽每个都不同于天然肽，其中一个氨基酸被替代了，从而定位关键氨基酸。一种途径是丙氨酸扫描，将肽中每个位置的天然氨基酸替换为 Ala，或用 Ser 或 Gly 替换自然发生的 Ala。用 Ala 是因为其侧链仅为一个甲基基团，所以它可以最小形式替代任何功能侧链；而 Gly 则不行，由于其对构象的影响而不被使用。因此，可以提问：是否缺失自然发生的侧链、而同时未引入一个新的侧链(本身就能影响功能的)会影响功能？一般的，每个肽会有几个氨基酸如果发生 Ala 替代会破坏肽的抗原性。这些有些是 TCR 的接触残基，而其他一些是 MHC 的接触残基。多数情况下，MHC 结合残基可通过以竞争性 MHC 结合分析法检测替换后的肽而得以确定。那些敲除了 T 细胞增殖、而未敲除 MHC 结合的氨基酸替代可能存在于 TCR 直接识别的表位中，这可通过另外的替换进行检测。例如，当同一个 HIV-1 V3 环肽 P18(308～322 位残基)被三种不同的 MHC 分子(人 MHC Ⅰ类分子、小鼠 MHC Ⅰ类分子和小鼠 MHC Ⅱ类分子)呈递(图 19.14)[382,383]时，可用该方法比较与 MHC 分子或 TCR 相作用的氨基酸残基。有意思的是，几个被上述三种 MHC 分子呈递的残基，其功能具有惊人的一致性(图 19.14)。例如，在上述三种情况下，Pro 和 Phe 都可与 MHC 分子相作用，而且同一 Val 也与 TCR 相作用。同时，在肽中间部位的同一 Arg 可与小鼠的 MHC Ⅰ、Ⅱ类分子相作用，而且 C 端的 Ile 是人和小鼠 MHC Ⅰ类分子的锚残基[382,383]。

TCR 可以区别不同化学类别的氨基酸侧链。被 TCR 所识别的氨基酸侧链之间的结构差异，其中一个例证来源于对可将同源性肽自不同株 HIV-1 包膜蛋白的 V3 环区别开来的非交叉反应性 CTL 的分析。在ⅢB 株(位置 8 残基为 Val)和 MN 株(位置 8 残基为 Tyr)中，最小决定簇中位置 8 的残基被确定为一个关键的表位性 TCR 接触残基[382,384,385]。ⅢB 株特异性的 CTL 不识别 MN 顺序，但会识别除该位置被替换为脂肪性氨基酸(如 Val、Leu 或 Ile)外与 MN 相同的肽[354]。相反，MN 株特异性 CTL 不识别ⅢB 顺序，但如果ⅢB 肽该位置的 Val 被 Tyr 所替代，则也会识别[384]。而且，它们能识别任何 Tyr 被另一个芳香氨基酸(如 Phe、Trp 或 His)替代的 MN 变异肽[354]。因此，两种非交叉反应性 TCR 识别相同的肽，但强烈地区别含芳香族氨基酸侧链和脂肪族氨基酸侧链的肽。另一方面，它们并不强烈地区分不同的芳香族氨基酸残基和不同的脂肪族氨基酸残基。但每一类，最低活性的是该类最大数量的 Ile 和 Trp，提示这些残基必须适配到 TCR 中有限尺寸的口袋内。

685

肽配体与 TCR 的相互作用可通过在接触残基部位引入单一保守氨基酸(如 Asp→Glu，Thr→Ser，Asn→Gln)替代而进行研究。TCR 可在单个氨基酸残基水平的这些微细变化基础上区别不同的肽，结果是有启迪性的。基于对 TCR 的不同亲和力，密切相关的(变化后的)多肽能诱发 T 细胞非常不同的应答。因此，虽然

一个氨基酸替代后的肽本身或许抗原性很弱或没有刺激性，但它仍可部分地作为一个激动剂，甚或在一个进行中的T细胞应答中作为一个强拮抗剂。拮抗肽可通过先用原始肽刺激APC得到证明，所以在加入T细胞前，人们不会通过用10倍或更高过量的拮抗剂进行刺激以检测对MHC结合的竞争。对HLA-DR1呈递的流感血凝素肽307~319而言，肽同源物，如Gln替代Asn313，它们并不刺激人T细胞克隆，而是抑制其增殖。但克隆无反应性也未得到诱导，拮抗肽必须存在于整个细胞培养过程中以抑制该应答[386,387]。因此，缺乏拮抗剂活性是肽（与MHC形成复合物）与TCR（是肽成为刺激活性的抗原决定簇所必需的）相互作用的另一个特征。

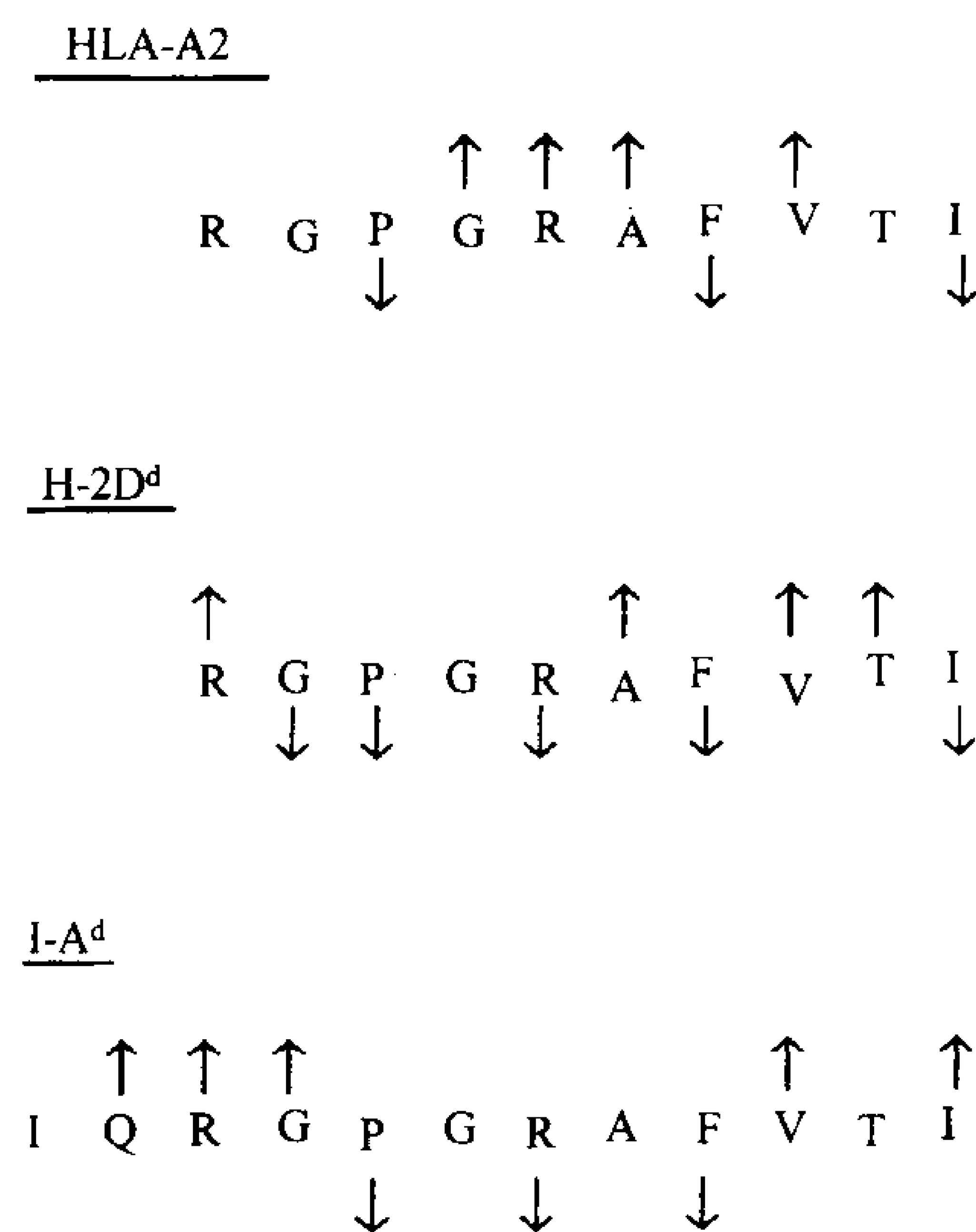


图19.14　同一HIV-1包膜蛋白V3环肽的MHC相互作用（抗原限制位）残基和TCR相互作用（表位）残基比较，该肽被人MHCⅠ、小鼠MHCⅠ、小鼠MHCⅡ类分子递呈给$CD8^+$、$CD4^+$ Th细胞。图示的是肽P18ⅢB（来自与每个MHC分子结合的HIV-1包膜蛋白V3环）的最适结合顺序的单字母氨基酸码。上指箭头表示确定与TCR相互作用的残基，下指箭头表示确定MHC分子相互作用的残基。与HLA-A2.1分子、小鼠$H-2D^d$分子和小鼠MHCⅡ类的$I-A^d$分子结合的氨基酸残基功能图谱已经得到描述[382,383]。注释结合三种MHC分子的通用残基Pro和Phe，结合TCR的关键残基Val。小鼠MHC分子应用Arg作为中心接触残基，而MHCⅠ类分子都用C端Ile残基作为锚残基。因此，存在惊人程度的和谐性。

部分激动剂是通过用等位基因形式的小鼠血色素特异性T细胞克隆而首先得到证明的。这些T细胞来自CE/J小鼠，在用Hb^d等位基因免疫后，表达小鼠血色素的Hb^s等位基因。最小的抗原肽对应于Hb^d的67~76位氨基酸残基，并与Hb^s在位置第72、73、76位进行区别[388]。69~76位氨基酸残基被替换的肽被用于检测T细胞增殖和细胞因子分泌。有些氨基酸替换能消除T细胞增殖，但不能消除IL-4分泌，这些肽叫作部分激动剂（图19.15）[389]。在结合竞争试验中，这些肽中只有一个以足够亲和力结合MHC并激活T细胞[390]。通过改变肽配体而得到的相同的细胞因子分泌形式的改变，在其他系统中也可见到[387,391,392]。

对一个Hb64~76特异性T细胞克隆而言，PL.17（氨基酸替代发生在位置70、72、73或76）如果保守氨基酸被替换了，可降低抗原效应达1000倍或更多。在位置72，Gln替换为Asn，可导致抗原性的完全消失（用T细胞增殖法或细胞因子释放法检测）。虽然上述两种试验中，Ala70被置换为Ser可抑制T细胞激活，但是仍明显存在对该肽的应答，因为它可降低IL-2受体的表达[393]。而一旦T细胞接触了Ser70肽，它们就会对继续接触天然Hb^d肽无应答能力。该现象极似T细胞无反应性（这可通过在化学固定的APC上呈递天然肽而诱导产生）[394]。在这两种情况中，继续用天然肽和APC刺激，无反应性T细胞也不能增殖，这种无反应性持续一周时间或更长。

686

Ser70氨基酸置换改变了肽对PL.17 TCR克隆的接触残基，并影响了其亲和力。但其它T细胞克隆能对在同一MHC分子（$I-E^k$）上呈递的该肽产生应答。在该位置发生氨基酸置换的其他Hb^d肽，如Met、Gly70，也能诱导T细胞无反应性，但不能诱导T细胞增殖；而非保守氨基酸置换，如Phe、Asn、Asp和His70，则不会[395]。

另一个研究得较为透彻的例证，是人HLA-DR1呈递的流感血凝素肽306~318。在已知肽-MHC复合物晶体结构[212]的基础上，氨基酸置换可定向在TCR接触残基上，如位置307、309、310、312、315和318[396]。在每个位置，非保守置换经常产生无活性肽，而几个位点的保守置换或者产生完全的抗原性，或者渐低其刺激活性，比天然肽低1000倍，但仍会保留诱导T细胞无反应性的能力。例如，用His或Gly替换Lys307使肽诱导T细胞增殖的能力降低1000倍，但仍有完全的诱导耐受的能力。相同，用His替换Lys315使肽完全丢失诱导T细胞增殖的能力，但几乎未丢失诱导T细胞无反应性的活性。同前，IL-2受体（CD25）的诱导是T细胞被这些变化了的肽配体所活化的标志（虽然它们不能诱导T细胞增殖）。这些肽与上述的拮抗肽不同，因为拮抗肽不能引起长期耐受。总之，现在已经确认，一些已改变的肽配体与MHC分子形成合适的复合物，诱导T细

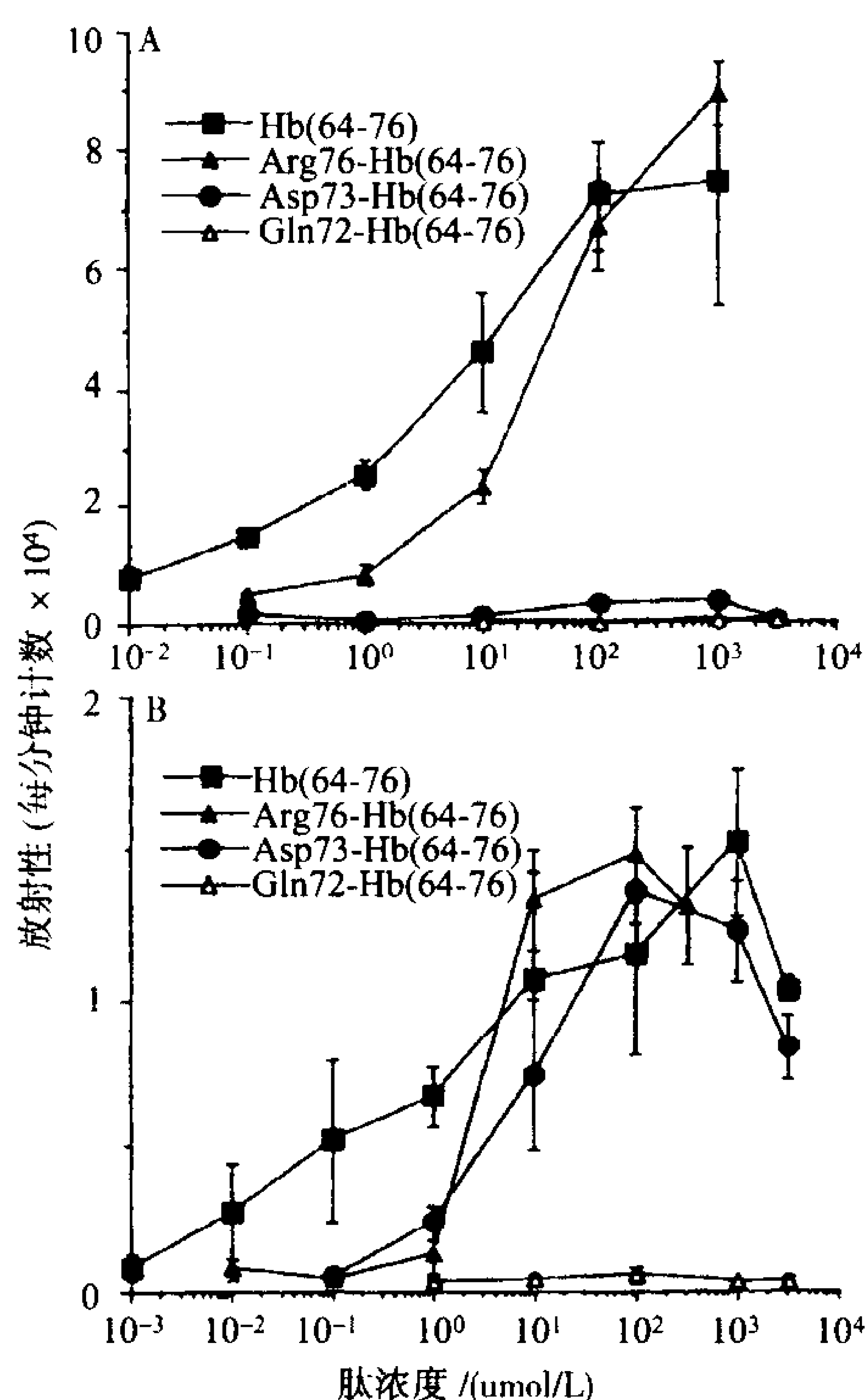


图 19.15 变化的肽配体对血球蛋白肽 64～76 应答的影响效果。A:T 细胞增殖反应,该 T 细胞系与 APC 和天然 Hb[64-76] 肽共孵育,或者与第 72、73 或 76 位发生氨基酸置换的肽共孵育。B:同等情况下,T 细胞分泌 IL-4 的情况。第 73 位的 Glu 被 Asp 替代的肽不能诱导 T 细胞增殖,但仍能诱导 IL-4 产生,所以它是部分激动剂。相反,第 72 位的 Gln 替换为 Asn 则会敲除两种反应[389]。

胞无反应性,或作为 TCR 的拮抗物通过传递中断信号而阻断被激动剂配体所诱导的 T 细胞活化[387]。

现已发现几种方法使 T 细胞对特异性抗原无反应一周时间,所有方法都是通过 TCR 传递部分信号,导致细胞耐受而非细胞激活。第一种方法是使 T 细胞接触碳双酰亚胺交联连接物 ECDI 处理的肽和 APC[394]。该处理方法可防止 APC 上的附属分子-TCR 复合物相互作用,或者防止共刺激信号参与 T 细胞活化。第二种方法是呈递 APC 上的肽与突变的 I-E 分子[397,398]。第三种方法是应用上述作为 TCR 拮抗物的已变化的肽配体[387,395,396]。由于一个完全刺激信号的产生需要 TCR 与附属分子的相互作用,影响任何成分的修饰行为都能阻断信号功能。一个已变化的肽配体,与已降低的对 TCR 的亲和力,可能形成一个不稳定的复合物,它们不能保持在一起足够长时间,以利用辅助分子并产生一个完全信号[399,400]。已变化的低亲和力 TCR 肽配体也能作为部分激动剂与最适激动剂竞争,并诱导基于相同机制(肽-MHC 复合物在 TCR 上停留短暂时间)的 T 细胞活化。

异常 TCR 信号可通过关注蛋白激酶活性而得以显示。正常信号使 TCR 亚单位(如 ζ 链)磷酸化,及受体相关酪氨酸激酶(如 ZAP-70)的磷酸化和活化。这些激酶产生 T 细胞活化所需的下游信号。但是,在每个研究中,部分抗原信号导致 ζ 链磷酸化,但没有 ZAP-70 的磷酸化和活化[395,398,399],所以下游活化不会发生。该异常形式的发生与诱导 T 细胞无反应性的方法无关。

部分信号对 T 细胞在胸腺中的阴性选择存活、或者在保持外周耐受中的存活方面可能都是重要的。通过处理自身抗原,使之成为胸腺中呈递的已变化的配体,则 T 细胞可利用无反应性诱导作为一个避免克隆缺失的成功策略。相同,外周耐受可能是防止自身免疫性疾病的一种重要机制。用已变化肽配体的免疫治疗可被认为是阻断进行中的应答反应或诱导针对特异性抗原耐受的一个途径。这在抑制我们不期望的免疫应答(如对变应原、对关节炎中的滑膜、或对自体移植排斥中的外源 MHC 抗原等)中可能是有用的。但是,一个潜在缺陷是:不同的 T 细胞以不同方式识别相同的肽,所以一个被某些 T 细胞克隆认为是已变化肽配体的肽,可能被其他 T 细胞克隆认为是完全抗原。而且,因 MHC 类型不同,对肽的选择也不同。为达到有效,一个已变化的肽配体应当拮抗多克隆 T 细胞或使之无反应性,并应当与每个病人的 MHC 类型协同。

T 细胞表位预测

如刚才所讨论的,T 细胞只识别另一细胞表面的蛋白抗原,而且只在抗原处理(或者切割为有效片段、或者结构展开)之后。这导致 T 细胞识别抗原的尴尬情形,它比由 TCR、抗原、MHC 分子之间的三级复合物的抗体识别更加复杂,它可能关注的是比大多天然抗原特异性抗体所需的更简单的结构。与许多抗体所识别的、组装的拓扑抗原位点[42,43]相反,处理后抗原特异性的 T 细胞限于识别连续结构的短片段[138,193]。因此,蛋白质的三级结构在 T 细胞识别的表位结构中几乎不发挥作用,尽管它在确定蛋白质被处理的方式中发挥一定作用,并因此间接地影响哪个表位是 T 细胞识别可用的。然而,T 细胞抗原位点结构本身必须限于一级和二级结构,后者只依赖于局部而非长距离的相互作用。该限制极大地简化了确定对 T 细胞识别非常重要的

结构特性的问题，因为这些序列信息现在可通过 DNA 获得，而不必先获得纯化蛋白，而对二级结构也不用先获得天然抗原的 X 射线晶体衍射学三维结构(这是非常困难的事情)。

这些特征通过允许使用合成短肽和不保留蛋白天然结构的重组片段，而大大有利于被 T 细胞识别的抗原位点的结构分析。比较轻松的产生交叠肽和截断肽及顺序变异物，与蛋白质一级、二级结构的优势特征的研究限制一起，使对确定在抗原位点预测中有用的蛋白质结构特性的研究大量涌现。 687

由于一个肽能被 T 细胞识别所必需的关键特征是其与 MHC 分子结合的能力，所以大多预测 T 细胞表位的方法都是基于预测与 MHC 分子的结合。最近阐述的这些方法[401,402]可分成两类：一类是那些用于特异性个别 MHC 分子的方法，如基于基序的方法；另一类是寻找肽序列的共同结构特征的方法。我们应当首先讨论基于共同特征的方法，然后才是指向个别 MHC 分子的方法。

与 T 细胞表位关联的氨基酸序列的第一个结构特征是螺旋两性特性[188,203,204,403,404]。虽然该特性与螺旋性相关联，早期确定与鸽子细胞色素 c 的免疫优势位点相关[149,202,205]，但其有不依赖形成螺旋的趋势的统计学重要性[204]。由于 MHC Ⅰ类分子[330~332,405]和 MHC Ⅱ类分子[212,406]的 X 射线晶体衍射结构表明肽分子结合到延展性的、非 α 螺旋的构象中，螺旋性/se 作为 T 细胞表位相关结构特征被丢弃了。然而，对两性结构的其他解释发现，不需要该肽分子以一个 α 螺旋结合到 MHC 分子。两性特征是同时含有亲水性和疏水性结构区的特性。观测数据表明，血色素的免疫优势 T 细胞表位对应于两性螺旋[146,150]。为确定该观测数据是否为血色素(含一个高度螺旋区)所特有，或者是否在其他蛋白中也是免疫优势性表位，DeLisi 和 Berzofsky[203]发展了一个运算法则，以寻找可折叠成两性螺旋的蛋白序列片段。该方法基于如下的设想：由于亲水性是疏水性的负面，所以蛋白序列中的氨基酸的疏水性必须围绕一个两性螺旋振荡。疏水性氨基酸残基排列在一侧，亲水性氨基酸残基排列在另一侧，这种振荡的周期必需与螺旋的结构周期大致相同(图19.16)。这对一个 α 螺旋，是每个转角 100 度(每个转角 3.6 个残基，每 3.6 个残基 360 度)对一个 3_{10}螺旋，这为每个转角 120 度(每个转角 3 个残基，每 3 个残基 360 度)。

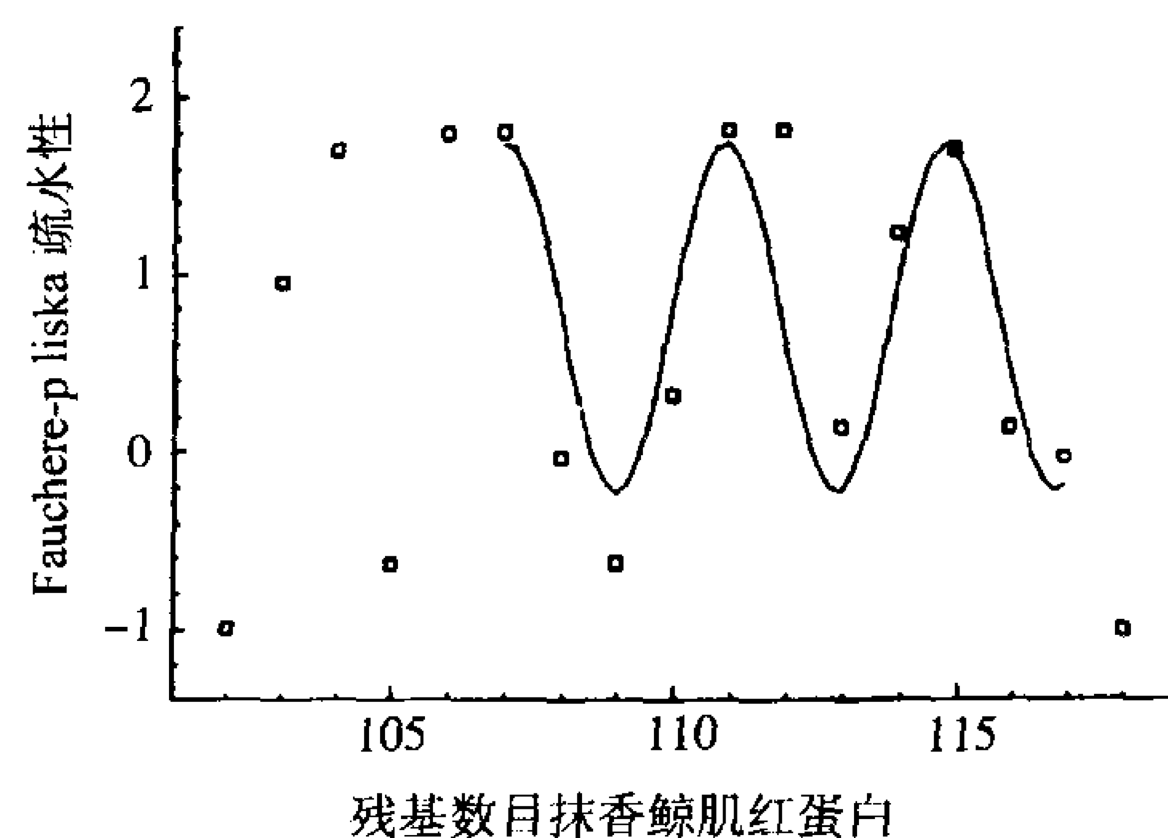


图 19.16 抹香鲸血球素 102～118 中，每个氨基酸的疏水性，根据 Fauchere 和 Pliska 的数值范围[468]，作为氨基酸序列的一个功能，显示对疏水性顺序的正弦函数的最小二乘拟合。

执行该分析的一个计算机程序已经发表了[404]。后来，Margalit 等[188]通过比较一些相关运算法则将原来的方法进行了最适化[203]，并发现对短片段，一个正弦函数的最小二乘最优拟合[407]比傅里叶变换式更有效。该运算法则正确地确定了扩展数据($p<0.001$)中的 12 个蛋白分子中、MHCⅡ类相关的 23 个免疫优势 Th 细胞抗原位点中的 18 个[188](表 19.6)。实际上，如果再包含新发现的 Th 细胞决定簇，以扩展数据达 2 倍、4 倍原大小，相关性仍保持高度重要性，预测位点的片段保持仍相对稳定(48 个位点中的 34 个 = 71%，$p<0.003$；92 个位点中的 61 个 = 66%，$p<0.001$)[408,409]。但是，很明显，一个大小相当的抗原决定簇的片段不会有此特性。

在最初研究时，只有极少的由 MHC Ⅰ类分子呈递给 $CD8^+$ CTL 的肽得到鉴定。但是，后续分析 MHC Ⅰ类分子呈递的 51 个肽表明，33 个(65%)可以折叠为两性螺旋($p=0.05$)。而且，11 个自 HLA-B27 分子上洗脱下的天然内源肽[362]中有 7 个有该种特性，11 个对照肽中，只有 2 或 3 个肽有上述特性($p=0.02$)[409]。因此，MHC Ⅰ类分子呈递的位点的相同片段也能折叠为两性螺旋。在一些 T 细胞表位中发现的一级顺序与两性螺旋的一个转角相一致[410]。另一种方法(螺旋条带运算法则)用疏水性条带沿一面而下寻找螺旋结构，也发现在两性螺旋与 MHC Ⅰ、Ⅱ类分子递呈的决定簇之间存在关联[403,411]。

最近的研究提供了至少两种解释，它们并不相互独立，因为该种相关性是在没有螺旋结构时，在结合到 MHC 分子的肽抗原中发现的[412]。首先，结合到 MHC Ⅱ类分子的肽的晶体结构揭示，肽分子是结合在一个延展的构象里，但像Ⅱ类多聚脯氨酸螺旋那样，有一个 130 度的扭转[212,406]。第一个这类结构是结合到 HLA-

DR1 的一个流感肽[212]，由于该类扭转而具有两性特性。虽然这个 130 度的扭转与 α 螺旋截然不同，但它的周期基本相同，以致检测该类两性螺旋周期的计算法则可获得此信号。其次，结合到 MHC Ⅰ、Ⅱ类分子的肽的基序中，锚残基之间的间隔与 α 螺旋转角之间的间隔（如位置 2 和 9 之间，像两个螺旋转角间那样隔 7 个残基；如位置 5 和 9 之间，间隔像一个螺旋转角）是一致的[412]。由于锚残基通常是疏水性的，该种形式产生一种只为一个锚残基的两性周期模式（像一个两性 α 螺旋），这可在大多数基序中见到[412]。因此，如果另一残基有一种无规形式，即使肽是结合到一个延展构象里，单独锚残基间隔（被结合这些锚残基的 MHC 分子的口袋的间隔所加强）也将会产生两性螺旋信号。这种两性螺旋周期支撑起肽的 T 细胞表位[412]，并成为确定潜在表位的一种有效的预测工具，如果不希望研究工作集中到个别 MHC 等位基因上，它可成功地用于一些研究中。

预测 T 细胞表位的其他方法一般是基于已发现的结合到 MHC 分子的序列[401,402]。最简单的方法是应用标准顺序搜寻法则，对已知蛋白顺序进行能结合特定 MHC 分子的肽结合基序定位，所用肽基序是文献中所确定的基序[236]。该方法最早在产单核细胞利斯特氏菌[413]和疟疾[414]蛋白的肽中成功应用，但现在很明显只有约 30%顺序含真正结合相应 MHC 分子的基序[413,415,416]。这种差异可能与非锚残基产生的不利相互作用[346,351,417]相关，而且在某种程度上可通过产生含肽顺序中每个残基的作用的延展基序而克服之[351]。这些不利的相互作用可通过下列方法而得以确定：通过检测不同氨基酸置换的肽抗原[346,351]；或通过将不同组别的、与给定 MHC 分子结合的肽和已知不能结合这些 MHC 分子的肽进行比较，检测在结合/不结合相关的不同位点的、不同模式的化学特征（如电荷、亲疏水性、氢键形成潜力、分子质量大小等）。

为确定能否用高密度基序定位那些结合多 MHC 分子的蛋白区域，Meister 等发展了 Epimer 运算法则，它能确定每个顺序长度的基序密度[418]。得到的一个令人惊奇的结果是：基序并不是均一分布的，而是簇集存在的。因此，就会有某些蛋白质片段相对缺乏基序，而在一个较短的片段内可能含高密度的交叠基序。这种簇集可能反映了许多基序是相关的，而且相同的锚残基被几个基序所共享，或许是因为 MHC 分子也是相关的，且其定义某些结合口袋的可变部分有时被基因颠覆事件所交换[419]。对 HIV 而言，MHC Ⅰ 的结合基序密度在定位的高低两端都是不规则的[420]。在高端的簇集可能是因为锚残基共享并表现出与该顺序的保守区和可变区无相关性。但是，在低端的簇集，低基序密度延伸在可变区内优先发生，提示病毒正在突变以逃避 CTL 免疫系统[420]。这种簇集对发展疫苗可能是有用的，因为对含多 MHC 分子结合的交叠基序的确定，或许可以混杂着定义可在广泛的多群体片段中诱发应答的、被呈递的肽分子。

另一种类型的 MHC-等位基因特异性方法是应用定义在 MHC 分子结合的顺序中可能在任何位置的、每个氨基酸的阳性、阴性分布的矩阵。一个阳性或阴性值被赋予一个肽顺序中能发生在每个位置的 20 种可能氨基酸中的每一个，这些合在一起，可给出该肽分子结合 MHC 分子的估计潜力。矩阵中的值来自用一系列肽（单个位点用每个可能的氨基酸进行置换[375,421~423]）做结合试验得到的数据，或者来自文献中已知能结合 MHC 的肽（如果数目足够大）之间的比较[402,424]。Davenport 等[425,426]也发展了一种基于对 MHC 分子上洗脱下的肽池进行 Edman 降解测序的基序方法。所有这些方法在预测肽与特殊 MHC 分子结合中得到一些成功应用[402]，但它们都需要肽的每个位置必须独立于它的近邻而发挥作用，这是一个合乎道理的近似值，但也会有例外。得到越多矩阵的试验资料，预测就会越可靠。因此，可能对一些比较常见的 HLA 分子，其预测成功的可能更大些，因为它们的数据资料较多。这种矩阵方法已经用于 MHC Ⅰ、Ⅱ 类分子。

一个有潜在应用价值的观测结果是，HLA Ⅰ 类分子能被分为几个家族（HLA 父型），它们共享相同的结合基序[374,421,427,428]。包含几个 MHC 分子的较宽广的基序叫做超基序。例如，HLA-A* 0301、A* 1101、A* 3101、A* 3401、A* 6601、A* 6801 和 A* 7401 都属 HLA-A3 超家族[427]。含有这种超基序的肽比被一个 HLA 分子呈递的肽有更宽的活性范围。而且，由于几个 HLA 父型（super typer）已得到定义，所以有可能设计一种疫苗，其在较广泛的群体中有效，但只有有限数量的优选的抗原决定簇。

对结合到 MHC 分子的肽的另一种预测方法，是基于对进入已知 MHC 分子结合槽内的肽的游离能的计算，其中晶体衍射学坐标已知；或是基于通过自另一个 MHC 分子同源延伸而得到的 MHC 分子的结构模建，这时其晶体结构尚未知[429,430]。用游离能比用能量更为重要，因为单纯后者不能发现一个侧链最稳定的取

向，并且不能在同一位置正确地排列不同的侧链次序。例如对 HLA-A2.1，它优先结合位置 2 为 Leu 的肽，结合在 B 口袋内，标准 CHARMm 能量步骤在位置 2 预测到一个带电荷的 Lys，而新的评估溶解的游离能的游离能模型则正确地预测其为疏水性 Leu[429]。如果从一个不同复合物的晶体结构开始，该方法能正确地预测几种已知 MHC-肽复合物的结构，每种情况都是在 1.2-1.6Å 全原子根平均方差内[430]。应用该种结构模建可在只有锚残基基序已知的情况下延展基序到非锚残基位置，并能使我们预测 MHC 分子(基序尚未得以确定的)的新基序。

另一种预测 MHC 结合顺序的方法是使用一种叫做“穿针引线”的技术，该技术被发展出来用于预测肽二级结构，是基于将一个顺序线性通过一系列已知的二级结构并计算每个结构的能量。Altuvia 等[431]发现“穿针引线”可应用于 MHC 结合槽内的肽，因为当几个结合到同一 MHC 分子的肽进行晶体衍射学比较时，这些肽的构象时非常相同的，例如结合到 HLA-A2.1 的几个晶体结构肽[405]。在检测“穿针引线”方法中，Altuvia 等[431]发现已知抗原肽在一个蛋白质的所有肽中排列的最高，通过竞争结合试验排列的肽的次序可得到正确预测。该方法的优势在于其不依赖已知的结合基序，并能确定结合 MHC 分子(缺乏共同基序)的肽。它也能被用于排序一组都含已知基序的肽。

最后，可用结合给定 MHC 分子的肽训练人工神经网络(ANN)去识别在结合肽中存在的模式[432]。当对 ANN 的预测进行检测时，结果能被用于进一步训练 ANN 以重复地提高预测的能力。

随着这些方法深入的发展和精炼，它们定能有助于对结合不同 MHC 分子的肽的精确预测，并因此可不需经验性结合研究而进行疫苗设计。虽然目前的方法仍不足以绕开试验性结合研究，对于研究得非常透彻的 MHC 分子结合的预测中存在的问题最终都能克服。同时，这些方法在确定合适的肽的过程中，可缩窄研究面，节省相当的时间和金钱。在一个蛋白序列的短片段中，对邻近或交叠结合顺序簇的定位对于选择被广泛识别的肽顺序也是有用的。

复合蛋白抗原分子上 Th 表位与 B 细胞表位之间的关系

我们已经观察到，确定 T、B 细胞抗原位点的定位(自身耐受可能是例外)是有极大不同的。实际上，如果 B 细胞(及其表面抗体)结合特别暴露出的或突出的位点(对抗原处理过程中溶蛋白酶更易接近、更为敏感的位点)，则可以认为 T 细胞有较低的可能识别这些相同的位点，这在抗原处理过程中更有可能被破坏掉。当然，组装的拓扑位点在抗原处理过程中被破坏掉。另一方面，也有研究发现，T 细胞和抗体似乎识别蛋白上相同的(或非常紧密的交叠的)位点[36,146,173,433~435]，尽管精确特异性分析通常提示，抗体和 T 细胞精确特异性是不同的。而这里提出的问题是：除这些 T、B 细胞表位可能(或不可能)共有的结构特征外，是否在 T-B 细胞协同作用中，存在功能的或调节性的因子？这种 T-B 细胞协同作用，在对给定蛋白质抗原的应答中，可在 Th 细胞特异性和 B 细胞特异性间产生相互作用关系。

有关 Th 细胞可能影响抗体特异性的第一个证据来自对抗体特异性的 Ir 基因控制的研究。有些研究表明，通过 T 细胞辅助效果而发挥作用的 Ir 基因能够影响给定抗原诱导的抗体的特异性[142,436~443]。一个显然的例外是豚鼠的胰岛素[444]。人们很容易预想编码呈递抗原给 T 细胞的 MHC 分子的 Ir 基因，是如何影响一个蛋白质的哪些表位可被给定 MHC 类型的 APC 呈递给 T 细胞？或者 MHC 产物是如何能够影响个体的 T 细胞系统的？但是难以想像 Ir 基因如何确定一个蛋白质的哪个表位能诱发抗体应答，该种抗体通常是非 MHC 限制性的。一种解释是 Ir 基因首先选择哪个 Th 细胞被活化，这接着又影响哪个特殊表位特异性的 B 细胞可被活化[104]。因为对同源辅助而言，B 细胞必须以与 MHC 分子关联的方式呈递抗原给 Th 细胞，抗体特异性的 Ir 基因控制至少部分要如此操作，选择哪个 Th 细胞可被活化并辅助特定的 B 细胞。其中有一个例子是 F1 杂合 T 细胞辅助一种或其他种表型的双亲 B 细胞。相反，如果 Th 细胞选择一种基于其本身的抗体特异性而活化的 B 细胞亚群，则在 T、B 细胞间会存在一种相互作用，影响双方的特异性。因此，该假说被称为 T-B 互惠[104]。Sercarz 等同时也提出[445]，存在对那些可被 Th 细胞用于辅助同一蛋白序列的其他表位特异性的 B 细胞表位的空间限制。

检测这些设想的努力首先涉及到限制 Th 细胞对一个或一些表位的精细特异性，然后是对应答整个分子

而产生的抗体的特异性的确定。Cecka 等[446]通过诱导对溶酶某些表位的 T 细胞耐受(使兔耐受交叉反应溶酶)而对此进行了完善,有其他研究[102,447,448]应用对蛋白的肽片段有免疫力的动物 T 细胞。在每种情况中,对 Th 细胞特异性系统的限制影响了所产生的抗体系统。其中一个例外是烟草花叶病毒十肽表位特异性的 T、B 细胞,尽管在该情况中,选择是在对同一表位(而非不同表位)的不同精细特异性的 T、B 细胞之间进行的[449]。

当抗原被认为是 B 细胞受体(免疫球蛋白)和 TCR 间的直接桥梁时,对这些限制的一种解释是"空间位阻"[104,445]。对共同结合原始蛋白分子的抗体、TCR 和 MHC,它们所结合的位点也服从空间限制。但是,现在已经明确,T 细胞识别 B 细胞上的抗原(如同其他 APC 上的)不是以原始形式,而是在经过处理并与 MHC 分子相关联之后[450~452]。上述这些研究成果及其他研究[453~457]提示,B 细胞表面的的疫球蛋白的一个目的就是以高亲和力摄取特异性抗原,该抗原然后通过受体介导的内吞作用而内在化,并像其他抗原那样被处理。因此,又提出了另一种解释:作为介导内吞作用的细胞表面的免疫球蛋白,空间地影响了抗原的不同部分被处理的比率,因为 B 细胞处理的不是游离抗原,而是单克隆抗体-抗原免疫复合物[104](图 19.17)。这个概念预示,许多抗原-抗体复合物在内体中在 pH6 附近稳定,而且当抗原和抗体都可能降解为单个氨基酸时,真正紧要的是大片段产生的动力学,而不是完全消化的产物。这种通过结合抗体而使抗原表位免受蛋白溶酶作用的保护性至少可在体外得以证明[51]。最近,Davidson 和 Watts 精确论证了抗原特异性 B 细胞表面的免疫球蛋白对抗原溶蛋白处理过程中所产生的片段的影响效果[458]。他们证明破伤风类毒素的破裂模式,就像通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳所检测的那样,在被破伤风类毒素特异性的 B 淋巴母细胞样克隆处理过程中产生,在依赖其对抗原不同表位特异性的 B 细胞克隆过程中多样化。与抗体结合也可能影响哪个片段被送到细胞表面、哪个进入到真正的溶酶体中被完全降解。因此,与那些以普通方式处理抗原的非特异性呈递细胞相反,含不同表面免疫球蛋白的不同 B 细胞会以不同方式优先处理抗原,以在其表面产生更多的某些潜在片段。通过该种机制,可认为,B 细胞特异性导致向 T 细胞的选择性抗原呈递,并因此可得到来自某些表位特异性的 T 细胞的(比来自其他特异性 T 细胞)更多的选择性辅助[104]。

691

为从 B 细胞的角度检验该假说,Ozaki 和 Berzofsky[103]通过包被多克隆 B 细胞和偶联到抗-IgM 抗体上的单克隆抗肌凝素的配体,制备了多种亚群的 B 细胞,这些细胞是以抗原呈递(不是分泌)为目的的有效的单克隆。他们发现,与这样一种配体一起包被的 B 细胞呈递肌凝素给肌凝素特异性 T 细胞克隆的能力较呈递给其他 T 细胞克隆的能力要差。与其他配体一起包被的 B 细胞呈递肌凝素给该 T 细胞克隆的能力与呈递给其他 T 细胞克隆的能力相同。因此,对通过该类 B 细胞群呈递肌凝素给这种特殊 T 细胞克隆的限制,有赖于包被该 B 细胞的单克隆抗体及该 T 细胞克隆受体的特异性。在该种情况下,单克隆抗体和 T 细胞克隆都需是同一表位特异性或紧密交叠表位特异性的。因此提示,B 细胞表面免疫球蛋白所结合的位点被呈递给 T 细胞克隆的活性较差。该发现与最近对一个嵌合蛋白的研究结果一致,该蛋白质的不同位置被插入了一个或更多个拷贝的卵清蛋白 Th 决定簇[459]。虽然卵清蛋白决定簇的位置不影响对大肠杆菌热稳定内毒素 N 端位点的抗体应答,但该位置确实会影响应答嵌合蛋白 C 端决定簇的抗体产生情况(该嵌合蛋白源自胰岛素样生长因子Ⅰ)。将一个卵清蛋白的决定簇插入 C 端抗体表位的远端而构建的免疫原,比插入到同一位点的临近端而构建的免疫原,在提供辅助作用中更为有效,尽管在体外这两种构建物都诱发相同水平的卵清蛋白特异性 T 细胞增殖(在体外非特异性呈递细胞存在时)。但是,对 Ir 基因的研究提示,T 细胞可能优先辅助那些以某种程度的亲近性与 T 细胞表位结合的 B 细胞,原因是在 Ir 基因控制下,T 细胞与蛋白质抗原大片段的抗体特异性之间存在某种相关性[101,104,142,439,440,443]。因此,抗体可能对抗原处理有阳性和阴性选择效果。非特异性 APC 对 β-半乳糖-单克隆抗体复合物的呈递行为的深入研究可得到相同的结论[460,461]。配体可能通过呈递细胞上的 Fc 受体被摄取,并根据抗体结合位点区分处理,以使其能分别呈递给不同 T 细胞克隆。因此,可制备非 B 呈递细胞模拟特异性 B 呈递细胞。同时这也提示,循环抗体可能在选择与抗原接触后哪些 T 细胞被活化中发挥一定作用。

关于结合抗体是提高还是抑制特异性表位向 T 细胞呈递的问题,Watts、Lanzavecchia 及其合作者进行了

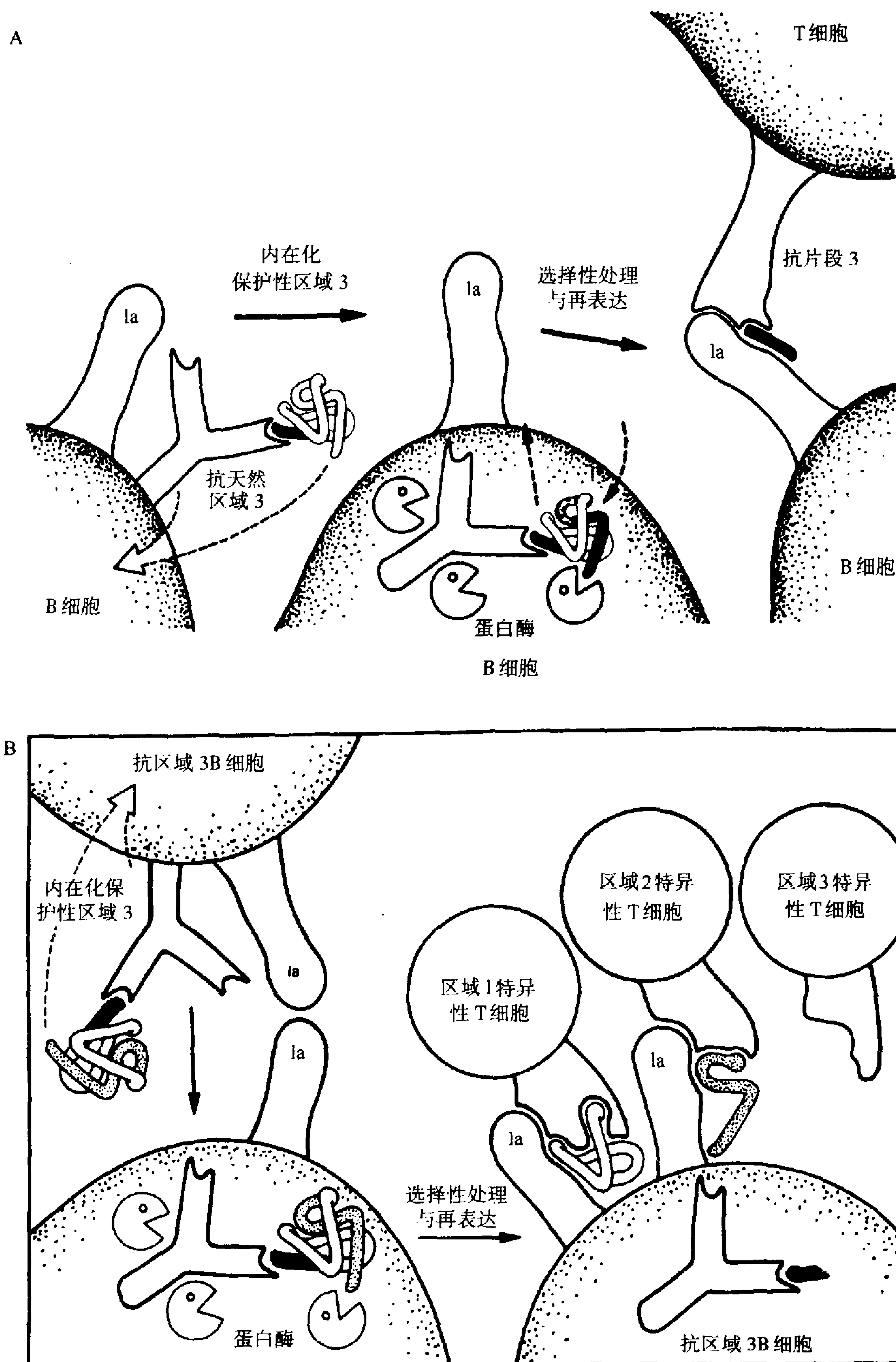


图 19.17　B 细胞抗原呈递:阳性(A)或阴性(B)选择。特殊抗原的区域 3 特异性的 B 细胞使抗原内在化(与区域 3 的抗体保护的区域 3 一起)。在抗体影响下,抗原的该部分被保护免受蛋白水解酶水解(选择性处理)。在阳性选择(A)中,该部分被优先再表达和呈递。在阴性选择(B)中,该部分的再表达比抗原的其他部分(不受抗体影响)持续较长,或更受限制。因此,这样的 B 细胞可以呈递该抗原的任何部分(结合到抗体的区域 3 部分除外)给相关的 Th 细胞(选择性呈递)[103,104]。

深入研究[462,463]。首先,他们发现,破伤风类毒素特异性 EB 病毒转染的人 B 细胞克隆 11.3 不能向特异性 T 细胞呈递破伤风类毒素表位[1174~1189],而能够像其他 B 细胞那样呈递另一个表位[947~967],而且另一个 B 细胞

克隆也能较好地呈递表位[1174~1189]。而且,11.3克隆的游离免疫球蛋白在通过Fc受体促进摄取和内吞而提高其他表位的呈递的同时,也抑制该表位向T细胞的呈递[462]。他们还发现,同一个11.3B细胞和抗体实际上提高了破伤风类毒素的另一个表位[1273~1284]的呈递约10倍,虽然两个表位都位于抗体印迹之中(用蛋白水解消化保护法进行确定)[463]。上述提高也可能通过游离抗体和Fab段而介导,提示其机制并不涉及Fc受体促进的抗原摄取。而且,11.3抗体对同一个破伤风类毒素C片段的另一个表位[947-967]没有影响,该表位不在抗体的印迹之中,而且C片段的另一个抗体不能提高表位1273~1284的呈递。最后,作者们认为,同一个抗体或表面免疫球蛋白能保护两个抗原表位不受蛋白水解作用,但在促进一个表位与MHCⅡ分子结合的同时,却在空间上阻碍了另一个表位与MHCⅡ分子的结合[463]。这种促进作用可能只是简单地保护其不被降解,或者是稳定某种构象。这种抗体介导的提高所选择表位向Th细胞的呈递作用,能极大地降低诱导T细胞应答的阈值,从而可能诱发对另外的亚优势表位的应答。也能有助于表位延展,例如在自身免疫性疾病中,对一个优势表位的最初应答导致其后对其他亚优势表位的应答,原因或许是通过辅助抗体产生,而抗体产生又促进了其他表位的呈递。

总之,这些结果支持T-B互惠的构想,其中Th细胞和B细胞都可影响对方表达的整个系统[104]。该机制可能也向某些Ir基因控制抗体独特型的情况提供了一种解释[464,465],但某些情况还需其他的解释[466]。虽然我们还不知道所有对T、B细胞表位间关系的限制因素,也不能以一种预测的方式使用这些信息,但这种关系可能在调节免疫系统的免疫应答精确特异性方面发挥重要的作用。所以,它们在设计组合有T、B细胞表位合成肽疫苗或重组片段疫苗,以诱导抗体应答方面发挥重要作用。

(石统东 译)

参 考 文 献

1. Goodman JW. Antigenic determinants and antibody combining sites. In: Sela M, ed. *The antigens*. New York: Academic Press, 1975:127–187.
2. Landsteiner K. *The specificity of serological reactions*. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1945.
3. Landsteiner K, Van der Scheer J. Serological studies on azoproteins. Antigens containing azo components with aliphatic side chains. *J Exp Med* 1934;59: 751–768.
4. Pressman D, Grossberg AL. *The structural basis of antibody specificity*. New York: Benjamin, 1968.
5. Pressman D, Siegel M, Hall LAR. The closeness of fit of antibenzoate antibodies about haptens and the orientation of the haptens in combination. *J Am Chem Soc* 1954;76:6336–6341.
6. Karush F. The interaction of purified anti-β-lactoside antibody with haptens. *J Am Chem Soc* 1957;79:3380–3384.
7. Eisen HN, Siskind GW. Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 1964;3:996–1008.
8. Kabat EA. *Structural concepts in immunology and immunochemistry*, 2nd ed. New York: Holt, Rinehart & Winston, 1976.
9. Jann K, Westphal O. Microbial polysaccharides. In: Sela M, ed. *The antigens*. New York: Academic Press, 1975:1–125.
10. Uchida T, Robbins PW, Luria SE. Analysis of the serologic determinant groups of the Salmonella E-group O-antigens. *Biochemistry* 1963;2:663–668.
11. Springer GF. Blood group and Forssman antigenic determinants shared between microbes and mammalian cells. In: Kallos P, Waksman BH, eds. *Progress in allergy*. Basel, Switzerland: Karger, 1971:9–77.
12. Marcus DM. The ABO and Lewis blood-group system. Immunochemistry, genetics, and relation to human disease. *N Engl J Med* 1969;280:994–1006.
13. Watkins WM. Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis, and P blood group systems. *Adv Hum Genet* 1980;10:1–136.
14. Kabat EA. The upper limit for the size of the human antidextran combining site. *J Immunol* 1960;84:82–85.
15. Kabat EA. The nature of an antigenic determinant. *J Immunol* 1966;97:1–11.
16. Cisar J, Kabat EA, Dorner MM, Liao J. Binding properties of immunoglobulin combining sites specific for terminal or nonterminal antigenic determinants in dextran. *J Exp Med* 1975;142:435–459.
17. Sharon J, Kabat EA, Morrison SL. Studies on mouse hybridomas secreting IgM or IgA antibodies to α(1→6)-linked dextran. *Mol Immunol* 1981;18:831–846.
18. Sharon J, Kabat EA, Liao J, Potter M. Immunochemical characterization of binding sites of hybridoma antibodies specific for α(1→6) linked dextran. *Mol Immunol* 1982;19:375–388.
19. Sharon J, D'Hoostelaere L, Potter M, Kabat EA, Morrison SL. A cross-reactive idiotype, QUPC 52 IdX, present on most but not all anti-α(1→6) dextran-specific IgM and IgA hydriboma antibodies with combining sites of different sizes. *J Immunol* 1982;128:498–500.
20. Jerne NK. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol Inst Pasteur* 1974;125C:373–389.
21. Eichmann K. Expression and function of idiotypes on lymphocytes. *Adv Immunol* 1978;26:195–254.
22. Sikder SK, Akolkar PN, Kaladas PM, Morrison SL, Kabat EA. Sequences of variable regions of hybridoma antibodies to α(1→6) dextran in BALB/c and C57BL/6 mice. *J Immunol* 1985;135:4215–4221.
23. Akolkar PN, Sikder SK, Bhattacharya SB, et al. Different V_L and V_H germline genes are used to produce similar combining sites with specificity for α(1→6) dextrans. *J Immunol* 1987;138:4472–4479.
24. Brodeur PM, Riblet R. The immunoglobulin heavy chain variable region (Igh-v) locus in the mouse. I. One-hundred Igh-v genes comprise seven families of homologous genes. *Eur J Immunol* 1984;14:922–930.
25. Griffiths GM, Berek C, Kaartinen M, Milstein C. Somatic mutation and the maturation of immune response to 2-phenxyloxazolone. *Nature* 1984;14:271–275.
26. Wang D, Chen H-T, Liao J, et al. Two families of monoclonal antibodies to α(1-6)dextran, V_H19.1.2. and V_H9.14.7, show distinct patterns of J_K and J_H minigene usage and amino acid substitutions in CDR3. *J Immunol* 1990;145:3002–3010.
27. Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SEV, Poljak RJ. Three-dimensional structure of an antigen–antibody complex at 2.8 Å resolution. *Science* 1986;233:747–758.
28. Colman PM, Laver WG, Varghese JN, et al. Three-dimensional structure of a complex of antibody with influenza virus neuraminidase. *Nature* 1987;326: 358–363.
29. Sheriff S, Silverton EW, Padlan EA, et al. Three-dimensional structure of an antibody–antigen complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:8075–8079.
30. Davies DR, Padlan EA. Antibody–antigen complexes. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:439–473.
31. Schlossman SF, Yaron A, Ben-Efraim S, Sober HA. Immunogenicity of a series of α,N-DNP-L-lysines. *Biochemistry* 1965;4:1638–1645.
32. Schlossman SF, Levine H. Desensitization to delayed hypersensitivity reactions. With special reference to the requirement for an immunogenic molecule. *J Immunol* 1967;99:111–114.
33. Van Vunakis H, Kaplan J, Lehrer H, Levine L. Immunogenicity of polylysine and polyornithine when complexed to phosphorylated bovine serum albumin. *Immunochemistry* 1966;3:393–402.
34. Getzoff ED, Tainer JA, Lerner RA, Geysen HM. The chemistry and mechanisms

of antibody binding to protein antigens. *Adv Immunol* 1988;43:1–98.
35. Sela M. Antigenicity: some molecular aspects. *Science* 1969;166:1365–1374.
36. Berzofsky JA, Buckenmeyer GK, Hicks G, Gurd FRN, Feldmann RJ, Minna J. Topographic antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies to sperm whale myoglobin. *J Biol Chem* 1982;257:3189–3198.
37. Koketsu J, Atassi MZ. Immunochemistry of sperm-whale myoglobin-XVI: accurate delineation of the single region in sequence 1-55 by immunochemical studies of synthetic peptides. Some conclusions concerning antigenic structures of proteins. *Immunochemistry* 1974;11:1–8.
38. Dickerson RE. X-ray analysis and protein structure. In: Neurath H, ed. *The proteins*, 2nd ed. New York: Academic Press, 1964:603–778.
39. Takano T. Structure of myoglobin refined at 2.0 Å resolution. I. Crystallographic refinement of metmyoglobin from sperm whale. *J Mol Biol* 1977;110:537–568.
40. Feldmann RJ, Bing DH, Furie BC, Furie B. Interactive computer surface graphics approach to the study of the active site of bovine trypsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:5409–5412.
41. Barlow DJ, Edwards MS, Thornton JM. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature* 1986;322:747–748.
42. Benjamin DC, Berzofsky JA, East IJ, et al. The antigenic structure of proteins: a reappraisal. *Annu Rev Immunol* 1984;2:67–101.
43. Berzofsky JA. Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science* 1985;229:932–940.
44. Sachs DH, Schechter AN, Eastlake A, Anfinsen CB. An immunological approach to the conformational equilibria of polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69:3790–3794.
45. Crumpton MJ. Protein antigen: the molecular bases of antigenicity and immunogenicity. In: Sela M, ed. *The antigens*. New York: Academic Press, 1974:1–79.
46. Merrifield RB. Automated synthesis of peptides. *Science* 1965;150:178–185.
47. Houghten RA. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen–antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:5131–5135.
48. Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ, Tribbick G, Schoofs PG. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J Immunol Methods* 1987;102:259–274.
49. Shi P-T, Riehm JP, Todd PEE, Leach SJ. The antigenicity of myoglobin-related peptides synthesised on polyacrylamide and polystyrene resin supports. *Mol Immunol* 1984;21:489–496.
50. Burnens A, Demotz S, Corradin G, Binz H, Bosshard HR. Epitope mapping by chemical modification of free and antibody-bound protein antigen. *Science* 1987;235:780–783.
51. Jemmerson R, Paterson Y. Mapping epitopes on a protein antigen by the proteolysis of antigen–antibody complexes. *Science* 1986;232:1001–1004.
52. Smith-Gill SJ, Wilson AC, Potter M, Prager EM, Feldmann RJ, Mainhart CR. Mapping the antigenic epitope for a monoclonal antibody against lysozyme. *J Immunol* 1982;128:314–322.
53. Kohno Y, Berkower I, Minna J, Berzofsky JA. Idiotypes of anti-myoglobin antibodies: shared idiotypes among monoclonal antibodies to distinct determinants of sperm whale myoglobin. *J Immunol* 1982;128:1742–1748.
54. Streicher HZ, Cuttitta F, Buckenmeyer GK, Kawamura H, Minna J, Berzofsky JA. Mapping the idiotopes of a monoclonal anti-idiotypic antibodies: detection of a common idiotope. *J Immunol* 1986;136:1007–1014.
55. Crumpton MJ, Wilkinson JM. The immunological activity of some of the chymotryptic peptides of sperm-whale myoglobin. *Biochem J* 1965;94:545–556.
56. Smith JA, Hurrell JGR, Leach SJ. A novel method for delineating antigenic determinants: peptide synthesis and radioimmunoassay using the same solid support. *Immunochemistry* 1977;14:565–568.
57. Atassi MZ. Antigenic structure of myoglobin: the complete immunochemical anatomy of a protein and conclusions relating to antigenic structures of proteins. *Immunochemistry* 1975;12:423–438.
58. Berzofsky JA, Buckenmeyer GK, Hicks G, et al. Topographic antigenic determinants detected by monoclonal antibodies to myoglobin. In: Celada F, Sercarz E, Shumaker V, eds. *Protein conformation as immunological signal*. New York: Plenum Press, 1983:165–180.
59. Hurrell JGR, Smith JA, Todd PE, Leach SJ. Cross-reactivity between mammalian myoglobins: linear vs. spatial antigenic determinants. *Immunochemistry* 1977;14:283–288.
60. East IJ, Todd PE, Leach SJ. On topographic antigenic determinants in myoglobins. *Mol Immunol* 1980;17:519–525.
61. Maron E, Shiozawa C, Arnon R, Sela M. Chemical and immunological characterization of a unique antigenic region in lysozyme. *Biochemistry* 1971;10:763–771.
62. Berzofsky JA, Hicks G, Fedorko J, Minna J. Properties of monoclonal antibodies specific for determinants of a protein antigen, myoglobin. *J Biol Chem* 1980;255:11188–11191.
63. East IJ, Hurrell JGR, Todd PE, Leach SJ. Antigenic specificity of monoclonal antibodies to human myoglobin. *J Biol Chem* 1982;257:3199–3202.
64. Arquilla ER, Bromer WW, Mercola D. Immunology conformation and biological activity of insulin. *Diabetes* 1969;18:193–205.
65. Lau HKF, Reichlin M, Noble RW. Preparation of antibodies that bind to HbF but not to the isolated α and γ subunits. *Fed Proc* 1975;34:975.
66. Benjamini E, Shimizu M, Yound JD, Leung CY. Immunochemical studies on the tobacco mosaic virus protein. VII. The binding of octanoylated peptides of the tobacco mosaic virus protein with antibodies to the whole protein. *Biochemistry* 1968;7:1261–1264.
67. Urbanski GJ, Margoliash E. Topographic determinants on cytochrome c. I. The complete antigenic structures of rabbit, mouse, and guanaco cytochromes c in rabbits and mice. *J Immunol* 1977;118:1170–1180.
68. Lando G, Berzofsky JA, Reichlin M. Antigenic structure of sperm whale myoglobin. I. Partition of specificities between antibodies reactive with peptides and native protein. *J Immunol* 1982;129:206–211.
69. White TJ, Ibrahimi IM, Wilson AC. Evolutionary substitutions and the antigenic structure of globular proteins. *Nature* 1978;274:92–94.
70. Kabat EA. The structural basis of antibody complementarity. *Adv Protein Chem* 1978;32:1–76.
71. Thornton JM, Edwards MS, Taylor WR, Barlow DJ. Location of "continuous" antigenic determinants in protruding regions of proteins. *EMBO J* 1986;5:409–413.
72. Reichlin M. Amino acid substitution and the antigenicity of globular proteins. *Adv Immunol* 1975;20:71–123.
73. Berzofsky JA, Schechter AN. The concepts of crossreactivity and specificity in immunology. *Mol Immunol* 1981;18:751–763.
74. Furie B, Schechter AN, Sachs DH, Anfinsen CB. An immunological approach to the conformational equilibria of staphylococcal nuclease. *J Mol Biol* 1975;92:497–506.
75. Green N, Alexander H, Wilson A, et al. Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin. *Cell* 1982;28:477–487.
76. Lerner R. Antibodies of predetermined specificity in biology and medicine. *Adv Immunol* 1984;36:1–44.
77. Perutz MF. Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci Am* 1978;239:92–125.
78. Monod J, Wyman J, Changeux J-P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol* 1965;12:88–118.
79. Papkoff J, Lai MH-T, Hunter T, Verma IM. Analysis of transforming gene products from Moloney murine sarcoma virus. *Cell* 1981;27:109–119.
80. Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 1983;303:41–44.
81. Lee B, Richards FM. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J Mol Biol* 1971;55:379–400.
82. Connolly ML. Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. *Science* 1983;221:709–713.
83. Novotny J, Handschumacher M, Haber E, et al. Antigenic determinants in proteins coincide with surface regions accessible to large probes (antibody domains). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:226–230.
84. Hopp TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:3824–3828.
85. Fraga S. Theoretical prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Can J Chem* 1982;60:2606–2610.
86. Hopp TP. Protein surface analysis: methods for identifying antigenic determinants and other interaction sites. *J Immunol Methods* 1986;88:1–18.
87. Leach SJ. How antigenic are antigenic peptides? *Biopolymers* 1983;22:425–440.
88. Todd PEE, East IJ, Leach SJ. The immunogenicity and antigenicity of proteins. *Trends Biochem Sci* 1982;7:212–216.
89. Chothia C, Janin J. Principles of protein–protein recognition. *Nature* 1975;256:705–708.
90. Tainer JA, Getzoff ED, Paterson Y, Olson AJ, Lerner RA. The atomic mobility component of protein antigenicity. *Annu Rev Immunol* 1985;3:501–535.
91. Tainer JA, Getzoff ED, Alexander H, et al. The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of sites in a protein. *Nature* 1984;312:127–133.
92. Westhof E, Altschuh D, Moras D, et al. Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature* 1984;311:123–126.
93. Al Moudallal Z, Briand JP, Van Regenmortel MHV. A major part of the polypeptide chain of tobacco mosaic virus protein is antigenic. *EMBO J* 1985;4:1231–1235.
94. Van Regenmortel MHV. Antigenic cross-reactivity between proteins and peptides: new insights and applications. *Trends Biochem Sci* 1987;12:237–240.
95. Geysen HM, Tainer JA, Rodda SJ, et al. Chemistry of antibody binding to a protein. *Science* 1987;235:1184–1190.
96. Edmundson AB, Ely KR, Herron JN. A search for site-filling ligands in the Meg Bence-Jones dimer: crystal binding studies of fluorescent compounds. *Mol Immunol* 1984;21:561–576.
97. Getzoff ED, Geysen HM, Rodda SJ, Alexander H, Tainer JA, Lerner RA. Mechanisms of antibody binding to a protein. *Science* 1987;235:1191–1196.
98. Gahm S-J, Fowlkes BJ, Jameson SC, et al. Profound alteration in an αβ T-cell antigen receptor repertoire due to polymorphism in the first complementarity-determining region of the β chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10267–10271.
99. Jemmerson R, Margoliash E. Topographic antigenic determinants on cytochrome c. Immunoadsorbent separation of rabbit antibody populations directed against horse cytochrome c. *J Biol Chem* 1979;254:12706–12716.
100. Cooper HM, East IJ, Todd PEE, Leach SJ. Antibody response to myoglobins: effect of host species. *Mol Immunol* 1984;21:479–487.
101. Berzofsky JA. Ir genes: antigen-specific genetic regulation of the immune response. In: Sela M, ed. *The antigens*. New York: Academic Press, 1987:1–146.

102. Manca F, Kunkl A, Fenoglio D, Fowler A, Sercarz E, Celada F. Constraints in T-B cooperation related to epitope topology on *E. coli* β-galactosidase. I. The fine specificity of T cells dictates the fine specificity of antibodies directed to conformation-dependent determinants. *Eur J Immunol* 1985;15:345–350.
103. Ozaki S, Berzofsky JA. Antibody conjugates mimic specific B cell presentation of antigen: relationship between T and B cell specificity. *J Immunol* 1987;138: 4133–4142.
104. Berzofsky JA. T-B reciprocity: an Ia-restricted epitope-specific circuit regulating T cell–B cell interaction and antibody specificity. *Surv Immunol Res* 1983;2: 223–229.
105. Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Development of sporozoite vaccines. *Philos Trans R Soc Lond [Biol]* 1984;307:117.
106. Potocnjak P, Yoshida N, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. *J Exp Med* 1980;151:1504.
107. Good MF, Berzofsky JA, Maloy WL, et al. Genetic control of the immune response in mice to a *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine: widespread non-responsiveness to a single malaria T epitope in highly repetitive vaccine. *J Exp Med* 1986;164:655–660.
108. Del Giudice G, Cooper JA, Merino J, et al. The antibody response in mice to carrier-free synthetic polymers of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite repetitive epitope is I-A^b–restricted: possible implications for malaria vaccines. *J Immunol* 1986;137:2952–2955.
109. Herrington DA, Clyde DF, Losonsky G, et al. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature* 1987;328:257–259.
110. Good MF, Maloy WL, Lunde MN, et al. Construction of a synthetic immunogen: use of a new T-helper epitope on malaria circumsporozoite protein. *Science* 1987;235:1059–1062.
111. Kawamura H, Rosenberg SA, Berzofsky JA. Immunization with antigen and interleukin-2 in vivo overcomes Ir genetic low responsiveness. *J Exp Med* 1985; 162:381–386.
112. Good MF, Pombo D, Lunde MN, et al. Recombinant human interleukin-2 (IL-2) overcomes genetic nonresponsiveness to malaria sporozoite peptides. Correlation of effect with biological activity of IL-2. *J Immunol* 1988;141:972–977.
113. Le Bouvier GL. The D → C change in poliovirus particles. *Br J Exp Pathol* 1959;40:605–620.
114. Gerhard W, Yewdell JW, Frankel ME, Webster RG. Antigenic structure of influenza virus hemagglutinin defined by hybridoma antibodies. *Nature* 1981: 290:713–717.
115. Emini EA, Kao S-Y, Lewis AJ, Crainic R, Wimmer E. Functional basis of poliovirus neutralization determined with mono-specific neutralizing antibodies. *J Virol* 1983;46:466–474.
116. Wiley DC, Wilson EA, Skehel JJ. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 1981;289:373–378.
117. Icenogle J, Shiwen H, Duke G, Gilbert S, Rueckert R, Anderegg J. Neutralization of poliovirus by a monoclonal antibody: kinetics and stoichiometry. *Virology* 1983;127:412–425.
118. Mandel B. Interaction of viruses with neutralizing antibodies. In: Fraenkel-Conrat H, Wagner RR, eds. *Comprehensive virology 15: viral–host interactions.* New York: Plenum Press, 1979.
119. Kaplan G, Freistadt MS, Racaniello VR. Neutralization of poliovirus by cell receptors expressed in insect cells. *J Virol* 1990;64:4697–4702.
120. Smith DH, Byrn RA, Marsters SA, Gregory T, Groopman JE, Capon DJ. Blocking of HIV-1 infectivity by a soluble, secreted form of the CD4 antigen. *Science* 1987;238:1704–1707.
121. Fisher RA, Bertonis JM, Meier W, et al. HIV infection is blocked in vitro by recombinant soluble CD4. *Nature* 1988;331:76–78.
122. Hussey RE, Richardson NE, Kowalski M, et al. A soluble CD4 protein selectively inhibits HIV replication and syncytium formation. *Nature* 1988;331: 78–81.
123. Capon DJ, Chamow SM, Mordenti J, et al. Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature* 1989;337:525–531.
124. Palker TJ, Clark ME, Langlois AJ, et al. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:1932–1936.
125. Rusche JR, Javaherian K, McDanal C, et al. Antibodies that inhibit fusion of HIV infected cells bind a 24 amino acid sequence of the viral envelope, gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:3198–3202.
126. Goudsmit J, Debouck C, Meloen RH, et al. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:4478–4482.
127. Kang C-Y, Nara P, Chamat S, et al. Evidence for non–V3-specific neutralizing antibodies that interfere with gp120/CD4 binding in human immunodeficiency virus 1–infected humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:6171–6175.
128. Berkower I, Murphy D, Smith CC, Smith GE. A predominant group-specific neutralizing epitope of human immunodeficiency virus type 1 maps to residues 342 to 511 of the envelope glycoprotein gp120. *J Virol* 1991;65:5983–5990.
129. Thali M, Olshevsky U, Furman C, Gabuzda D, Posner M, Sodroski J. Characterization of a discontinuous human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitope recognized by a broadly reactive neutralizing human monoclonal antibody. *J Virol* 1991;65:6188–6193.
130. Berkower I, Smith GE, Giri C, Murphy D. Human immunodeficiency virus-1: predominance of a group-specific neutralizing epitope that persists despite genetic variation. *J Exp Med* 1989;170:1681–1695.
131. Steimer KS, Scandella CJ, Skiles PV, Haigwood NL. Neutralization of divergent HIV-1 isolates by conformation-dependent human antibodies to Gp120. *Science* 1991;254:105–108.
132. Benacerraf B, McDevitt HO. Histocompatibility-linked immune response genes. *Science* 1972;175:273–279.
133. Godfrey WL, Lewis GK, Goodman JW. The anatomy of an antigen molecule: functional subregions of L-tyrosine-p-azobenzenearsonate. *Mol Immunol* 1984; 21:969–978.
134. Solinger AM, Ultee ME, Margoliash E, Schwartz RH. The T-lymphocyte response to cytochrome c. I. Demonstration of a T-cell heteroclitic proliferative response and identification of a topographic antigenic determinant on pigeon cytochrome c whose immune recognition requires two complementing major histocompatibility complex–linked immune response genes. *J Exp Med* 1979; 150:830–848.
135. Berkower I, Buckenmeyer GK, Gurd FRN, Berzofsky JA. A possible immunodominant epitope recognized by murine T lymphocytes immune to different myoglobins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:4723–4727.
136. Katz ME, Maizels RM, Wicker L, Miller A, Sercarz EE. Immunological focusing by the mouse major histocompatibility complex: mouse strains confronted with distantly related lysozymes confine their attention to very few epitopes. *Eur J Immunol* 1982;12:535–540.
137. Gell PGH, Benacerraf B. Studies on hypersensitivity II Delayed hypersensitivity to denatured proteins in guinea pigs. *Immunology* 1959;2:64–70.
138. Berzofsky JA. The nature and role of antigen processing in T cell activation. In: Cruse JM, Lewis RE Jr, eds. *The Year in Immunology 1984–1985.* Basel: Karger, 1985:18–24.
139. Livingstone A, Fathman CG. The structure of T cell epitopes. *Annu Rev Immunol* 1987;5:477–501.
140. Schwartz RH. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1985;3: 237–261.
141. Berzofsky JA, Cease KB, Cornette JL, et al. Protein antigenic structures recognized by T cells: potential applications to vaccine design. *Immunol Rev* 1987;98: 9–52.
142. Berzofsky JA, Richman LK, Killion DJ. Distinct H-2–linked Ir genes control both antibody and T cell responses to different determinants on the same antigen, myoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4046–4050.
143. Manca F, Clarke JA, Miller A, Sercarz EE, Shastri N. A limited region within hen egg-white lysozyme serves as the focus for a diversity of T cell clones. *J Immunol* 1984;133:2075–2078.
144. Shimonkevitz R, Colon S, Kappler JW, Marrack P, Grey H. Antigen recognition by H-2–restricted T cells. II. A tryptic ovalbumin peptide that substitutes for processed antigen. *J Immunol* 1984;133:2067–2074.
145. Allen PM, Unanue ER. Differential requirements for antigen processing by macrophages for lysozyme-specific T cell hybridomas. *J Immunol* 1984;132: 1077–1079.
146. Berkower I, Buckenmeyer GK, Berzofsky JA. Molecular mapping of a histocompatibility-restricted immunodominant T cell epitope with synthetic and natural peptides: implications for antigenic structure. *J Immunol* 1986;136: 2498–2503.
147. Kurokohchi K, Akatsuka T, Pendleton CD, et al. Use of recombinant protein to identify a motif-negative human CTL epitope presented by HLA-A2 in the hepatitis C virus NS3 region. *J Virol* 1996;70:232–240.
148. Thomas JW, Danho W, Bullesbach E, Fohles J, Rosenthal AS. Immune response gene control of determinant selection. III. Polypeptide fragments of insulin are differentially recognized by T but not by B cells in insulin immune guinea pigs. *J Immunol* 1981;126:1095–1100.
149. Schwartz RH, Fox BS, Fraga E, Chen C, Singh B. The T lymphocyte response to cytochrome c. V. Determination of the minimal peptide size required for stimulation of T cell clones and assessment of the contribution of each residue beyond this size to antigenic potency. *J Immunol* 1985;135:2598–2608.
150. Cease KB, Berkower I, York-Jolley J, Berzofsky JA. T cell clones specific for an amphipathic alpha helical region of sperm whale myoglobin show differing fine specificities for synthetic peptides: a multi-view/single structure interpretation of immunodominance. *J Exp Med* 1986;164:1779–1784.
151. Kurata A, Palker TJ, Streilein RD, Scearce RM, Haynes BF, Berzofsky JA. Immunodominant sites of human T-cell lymphotropic virus type 1 envelope protein for murine helper T cells. *J Immunol* 1989;143:2024–2030.
152. Lamb JR, Ivanyi J, Rees ADM, et al. Mapping of T cell epitopes using recombinant antigens and synthetic peptides. *EMBO J* 1987;6:1245–1249.
153. Townsend ARM, Gotch FM, Davey J. Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell* 1985;42:457–467.
154. Walker BD, Flexner C, Birch-Limberger K, et al. Long-term culture and fine specificity of human cytotoxic T lymphocyte clones reactive with human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:9514–9518.

155. Hosmalin A, Clerici M, Houghten R, et al. An epitope in HIV-1 reverse transcriptase recognized by both mouse and human CTL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2344–2348.
156. Kojima M, Cease KB, Buckenmeyer GK, Berzofsky JA. Limiting dilution comparison of the repertoires of high and low responder MHC-restricted T cells. *J Exp Med* 1988;167:1100–1113.
157. Heber-Katz E, Hansburg D, Schwartz RH. The Ia molecule of the antigen-presenting cell plays a critical role in immune response gene regulation of T cell activation. *J Mol Cell Immunol* 1983;1:3–14.
158. Matis LA, Longo DL, Hedrick SM, Hannum C, Margoliash E, Schwartz RH. Clonal analysis of the major histocompatibility complex restriction and the fine specificity of antigen recognition in the T cell proliferative response to cytochrome c. *J Immunol* 1983;130:1527–1535.
159. Hansburg D, Heber-Katz E, Fairwell T, Appella E. Major histocompatibility complex–controlled antigen presenting cell–expressed specificity of T cell antigen recognition. *J Exp Med* 1983;158:25–39.
160. England RE, Kullberg MC, Cornette JL, Berzofsky JA. Molecular analysis of a heteroclitic T-cell response to the immunodominant epitope of sperm whale myoglobin: implications for peptide partial agonists. *J Immunol* 1995;155:4295–4306.
161. Gammon G, Geysen HM, Apple RJ, et al. T cell determinant structure: cores and determinant envelopes in three mouse major histocompatibility complex haplotypes. *J Exp Med* 1991;173:609–617.
162. Kimoto M, Fathman CG. Antigen-reactive T cell clones I transcomplementing hybrid I-A–region gene products function effectively in antigen presentation. *J Exp Med* 1980;152:759–770.
163. Kappler JW, Skidmore B, White J, Marrack P. Antigen-inducible H-2–restricted interleukin-2–producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition. *J Exp Med* 1981;153:1198–1214.
164. Young DB, Lamb JR. T lymphocytes respond to solid-phase antigen: a novel approach to the molecular analysis of cellular immunity. *Immunology* 1986;59:167–171.
165. Lamb JR, Young DB. A novel approach to the identification of T-cell epitopes in *Mycobacterium tuberculosis* using human T-lymphocyte clones. *Immunology* 1987;60:1–5.
166. Mustafa AS, Gill HK, Nerland A, et al. Human T-cell clones recognize a major M. Leprae protein antigen expressed in *E. coli*. *Nature* 1986;319:63–66.
167. De Plaen E, Lurquin C, Van Pel A, et al. Immunogenic (tum^-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum^- antigen P91A and identification of the tum^- mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:2274–2278.
168. Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991;254:1643–1647.
169. Guilloux Y, Lucas S, Brichard VG, et al. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase B gene. *J Exp Med* 1996;183:1173–1183.
170. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3515–3519.
171. Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, et al. A mutated b-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183:1185–1192.
172. Wang R-F, Parkhurst MR, Kawakami Y, Robbins PF, Rosenberg SA. Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *J Exp Med* 1996;183:1131–1140.
173. Berkower I, Kawamura H, Matis LA, Berzofsky JA. T cell clones to two major T cell epitopes of myoglobin: effect of I-A/I-E restriction on epitope dominance. *J Immunol* 1985;135:2628–2634.
174. Berkower I, Matis LA, Buckenmeyer GK, Gurd FRN, Longo DL, Berzofsky JA. Identification of distinct predominant epitopes recognized by myoglobin-specific T cells under control of different Ir genes and characterization of representative T-cell clones. *J Immunol* 1984;132:1370–1378.
175. Shastri N, Oki A, Miller A, Sercarz EE. Distinct recognition phenotypes exist for T cell clones specific for small peptide regions of proteins. Implications for the mechanisms underlying major histocompatibility complex–restricted antigen recognition and clonal deletion models of immune response gene defects. *J Exp Med* 1985;162:332–345.
176. Allen PM, McKean DJ, Beck BN, Sheffield J, Glimcher LH. Direct evidence that a class II molecule and a simple globular protein generate multiple determinants. *J Exp Med* 1985;162:1264–1274.
177. Hackett CJ, Dietzschold B, Gerhard W, et al. Influenza virus site recognized by a murine helper T cell specific for H1 strains. *J Exp Med* 1983;158:294–302.
178. Hurwitz JL, Heber-Katz E, Hackett CJ, Gerhard WJ. Characterization of the murine TH response to influenza virus hemagglutinin: evidence for three major specificities. *J Immunol* 1984;133:3371–3377.
179. Lamb JR, Eckels DD, Lake P, Woody JN, Green N. Human T cell clones recognize chemically synthesized peptides of influenza hemagglutinin. *Nature* 1982;300:66–69.
180. Rosenthal AS. Determinant selection and macrophage function in genetic control of the immune response. *Immunol Rev* 1978;40:136–152.
181. Milich DR, McLachlan A, Chisari FV, Thornton GB. Nonoverlapping T and B cell determinants on an hepatitis B surface antigen pre-S(2) region synthetic peptide. *J Exp Med* 1986;164:532–547.
182. Francis MJ, Fry CM, Rowlands DJ, et al. Immunological priming with synthetic peptides of foot and mouth disease virus. *J Gen Virol* 1985;66:2347–2352.
183. Corradin GP, Juillerat MA, Vita C, Engers HD. Fine specificity of a BALB/c T cell clone directed against beef apo cytochrome c. *J Mol Immunol* 1983;20:763–768.
184. Corradin GP, Wallace CJA, Proudfoot AEI, Baumhuter S. Murine T cell response specific for cytochrome c. In: Sercarz EE, Berzofsky JA, eds. *The immunogenicity of protein antigens: repertoire and regulation.* Boca Raton, FL: CRC Press, 1987:43–48.
185. Milich DR, Peterson DL, Leroux-Roels GG, Lerner RA, Chisari FV. Genetic regulation of the immune response to hepatitis B surface antigen (HBsAg). VI. Fine specificity. *J Immunol* 1985;134:4203–4211.
186. Guillet J-G, Lai M-Z, Briner TJ, Smith JA, Gefter ML. Interaction of peptide antigens and class II major histocompatibility complex antigens. *Nature* 1986;324:260–262.
187. Macfarlan RI, Dietzschold B, Wiktor TJ, et al. T cell responses to cleaved rabies virus glycoprotein and to synthetic peptides. *J Immunol* 1984;133:2748–2752.
188. Margalit H, Spouge JL, Cornette JL, Cease K, DeLisi C, Berzofsky JA. Prediction of immunodominant helper T-cell antigenic sites from the primary sequence. *J Immunol* 1987;138:2213–2229.
189. Townsend ARM, Rothbard J, Gotch FM, Bahadur G, Wraith D, McMichael AJ. The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* 1986;44:959–968.
190. Townsend ARM, Bastin J, Gould K, Brownlee GG. Cytotoxic T lymphocytes recognize influenza haemagglutinin that lacks a signal sequence. *Nature* 1986;324:575–577.
191. Berzofsky JA. Structural features of protein antigenic sites recognized by helper T cells: What makes a site immunodominant? In: Cruse JM, Lewis RE Jr, eds. *The year in immunology 1985–1986.* Basel, Switzerland: Karger, 1986:28–38.
192. Berzofsky JA. Immunodominance in T lymphocyte recognition. *Immunol Lett* 1988;18:83–92.
193. Allen PM. Antigen processing at the molecular level. *Immunol Today* 1987;8:270–273.
194. Goodman JW, Sercarz EE. The complexity of structures involved in T-cell activation. *Annu Rev Immunol* 1983;1:465–498.
195. Finnegan A, Smith MA, Smith JA, Berzofsky JA, Sachs DH, Hodes RJ. The T cell repertoire for recognition of a phylogenetically distant protein antigen: peptide specificity and MHC restriction of staphylococcal nuclease specific T cell clones. *J Exp Med* 1986;164:897–910.
196. Good MF, Pombo D, Quakyi IA, et al. Human T cell recognition of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum.* Immunodominant T cell domains map to the polymorphic regions of the molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:1199–1203.
197. Nanda NK, Arzoo KK, Geysen HM, Sette A, Sercarz EE. Recognition of multiple peptide cores by a single T cell receptor. *J Exp Med* 1995;182:531–539.
198. Brett SJ, Cease KB, Berzofsky JA. Influences of antigen processing on the expression of the T cell repertoire: evidence for MHC-specific hindering structures on the products of processing. *J Exp Med* 1988;168:357–373.
199. Gammon G, Shastri N, Cogswell J, et al. The choice of T-cell epitopes utilized on a protein antigen depends on multiple factors distant from as well as at the determinant site. *Immunol Rev* 1987;98:53–73.
200. Sercarz EE, Lehmann PV, Ametani A, Benichou G, Miller A, Moudgil K. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol* 1993;11:729–766.
201. Unanue ER. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu Rev Immunol* 1984;2:395–428.
202. Pincus M, Gerewitz F, Schwartz RH, Scheraga HA. Correlation between the conformation of cytochrome c peptides and their stimulatory activity in a T-lymphocyte proliferation assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:3297–3300.
203. DeLisi C, Berzofsky JA. T cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7048–7052.
204. Spouge JL, Guy HR, Cornette JL, et al. Strong conformational propensities enhance T-cell antigenicity. *J Immunol* 1987;138:204–212.
205. Carbone FR, Fox BS, Schwartz RH, Paterson Y. The use of hydrophobic a-helix–defined peptides in delineating the T cell determinant for pigeon cytochrome c. *J Immunol* 1987;138:1838–1844.
206. Ziegler HK, Unanue ER. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:175–178.
207. Shimonkevitz R, Kappler J, Marrack P, Grey H. Antigen recognition by H-2 restricted T cells. I. Cell free antigen processing. *J Exp Med* 1983;158:303–316.
208. Streicher HZ, Berkower IJ, Busch M, Gurd FRN, Berzofsky JA. Antigen conformation determines processing requirements for T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:6831–6835.
209. Lee P, Matsueda GR, Allen PM. T cell recognition of fibrinogen. A determinant on the Aa-chain does not require processing. *J Immunol* 1988;140:1063–1068.
210. Régnier-Vigouroux A, Ayeb ME, Defendini M-L, Granier C, Pierres M. Pro-

cessing by accessory cells for presentation to murine T cells of apamin, a disulfide-bonded 18 amino acid peptide. *J Immunol* 1988;140:1069–1075.
211. Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong S-C, Barlow A, Janeway CA Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991; 353:622–627.
212. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 1994;368:215–221.
213. Stern LJ, Wiley DC. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure* 1994;2:245–251.
214. Townsend ARM, Skehel JJ. The influenza A virus nucleoprotein gene controls the induction of both subtype specific and crossreactive cytotoxic T cells. *J Exp Med* 1984;160:552–563.
215. Braciale TJ, Braciale VL, Winkler M, et al. On the role of the transmembrane anchor sequence of influenza hemagglutinin in target cell recognition by class I MHC-restricted hemagglutinin-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1987;166:678–692.
216. Tobery T, Siliciano RF. Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocytes (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses in vivo after immunization. *J Exp Med* 1997;185:909–920.
217. Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL, Fan DP, Braciale TJ. Differences in antigen presentation to MHC class I and class II–restricted influenza virus specific cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med* 1986;163:903–921.
218. Yewdell JW, Bennink JR, Hosaka Y. Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Science* 1988;239:637–640.
219. Nuchtern JG, Biddison WE, Klausner RD. Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* 1990;343:74–76.
220. Matlin KS, Reggio H, Helenius A, Simons K. Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J Cell Biol* 1981;91:601–613.
221. Jin Y, Shih JW-K, Berkower IJ. Human T cell response to HBsAg: endosomal and nonendosomal processing pathways are accessible to both endogenous and exogenous antigen. *J Exp Med* 1988;168:293–306.
222. Moore MW, Carbone FR, Bevan MJ. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 1988;54:777–785.
223. Weiss S, Bogen B. B-lymphoma cells process and present their endogenous immunoglobulin to major histocompatibility complex–restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:282–286.
224. Weiss S, Bogen B. MHC class II–restricted presentation of intracellular antigen. *Cell* 1991;64:767–776.
225. Eisenlohr LC, Hackett CJ. Class II major histocompatibility complex–restricted T cells specific for a virion structural protein that do not recognize exogenous influenza virus. Evidence that presentation of labile T cell determinants is favored by endogenous antigen synthesis. *J Exp Med* 1989;169:921–931.
226. Polydefkis M, Koenig S, Flexner C, et al. Anchor sequence–dependent endogenous processing of human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160 for CD4+ T cell recognition. *J Exp Med* 1990;171:875–887.
227. Jaraquemada D, Marti M, Long EO. An endogenous processing pathway in vaccinia virus–infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II–restricted T cells. *J Exp Med* 1990;172:947–954.
228. Smith GL, Mackett M, Moss B. Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 1983;302:490–495.
229. Jacobson S, Sekaly RP, Jacobson CL, McFarland HF, Long EO. HLA class II–restricted presentation of cytoplasmic measles virus antigens to cytotoxic T cells. *J Virol* 1989;63:1756–1762.
230. Monaco JJ, McDevitt HO. Identification of a fourth class of proteins linked to the murine major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79:3001–3005.
231. Tanaka K, Ii K, Ichihara A, Waxman L, Goldberg AL. A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution. *J Biol Chem* 1986;261:15197–15203.
232. Tanaka K, Yoshimura T, Ichihara A, Kameyama K, Takagi T. A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. II. Properties of the purified enzyme. *J Biol Chem* 1986;261:15204–15207.
233. Arrigo A-P, Tanaka K, Goldberg AL, Welch WJ. Identity of the 19S "prosome" particle with the large mutifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* 1992;331:192–194.
234. Vinitsky A, Antón LC, Snyder HL, Orlowski M, Bennink JR, Yewdell JW. The generation of MHC class I–associated peptides is only partially inhibited by proteasome inhibitors. Involvement of nonproteasomal cytosolic proteases in antigen processing? *J Immunol* 1997;159:554–564.
235. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994;78:761–771.
236. Rammensee H-G, Friede T, Stevanovic S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 1995;41:178–228.
237. Brown MG, Driscoll J, Monaco JJ. Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* 1991; 353:355–357.
238. Vinitsky A, Cardozo C, Sepp-Lorenzino L, Michaud C, Orlowski M. Inhibition of the proteolytic activity of the multicatalytic proteinase complex (proteasome) by substrate-related peptidyl aldehydes. *J Biol Chem* 1994;269:29860–29866.
239. Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 1995;268:726–731.
240. Hughes EA, Ortmann B, Surman M, Cresswell P. The protease inhibitor, N-Acetyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Norleucinal, decreases the pool of major histocompatibility complex class I–binding peptides and inhibits peptide trimming in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 1996;183:1569–1578.
241. Henderson RA, Michel H, Sakaguchi K, et al. HLA-A2.1–associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science* 1992; 255:1264–1266.
242. Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL. γ-Interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 1993;365:264–267.
243. Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Eichelberger M, et al. Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity* 1994;1: 533–541.
244. Fehling HJ, Swat W, Laplace C, et al. MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* 1994;265:1234–1237.
245. Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M. Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 1992;267:22369–22377.
246. Dick TP, Ruppert T, Groettrup M, et al. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 1996;86: 253–262.
247. Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 1992;357:375–379.
248. Shastri N, Gammon G, Horvath S, Miller A, Sercarz EE. The choice between two distinct T cell determinants within a 23 amino acid region of lysozyme depends upon structure of the immunogen. *J Immunol* 1986;137:911–915.
249. Shastri N, Miller A, Sercarz EE. Amino acid residues distinct from the determinant region can profoundly affect activation of T cell clones by related antigens. *J Immunol* 1986;136:371–376.
250. Grewal IS, Moudgil KD, Sercarz EE. Hindrance of binding to class II major histocompatibility complex molecules by a single amino acid residue contiguous to a determinant leads to crypticity of the determinant as well as lack of response to the protein antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1779–1783.
251. Fox BS, Carbone FR, Germain RN, Paterson Y, Schwartz RH. Processing of a minimal antigenic peptide alters its interaction with MHC molecules. *Nature* 1988;331:538–540.
252. Sercarz E, Wilbur S, Sadegh-Nasseri S, et al. The molecular context of a determinant influences its dominant expression in a T cell response hierarchy through "fine processing." In: Cinader B, Miller RG, eds. *Progress in immunology VI.* New York: Academic Press, 1986:227–237.
253. Kärre K, Ljunggren H-G, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2–deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986;319:675–678.
254. DeMars R, Rudersdorf R, Chang C, et al. Mutations that impair a posttranscriptional step in expression of HLA-A and -B antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:8183–8187.
255. Townsend A, Öhlén C, Bastin J, Ljunggren H-G, Foster L, Kärre K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 1989;340:443–448.
256. Monaco JJ, Cho S, Attaya M. Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing. *Science* 1990;250:1723–1726.
257. Deverson EV, Gow IR, Coadwell WJ, Monaco JJ, Butcher GW, Howard JC. MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* 1990;348:738–741.
258. Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the "ABC" superfamily of transporters. *Nature* 1990;348:741–743.
259. Schumacher TNM, Heemels M-T, Neefjes JJ, Kast WM, Melief CJM, Ploegh HL. Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules on intact cells and in vitro. *Cell* 1990;62:563–567.
260. Attaya M, Jameson S, Martinez CK, et al. Ham-2 corrects the class I antigen-processing defect in RMA-S cells. *Nature* 1992;355:647–649.
261. Spies T, Cerundolo V, Colonna M, Cresswell P, Townsend A, DeMars R. Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature* 1992;355:644–646.
262. Kelly A, Powis SH, Kerr L-A, et al. Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* 1992;355:641–644.
263. Ortmann B, Androlewicz MJ, Cresswell P. MHC class I/β2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 1994;368: 864–867.
264. Suh W-K, Cohen-Doyle MF, Fruh K, Wang K, Peterson PA, Williams DB. Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science* 1994;264:1322–1326.
265. Livingstone AM, Powis SJ, Diamond AG, Butcher GW, Howard JC. A trans-acting major histocompatibility complex–linked gene whose alleles determine gain and loss changes in the antigenic structure of a classical class I molecule. *J Exp Med* 1989;170:777–795.
266. Livingstone AM, Powis SJ, Günther E, Cramer DV, Howard JC, Butcher GW. Cim: an MHC class II–linked allelism affecting the antigenicity of a classical

class I molecule for T lymphocytes. *Immunogenetics* 1991;34:157–163.

267. Powis SJ, Deverson EV, Coadwell WJ, et al. Effect of polymorphism of an MHC-linked transporter on the peptides assembled in a class I molecule. *Nature* 1992; 357:211–215.
268. Powis SJ, Young LL, Joly E, et al. The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* 1996;4:159–165.
269. Neefjes JJ, Momburg F, Hämmerling GJ. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 1993;261: 769–771.
270. Neefjes J, Gottfried E, Roelse J, et al. Analysis of the fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters. *Eur J Immunol* 1995;25: 1133–1136.
271. Androlewicz MJ, Cresswell P. Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity* 1994;1:7–14.
272. Schumacher TNM, Kantesaria DV, Heemels M-T, et al. Peptide length and sequence specificity of the mouse TAP1/TAP2 translocator. *J Exp Med* 1994; 179:533–540.
273. van Endert PM, Riganelli D, Greco G, et al. The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J Exp Med* 1995;182: 1883–1895.
274. van Endert PM. Peptide selection for presentation by HLA class I: a role for the human transporter associated with antigen processing? *Immunol Res* 1996; 15:265–279.
275. Del Val M, Hengel H, Häcker H, et al. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J Exp Med* 1992; 176:729–738.
276. Beersma MFC, Bijlmakers MJE, Ploegh HL. Human cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains. *J Immunol* 1993;151:4455–4464.
277. York IA, Roop C, Andrews DW, Riddell SR, Graham FL, Johnson DC. A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. *Cell* 1994;77:525–535.
278. Früh K, Ahn K, Djaballah H, et al. A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* 1995;375:415–418.
279. Hill A, Jugovic P, York I, et al. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 1995;375:411–415.
280. Müllbacher A, Lobigs M. Up-regulation of MHC class I by flavivirus-induced peptide translocation into the endoplasmic reticulum. *Immunity* 1995;3:207–214.
281. Stockinger B, Pessara U, Lin RH, Habicht J, Grez M, Koch N. A role of Ia-associated invariant chains in antigen processing and presentation. *Cell* 1989;56: 683–689.
282. Brodsky FM, Guagliardi LE. The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 1991;9:707–744.
283. Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 1993;11:403–450.
284. Elliot WL, Stille CJ, Thomas LJ, Humphreys RE. An hypothesis on the binding of an amphipathic, a helical sequence in I_i to the desetope of class II antigens. *J Immunol* 1987;138:2949–2952.
285. Roche PA, Cresswell P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 1990;345:615–618.
286. Teyton L, O'Sullivan D, Dickson PW, et al. Invariant chain distinguishes betweeen the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 1990;348:39–44.
287. Roche PA, Cresswell P. Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3150–3154.
288. Bodmer H, Viville S, Benoist C, Mathis D. Diversity of endogenous epitopes bound to MHC class II molecules limited by invariant chain. *Science* 1994;263: 1284–1286.
289. Long EO, LaVaute T, Pinet V, Jaraquemada D. Invariant chain prevents the HLA-DR-restricted presentation of a cytosolic peptide. *J Immunol* 1994;153: 1487–1494.
290. Roche PA, Marks MS, Cresswell P. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 1991;354:392–394.
291. Fling SP, Arp B, Pious D. HLA-DMA and-DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* 1994;368:554–558.
292. Sadegh-Nasseri S, Stern LJ, Wiley DC, Germain RN. MHC class II function preserved by low-affinity peptide interactions preceding stable binding. *Nature* 1994;370:647–650.
293. Mellins E, Kempin S, Smith L, Monji T, Pious D. A gene required for class II-restricted antigen presentation maps to the major histocompatibility complex. *J Exp Med* 1991;174:1607–1615.
294. Riberdy JM, Newcomb JR, Surman MJ, Barbosa JA, Cresswell P. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 1992;360:474–477.
295. Morris P, Shaman J, Attaya M, et al. An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* 1994;368: 551–554.
296. Sette A, Ceman S, Kubo RT, et al. Invariant chain of peptides in most HLA-DR molecules of an antigen-processing mutant. *Science* 1992;258: 1801–1804.
297. Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II $\alpha\beta$ dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 1995;82:155–165.
298. Denzin LK, Robbins NF, Carboy-Newcome C, Cresswell P. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1994;1:595–606.
299. Sloan VS, Cameron P, Porter G, et al. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 1995;375:802–806.
300. Sherman MA, Weber DA, Jensen PE. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* 1995;3:197–205.
301. Benacerraf B. A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I region-specific Ir genes in macrophages and B lymphocytes. *J Immunol* 1978;120:1809–1812.
302. Rosenthal AS, Barcinski MA, Blake JT. Determinant selection is a macrophage dependent immune response gene function. *Nature* 1977;267:156–158.
303. Paul WE, Shevach EM, Pickeral S, Thomas DW, Rosenthal AS. Independent populations of primed F1 guinea pig T-lymphocytes respond to antigen-pulsed parental peritoneal exudate cells. *J Exp Med* 1977;145:618–630.
304. Watts TH, Brian AA, Kappler JW, Marrack P, McConnell HM. Antigen presentation by supported planar membranes containing affinity-purified I-A^d. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:7564–7568.
305. Walden P, Nagy ZA, Klein J. Induction of regulatory T-lymphocyte responses by liposomes carrying major histocompatibility complex molecules and foreign antigen. *Nature* 1985;315:327–329.
306. Norcross MA, Bentley DM, Margulies DH, Germain RN. Membrane Ia expression and antigen-presenting accessory cell function of L cells transfected with class II major histocompatibility genes. *J Exp Med* 1984;160:1316–1337.
307. Demotz S, Grey HM, Sette A. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 1990;249:1028–1030.
308. Harding CV, Unanue ER. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 1990;346: 574–576.
309. Christinck ER, Luscher MA, Barber BH, Williams DB. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* 1991;352:67–70.
310. Cabral GA, Marciano-Cabral F, Funk GA, et al. Cellular and humoral immunity in guinea pigs to two major polypeptides derived from hepatitis B surface antigen. *J Gen Virol* 1978;38:339–350.
311. Takeshita T, Kozlowski S, England RD, et al. Role of conserved regions of class I MHC molecules in the activation of CD8+ CTL by peptide and purified cell-free class I molecules. *Int Immunol* 1993;5:1129–1138.
312. Brower RC, England R, Takeshita T, et al. Minimal requirements for peptide mediated activation of CD8+ CTL. *Mol Immunol* 1994;31:1285–1293.
313. Werdelin O. Chemically related antigens compete for presentation by accessory cells to T cells. *J Immunol* 1982;129:1883–1891.
314. Rock KL, Benacerraf B. Inhibition of antigen-specific T lymphocyte activation by structurally related Ir gene-controlled polymers. Evidence of specific competition for accessory cell antigen presentation. *J Exp Med* 1983;157: 1618–1634.
315. Rock KL, Benacerraf B. Inhibition of antigen-specific T lymphocyte activation by structurally related Ir gene-controlled polymers II competitive inhibition of I-E. *J Exp Med* 1984;160:1864–1879.
316. Guillet J-G, Lai M-Z, Briner TJ, et al. Immunological self, nonself discrimination. *Science* 1987;235:865–870.
317. Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue ER. The binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 1985;317: 359–361.
318. Buus S, Sette A, Colon SM, Jenis DM, Grey HM. Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition. *Cell* 1986;47:1071–1077.
319. Phillips ML, Yip CC, Shevach EM, Delovitch TL. Photoaffinity labeling demonstrates binding between Ia molecules and nominal antigen on antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:5634–5638.
320. Babbitt BP, Matsueda G, Haber E, Unanue ER, Allen PM. Antigenic competition at the level of peptide-Ia binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:4509–4513.
321. Buus S, Sette A, Colon SM, Miles C, Grey HM. The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science* 1987;235:1353–1358.
322. Ronchese F, Schwartz RH, Germain RN. Functionally distinct subsites on a class II major histocompatibility complex molecule. *Nature* 1987;329:254–256.
323. Sette A, Buus S, Colon S, Smith JA, Miles C, Grey HM. Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T cells. *Nature* 1987;328:395–399.
324. Kurata A, Berzofsky JA. Analysis of peptide residues interacting with MHC molecule or T-cell receptor: can a peptide bind in more than one way to the same MHC molecule? *J Immunol* 1990;144:4526–4535.
325. Allen PM, Matsueda GR, Evans RJ, Dunbar JB Jr, Marshall GR, Unanue ER. Identification of the T-cell and Ia contact residues of a T-cell antigenic epitope. *Nature* 1987;327:713–717.
326. Ortmann B, Martin S, von Bonin A, Schiltz E, Hoschützky H, Weltzien HU. Syn-

thetic peptides anchor T cell-specific TNP epitopes to MHC antigens. *J Immunol* 1992;148:1445–1450.
327. Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of Class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988;332:845–850.
328. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* 1987; 329:506–512.
329. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987;329:512–518.
330. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 1991; 353:321–325.
331. Matsumura M, Fremont DH, Peterson PA, Wilson IA. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 1992; 257:927–934.
332. Fremont DH, Matsumura M, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K^b. *Science* 1992;257:919–927.
333. Germain RN, Ashwell JD, Lechler RI, et al. "Exon-shuffling" maps control of antibody and T-cell-recognition sites to the NH2 terminal domain of the class II major histocompatibility polypeptide Abeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82: 2940–2944.
334. Glimcher LH. T cells recognize multiple determinants on a single class II molecule, some of which depend on tertiary conformation. In: Sercarz EE, Berzofsky JA, eds. *Immunogenicity of protein antigens: repertoires and regulation.* Boca Raton, FL: CRC Press, 1987:131–138.
335. Haskins K, Kappler J, Marrack P. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. *Annu Rev Immunol* 1984;2:51–66.
336. Meuer SC, Acuto O, Hercend T, Schlossman SF, Reinherz EL. The human T-cell receptor. *Annu Rev Immunol* 1984;2:23–50.
337. Davis MM. Molecular genetics of the T cell-receptor beta chain. *Annu Rev Immunol* 1985;3:537–560.
338. Kronenberg M, Siu G, Hood LE, Shastri N. The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 1986;4: 529–591.
339. Vasmatzis G, Cornette J, Sezerman U, DeLisi C. TcR recognition of the MHC-peptide dimer: structural properties of a ternary complex. *J Mol Biol* 1996; 261:72–89.
340. Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, et al. An αβ T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR–MHC complex. *Science* 1996;274:209–219.
341. Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 1996;384:134–141.
342. Bhayani H, Paterson Y. Analysis of peptide binding patterns in different major histocompatibility complex/T cell receptor complexes using pigeon cytochrome c-specific T cell hybridomas. Evidence that a single peptide binds major histocompatibility complex in different conformations. *J Exp Med* 1989;170: 1609–1625.
343. Brett SJ, McKean D, York-Jolley J, Berzofsky JA. Antigen presentation to specific T cells by Ia molecules selectively altered by site-directed mutagenesis. *Int Immunol* 1989;1:130–140.
344. McMichael AJ, Gotch FM, Santos-Aguado J, Strominger JL. Effect of mutations and variations of HLA-A2 on recognition of a virus peptide epitope by cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:9194–9198.
345. Racioppi L, Ronchese F, Schwartz RH, Germain RN. The molecular basis of class II MHC allelic control of T cell responses. *J Immunol* 1991;147: 3718–3727.
346. Boehncke W-H, Takeshita T, Pendleton CD, et al. The importance of dominant negative effects of amino acids side chain substitution in peptide–MHC molecule interactions and T cell recognition. *J Immunol* 1993;150:331–341.
347. Rothbard JB, Busch R, Howland K, et al. Structural analysis of a peptide–HLA class II complex: identification of critical interactions for its formation and recognition by T cell receptor. *Int Immunol* 1989;1:479–486.
348. Jardetzky TS, Gorga JC, Busch R, Rothbard J, Strominger JL, Wiley DC. Peptide binding to HLA-DR1: a peptide with most residues substituted to alanine retains MHC binding. *EMBO J* 1990;9:1797–1803.
349. Rothbard JB, Busch R, Bal V, Trowsdale J, Lechler RI, Lamb JR. Reversal of HLA restriction by a point mutation in an antigenic peptide. *Int Immunol* 1989;1: 487–495.
350. Maryanski JL, Verdini AS, Weber PC, Salemme FR, Corradin G. Competitor analogs for defined T cell antigens: peptides incorporating a putative binding motif and polyproline or polyglycine spacers. *Cell* 1990;60:63–72.
351. Ruppert J, Sidney J, Celis E, Kubo RT, Grey HM, Sette A. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell* 1993; 74:929–937.
352. Berzofsky JA. Epitope selection and design of synthetic vaccines: molecular approaches to enhancing immunogenicity and crossreactivity of engineered vaccines. *Ann N Y Acad Sci* 1993;690:256–264.
353. Berzofsky JA. Designing peptide vaccines to broaden recognition and enhance potency. *Ann N Y Acad Sci* 1995;754:161–168.
354. Takahashi H, Nakagawa Y, Pendleton CD, et al. Induction of broadly cross-reactive cytotoxic T cells recognizing an HIV-1 envelope determinant. *Science* 1992; 255:333–336.
355. Ahlers JD, Takeshita T, Pendleton CD, Berzofsky JA. Enhanced immunogenicity of HIV-1 vaccine construct by modification of the native peptide sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10856–10861.
356. Ahlers JD, Dunlop N, Pendleton CD, Newman M, Nara PL, Berzofsky JA. Candidate HIV type1 multideterminant cluster peptide-P18MN vaccine constructs elicit type1 helper T cells, cytotoxic T cells, and neutralizing antibody, all using the same adjuvant immunization. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996;12:259–272.
357. Shirai M, Pendleton CD, Ahlers J, Takeshita T, Newman M, Berzofsky JA. Helper-CTL determinant linkage required for priming of anti-HIV CD8+ CTL in vivo with peptide vaccine constructs. *J Immunol* 1994;152:549–556.
358. Ahlers JD, Dunlop N, Alling DW, Nara PL, Berzofsky JA. Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs: GM-CSF and TNFα synergize with IL-12 to enhance induction of CTL. *J Immunol* 1997;158:3947–3958.
359. Pogue RR, Eron J, Frelinger JA, Matsui M. Amino-terminal alteration of the HLA-A*0201-restricted human immunodeficiency virus pol peptide increases complex stability and in vitro immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:8166–8170.
360. Parkhurst MR, Salgaller ML, Southwood S, et al. Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J Immunol* 1996;157:2539–2548.
361. Falk K, Rötzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee H-G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991;351:290–296.
362. Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 1991;353:326–329.
363. Romero P, Corradin G, Luescher IF, Maryanski JL. H-2K^d–restricted antigenic peptides share a simple binding motif. *J Exp Med* 1991;174:603–612.
364. Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, et al. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 1992;255:1261–1263.
365. Corr M, Boyd LF, Padlan EA, Margulies DH. H-2D^d exploits a four residue peptide binding motif. *J Exp Med* 1993;178:1877–1892.
366. Schumacher TNM, De Bruijn MLH, Vernie LN, et al. Peptide selection by MHC class I molecules. *Nature* 1991;350:703–706.
367. Tsomides TJ, Walker BD, Eisen HN. An optimal viral peptide recognized by CD8+ T cells binds very tightly to the restricting class I major histocompatibility complex protein on intact cells but not to the purified class I protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:11276–11280.
368. Hunt DF, Michel H, Dickinson TA, et al. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-A^d. *Science* 1992;256:1817–1820.
369. Sette A, Buus S, Appella E, et al. Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:3296–3300.
370. Chicz RM, Urban RG, Gorga JC, Vignali DAA, Lane WS, Strominger JL. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med* 1993;178:27–47.
371. Chicz RM, Urban RG, Lane WS, et al. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 1992;358:764–768.
372. Hammer J, Takacs B, Sinigaglia F. Identification of a motif for HLA-DR1 binding peptides using M13 display libraries. *J Exp Med* 1992;176:1007–1013.
373. Hammer J, Valsasnini P, Tolba K, et al. Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* 1993;74:197–203.
374. Sinigaglia F, Hammer J. Motifs and supermotifs for MHC class II binding peptides. *J Exp Med* 1995;181:449–451.
375. Marshall KW, Wilson KJ, Liang J, Woods A, Zaller D, Rothbard JB. Prediction of peptide affinity to HLA DRB1*0401. *J Immunol* 1995;154:5927–5933.
376. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 1994;368:711–718.
377. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988;334:395–402.
378. Ogasawara K, Maloy WL, Schwartz RH. Failure to find holes in the T cell repertoire. *Nature* 1987;325:450.
379. Shirai M, Arichi T, Nishioka M, et al. CTL responses of HLA-A2.1–transgenic mice specific for hepatitis C viral peptides predict epitopes for CTL of humans carrying HLA-A2.1. *J Immunol* 1995;154:2733–2742.
380. Schaeffer EB, Sette A, Johnson DL, et al. Relative contribution of "determinant selection" and "holes in the T-cell repertoire" to T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:4649–4653.
381. Moudgil KD, Grewal IS, Jensen PE, Sercarz EE. Unresponsiveness to a self-peptide of mouse lysozyme owing to hindrance of T cell receptor-major histocompatibility complex/peptide interaction caused by flanking epitopic residues. *J Exp Med* 1996;183:535–546.
382. Takeshita T, Takahashi H, Kozlowski S, et al. Molecular analysis of the same

HIV peptide functionally binding to both a class I and a class II MHC molecule. *J Immunol* 1995;154:1973–1986.
383. Alexander-Miller MA, Parker KC, Tsukui T, Pendleton CD, Coligan JE, Berzofsky JA. Molecular analysis of presentation by HLA-A2.1 of a promiscuously binding V3 loop peptide from the HIV-1 envelope protein to human CTL. *Int Immunol* 1996;8:641–649.
384. Takahashi H, Merli S, Putney SD, et al. A single amino acid interchange yields reciprocal CTL specificities for HIV gp160. *Science* 1989;246:118–121.
385. Takahashi H, Houghten R, Putney SD, et al. Structural requirements for class-I MHC molecule-mediated antigen presentation and cytotoxic T-cell recognition of an immunodominant determinant of the HIV envelope protein. *J Exp Med* 1989;170:2023–2035.
386. De Magistris MT, Alexander J, Coggeshall M, et al. Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell* 1992;68: 625–634.
387. Sette A, Alexander J, Ruppert J, et al. Antigen analogs/MHC complexes as specific T cell receptor antagonists. *Annu Rev Immunol* 1994;12:413–431.
388. Lorenz RG, Allen PM. Direct evidence for functional self-protein/Ia-molecule complexes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5220–5223.
389. Evavold BD, Allen PM. Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science* 1991;252:1308–1310.
390. Evavold BD, Williams SG, Hsu BL, Buus S, Allen PM. Complete dissection of the Hb(64-76) determinant using Th1, Th2 clones and T cell hybridomas. *J Immunol* 1992;148:347–353.
391. Pfeiffer C, Stein J, Southwood S, Ketelaar H, Sette A, Bottomly K. Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. *J Exp Med* 1995;181:1569–1574.
392. Chaturvedi P, Yu Q, Southwood S, Sette A, Singh B. Peptide analogs with different affinities for MHC alter the cytokine profile of T helper cells. *Int Immunol* 1996;8:745–755.
393. Sloan-Lancaster J, Evavold BD, Allen PM. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* 1993;363:156–159.
394. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 1989;7:445–480.
395. Sloan-Lancaster J, Shaw AS, Rothbard JB, Allen PM. Partial T cell signaling: altered phospho-ζ and lack of Zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* 1994;79:913–922.
396. Tsitoura DC, Holter W, Cerwenka A, Gelder CM, Lamb JR. Induction of anergy in human T helper 0 cells by stimulation with altered T cell antigen receptor ligands. *J Immunol* 1996;156:2801–2808.
397. Racioppi L, Ronchese F, Matis LA, Germain RN. Peptide–major histocompatibility complex class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor–dependent intracellular signaling. *J Exp Med* 1993;177:1047–1060.
398. Madrenas J, Wange RL, Wang JL, Isakov N, Samelson LE, Germain RN. ζ phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* 1995;267:515–518.
399. Madrenas J, Chau LA, Smith J, Bluestone JA, Germain RN. The efficiency of CD4 recruitment to ligand-engaged TCR controls the agonist/partial agonist properties of peptide–MHC molecule ligands. *J Exp Med* 1997;185:219–229.
400. McKeithan TW. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5042–5046.
401. DeGroot AS, Meister GE, Cornette JL, Margalit H, DeLisi C, Berzofsky JA. Computer prediction of T-cell epitopes. In: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds. *New generation vaccines,* 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1997:127–138.
402. DeGroot AS, Jesdale BM, Berzofsky JA. Prediction and determination of MHC ligands and T cell epitopes. In: Kaufmann SHE, Kabelitz D, eds. *Immunological methods in microbiology.* London: Academic Press, 1998:79–106.
403. Stille CJ, Thomas LJ, Reyes VE, Humphreys RE. Hydrophobic strip-of-helix algorithm for selection of T cell–presented peptides. *Mol Immunol* 1987;24: 1021–1027.
404. Sette A, Doria G, Adorini L. A microcomputer program for hydrophilicity and amphipathicity analysis of protein antigens. *Mol Immunol* 1986;23:807–810.
405. Madden DR, Garboczi DN, Wiley DC. The antigenic identity of peptide–MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* 1993;75:693–708.
406. Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 1995;378:457–462.
407. Cornette JL, Cease KB, Margalit H, Spouge JL, Berzofsky JA, DeLisi C. Hydrophobicity scales and computational techniques for detecting amphipathic structures in proteins. *J Mol Biol* 1987;195:659–686.
408. Cornette JL, Margalit H, DeLisi C, Berzofsky JA. Concepts and methods in the identification of T cell epitopes and their use in the construction of synthetic vaccines. *Methods Enzymol* 1989;178:611–634.
409. Cornette JL, Margalit H, DeLisi C, Berzofsky JA. The amphipathic helix as a structural feature involved in T-cell recognition. In: Epand RM, ed. *The amphipathic helix.* Boca Raton, FL: CRC Press, 1993:333–346.
410. Rothbard JB, Taylor WR. A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO J* 1988;7:93–100.
411. Reyes VE, Chin LT, Humphreys RE. Selection of class I MHC-restricted peptides with the strip-of-helix hydrophobicity algorithm. *Mol Immunol* 1988;25: 867–871.
412. Cornette JL, Margalit H, Berzofsky JA, DeLisi C. Periodic variation in side-chain polarities of T-cell antigenic peptides correlates with their structure and activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8368–8372.
413. Pamer EG, Harty JT, Bevan MJ. Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes. Nature* 1991;353:852–855.
414. Hill AVS, Elvin J, Willis AC, et al. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 1992;360:434–439.
415. Lipford GB, Hoffman M, Wagner H, Heeg K. Primary in vivo responses to ovalbumin: probing the predictive value of the K^b binding motif. *J Immunol* 1993; 150:1212–1222.
416. Nijman HW, Houbiers JGA, Vierboom MPM, et al. Identification of peptide sequences that potentially trigger HLA-A2.1–restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1993;23:1215–1219.
417. Altuvia Y, Berzofsky JA, Rosenfeld R, Margalit H. Sequence features that correlate with MHC restriction. *Mol Immunol* 1994;31:1–19.
418. Meister GE, Roberts CGP, Berzofsky JA, DeGroot AS. Two novel T cell epitope prediction algorithms based on MHC-binding motifs; comparison of predicted and published epitopes from *Mycobacterium tuberculosis* and HIV protein sequences. *Vaccine* 1995;13:581–591.
419. Kaufman JF, Auffray C, Korman AJ, Shackelford DA, Strominger J. The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell* 1984;36:1–13.
420. Zhang C, Cornette JL, Berzofsky JA, DeLisi C. The organization of human leukocyte antigen class I epitopes in HIV genome products: implications for HIV evolution and vaccine design. *Vaccine* 1997;
421. Hammer J, Bono E, Gallazzi F, Belunis C, Nagy Z, Sinigaglia F. Precise prediction of major histocompatibility complex class II–peptide interaction based on peptide side chain scanning. *J Exp Med* 1994;180:2353–2358.
422. Parker DC, Bednarek MA, Coligan JE. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* 1994;152:163–175.
423. Fleckenstein B, Kalbacher H, Muller CP, et al. New ligands binding to the human leukocyte antigen class II molecule DRB1*0101 based on the activity pattern of an undecapeptide library. *Eur J Biochem* 1996;240:71–77.
424. Jesdale BM, Mullen L, Meisell J, Marznello M, Deocampo G, De Groot AS. Epimatrix and epimer, tools for HIV research. In: *Vaccines.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
425. Davenport MP, Ho Shon IAP, Hill AVS. An empirical method for the prediction of T-cell epitopes. *Immunogenetics* 1995;42:392–397.
426. Davenport MP, Godkin A, Friede T, et al. A distinctive peptide binding motif for HLA-DRB1*0407, an HLA-DR4 subtype not associated with rheumatoid arthritis. *Immunogenetics* 1997;45:229–232.
427. Sidney J, Grey HM, Southwood S, et al. Definition of an HLA-A3–like supermotif demonstrates the overlapping peptide-binding repertoires of common HLA molecules. *Hum Immunol* 1996;45:79–93.
428. Kropshofer H, Max H, Halder T, Kalbus M, Muller CA, Kalbacher H. Self-peptides from four HLA-DR alleles share hydrophobic anchor residues near the NH_2-terminal including proline as a stop signal for trimming. *J Immunol* 1993; 151:4732–4742.
429. Vajda S, Weng Z, Rosenfeld R, DeLisi C. Effect of conformational flexibility and solvation on receptor-ligand binding free energies. *Biochemistry* 1994;33: 13977–13988.
430. Sezerman U, Vajda S, DeLisi C. Free energy mapping of class I MHC molecules and structural determination of bound peptides. *Protein Sci* 1996;5:1272–1281.
431. Altuvia Y, Schueler O, Margalit H. Ranking potential binding peptides to MHC molecules by a computational threading approach. *J Mol Biol* 1995;249:244–250.
432. Brusic V, Rudy G, Harrison LC. Prediction of MHC binding peptides using artificial neural networks. In: Stonier RJ, Yu XS, eds. *Complex systems mechanism of adaptation.* Amsterdam: IOS Press, 1994:253–260.
433. Takahashi H, Cohen J, Hosmalin A, et al. An immunodominant epitope of the HIV gp160 envelope glycoprotein recognized by class I MHC molecule-restricted murine cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:3105–3109.
434. Langton BC, Mackewicz CE, Wan AM, Andria ML, Benjamini E. Structural features of an antigen required for cellular interactions and for T-cell activation in an MHC-restricted response. *J Immunol* 1988;141:447–456.
435. Thomas DB, Skehel JJ, Mills KHG, Graham CM. A single amino acid substitution in influenza haemagglutinin abrogates recognition by a monoclonal antibody and a spectrum of subtype-specific L3T4⁺ T cell clones. *Eur J Immunol* 1987;17:133–136.
436. Mozes E, McDevitt HO, Jaton J-C, Sela M. The nature of the antigenic determinant in genetic control of antibody response. *J Exp Med* 1969;130:493–504.
437. Mozes E, McDevitt HO, Jaton J-C, Sela M. The genetic control of antibody specificity. *J Exp Med* 1969;130:1263–1278.
438. Bluestein HG, Green I, Maurer PH, Benacerraf B. Specific immune response genes of the guinea pig. V: Influence of the GA and GT immune response genes on the specificity of cellular and humoral immune responses to a terpolymer of L-glutamic acid, L-alanine, and L-tyrosine. *J Exp Med 1972;135:98–109.*
439. Berzofsky JA, Schechter AN, Shearer GM, Sachs DH. Genetic control of the

immune response to staphylococcal nuclease III. Time course and correlation between the response to native nuclease and the response to its polypeptide fragments. *J Exp Med* 1977;145:111–112.

440. Berzofsky JA, Schechter AN, Shearer GM, Sachs DH. Genetic control of the immune response to staphylococcal nuclease IV. H-2-linked control of the relative proportions of antibodies produced to different determinants of native nuclease. *J Exp Med* 1977;145:123–145.
441. Campos-Neto A, Levine H, Schlossman SJ. T cell regulation of specific B cell responses. *J Immunol* 1978;121:2235–2240.
442. Campos-Neto A, Levine H, Schlossman SJ. Immune response gene control of antibody specificity. *Cell Immunol* 1982;69:128–137.
443. Kohno Y, Berzofsky JA. Genetic control of the immune response to myoglobin. V. Antibody production in vitro is macrophage and T cell–dependent and is under control of two determinant-specific Ir genes. *J Immunol* 1982;128:2458–2464.
444. Barcinski MA, Rosenthal AS. Immune response gene control of determinant selection. I. Intramolecular mapping of the immunogenic sites on insulin recognized by guinea pig T and B cells. *J Exp Med* 1977;145:726–742.
445. Sercarz E, Cecka JM, Kipp D, Miller A. The steering function of T cells in expression of the antibody repertoire directed against multideterminant protein antigen. *Ann Immunol Inst Pasteur* 1977;128:599.
446. Cecka JM, Stratton JA, Miller A, Sercarz EE. Structural aspects of immune recognition of lysozymes. III. T cell specificity restriction and its consequences for antibody specificity. *Eur J Immunol* 1976;6:639–646.
447. Ferguson TA, Peters T Jr, Reed R, Pesce A, Michael JG. Immunoregulatory properties of antigenic fragments from bovine serum albumin. *Cell Immunol* 1983;78:1–12.
448. Kawamura H, Berkower I, Glover C, Berzofsky J. Helper T cell epitope specificity regulates B cell (antibody) specificity. *J Cell Biochem* 1984;8A:211.
449. Benjamini E, Wan AM, Langton BC, Andria ML. Induction of immunity by model synthetic vaccines derived from tobacco mosaic virus protein. In: Dreesman GR, Bronson JG, Kennedy R, eds. *High technology route to virus vaccines.* Washington, DC: American Society of Microbiology, 1985:30–42.
450. Chesnut RW, Colon SM, Grey HM. Antigen presentation by normal B cells B cell tumors and macrophages: functional biochemical comparison. *J Immunol* 1982;128:1764–1768.
451. Chesnut RW, Colon SM, Grey HM. Requirements for the processing of antigen by antigen-presenting cells. I. Functional comparison of B cell tumors and macrophages. *J Immunol* 1982;129:2382–2388.
452. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T cells and B cells. *Nature* 1985;314:537–539.
453. Chesnut RW, Grey HM. Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. *J Immunol* 1981;126:1075–1079.
454. Malynn BA, Wortis HH. Role of antigen-specific B cells in the induction of SRBC-specific T cell proliferation. *J Immunol* 1984;132:2253–2258.
455. Rock KL, Benacerraf B, Abbas AK. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes I Role of surface immunoglobulin receptors. *J Exp Med* 1984;160: 1102–1113.
456. Tony H-P, Parker DC. Major histocompatibility complex–restricted polyclonal B cell responses resulting form helper T cell recognition of antiimmunoglobulin presented by small B lymphocytes. *J Exp Med* 1985;161:223–241.
457. Kawamura H, Berzofsky JA. Enhancement of antigenic potency in vitro and immunogenicity in vivo by coupling the antigen to anti-immunoglobulin. *J Immunol* 1986;136:58–65.
458. Davidson HW, Watts C. Epitope-directed processing of specific antigen by B lymphocytes. *J Cell Biol* 1989;109:85–92.
459. Löwenadler B, Lycke N, Svanholm C, Svennerholm A-M, Krook K, Gidlund M. T and B cell responses to chimeric proteins containing heterologous T helper epitopes inserted at different positions. *Mol Immunol* 1992;29: 1185–1190.
460. Manca F, Fenoglio D, Kunkl A, Cambiaggi C, Sasso M, Celada F. Differential activation of T cell clones stimulated by macrophages exposed to antigen complexed with monoclonal antibodies. A possible influence of paratope specificity on the mode of antigen processing. *J Immunol* 1988;140:2893–2898.
461. Manca F, Fenoglio D, Li Pira G, Kunkl A, Celada F. Effect of antigen/antibody ratio on macrophage uptake, processing, and presentation to T cells of antigen complexed with polyclonal antibodies. *J Exp Med* 1991;173:37–48.
462. Watts C, Lanzavecchia A. Suppressive effect of antibody on processing of T cell epitopes. *J Exp Med* 1993;178:1459–1463.
463. Simitsek PD, Campbell DG, Lanzavecchia A, Fairweather N, Watts C. Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J Exp Med* 1995;181:1957–1963.
464. Bekoff MC, Levine H, Schlossman SF. T cell and Ir gene regulation of expression of a cross-reactive idiotype. *J Immunol* 1982;129:1173–1180.
465. Kawamura H, Kohno Y, Busch M, Gurd FRN, Berzofsky JA. A major anti-myoglobin idiotype: influence of H-2–linked Ir genes on idiotype expression. *J Exp Med* 1984;160:659–678.
466. Babu UM, Maurer PH. The expression of anti-poly (L-Glu60 L-Phe40) idiotypic determinants dictated by the gene products in the major histocompatibility complex (H-2q). *J Exp Med* 1981;154:649–658.
467. Germain RN. The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 1986;322:687–689.
468. Fauchère JL, Pliska V. Hydrophobic parameters q of amino-acid side chains from the partitioning of N-acetyl-amino-acid amides. *Eur J Med Chem* 1983;18: 369–374.

第20章 免疫耐受

Ronald H. Schwartz[①]

在20世纪初,Ehrlich和Morgenroth[1]发现注射另一只山羊的红细胞可使山羊体内产生针对供体细胞的溶血性抗体,但是这些抗血清与受者自身红细胞从不发生反应。进一步用山羊的自体红细胞来免疫山羊也未诱导出任何抗体反应,他们引用一个拉丁短语“horror autotoxicus”(自身中毒禁忌)来描述这现象,尽管其他人认为这一短语是指动物不能产生任何针对自身成分的免疫反应,但对他们而言则意味着动物能够逃避自体破坏性的反应。实际上,他们在论文的脚注中讨论Metalinikoff的实验时已经阐明了自身反应和自身免疫病之间的区别[1]。Metalinikoff的实验发现向豚鼠注射其自身的精子可产生针对这些精子细胞的细胞毒性抗体。Ehrlich和Morgenroth认为这些抗体对自身无毒性作用,因为它们并不杀死体内的精子(如动物仍保持生育能力)。 701

在本章讨论免疫耐受时,本人持同样的看法,因此可将免疫耐受定义为免疫系统不与 机体固有成分和

① R.H.Schwartz: Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, National Institute of Allergy and Infectious Diseaes, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892-0420.

被引入的抗原发生破坏性反应的一种生理状态。破坏性反应被免疫系统发育和免疫反应产生过程中的不同机制所阻断,药物的作用不包括在其内。这一观点从广义上将免疫调节看作是耐受过程的一部分。

耐受是一种获得性的过程

在上文提到的那个例子中,为什么山羊体内没有产生针对它们自身红细胞的抗体? Owen[2]对牛的异卵双生和五胞胎的观察结果使人们首次对这一问题有了更清楚的了解。他分析了那些具有同种型抗血清的牛的红细胞表面抗原(Ehrlich 在山羊体内诱导出这种同种型抗血清),发现每一子代都具有双亲体内的所有抗原,尽管其中的一些抗原决定簇并不是父母双方都表达。在五胞胎中,如果这一现象是由共显性杂合子引起的,那么亲代必须在多基因位点是纯合的,而这几乎是不可能发生的。相反,在细胞毒性实验中能够证明子代是嵌合体,也就是说子代的血中混合有不同表型的细胞。Lillce 的早期研究[3]提示异卵双生小牛可能通过胎盘中吻合的血管交换产物,Owen 据此推测每个同胞的造血干细胞可向其他同胞的骨髓中迁移,从而产生一种稳定的嵌合状态,并一直持续到它们在出生时分开。因为这种具有不同抗原细胞的嵌合现象并不受免疫反应的干扰,因此 Owen 认为这种和平共存状态是耐受的一种。研究提示免疫系统对外源物质发生反应还是耐受,取决于抗原是何时被呈递的,而且自身分子(由宿主基因组编码)和外源来分子在诱导耐受的能力方面并没有本质差别。

不仅是 Owen 的观察结果对 Burnet 和 Fenner[4]产生了深远的影响,Traub 的研究[5]也起到同样的作用,他证明了将子宫内或新生期的小鼠自然暴露于 LCMV 病毒可诱导其进入一种病毒携带状态。他们对上述两种现象的解释是:正在发育的免疫系统容易适应,如果外来物质能够被尽早引入,那么将诱导耐受而不是免疫。Billingham 等[6]的实验结果是支持这一推论的最早证据,他们将 A 系小鼠组织的混合细胞悬液注射进 B 系新生鼠或胎鼠体内,证明这种 B 系小鼠成年后尽管对来自第三者[即 C 系小鼠]的皮肤移植产生快速排斥,但是能够接受 A 系小鼠的皮肤移植。Hasek[7]证实了由以上研究得出的结论,即耐受是一种获得性状态,他用联体的鸡胚在实验上重复了 Owen 的结果,他发现成年鸡在出生分开后不能产生针对其同伴红细胞的抗体反应(同 Ehrlich 的实验),并且对来自对方的皮肤移植也不能发生排斥反应(同 Medawar 的实验)。Burnet 随后在他的克隆选择学说中为这些研究结果总结了一个理论框架,假定那些对出现在免疫系统发育过程中的分子具有特异性受体的淋巴细胞克隆将通过清除过程被选择性地清除。

免疫系统在其发育过程学会了耐受,Triplett 随后的实验结果[9]与这一观点一致,他将树蛙幼虫的垂体始基切除,使其在其他幼虫的皮下分化。当蝌蚪经过变形后,他又将成年树蛙自身的垂体移回其体内,此时发现这只树蛙对其自身移植物发生排斥。而垂体被部分切除的树蛙对这种移植并不发生排斥反应,这表明了排斥反应并不是由于通过异常分化或暂时携带宿主组织而获得新抗原引起的。可见,耐受似乎是一种获得性现象,需要抗原诱导才能产生,即便是对自身抗原的耐受也是如此。

耐受的获得性是免疫系统的一种基本特性。免疫系统的任务是通过 T 细胞和 B 细胞抗原受体基因的重排产生随机的结构多样性,识别不期而遇的分子并做出反应,鉴于此,从遗传学角度来看不存在特定的程序使免疫系统事先知道什么分子会引起自身破坏性反应。相反,在后天体细胞发育过程中,根据不同环境采取一系列措施使免疫系统精确适应以避免自身破坏,在免疫系统成熟和发育过程所采取的这些措施将是本章讨论的重点。

T 细胞发育过程中的阴性选择

Kappler 等[10]首先报道证明了克隆清除(clonal deletion)的存在。他们用抗 T 细胞受体(TCR)β 链可变区的单抗(抗 $V_{\beta}17a$)来追踪表达 $V_{\beta}17$ 的 T 细胞的存活情况,发现在表达 MHC Ⅱ 基因编码的 E 分子的小鼠体内,表达 $V_{\beta}17$ 的细胞被清除了。后来证明这一过程与内源性超抗原[即鼠乳腺瘤病毒 6、8、9(Mtv-6,8,9)的

ORF 基因产物]的表达有关,这些超抗原与 $V_{\beta}17$ 和 E 分子都能相互作用[11]。将 E^+ 和 E^- 小鼠交配后,其子代 F_1 也表现出 $V_{\beta}17$ 阳性细胞缺失的表型。已证明这种清除过程发生在胸腺内,表达 $V_{\beta}17$ 的细胞数量在未成熟的 $CD4^+8^+$ TCR^{low} 细胞群中只是稍有减少,但在较成熟的单阳性($CD4^+8^-$ 和 $CD4^-8^+$)淋巴细胞中被大量清除,后续的实验证明在成熟的 T 细胞群中 $V_{\beta}17$ mRNA 也缺失,从而排除了仅仅是由于细胞受体下调而引起这一现象的可能性,但是直到很久以后细胞清除现象才被其他研究者真正观察到[12](参见"胸腺细胞克隆清除中的生化反应")。MacDonald 等[13]观察到 $V_{\beta}6^+$ T 细胞也发生上述同样现象,后来的研究[14,15]证明克隆清除发生在双阳性期的晚期,此时表达高水平的 TCR,而且 CD4 和 CD8 共受体开始下调。

Kisielow 等[16]的研究将以上这些观察结果扩展至更为传统的抗原系统——雄性特异性抗原 H-Y。他们利用 Bluthmann 等[17]构建的 α-βTCR($TCR\alpha\beta^+$)转基因小鼠来追踪表达抗 H-Y 受体的 T 细胞群在雌性(不表达 H-Y,做为对照)和雄性(表达 H-Y 抗原)小鼠体内的最终结局,发现雄性小鼠胸腺体积显著减小(只有正常大小的 10%),双阳性胸腺细胞的数量也明显下降。Sha 等[18]用另外一种转基因鼠也观察到同样的现象,这种转基因小鼠携带有编码 MHC Ⅰ 同种抗原特异性的 $TCR\alpha\beta^+$ 受体的基因,当它们与表达这种同种抗原的小鼠交配时,产生相应受体的 T 细胞就会在双阳性期被清除。可见,Burnet 提出的基本模型对标准的 $TCR\alpha\beta^+$ 细胞是正确的,即未成熟的 T 细胞在发育过程中如果遇到其受体特异性的抗原就会被克隆清除(图20.1),这一过程被称为阴性选择。

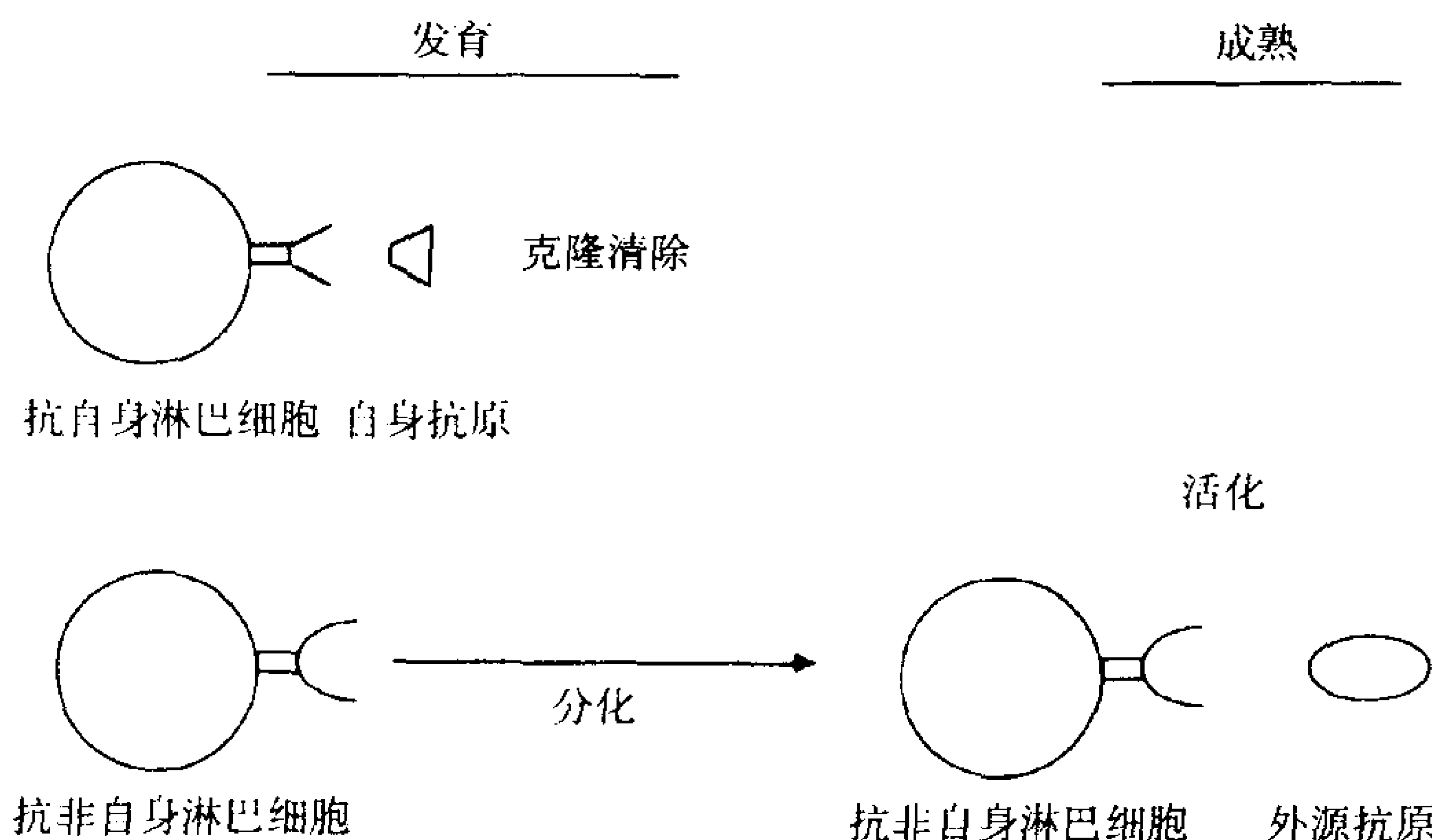


图 20.1 Burnet 的克隆选择模型。正在发育的淋巴细胞如果遇到特异性自身抗原将被清除。分化后,未被清除的细胞遇到外源抗原时能被活化。

除了 $TCR\alpha\beta^+$ 胸腺细胞,$TCR\gamma\delta^+$ 细胞在胸腺内也经历了阴性选择。一种表达 MHC Ⅰb 类分子特异性 γδ 受体的转基因小鼠(其体内不存在 MHC Ⅰb 类分子),其胸腺和脾脏内产生这种 γδ 受体 $CD4^-8^-$ T 细胞占绝大多数[19],当这种转基因鼠与表达 MHC Ⅰb 的鼠种交配时,产生转基因受体的细胞在胸腺和脾脏内均消失了。可见,在抗原存在的情况下,相应的细胞被克隆清除。同样,表达 NK1-1 和 Ly6c 标志的 $CD4^-8^-$ 和 $CD4^+8^-$ TCR $\alpha\beta^+$ 细胞亚群也对胸腺的阴性选择表现出敏感性[20~22]。在携带 Mtv-7 或 Mtv-6/8/9 小鼠乳腺瘤病毒的动物体内,当 MHC Ⅱ E 类分子也被表达时,产生 $V_{\beta}11$ 和 $V_{\beta}17$ 的 $CD4^-8^-$ $Ly6c^+$ T 细胞数量明显减少。当 CD8 转基因被诱导表达时可导致 $CD4^+8^-$ $NK1.1^+$ T 细胞被清除,这可能是由于它们对自身抗原的活性增加。最后,在肠上皮淋巴细胞群中证明 $V_{\beta}11^+$ 和 $V_{\beta}6^+$ 细胞在表达 MHC Ⅱ E 分子的 $Mtv\text{-}7^+$ 动物体内被克隆清除。综上所述,所有 T 细胞均对阴性选择表现敏感。

发生阴性选择的 T 细胞发育期

对 H-Y 抗原耐受的实验表明克隆清除发生在双阳性期的早期,但是对超抗原的耐受实验却提示克隆清除发生在从双阳性向单阳性的过渡期。在转基因小鼠中观察到的早期清除事件是过早地表达高水 TCR 的结果[14],代表一种类似于成熟停滞(maturational arrest)的不同过程[24]。但是,对一种具有同时针对一种病毒抗原和 Mtv-7 编码的超抗原特异性受体的转基因小鼠研究表明,当其携带病毒时双阳性细胞被清除;但是当

这种小鼠与表达 Mtv-7 超抗原的小鼠交配时,仅有单阳性细胞被清除[25]。可见,抗原的性质及其表达递呈的部位和方式决定了细胞的清除时期。目前尚不清楚在阴性选择发生之前是否必须发生阳性选择作为细胞成熟的必经过程。

关于克隆清除发生在 T 细胞发育的单阳性期的证据也不充分。MacDonald 和 lees[26]曾证明 Mtv-7 超抗原反应性 $CD4^+8^-$ 胸腺细胞在发育的最初几天内就消失了,体外培养这些细胞证明这一现象的发生并不是因为细胞向胸腺外迁移,而是一种主动的死亡过程,这种主动死亡可被低温、放线菌酮或放线菌素 D 所抑制。用超抗原和抗 TCR 单抗进行的体内实验[27,28]表明被清除的是那些最早表达高水平、热稳定性抗原(heat stable antigen,HSA)的 $CD4^+8^-$ 细胞。总之,胸腺细胞似乎从最初表达 TCR 到发育成完全成熟的单阳性 T 细胞的整个过程中对阴性选择均表现敏感。

抗原呈递细胞在阴性选择中的作用

关于哪种细胞在胸腺的克隆清除中发挥抗原呈递作用长期以来一直是争论的焦点所在,源自骨髓的细胞被一致认为具有重要作用,这一观点的最初依据来自对放射线诱导的骨髓嵌合体的实验[29],将(A×B)F 的骨髓输入受到致死剂量射线照射的 B 系受体内,可诱导对 A 系和 B 系肽-MHC 复合物的耐受,这一现象在混合白细胞培养中也可被检测到(表 20.1)。在 $V_\beta17$ 模型中,只有当供者的骨髓细胞上表达 E 分子时,T 细胞才被克隆清除[30],可见这些细胞可以诱导阴性选择。在源自骨髓的细胞中,最有可能诱导清除的是树突细胞,因为来自供体的树突细胞可在受射线照射的胸腺内迅速定居[31],而且将来自脾的同种异体树突细胞引入胸腺器官培养中,可诱导对同种异体抗原的耐受,用细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)实验可检测到这种耐受现象[32]。可见,能够活化外周 T 细胞的专职抗原呈递细胞(APC)可诱导胸腺细胞发生免疫耐受。随后用 TCR 转基因小鼠的胸腺细胞悬液进行的实验直接证明了脾 APC 能够诱导 $CD4^+8^+$ T 细胞的克隆清除[33]。以上两种观察结果意味着决定抗原呈递阴性选择结局的并不是胸腺特异性的 APC,而是 T 细胞的发育时期。

704

表 20.1 经放射线诱导的骨髓嵌合体中的耐受情况

嵌合体 BM→X 射线宿主	胸腺 树突细胞	胸腺 上皮细胞	混合白细胞反应 反 应
$(A\times B)F_1\to P_B$	A 和 B	B	A、B 均不反应
$P_B\to(A\times B)F_1$	B	A 和 B	A 反应,B 不反应

BM→X 射线宿主:将骨髓干细胞输入经致死性射线照射的小鼠体内。

胸腺基质(非血源性)细胞在阴性选择中的作用更具有争议性,在最初的实验中[34]将亲代 B 的骨髓输入经射线照射的 $(A\times B)F_1$ 宿主体内可诱导针对 A 系 APC 的同种异体反应(表 20.1)。同样,将脱氧鸟苷处理过的胎儿胸腺(已经去除了其中的血源性细胞)移植进同种裸鼠体内后,其产生的 T 细胞可产生混合白细胞反应(mixed leukocyte response,MLR)[35]和针对胸腺供体同种抗原的细胞介导的淋巴细胞溶解反应(cell-mediated lympholysis,CML)[36]。起初根据上述及其他研究所得出的结论是胸腺基质细胞不能诱导阴性选择。但是,对这些实验仔细研究却发现的确发生了一些阴性效应,例如,MLR 中的同种反应经常发生数量上的减少[37],裸鼠对胸腺移植不发生排斥。随后 TCR 转基因动物实验为胸腺基质细胞介导清除提供了有力的证据。将不发生清除反应的动物的 TCR 转基因骨髓细胞移植进感染了病毒并经射线照射过的宿主体内,可导致处于双阳性期的胸腺细胞被大量清除,在宿主胸腺基质细胞上表达的 MHC 分子是病毒特异性清除所必需的[38]。另外,移植同种异体胸腺始基(上皮间质始基)可诱导对随后人皮肤移植的耐受[39],尽管在产生 IL-2 的体外实验中并未诱导出对同种脾细胞刺激的耐受。在蛙体内也观察到同样的结果,将蛙胚的前部(含有胸腺基质细胞的始基)与另一同种胚胎的后部(含有造血细胞的始基)融合[40],这种嵌合体可接受与胸腺具有相同 MHC 类型的蛙皮肤移植,但是在体外可表现出针对此种 MHC 类型脾细胞的混合白细胞反应(MLR)。可见胸腺基质细胞显然能够呈递抗原并诱导阴性选择,但在诱导耐受的程度上可能不如树突细胞那么彻底。

如何解释胸腺基质细胞的抗原呈递不能彻底地诱导耐受形成？一种可能的原因是耐受是组织特异性的。也就是说只对那些由基质细胞表达的肽发生耐受[41]。因此，在由脾树突细胞执行抗原呈递功能的MLR和CML实验中，对那些源自造血细胞的肽特异性的T细胞将被激活，而这些肽并不在胸腺基质细胞上表达[41]。第二次移植整个胸腺时，只有造血细胞被排斥，对基质细胞不发生排斥。其它组织移植物的最终命运取决于胸腺和那些移植物之间存在肽交叠的程度，但是这个理由尚不足以解释为什么内源性病毒超抗原不能诱导克隆清除。大多数情况下，不管何种肽与MHC结合，这种超抗原分子均可产生刺激作用。不能被清除并不是因为超抗原不能进入胸腺基质，因为在用新鲜的T细胞和树突细胞来重构经脱氧鸟苷处理的胸腺基质细胞的组织培养实验中，加入超抗原葡萄球菌B型肠毒素(SEB)可迅速诱导SEB反应性的$V\beta 8^+$ T细胞的完全清除，这种清除只有当树突细胞存在时才发生，尽管已证明SEB可与上皮细胞的MHCⅡ类分子结合[42]。但是在缺乏树突细胞的培养物中长期暴露于SEB的确有清除现象存在。基质细胞呈递效率较低的原因尚不清楚，可能与其细胞黏附分子的表达水平和性质、MHC分子的表达水平、抗原处理的差异或缺乏共刺激分子有关(对内源性病毒超抗原来说，可能与细胞表面的蛋白酶有关)。然而，在一种TCR转基因模型中，超抗原诱导的清除很显然发生在双阳性期[43]，而抗原诱导的清除只发生在抗原作为一种转基因被高表达的时相点上[44]，但是对同样的抗原转基因，清除却发生在单阳性期，此时转基因TCR具有较低的抗原亲和力。以上这些结果表明尽管基质细胞的抗原呈递效率较低，但却能有效地诱导T细胞清除，这种清除作用依赖于特定TCR的亲和力及其识别的肽-MHC复合物的密度。由于许多胸腺基质细胞特异性的自身肽可被大量呈递，而来自其他组织的肽则不然，因此，这在一定程度上通常混淆了组织特异性耐受和无效率的抗原呈递这两种机制之间的差别。

有一种转基因小鼠可用来研究参与耐受过程的特殊胸腺基质细胞类型，这种小鼠可在组织特异性启动子的控制下表达MHC分子。将MHCⅠ类分子定位于具有角蛋白Ⅳ启动子[45]或异常表达的$E\mu$启动子[46]的髓质上皮细胞可诱导耐受，果然不出所料，这种耐受是组织特异性的，也就是说动物可接受皮肤移植，但在存在IL-2的体外实验中可发生CTL反应[46]。可见，胸腺髓质上皮细胞似乎能够诱导耐受。有关将MHCⅡ类分子定位于皮质上皮细胞的研究资料尚存在相互矛盾的地方。由小鼠I-E编码的分子可诱导耐受，表现为MLR的消失[30]和$V_\beta 17^+$细胞的清除[47]。相反，表达在皮质上皮由小鼠I-A编码的分子可引起强烈的MLR，因此并不诱导耐受[48]。后者是人们所期望观察到的结果，由于小鼠应该只对胸腺皮质上皮抗原发生耐受。遗憾的是没有用胸腺移植实验来证实这一点。与I-E编码的分子不发生MLR可能是因为Ⅱ类E分子的差异不能刺激强烈的MLR，因此只对基质和树突细胞共有肽产生的耐受可能足以将这种微弱的MLR降至本底水平。

最后，几项研究报道表明即使正在发育的T细胞也能呈递抗原诱导耐受[49]。在这些实验中，将纯化的与宿主呈单倍体同源的$Thy1^+ CD4^- 8^-$ T细胞注射进经致死剂量射线照射的同系骨髓重构小鼠的胸腺内[即将$(A\times B)F_1$的T细胞输入宿主A体内]，50天后宿主细胞在CTL反应中对亲代B的“B”Ⅰ类同种抗原表现出特异性耐受。这种效应不是由于树突细胞的污染引起的，因为在MLR中宿主细胞并不对MHC“B”Ⅱ类同种抗原发生耐受。注意到小鼠T细胞并不表达Ⅱ类分子，而树突细胞却表达。因此，注射T细胞能够诱导耐受。用纯化的TCR转基因小鼠的$CD4^+ 8^+$胸腺细胞进行体外实验也得出同样结论[50]。当暴露于细胞特异性肽时，这些细胞可能通过识别培养物中其他T细胞表面的肽-MHCⅠ复合物而被清除掉。这一结果意味着T细胞能直接诱导未成熟淋巴细胞的克隆清除。总之，这些实验均表明不论何种细胞只要能将抗原呈现于其表面，均可诱导胸腺内的阴性选择[51]。

胸腺细胞克隆清除中的生化反应

所有类型的APC均可诱导胸腺细胞耐受，这一事实表明T细胞只有在发育的这一时期才能够发生耐受，Burnet[8]和Lederberg[52]均推测这一耐受现象是由抗原特异性受体传递信号所致，随后发生细胞死亡。胸腺的组织学检查并未发现多少进行性细胞死亡的证据；但是动力学标记研究证明产生自胸腺的细胞中超过

95%都在胸腺内死亡[53]。用一种敏感的实验检测 DNA 链的断裂情况,发现巨噬细胞内有凋亡的胸腺细胞碎片(图 20.2)。在一种表达 MHC Ⅱ类 E 分子及内源性 $V_{\beta}5$ 反应性超抗原的 $TCRV_{\beta}5$ 转基因小鼠体内,发现其胸腺髓质内聚积有被 $MAC3^+$ 巨噬细胞吞噬了的凋亡细胞[12]。

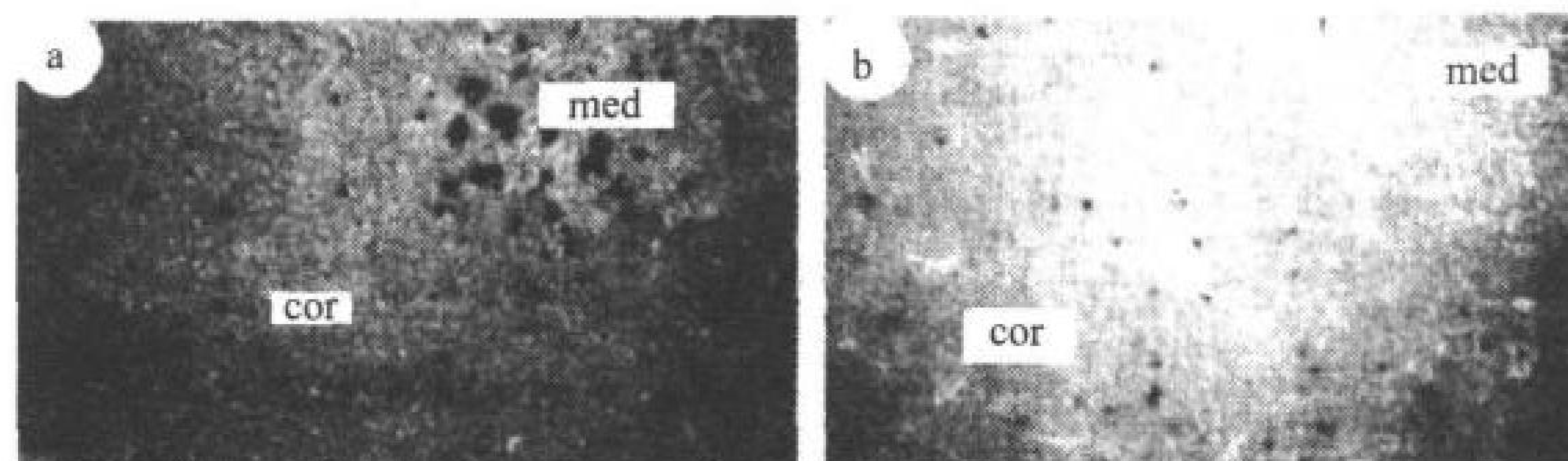


图 20.2 T 细胞在胸腺内的凋亡。(A)用 TUNEL 法标记巨噬细胞内的凋亡细胞。MED 表示髓质;COR 表示皮质。(B)在 MHC Ⅱ类 E 分子缺乏的小鼠髓质内未见凋亡细胞,这一结果支持凋亡细胞是经历阴性选择的细胞。(征得同意,图片引自参考文献[12]。)

目前一致认为胸腺细胞在阴性选择中凋亡而死,但诱导凋亡的分子机制尚不十分清楚。多项体外实验均表明在分离的双阳性胸腺细胞上交联 TCR 尚不足以诱导细胞死亡[54,55],而另外几项研究表明加入抗 CD28 和抗 TCR 抗体可诱导细胞死亡[28,55],但是小鼠的 CD28 基因敲除并不影响阴性选择[56],这意味着 CD28 并不是在阴性选择过程中起辅助作用的惟一受体。在体内 CD28 可能只参与晚期的清除,因为其配体 B7 分子表达在胸腺髓质而不是皮质内。

通过 TCR 介导凋亡的分子途径也不清楚。Fas 与 Fas 配体的突变对阴性选择毫无影响[58]。同样,肿瘤坏死因子(TNF)和 TNF 受体上的无意义突变也无影响[59]。据报道只有对 CD30 分子(TNF/NGF 细胞因子受体家族的成员之一)的基因打靶对阴性选择有影响[60]。这种突变使胸腺细胞数量增加了两倍,而且削弱了抗 CD3 在体外诱导的细胞死亡,但是将其与产生强烈阴性选择配体的 TCRαβ 或 TCRγδ 转基因小鼠交配后,清除只受到部分减弱(大多数发生在双阳性期),新产生的 T 细胞功能正常(例如,它们不是自身反应的),由内源性超抗原诱导的清除不受影响,这些结果意味着 CD30 可能只是介导胸腺细胞凋亡的几种分子途径之一。

活化与耐受的阈值

当抗原肽-MHC 复合物的浓度达到某种严格的阈值后,在胸腺内成熟后的 T 细胞就能对外来抗原发生反应。这种阈值和完整抗原浓度之间的关系除了依赖于 TCR 对肽-MHC 复合物的内在亲和力外,还依赖于抗原处理和呈递的需要。重要的是活化阈和阴性选择阈之间的关系。如果一种在胸腺内呈递的自身抗原只诱导一种 T 细胞亚群克隆清除,那么在炎症反应的组织破坏时,当这种抗原在外周组织的表达增加时情况会怎样? 那些与自身肽-MHC 复合物亲和力低的 T 细胞克隆是否会被活化? 答案是:通常不会出现这种情况,也就是说创伤很少引起自身免疫,但原因何在呢?

706

对内源性病毒超抗原的早期研究提示如果小鼠携带 Mtv,那么产生特定 V_{β} 的 T 细在体内可被清除,但是同样的 T 细胞在体外用表达 Mtv 的 APC 刺激时不能被活化增殖[61]。这意味着耐受的诱导比激活来的容易,尽管这种差别大部分是由体内和体外实验系统的不同所造成的[62]。胸腺器官培养和 TCR 转基因小鼠的应用使人们能够更准确地定量分析这一问题。在胸腺组织培养中,SEB 诱导 $TCR^{hi}V_{\beta}8^+$ 细胞清除的浓度比活化成熟 $CD4^+$ 细胞增殖所需的浓度低 30~100 倍[63]。在抗原特异性转基因 $CD4^+8^+$ 胸腺细胞中也观察到同样的结果,但不如前者那么明显,这些细胞可被培养物中一定浓度的肽诱导清除,但这一浓度不足以刺激成年转基因动物的淋巴结 T 细胞产生 IL-2 或增殖[64],在这一系统内由于每项体外实验均应用同样的 APC,所以定量是相当可靠的。

胸腺培养中产生的辅助性 T 细胞在体外培养期间暴露于肝 F 蛋白被诱导耐受的浓度比成熟 T 细胞增殖所需的浓度低 10 倍[65]。最后,比较不同的淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)在 TCR 转基因小鼠体内诱导抗病毒反应和新生期耐受的能力[66],有一种病毒株即使用超过刺激剂量范围 1000 倍的病毒量也不能激活 CTL 反应或使病毒被清除,但在新生期耐受后却能诱导胸腺内的转基因 TCR^+ $CD8^+$ T 细胞被部分清除(30%~40%)。另一株 LCMV 在体内起微弱活化作用,可通过胸腺内清除诱导完全的免疫耐受。可见,所有

这些实验均提示诱导未成熟T细胞耐受比成熟T细活化所需的阈值低，这种阈值不同的生化基础尚不清楚。

共同受体与受体下调

在雌性H-Y特异性TCR转基因动物体内，胸腺大小只有正常的1/10，胸腺内只有极少数表达转基因受体的CD $8^{+}4^{-}$细胞[16]。但是这种细胞在外周很常见，其CD8的表达水平却较正常低。有趣的是，当H-Y转基因小鼠与组成型表达CD8的转基因小鼠交配后，表达低水平内源性CD8的T细胞在胸腺和外周均消失了[67]。可见，选择过程中CD8水平的增高或CD8转基因不能下调导致胸腺内的完全清除。低水平的CD8似乎是一种稳定的表型，因为外周细胞活化增殖后保持这种低水平[68]。另一有趣的观察结果是根据阴性选择压力的强度不同T细胞表达CD8的水平也不同[68]。

当TCR水平被降低时可导致另一种形式对阴性选择的逃避。在内源性α链基因重排和表达的TCR转基因小鼠体内可发生此种现象[69]，在这种小鼠体内第二种α链能与转基因β链匹配，在T细胞表面以不同程度表达两种受体，这降低了转基因TCR在细胞表面的表达水平，从而使T细胞逃避阴性选择。有趣的是许多正常T细胞也表达两种受体[70,71]。可见，这些观察结果可能与自身免疫病的发展有关联(见“耐受中断”部分)。

B细胞发育过程中的阴性选择

B细胞池是否存在阴性选择?

在20世纪60年代后期，应用荧光素及同位素标记的抗原使人们第一次可以对抗原结合细胞进行定量研究。检测的大部分细胞是其表面表达免疫球蛋白(Ig)的B细胞。应用这项技术来研究天然耐受或获得耐受的动物可观察到一种奇怪的现象，即动物体内存在耐受原特异性的抗原结合细胞。例如，在人的外周血内曾多次发现结合甲状腺球蛋白的细胞，但却未发现人血清白蛋白特异性细胞[72]。这提示耐受并不像Burnet[8]推测的那样总是与克隆清除有关。此外，用大肠杆菌脂多糖(LPS)之类的多克隆激活剂来刺激成熟B细胞，其中一些细胞分化成了IgM分泌型浆细胞，其抗体与自身成分发生反应[73]。随后，在未经LPS刺激的正常个体[74,75]、未感染细菌的小鼠[76]以及人体内[77]均发现了这种分泌自身抗体的细胞。

后来有证据表明对特定自身抗原的阴性选择只发生在T细胞池而非B细胞池。最初的实例来自对肝脏F蛋白的研究，这种蛋白质有两种等位基因形式(只存在单个氨基酸的不同)，表达合适的MHC单倍体的小鼠(反应者)能够产生针对F蛋白等位基因产物(小鼠不表达这种产物)的抗体反应[78,79]，但是产生的抗体能与两种形式的F蛋白发生同样的反应。有人认为这些实验提示小鼠体内缺乏来自蛋白多态性部位的自身肽特异性的T细胞，但却存在可与其他等位基因编码的非自身肽发生反应的T细胞，而且在B细胞水平不存在阴性选择。另一实例来自对IgE的观察，IgE在自体内并不产生免疫反应，但在同系小鼠体内当其与外源蛋白结合时却能引发强烈的抗体反应[80]。最后，对补体第5种成分(C5)的研究也得出同样的结论[81]，一种B10.D2小鼠的突变亚型(o)不产生C5，因此对C5不耐受，将这种小鼠的T细胞与来自非突变亚型(B10.D2/n，对C5耐受)的B细胞一同输入经放射线照射的非耐受受者(B10.D2/o)体内，用C5加弗氏(Freund's)完全佐剂(CFA)免疫后可产生抗体反应(表20.2)。将细胞混合物输入经射线照射的耐受小鼠(B10.D2/n)体内也可产生抗体反应。在这一试验中，抗原刺激来自小鼠体内正常循环水平的C5，在输入细胞后12天C5水平

表20.2 某些耐受动物并未经历B细胞阴性选择

T细胞来源	B细胞来源	放射线处理的受者	抗体反应
非耐受	耐受	非耐受	有
耐受	耐受	非耐受	无
非耐受	耐受	耐受	有
耐受	耐受	耐受	无

表中资料是对参考文献[81]的总结。

707 降低时检测抗体反应。这一试验表明当存在来自非耐受动物的 T 细胞时，来自耐受动物的 B 细胞能与生理水平的自身抗原发生反应。

这一系列实验使许多研究者提出质疑：B 细胞库究竟是否存在阴性选择？几项证据表明肯定存在，至少在一定程度上存在。首先，产生异种和同种抗血清的免疫几乎总是产生外源蛋白特异性的抗体，而这种抗体即使能与动物相应的自身蛋白发生任何交叉反应也是极其微弱的[82~84]。对细胞表面蛋白（如 MHC 分子）和可溶性蛋白抗原（如血红蛋白）来说的确如此。不存在针对自身蛋白的抗体并不只是因为被动物体内的抗原吸收，因为来自这些小鼠的杂交瘤细胞对外源抗原也表现同样的优先选择[84,85]。其次，用低亲和力相互作用可以解释体外试验中抗原结合细胞的存在以及用 LPS 刺激可诱导产生与自身蛋白反应的 IgM 抗体，这种低亲和力作用在生理状态下不足以诱导 B 细胞的活化。由此可见 B 细胞耐受可能只影响高亲和力的克隆。

支持这一观点的证据来自 Tsubata 等的研究[86]，他们构建了一系列可产生抗单链 DNA 抗体的 IgM 分泌型杂交瘤。由 LPS 活化的 B6 小鼠的骨髓前 B 细胞和成熟脾 B 细胞可产生同样数量的这些抗 DNA 杂交瘤，但是高亲和力抗体在成熟 B 细胞抗体中只占 2%，而在前 B 细胞抗体中占 17%。这些结果意味着一些自身反应性细胞在前 B 细胞向成熟 B 细胞转变过程中被清除了，而且这些被清除的 B 细胞与抗原的平均亲和力较高。目前尚不清楚这种清除的机制，对这一课题的研究需要构建 Ig 受体转基因小鼠，以提供合适的实验模型来追踪单个 B 细胞在其发育转变期的命运。

骨髓中阴性选择的机制

Nenazec 和 Burki 首次证明了 B 细胞水平的阴性选择[87]。他们构建了一种 MHC Ⅰ类分子 K^k 和 D^k 特异性的 IgM B 细胞受体（BCR）转基因小鼠。在中性的 MHC^d 背景下，25% ~ 50% 的脾 B 细胞（$B220^+$，IgM^+）表达这种受体，这种特异性 IgM 在血清中表达。但是当这种转基因小鼠与 MHC^k 小鼠交配时，外周 B 细胞和抗体均消失了。由于在脾脏内未检测到任何表达转基因受体的细胞，因此阴性选择发生的部位似乎是在骨髓。在骨髓内，IgM 及受体独特型水平太低而不能被检测到，但 B220 表达水平正常。这提示耐受过程可能与遭遇抗原后 Ig 受体的下调（聚集、成帽和内在化）有关。这一现象与较早期的研究结果是一致的[88,89]，即用高浓度的抗 IgM 抗体处理骨髓或胎肝 B 细胞可引起细胞表面 Ig 的永久性消失。

未成熟 B 细胞（$B220^+$，IgD^-，$CD23^-$）上 Ig 受体的充分参与能够诱导成熟受阻[90,91]，对此已达成共识。将 BCR 转基因骨髓细胞加入具有膜结合抗原或抗 κ 抗体的培养物中可使其受体下调，而细胞仍能存活。如果用表达 BCR 和相关抗原的双重转基因动物的细胞，那么在抗原存在的情况下体内成熟受阻的细胞可在培养中持续存在。有趣的是，在抗原缺失情况下，这些细胞会摆脱受阻状态，分化成更为成熟的 B 细胞（$B220^{hi}$，IgD^+，$CD23^+$）[90]，可见，成熟受阻是可逆转的。

这种成熟受阻的功能是什么呢？有两个实验小组的研究表明 B 细胞经历了 Ig 轻链的变化，他们将这一过程称为“受体编辑”（receptor editing）[91~94]。停滞在 IgD^-、CD23-期的 BCR 转基因骨髓细胞可升高其 RAG 酶的水平，用抗 κ 链抗体刺激时细胞可经历内源性轻链基因的重排。在体内 BCR 转基因 B 细胞遇到其相关抗原时也可观察到类似的结果。另外，正常小鼠的未成熟 B 细胞用抗 κ 抗体刺激后产生 λ 的细胞（未经过细胞分裂）数量有所增加。这些结果表明发生有效重排的受体对轻链基因重排的反馈抑制（即等位基因排斥）并未发生，而且未成熟的 B 细胞在骨髓中遇到自身抗原时能够通过轻链转换对其受体进行修饰以逃避自身反应。

如果轻链替换并未改变 B 细胞的特异性使其足以逃脱自身反应，那么会出现什么情况呢？用抗 Ig 刺激未成熟 B 细胞或许能模拟这种状况[88,89]。在这些研究中，去除抗体并未使细胞表面的 Ig 重新表达，这提示成熟受阻后接着可能发生细胞死亡，Norvell 等的研究直接证实了这一现象[95]，他们发现用高水平的抗 Ig 刺激从骨髓中分离的未成熟 B 细胞可使其发生凋亡。这一观察结果与较早期的体内实验是一致的，即在小鸡[96]或小鼠[97]出生时就给予抗 μ 抗体刺激，可完全清除其体内的所有 B 细胞。将处于发育期的 BCR 转基因小鼠暴露于抗原至少在其成年早期可导致外周 B 细胞池的枯竭，在此之前受体编辑过程还未来得及积累

足够的逃逸细胞移居于外周[87,98]。所有这些结果都与B细胞转变研究相一致，产生的B细胞中只有10%曾离开骨髓[99]。可见，在骨髓内有两种机制来处理自身反应细胞，一是受体选择过程，这一机制使细胞在发育的未成熟期遇到自身抗原时可通过轻链转换而继续存活；二是由凋亡介导的克隆清除，如果受体被反复占据持续足够长的时间而未从受体编辑中解脱出来，继而就会发生凋亡被清除。

B细胞阴性选择所需的抗原特征

从诱导B细胞对外源抗原耐受的早期研究中可推断决定哪一种B细胞被删除的自身反应性B细胞和自身抗原的特征。Metcalf和Klimman[100]用体内有限稀释脾聚集试验（limiting dilution splenic focus assay）来研究B细胞耐受，首次证明如果将未成熟的半抗原特异性B细胞（新生脾或Ig^-骨髓细胞）在没有T细胞辅助的情况下暴露于半抗原24小时，对半抗原加T细胞辅助的再次刺激不发生反应。在这一系统中，诱导耐受的抗原必须是多价的。DNP特异性B细胞的耐受原是DNP_4卵白蛋白而非DNP_1木瓜蛋白酶。这一观察结果提示由Ig受体介导信号传导需要通过交联来诱导耐受。上文提到的BCR转基因实验中，MHC^k Ⅰ类抗原是一种跨膜糖蛋白，可以多聚物的形式表达于细胞表面，因此这种抗原可形成一种很好的耐受原。相反，当BCR转基因小鼠与另一种表达可溶性形式的MHC K^k分子的转基因小鼠交配时，未观察到B细胞清除现象[101]。尽管难以比较这两种模型中Ig受体的占用水平，但结果提示只有能以多价形式呈递给B细胞的自身抗原才是耐受原。表面呈现的抗原是较好的耐受原，与这一观点一致的是许多天生的自身反应性B细胞和抗体普遍对细胞内分子表现特异性[76,102,103]，只有少数与细胞表面蛋白发生反应[104,105]。最后，对两种新近报道的Ig受体转基因鼠的研究也发现细胞表面分子特异性B细胞可被阴性选择，而细胞内聚合物特异性B细胞则不然。红细胞表面抗原决定簇特异性Ig受体转基因动物体内的许多B细胞可经历阴性选择[106]，而单链DNA特异性Ig受体的转基因则并非如此[107]。有趣的是，在后一种系统中，如果建立一种只有Ig重链的转基因，使其与多种轻链配对产生抗双链和抗单链DNA抗体，只能检测到抗单链DNA反应性的B细胞[108]。在正常小鼠体内也发现了双链DNA特异性B细胞的缺失[109~111]，这可能是因为从死亡细胞中释放出的寡核苷酸样物质（oligonucleosome）比较稳定[112]，使抗原以多价形式呈现给正在发育的B细胞。

708

对分泌性自身抗原的耐受是更为复杂的课题。Metcacf和Klinman[100]所进行的体外实验证明诱导B细胞耐受的分子不仅必须是多价的，而且应以足够高的浓度被呈递，以足够高的亲和力与Ig受体反应。对一系列转基因小鼠的研究已证实抗原浓度的重要性[113]，这些转基因小鼠表达不同循环水平的鸡蛋白溶菌酶，当溶菌酶的血清浓度高于10^{-10}mol/L时，即使将溶菌酶与外源载体偶联以提供T细胞辅助作用，然后与CFA一同免疫，小鼠依然会出现耐受，这种耐受表现为只有低亲和力B细胞组成的空斑形成细胞反应（plaque-forming cell response）明显降低。当溶菌酶的血清浓度低于10^{-10}mol/L时，动物在T细胞水平仍保持耐受，但此时如果给予T细胞辅助，可产生正常的高亲和力抗体反应。这种天然耐受模型与Chiller等起初对外源抗原的实验相一致[114]，证明抗原浓度决定了只有T细胞处于不反应状态。关于B细胞和T细胞阴性选择阈值不相同的原因仍不清楚。

诱导一群特定的B细胞耐受所需的绝对浓度显然随抗原的性质而改变。在上文讨论过的关于C5分子的例子中[81]，5×10^{-7}mol/L的循环抗原浓度并不足以诱导耐受，但在有关溶菌酶的例子中，10^{-10}mol/L的浓度即可诱导耐受。应该注意的是能诱导耐受的抗原的实际形式并不一定是自由抗原，例如，有研究表明溶菌酶的耐受原形式可能是与高分子质量血清蛋白结合的分子，这种修饰作用可能使分子成为多价形式，从而使溶菌酶成为有效的耐受原[115]。用基因工程方法使溶菌酶在MHCⅠ启动子的调控下以膜结合蛋白的形式表达时，可导致溶菌酶特异性Ig受体转基因小鼠骨髓内B细胞的阴性选择[98]。在这种情况下，溶菌酶在骨髓中以较高的局部浓度和多价抗原的形式被呈递。

未成熟B细胞的耐受

将脾树突细胞上的抗原呈递给胸腺内的T细胞，可诱导T细胞耐受，这与克隆选择模型的推测是一致

的。相反，当未成熟的 B 细胞在 T 细胞辅助下暴露于抗原时可产生抗体反应[100,116]。在这些实验中，将表面 Ig^- 骨髓细胞或新生脾细胞有限稀释后输入经钥孔血蓝蛋白(KLH)载体刺激并经放射性照射的受者体内。当初始 B 细胞在体外脾集中培养(splenic focus culture)中成熟时，呈递与 KLH 结合的 DNP 半抗原可导致 IgM 抗体反应，相反，如果呈递与另一种载体结合的半抗原(DNP-HGG)(T 细胞未经 HGG 刺激)，则不会产生针对 DNP 的抗体，但此时抗原能被识别，因为在暴露于 DNP-HGG 的前 24 小时内可阻止产生针对 DNP-KLH 的抗体反应。这些研究证明在没有 T 细胞辅助时正在发育的未成熟 B 细可被诱导对半抗原的耐受。因此，同样的 B 细胞发生活化或耐受，取决于 T 细胞辅助作用的存在与否。

用抗 IgM 抗体在体外刺激未成熟的来源于骨髓的 IgM^+、IgD^- B 细胞，研究结果与上述一致[95]。单独给予抗 μ，B 细胞发生凋亡，但如果同时将 IL-4 加入培养物中可阻止凋亡，而且出现 B 细胞增殖。IL-4 是参与 T 细胞辅助作用的细胞因子之一。在分子水平，抗-IgM 可诱导细胞周期蛋白依赖激酶(cdk)-4 和其调节亚基细胞周期素 D_2，后者使细胞从 G_0 转到 G_1 期。但同时加入 IL-4 时，也可诱导细胞周期蛋白 E 和 cdk-2 的表达，使细胞转入 S 期[117]。可见，这些实验支持 T 细胞辅助作用可以挽救能够耐受的未成熟 B 细胞。

这些观察结果与 Burnet 提出的克隆选择学说一致[8]，但是而且也与 Bretscher 和 cohn 起初提出的 B 细胞活化的一般模式一致[118](图 20.3)。为什么免疫反应需要识别抗原上两种不同的决定簇？抗原剂量不同时为什么既能诱导耐受又能诱导免疫反应？Bretscher 和 Cohn 在试图解释这些现象时首次提出：通过其抗原特异性受体刺激时(称为信号 1)能够诱导抗体分泌细胞发生耐受，但如果同时接受第二个信号时(称为信号 2)，可诱导细胞则被活化。据推测这个第二信号可能是抗原特异性的，而且在同一分子上两个抗原决定簇必须连接在一起。在原始的模型中，另一 B 细胞上的抗体通过抗原桥传递第二信号。随着 T 淋巴细胞的发现，由同种抗原特异性的 T 细胞提供的辅助作用即为第二信号(图 20.3)。现在看来，B 细胞通过 Ig 受体结合抗原，通过活化酪氨酸蛋白激(如 syk 和 lyn)传递第一信号，然后受体-抗原复合物内在化，抗原被加工处理后以肽-MHC 复合物形式呈现于 B 细胞表面。如果 T 细胞上具有识别这些肽-MHC 复合物的受体，T-B 细胞可相互作用，并通过 CD40 与 CD40 配体的结合以及释放刺激性细胞因子(如 IL-4、IL-5 或 IFN-γ)提供第二信号。在这一模型中，缺乏 T 细胞辅助的抗原刺激可诱导 B 细胞耐受，存在抗原特异性 T 细胞辅助时可诱导 B 细胞增殖和分化，基于上述实验结果，这些原则似乎控制着未成熟 B 细胞对抗原的反应。

自然杀伤细胞的耐受

骨髓和胸腺中均可产生自然杀伤(NK)，起初认为 NK 细胞是非获得性免疫系统的一部分。但是对 NK 细胞在骨髓移植中作用的早期研究提示这种细胞可能对 MHC 基因产物具有特异性，可发生获得性耐受[121~123](见第 17 章)。过去几年在鉴定和克隆与识别和调节有关的许多受体分子方面取得了很大进展[124]。每一个 NK 细胞都具有能诱导细胞死亡的受体(如 IL-2 受体和 Fc 受体)，并可表达一种或几种可抑制细胞死亡的抑制受体。有两种均识别 MHC Ⅰ类分子的抑制性受体家族，一种属于 Ig 超家族，可以非等位基因方式识别 MHC Ⅰ类分子；另一类属于 C 型凝集素超家族，可识别 MHC Ⅰ类分子的特定等位基因产物。在第 17 章中已详细讨论了 NK 细胞及其受体，这里我们只关心这些细胞是如何发生耐受的。

有几项研究提示 NK 群的耐受是由细胞内的分子适应而非阴性细胞选择介导的。第一类实验是构建 MHC Ⅰ 转基因或基因敲除小鼠，使 MHC Ⅰ以不同的水平表达，然后检测小鼠体内这些 MHC 分子特异性的 NK 抑制性受体的表达水平[125~130]。最典型的是与小鼠等位基因 D^d 特异性 Ly49A 受体有关的系统。构建表达配体 D^d 的 B6 转基因小鼠可使 NK 细胞表达低水平的 Ly49A 受体。这些 NK 细胞不但可杀死缺乏 D^d 的靶细胞，也可杀死 β_2m 基因敲除小鼠[一种可阻止大部分(并非全部)MHC Ⅰ 表达的突变体]的靶细胞。当 D^d 转基因鼠与 β_2m 基因敲除小鼠交配时，D^d 的表达显著减少，而 Ly49A 受体的表达则增加[131]，这种小鼠的 NK 细胞尽管仍具有杀死 D^d 阴性靶细胞的能力，但不能杀死 β_2m 阴性靶细胞。因此，Ly49A 抑制性受体的水平与 D^d 水平似乎成反比。在另一项不同的实验中，检测 B6 转基因小鼠在 MHC Ⅰ 启动子的控制下 Ly49A 受体

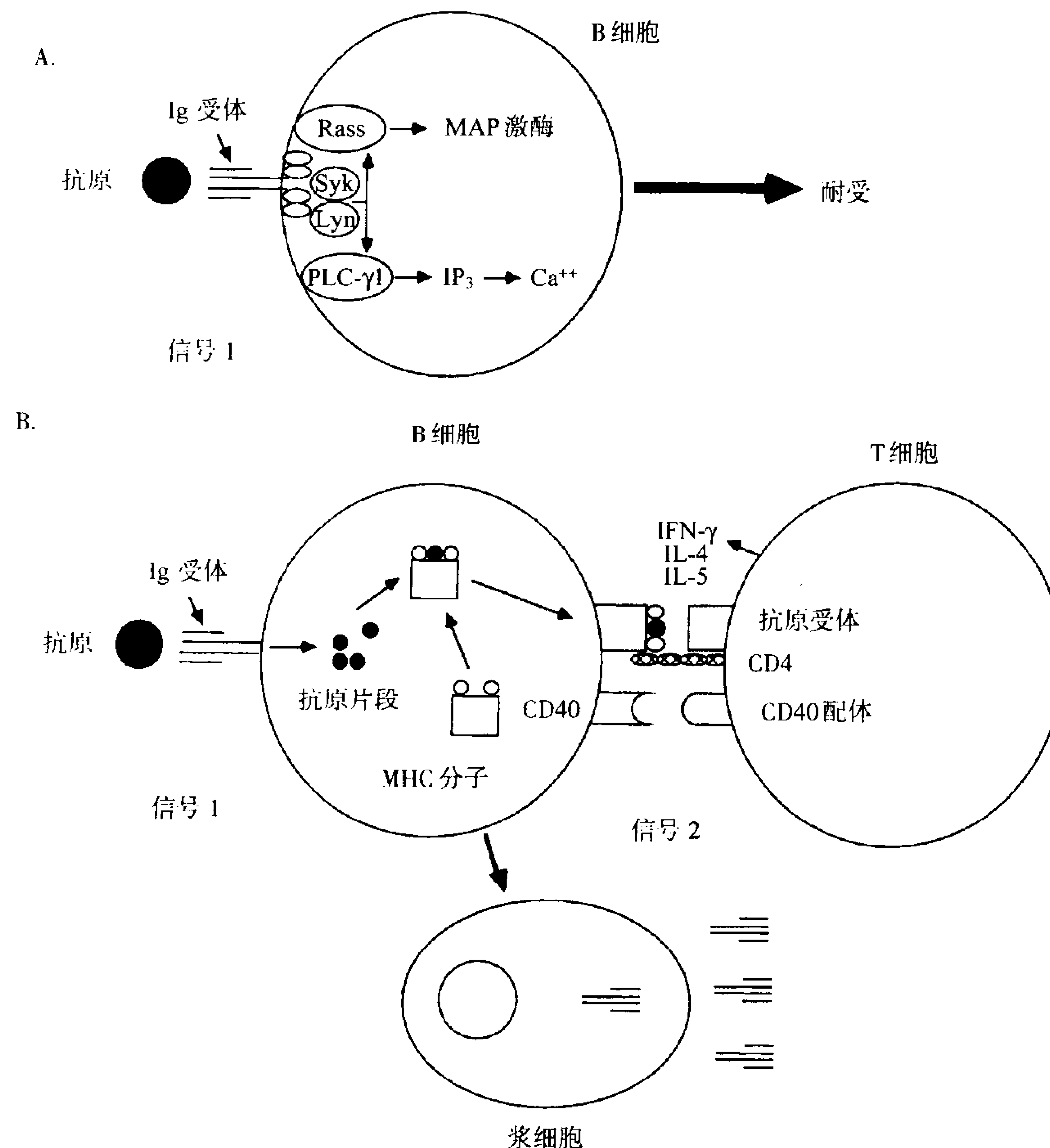


图 20.3　B 细胞活化的 Bretscher-Cohn 双信号模型(现代版)。A:抗原与 Ig 受体结合,通过酪氨酸激酶 Syk 和 Lyn 向 B 细胞传递第一信号,导致 GTP 结合蛋白 Ras 和丝裂原活化蛋白(MAP)激酶的活化以及磷脂酶(PLC)-γ1 的磷酸化,后者可产生三磷酸肌醇(IP_3)并使细胞内钙离子水平升高。如果只给予第一信号可使 B 细胞耐受。B:Ig 受体的内在化将抗原带进细胞内,核内蛋白酶将抗原消化成片段,其中一些肽段与 MHC Ⅱ 结合回到细胞表面被呈递给 T 细胞。T 细胞抗原特异性受体识别这些肽-NHC 复合物,活化 T 细胞表达 CD40 配体(通过 CD40 向 B 细胞传递信号),并分泌 Th2 细胞因子 IL-4 和 IL-5 以及 Th1 因子 IFN-γ。当 B 细胞接受这些第二信号时可发生增殖,一部分分化为浆细胞。在此模型中,信号 1 和信号 2 必须协同作用才能活化 B 细胞,只有信号 2 不产生任何作用。

的表达情况[132],发现同正常 B6 小鼠一样 Ly49A 受体在所有 NK 细胞(而不仅仅是只有 20%的细胞)上表达。研究发现这些转基因小鼠尽管在发育过程并未暴露于 D^d,但对 D^d 骨髓和肿瘤细胞移植发生耐受。这些实验均提示 NK 细胞上抑制性受体的分布和密度在耐受过程中起重要作用。

第二类实验利用一种嵌合体小鼠,即在 B6 小鼠体内表达可被 Ly49A 识别的 D^d/L^d 杂合分子[133]。在其中的一种嵌合体内,可观察到每一新生鼠中有 10% ~ 80%的细胞表达正常水平的 D^d/L^d 分子,剩余的细胞不表达(图 20.4)。与上述普通 D^d 转基因小鼠相反,来自这些小鼠的 NK 细胞群并不杀死缺少 D^d 的靶细胞,也就是说处于耐受状态。有趣的是如果将两种 NK 细胞亚型(D^d/L^d 阳性和 D^d/L^d 阴性)加入 IL-2 分开培养,并单独活化,可发现 D^d/L^d 阳性细胞获得杀死 D^d 阴性靶细胞的能力;相反,如果将细胞混合在一起激活,则不能获得杀伤力。这些结果提示能够杀死 D^d 靶细胞的 NK 细胞事先并未通过克隆清除过程而被清除,而且细胞可以某种方式适应环境和并具有再适应的能力。

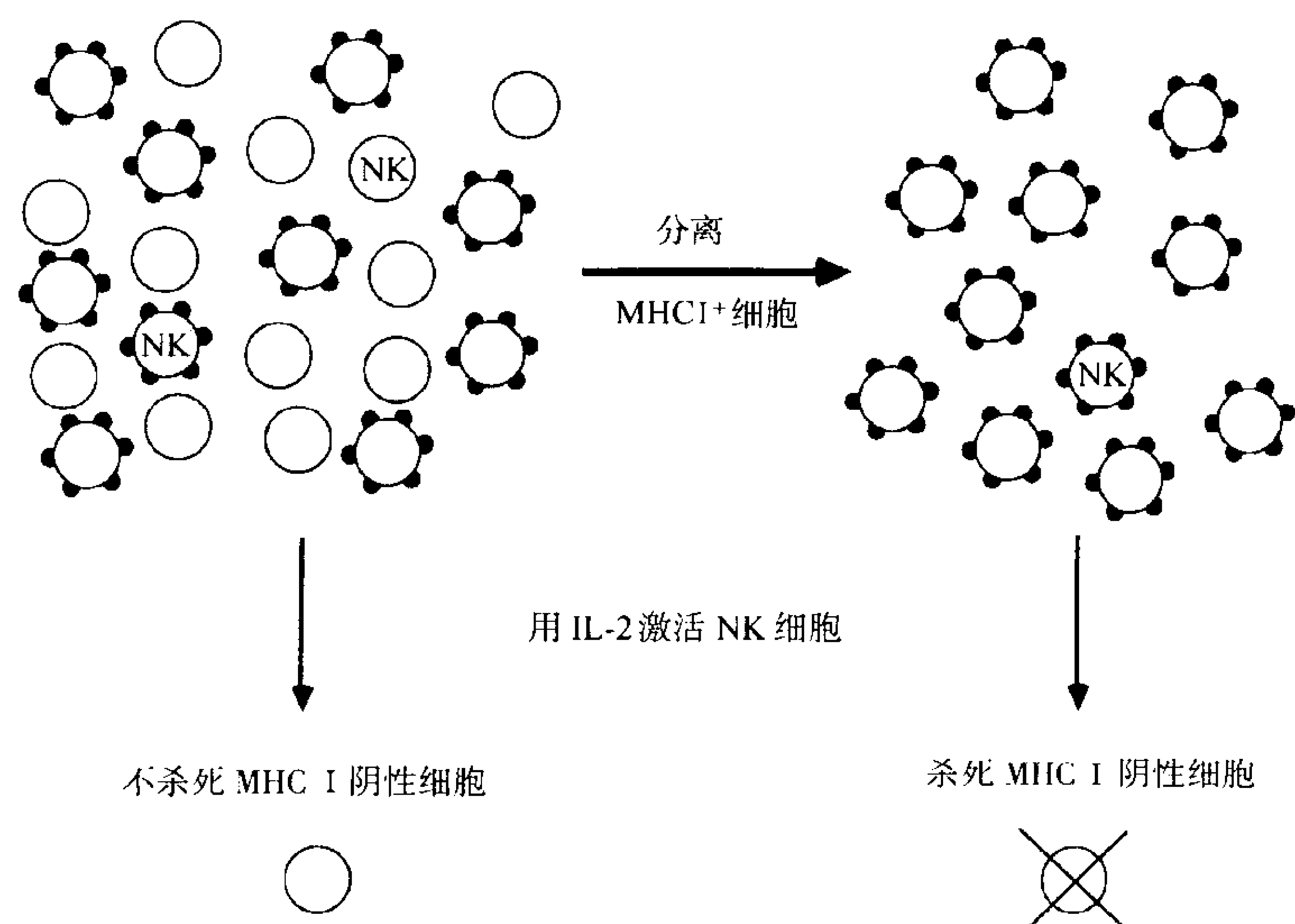


图 20.4 MHCⅠ嵌合体小鼠的 NK 细胞对 MHCⅠ阴性靶细胞的杀伤具有较强的适应性。嵌合体小鼠具有所有类型的 MHCⅠ阳性和阴性细胞 NK 细胞,用 IL-2 活化后 NK 细胞不能杀死 MHCⅠ阴性靶细胞。相反,活化后将 MHCⅠ阳性 NK 细胞分离出来时可获得杀死 MHCⅠ阴性靶细胞的能力。

总之,这些观察结果提示 NK 细胞可能通过调整其抑制性受体(也可能是其他分子)的表达水平阻止其杀伤宿主内的邻近细胞从而适应环境(变为耐受状态)。在嵌合体动物中 NK 细胞如何学会在功能上适应表达最低水平 MHCⅠ分子的细胞?弄清楚这一问题是我们了解这种耐受机制的关键。这一机制似乎比 T 细胞的 CD8 下调或 B 细胞的受体编辑更为复杂。尽管如此,从耐受的观点来看,所有这些机制均可被看作是受体调节,是一种适应方式,这种适应方式同原始的克隆选择学说提出的细胞清除在功能上截然不同。

对外周抗原的耐受

T 细胞和 B 细胞成熟后迁出初级淋巴器官进入外周淋巴细胞的再循环池中。这些完全成熟的初始细胞首先遇到的即是来自各种非淋巴器官且不在胸腺内表达的抗原。在这一节中我们将讨论这些抗原是否被免疫系统识别,是否只是在外周组织表达,免疫系统能否对其产生耐受。

组织特异性肽抗原

当 Medawar 被问及能否将异卵双生和同卵双生的双胞胎牛区分开时,他确信可通皮肤移植来区分。但是当 Anderson 等[134]试图进行这一实验时却发现大部分情况下(7/8)异卵双生的双胞胎之间的皮肤移植不发生排斥反应。根据这一出人意料的结果,Medawar 认为皮肤内不含有任何独特的移植抗原,在双胞胎体内呈嵌合状态存在的血源性细胞上发现的正是这种独特的移植抗原,因此有人认为血细胞对所有组织均耐受。

Billingham 和 Brent[135]对小鼠新生期耐受的研究首次对这一理论提出挑战。他们发现注射了 A 脾细胞的 B6 新生鼠对 A 皮肤移植不耐受。Boyse 等[136]在放射线诱导的$(A\times B6)F_1\rightarrow B6$骨髓嵌合体中进一步证实了这一发现,受者体内存在$(A\times B6)F_1$的血源性细胞,但仍对 A 皮肤产生排斥(表 20.3)。但是,如果将 A 系的表皮细胞与 F_1 骨髓同时注射,可诱导耐受形成[137]。因此,他们认为一定存在某种 A 系表达而 B6 小鼠不表达的皮肤特异性移植抗原(Sk)。随后的研究表明有两种基因控制这种抗原的表达[138],在其他种系组合中也能检测到 Sk 抗原的存在[139]。这些研究结果似乎与起初 Medawar 的结果相矛盾。

Emery 和 McCullagh[140]的研究解决了这一矛盾。最初的实验是从供者耳部制备皮肤,然后移植到受者背部的任何部位。但是 Emery 和 McCullagh 的实验是胁腹部皮肤的相互移植,这种情况下,所有异卵双生的双胞胎均对其同胞的皮肤移植产生排斥。当完全重复 Anderson 等实验时,他们证实了许多动物(在他们看来有 50%)在这些情况下不发生排斥反应。因此,牛也具有皮肤特异性抗原。

表 20.3　小鼠体内的组织特异性抗原

供者细胞		X 射线照射的宿主	对 A 系皮肤移植的排斥
骨髓和脾细胞	表皮细胞		
(A × B6)F_1	无	B6	43%(100 天时)
(A × B6)F_1	A	B6	0%(100 天时)
	5×10^6 ip (分别在 0、50、85 天时)		63%(300 天时)

将(A × B)F_1 小鼠的骨髓(BM)和脾细胞注射到致死性射线照射的 B6 小鼠体内,同时注射或不注射 A 表皮细胞。移植 A 系小鼠的皮肤并监测排斥情况。

对耳部皮肤移植未产生排斥反应,最有可能与抗原呈递的强度有关(例如朗格汉斯细胞的密度),在小鼠体内已证明抗原呈递强度随皮肤的部位不同而发生变化[141]。Anderson 等发现异卵双生的双胞胎之间皮肤特异性抗原的差异使两种免疫系统对所有血源性细胞蛋白衍生的肽均发生耐受,但对皮肤独特性抗原衍生的肽不发生耐受。如果编码皮肤蛋白的基因以两个等位基因形式存在,那么移植组织将表达在宿主皮肤上不存在的潜在的肽。这种肽必须能够与 MHC Ⅰ类或 MHC Ⅱ类分子结合才能诱导免疫应答,这或许可以解释为什么有两种基因操纵 Sk 抗原的表达。有三种限制因素:①需要等位基因多态性;②需要肽与 MHC 分子结合(由 Ir 基因控制);③对血源性细胞表达的次要组织相容性抗原产生耐受。这些限制因素可解释为什么并非所有的鼠种组合都能产生针对皮肤特异性抗原的免疫反应。但是由于远交系动物(如牛)编码皮肤特异性蛋白的基因具有更高的变异性,因此发生这种免疫反应的频率更高。

712

组织特异性抗原并非为皮肤所独有。Tripleff[9] 在证实免疫耐受是一种获得性状态的实验中证明了蛙的始基也表达组织特异性抗原。由于在其他蛙种的始基、胸腺和眼中试图证实这一研究均以失败告终,McCullagh[143] 用胎羊的甲状腺对这一课题重新进行研究。在妊娠 45 天时,羔羊免疫系统尚未发育,可接受成年羊皮肤的同种异体移植,此时如果将甲状腺切除,移植入裸鼠体内,5 ~ 9 周后再移植入同一只羔羊的皮下,此时可发生自身免疫性甲状腺炎。甲状腺部分切除的羔羊则不患此疾病,这表明免疫反应是特异性地针对甲状腺抗原而并非任何异种的鼠组织。这些观察结果表明免疫系统在正常情况下能够学会对其他组织产生耐受,并且以某种机制对那些只在外周非淋巴组织内合成的抗原产生耐受。

将抗原传递给胸腺是产生外周性耐受的原因吗?

因为诱导 T 细胞耐受的最初机制是胸腺内的克隆清除,因此组织特异性抗原的存在为免疫系统制造了一个麻烦,解决这一问题可能的一种办法是让这些抗原也在胸腺内表达。例如,髓磷脂碱性蛋白(由少突神经胶质构成的髓鞘的一种组分)在胚胎的胸腺中也以低水平表达[144]。即使用反转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术也未在胸腺内发现其他抗原[如胰腺 β 细胞的谷氨酸脱羧酶(GAD)]的表达,另外,某些自身抗原只有在免疫系统发育完全后才出现在组织内(例如在青春期的乳腺组织内)。

另一种解决办法是将未在胸腺内表达的所有分子都带到胸腺内。据推测树突细胞或许可以将外周抗原带回胸腺从而诱导耐受[32]。但是,隐蔽的树突细胞(活化的朗格汉斯细胞从组织迁移到淋巴结)只在输入淋巴液中被发现[145],而且从未证明树突细胞可迁移到胸腺。最后,来自外周组织的循环蛋白及其片段可能迁移入胸腺髓质,已证明胸腺树突细胞可加工处理静脉注射的外源抗原,并以刺激 T 细胞克隆增殖的形式呈递给 MHC Ⅱ分子[146]。胞质蛋白衍生的大部分肽由 MHC Ⅰ分子呈递,通过这一途径呈递外周抗原诱导耐受的效率非常低。尽管如此研究者们还是利用组织特异启动子使 MHC Ⅰ和 MHC Ⅱ 在外周组织表达来检验外周抗原是否向胸腺内迁移。与可溶性蛋白相反,这些 MHC 分子必须保持完整无损才能呈递其组织特异性肽,因此,如果这些 MHC 分子在胸腺内被树突细胞加工呈递,它们就不能使那些表达在外周组织的肽-MHC 复合物特异性的 T 细胞发生耐受。

这种类型的第一例转基因模型是由大鼠胰岛素启动子控制在胰腺 β 细胞内[147]或由弹性蛋白酶启动子

控制在胰腺的腺泡细胞内表达 MHC Ⅱ 类分子[148]。这些动物尽管并未清除某些表达 V_β 的 T 细胞(而在正常情况下 E 分子在胸腺内表达时,这些表达 V_β 的细胞将被清除),但在 MLR 中对 E 分子产生耐受。用固定在平板上的抗 V_β 抗体刺激培养的细胞时,表达相应 V_β 的一些细胞不发生反应[149]。将非转基因胸腺移植进胸腺切除并经致死剂量射线照射及骨髓重构(AT×BM)的转基因小鼠体内[148],这一试验排除了由于 E 分子的低水平表达而诱导耐受的可能性,而且使 T 细胞在不表达内源性转基因的胸腺环境内发育成熟,这些小鼠也可发生耐受,这一现象支持外周性耐受的机制。后来由胰岛素[150,151]或弹性蛋白酶[152]启动子控制在同样组织内表达 A 分子转基因得出的实验结果与上述稍有不同。这些小鼠在混合淋巴细胞培养中不发生耐受,但它们不对组织发生排斥。对这一观察结果最可能的解释是耐受只特异性地针对那些由 β 细胞或腺泡呈递的肽。与这一推测一致的是将同种异体脾细胞(MLR 中的 APC)注入转基因小鼠体内并未诱导组织排斥反应[150]。

用表达在不同外周组织的 MHC Ⅰ 类分子进行了一系列类似的实验。Morahan 等[153]运用的转基因小鼠可在锌诱导的金属硫蛋白启动子控制下在肝、肾和外分泌胰腺中表达 MHC Ⅰ 类分子 K^b,这种转基因小鼠甚至在用锌诱导、用表达 K^b 腺细胞免疫、用环磷酰胺或者外源性白细胞介素处理后仍对 K^b 表现耐受。这种小鼠对表达 K^b 的皮肤移植不发生排斥,但在体外仍能产生 K^b 特异性的 CTL。在另一模型中[154,155]运用了非经典的 Ⅰb 类 MHC 分子 Q10,这种分子只在肝脏内以分泌蛋白的形式合成。将经典的 Ⅰ 类 MHC 分子的跨膜区 α3 和胞质区 L^d 与 Q10 的 α1 和 α2 区相连接建立一种只在肝内表达的与细胞膜结合的 MHC Ⅰ 类杂合分子(Q10/L),具有这种分子的转基因小鼠即使用表达 L^d 的脾细胞免疫也未表现任何肝炎迹象。奇怪的是,同样的脾细胞在体外可激活 CTL 反应,而且反应的转基因杀伤细胞对表达杂合 Q10/L 分子的靶细胞表现出交叉的溶解反应。但是这种 CTL 反应的强度比非转基因小鼠明显减弱,而且体内免疫未诱导出交叉的 CTL 反应。由此可见严格的抗 Q10/L 的 CTL 前体细胞亚群在体内处于耐受状态。将 T 细胞注入经亚致死剂量射线照射并切除胸腺的非转基因受者体内,3 周后并未逆转在体外实验中减弱的 CTL 反应,提示这种耐受是不可逆转的,可能与清除有关。总之,这些结果表明胸腺产生的 T 淋巴细胞在初次遭遇外周组织内的肽-MHC 复合物时即可被诱导耐受。

B 细胞的外周耐受

713

用 K^b MHC Ⅰ 类分子特异性受体的转基因小鼠也检测到了 B 细胞对外周抗原的耐受[156]。将这种 BCR 转基因小鼠与金属硫蛋白启动子控制在肝、胰腺和肾中表达 K^b 的 MHC 转基因小鼠进行杂交[153]。尽管在双重转基因子代的骨髓中有大量的转基因受体阳性 B 细胞,但在其脾和淋巴结内只有少数受体阳性 B 细胞。外周淋巴组织中 $B220^+$ B 细胞也明显减少,而且未检测到编码转基因受体的 mRNA,因此可认为 B 细胞已被清除。可见,在某些外周组织中 B 细胞对 K^b 识别(在上述特例中即使 B 细胞与 K^b 的亲和力非常低)可诱导耐受。

用 Bretscher 和 Cohn 的模型很容易解释这种耐受机制。由于 T 细胞对 K^b 产生耐受(如上所述),B 细胞在遇到 K^b 时没有 T 细胞的辅助,因而只接受信号 1 而无信号 2。但是正如下面几节将要详细讨论的那样,并非所有的研究者都认为这一模型可以解释成熟 B 细胞耐受的诱导。

诱导成熟 B 细胞耐受的机制

成熟 T 细胞和 B 细胞均具有对外周自身抗原产生耐受的能力,这提示二者可能具有相似的机制诱导对外源抗原的耐受。Telton 及其同事[157]在这一领域进行了最早的研究工作。他们研究了肺炎球菌多糖的免疫原性,发现 0.5mg 的多糖可使免疫系统处于瘫痪状态,以致随后的细菌感染通常导致动物死亡。对合适剂量(0.5μg)的多糖产生的主要免疫效应表现为抗体反应的抑制。在成年动物中可诱导出这种针对特定多糖的特异性抑制现象,并可持续很长一段时间(可能由于多糖分子不容易降解)。尽管 Felton 确信抗体分泌细胞受到了影响,但在当时难以排除由于持续存在的抗原的吸附作用掩盖了抗体反应。

在 20 世纪 50 年代,许多研究均证明了高剂量的蛋白将使免疫系统瘫痪,并阻止其对随后免疫原剂量的抗原刺激产生抗体反应。由于这种耐受的诱导速度很快,因此可能对成熟淋巴细胞产生了直接影响。这些实验结果再次支持以下观点:即不同剂量的抗原既可使免疫系统激活也可使其灭活[120]。Dresser 的实验证明了淋巴细胞激活需要的信号不至一种[159],他发现如果在注射前用超速离心去除蛋白聚合物,那么在成年动物体内适当的低剂量的蛋白抗原可以是耐受原(表 20.4)。有趣的是,用同样方法制备的蛋白抗原如果与 CFA 联合应用则成为免疫原。Dresser 最后得出的结论为:当淋巴细胞只识别未聚合的抗原时出现免疫系统瘫痪,但如果同时给予第二种成分时(他称之为免疫佐剂性,adjuvanticity)将产生抗体反应。免疫佐剂性可能只是抗原的重新聚合或者由佐剂中的分枝杆菌成分所介导。Frei 等预见到免疫佐剂性可能是一种抗原刺激,抗原可由巨噬细胞摄入,然后将其转变为免疫原形式。不幸的是,在那时尚未证明分子观点(即免疫原形式是与 RNA 结合的抗原)的正确性,而且巨噬细胞活化的观点也被人们普遍所摒弃。

表 20.4　双信号模型中的第二信号是非抗原特异性的(第一证据)

第一种抗原的形式	第二种抗原的形式	抗体反应
未去除聚合物	无	有
去除聚合物	无	无
去除聚合物	未去除聚合物	无
去除聚合物 + 佐剂	无	有

当单独注射去除聚合的抗原时可诱导耐受,但是当与佐剂联合注射可诱导免疫反应。

随后,有人建议用 Bretscher 和 Cohn 的模型(图 20.3)来解释抗原剂量不同既可诱导免疫应答也可诱导耐受以及需要两种抗原决定簇来刺激免疫反应(对半抗原-载体的识别)的现象,此模型也有助于解释成熟 B 细胞如何发生体细胞突变以增加其 Ig 受体的亲和力,但并不产生危胁宿主的抗自身受体。如果只有 B 细胞获得抗自身受体而 T 细胞没有,那么 B 细胞因为只接受信号 1 而被灭活。Havas[161]、Golan 和 Borel[162] 所进行的实验为这一模型提供了最早的支持,他们用半抗原 DNP 和自身蛋白鼠 IgG 来免疫小鼠,发现动物对半抗产生耐受,即随后用半抗原加外源蛋白载体来免疫动物时不产生针对半抗原的抗体反应。Katz 及其同事[163~165](对 Felton 的多糖实验进一步扩展)将半抗原与不易降解的化学合成的 *D*-氨基酸共聚物交联在一起,证明豚鼠的 B 细胞(即便已经接触过抗原)直接受到影响。如果将可降解的 L 型共聚物分子给予对载体不发生 T 细胞反应的豚鼠能够诱导对半抗原的耐受。在以上每种情况下,所用的抗原对 T 细胞来说不是免疫原,因为动物要么对载体蛋白(鼠 Ig)耐受,要么由于抗原加工处理(D 共聚物)和(或)MHC 结合的问题(共聚肽)而不能被识别。因此,T 细胞辅助(信号 2,由第二抗原决定簇所介导的)的缺乏可导致耐受。

受体阻断

起初认为在上述那些模型中,由于不易降解的抗原黏附于 B 细胞表面使受体阻断从而诱导 B 细胞的不反应。Diener 和 Paetkou[166] 首次发现给予成年动物以耐受剂量的抗原时,抗原可持续存在于淋巴细胞表面,这种结合有抗原的细胞在 Aldo-Benion 和 Borel[167] 的半抗原 IgG 模型中也可观察到。只有耐受原性的结合物(如 $DNP_{12}IgG_1$)可产生这些细胞,与非耐受原性结合物(如 $DNP_{52}IgG_3$)关系并不密切。存在高剂量的耐受原时,这种细胞与耐受状态均可持续数周,当耐受衰退时,与细胞结合的抗原也消失。体外培养可使抗原从细胞上脱落,而且使耐受在细胞过继转移中消失[168,169]。

714

已证明抗原的物理性质(如大小)[170~172] 和半抗原密度[173] 是受体阻断的重要因素。在一系列严格的实验中,Dintzis 等[174,175] 合成了各种长度的线性丙烯酰胺多聚物,并将其与不同密度的半抗原相连接,发现与高密度半抗原相连的大多聚物是免疫原,而与低密度半抗原相连的小多聚物不是免疫原,但后者能阻断前者的活化作用。这一结果被解释为 BCR 必须聚集成 10 ~ 15 个受体的复含物才能向细胞传递信号。连接低密度半抗原的小聚含物不能获得这种形态,但它们能以非活化性复含物的形式占据受体,并阻断较大聚含物引起的活化。这个模型为受体阻断提供了一种分子机制。

将 DNP_{12} IgG1 与 DNP_{52} IgG3 比较又发现了另一种机制。抗体类型是决定结局的重要变量[176]。TNP_{11} IgG1 可诱导耐受，而 TNP_{11} IgG3 则是免疫原，而且去除人 γ 球蛋白抗体的 Fc 段构建 $TNF_{10}F(ab')_2$，可将耐受原 变成免疫原。这些结果提示 B 细胞上 Fc 受体可能在耐受中起作用[177]。更近的研究表明如果 Fc 受体同时参与同样的复含物形成(最典型的是通过抗原-抗体复合物结合而产生)，那么通过 BCR 的信号传导会受到抑制[178]。

早期的研究证明经细胞胰蛋白酶作用去除结合的抗原和受体后，成熟 B 细胞某些形式的耐受可被逆转，继而出现受体的再表达[179]。这些细胞的不反应可能是由受体阻断使信号不能传导引起的。但是，仅仅去除细胞表面分子尚不能逆转其他一些抗原诱导的耐受，这表明在耐受诱导过程中还需要一种主动的代谢过程[180]。例如，D 共聚物在 37℃时可诱导不反应，即使随后通过胰蛋白酶作用清除 B 细胞表面结合的 Ig 受体，耐受状态依然存在。相反，将细胞在 4℃暴露于抗原并不诱导耐受。由此可推测低温阻断了诱导耐受所必需信号传导。但是后来的研究发现，即便是这种耐受状态，在脾聚集实验中仍可被逆转(实验前细胞经过仔细洗涤并暴露于过量的 T 细胞辅助下)[181]。在其他几种系统中，用诸如 LPS 之类的丝裂原也可逆转 B 细胞耐受[182,183]。这些观察结果提示对成熟 B 细胞来说可能存在一种稳定的但又能逆转的不反应状态。

B 细胞无反应性和死亡

尽管 B 细胞同样表现为对抗原不反应，但不是所有的 B 细胞耐受模型都表现受体阻断[169,183,184]。由于能与标记抗原结合的 B 细胞总数并未减少，因此这种耐受状态被认为是克隆无反应性而不是克隆清除或流产[184]。但是要证明这一点较为困难，因为在正常小鼠体内用 LPS 刺激时只有 1% ~ 3% 的抗原结合细胞(在有限稀释实验中)可对抗原产生应答或产生特异性抗体。由此可见，一小部分具有重要功能的细胞可能已被清除，在大量低亲和力的抗原结合细胞中可能未检测到这种细胞的缺失。在后来进行的有限稀释实验中，运用一种更强的丝裂原即葡聚糖硫酸盐与 LPS 的混合物作为刺激物，发现一些耐受的 B 细胞可通过 BCR 旁路途径被激活，分化成抗体形成细胞[183]，这种耐受逆转现象提示至少有一部分细胞被诱导功能性的无反应性(失能)而不是被清除。

BCR 转基因小鼠的运用[185]使人们有可能更加清楚地了解 B 细胞无反应性的特性。已构建了一种能够在其 B 细胞上表达鸡蛋清溶菌酶特异性高亲和力受体(IgM 和 IgD)的转基因小鼠，其体内大约有 90% B 细胞表达转基因受体。将这种 BCR 转基因鼠与另一种组成型表达溶菌酶抗原的转基因小鼠交配，其双重转基因子代的脾和淋巴结内仍表达大量与溶菌酶结合的转基因 B 细胞。当用溶菌酶免疫时，这些 B 细胞不能产生抗体或空斑形成细胞反应。由于无应答可能是 T 细胞水平的耐受所引起的，因此将这些动物的脾细胞输入经放射线照射的非转基因受者体内，同时注入已接触过马或羊红细胞抗原的小鼠脾细胞作为 T 细胞辅助的来源，然后用溶菌酶-RBC 结合物刺激受者。双重转基因动物 B 细胞产生的空斑形成细胞反应比 BCR 转基因对照低 10 ~ 100 倍。因此，尽管 B 细胞未被删除，但其表现出功能性的反应低下，这种内在的功能性的不反应状态即为"无反应性"。

这种无反应性状态最显著的特征是 B 细胞表面的 IgM 减少了 90%，这种减少是由于 IgM 从内质网向高尔基体的转移受到阻止[186]。IgD 和其他细胞表面标志物如 B220 和 Jlld 均正常。细胞也能结合溶菌酶(在从骨髓和脾内分离的新鲜 $B220^+$ 细胞表面可检测到这种抗原)，并表现出受体阻断。有趣的是，将 BCR 转基因动物与另一种不同的溶菌酶转基因动物(表达的循环蛋白水平降低了 10 倍)交配后，发现 B 细胞不耐受，表面 IgM 水平也未减少[187]。如果在饮水中给这些动物喂饲锌，诱导溶菌酶转基因的金属硫蛋白启动子，在 4 天内可使溶菌酶循环浓度增高 70 倍，在此期间，所有表达转基因 BCR 的 B 细胞表面 IgM 逐渐减少，最终降至上述双重转基因小鼠体内的低水平。这些 B 细胞似乎已经耐受，因为将其与接触过马 RBC 的辅助 T 细胞共同过继转移给经放射线照射的小鼠后，溶菌酶-RBC 结合物并未诱导较好的免疫应答。将 Ig 受体转基因小鼠的 B 细胞输入表达高水平循环抗原的溶菌酶转基因小鼠体内时，也观察到上述同样的结果。因此，4 天内即可诱导成熟的成年 B 细胞发生无反应性。

无反应性 B 细胞活化受阻似乎完全发生在 Ig 受体水平,因为在缺乏抗原时通过 CD40 或由 LPS 刺激诱导的活化增殖未受到影响[188,189]。Ig 介导的信号阻断影响了协同刺激分子 B7 的正常上调[190]。从生化角度来看,由于酪氨酸蛋白激酶的活性明显降低,因此这种阻断发生在信号传导的早期[191],结果将导致钙离子流的减弱,而且不能激活转录因子 NF-κB 和 JunN 端激酶(JNK)途径[192],相反,NF-AT 转录因子的活化和细胞外信号调节激酶(ERK)途径是正常的。

用 LPS 刺激可逆转培养细胞的无反应性状态[189],2 天内 B 细胞可充分再表达表面 IgM,3 天后抗体产生增加。有趣的是,如果培养物中同时存在抗原和 LPS,B 细胞分泌抗体的能力仍受到抑制,尽管其增殖能力保持不变。这表明 BCR 被抗原占据是诱导和保持这种无反应性状态的关键信号。

用 5-溴-2 脱氧尿苷标记实验可检测细胞的转变,从而追踪体内无反应性 B 细胞的命运[193]。正常成熟 B 细胞的半寿期是 4~5 周,而无反应性 B 细胞只能存活 3~4 天。这两种 B 细胞进入成熟细胞池的速度相同,这表明无反应性 B 细胞死亡速度较快。但是这种结果只有在抗原存在时才会发生。如果将无反应性 B 细胞过继转移给经放射线处理并且未接触抗原的受者体内,其寿命和正常 B 细胞一样[189,194]。有趣的是,5~10 天后这些 B 细胞分泌的 IgM 恢复至正常水平,但对抗原刺激仍不反应。可见,IgM 水平降低是无反应性细胞的一个标志,但并不是无反应性的必要因素。奇怪的是,这些对抗原和辅助 T 细胞产生应答的无反应性细胞的结局是死亡[195](图 20.5)。当存在溶菌酶特异性 TCR 转基因动物的 CD4$^+$ T 细胞时,用抗原刺激 BCR 转基

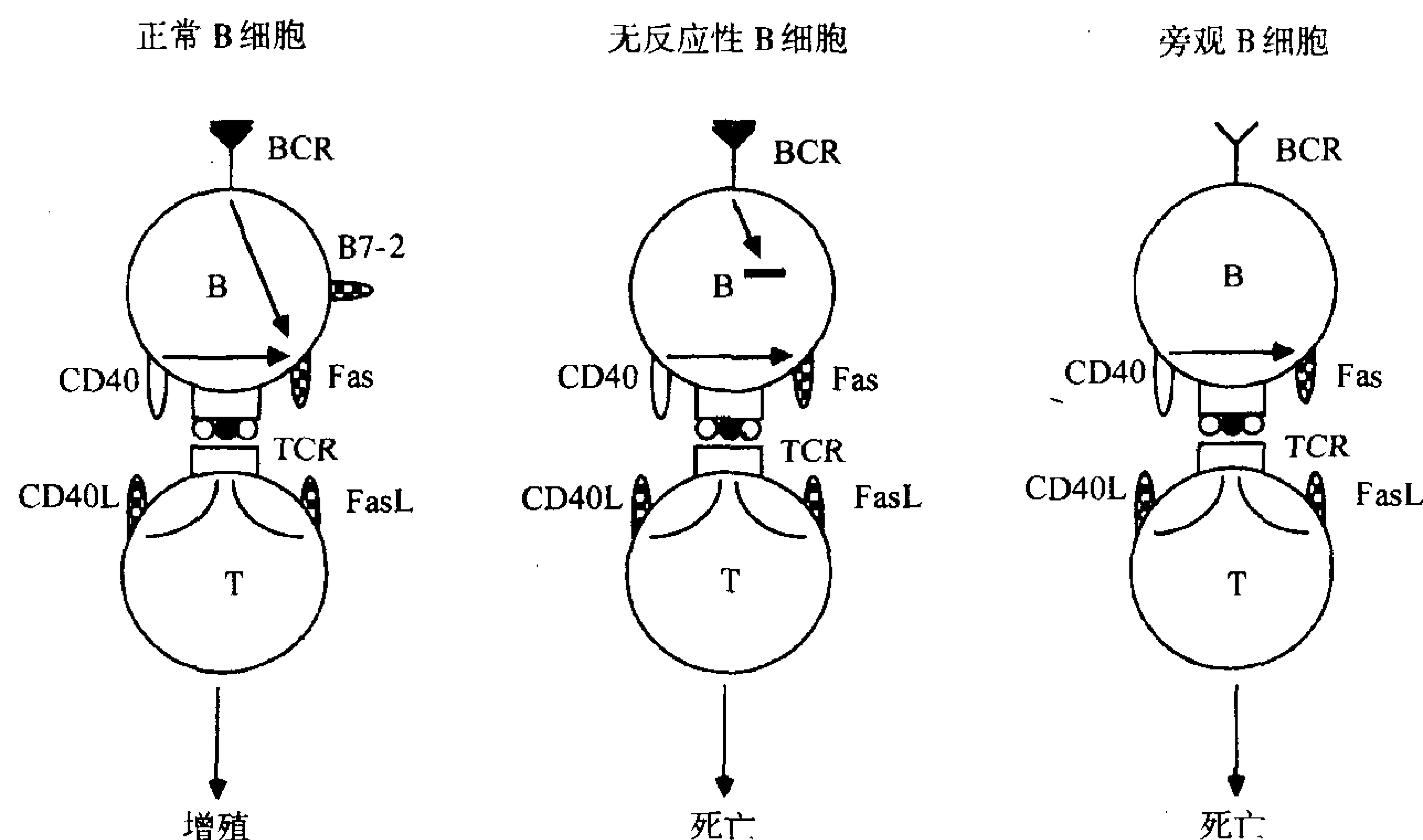


图 20.5 T 细胞辅助过程中或之前 BCR 介导的信号传导决定了 B 细胞活化、增殖或死亡的结局。B 细胞将抗原呈递给 T 细胞,使其表达 CD40 配体和 Fas 配体。然后 CD40 配体通过 CD40 刺激 B 细胞表达 Fas 和 B7-2,通过 Fas 配体向 B 细胞传递信号。存在 BCR 介导的抗原信号时,Fas 信号与 CD40 信号协同作用增强 B 细胞增殖。相反当缺乏抗原特异性信号(旁观 B 细胞)或信号被阻断(无反应性 B 细胞)时,Fas 信号可导致细胞凋亡,原因可能是未诱导 B7 的表达。黑白方格图案代表被诱导表达的分子。(本图引自参考文献[196]。)

因小鼠的非耐受 B细胞可使其增殖并产生针对溶菌酶的抗体。相反,如果将双重转基因鼠的 B 细胞在早期发育即开始暴露于可溶性的循环溶菌酶诱导其无反应性,接受同样的刺激后这些无反应性 B 细胞将发生凋亡。这种死亡在 CD95 缺陷(*lpr*)环境中可被阻止,提示细胞死亡需要 Fas/Fas 配体途径的参与。后来的研究表明 CD40 受体也是诱导细胞死亡所必需的,因为无反应性 B 细胞上 Fas 表达的上调需要 CD40 介导的信号传导[196](图 20.5)。在同样的环境下正常转基因 B 细胞(非无反应性)并不死亡,实事上最佳的克隆增殖和抗体产生还需要 CD40 和 Fas 的表达。如果用可被 T 细胞识别的肽刺激 B 细胞,绕过由抗原占据的 BCR 途径,那么即使未耐受的 B 细胞也会死亡。可见,通过 BCR 的信号传递是决定辅助性 T 细胞与 B 细胞相互作

用结局的关键因素，由此可推测无反应性 B 细胞的死亡是通过 BCR 的信号传导阻止所致。

这些结果提示对成熟 B 细胞来说，单独给予信号 2(正如在某种旁观情形下可能发生的那样)可诱导耐受。这与起初 Bretscher 和 Cohn 的模型仍是一致的，他们的模型只推测信号 1 和 2 都是活化所必需的，但对单独给予信号 2 的情况未作任何预测。总之，B 细胞无反应性是一种暂时状态，这种状态在正常情况下缺乏 T 细胞辅助时通过持续性受体占据引起细胞死亡。但是受体阻断实验表明如果能够尽快地去除抗原(一定在最初的 24 小时内)并提供 T 细胞辅助，可挽救 B 细胞免于死亡，并代之以活化。至于能否通过类似于 LPS 的生理性信号挽救完全无反应性的 B 细胞仍有待研究。

记忆 B 细胞

716 一旦 B 细胞被活化、分裂，其子代中的一部分最终分化成抗体形成细胞，然后死亡[197]。这一过程在 *lpr* 和 *gld* 小鼠体内受到阻止，因为细胞死亡所需的 Fas 或 FasL 存在基因缺陷[198]。这些小鼠患有一种类似于人类红斑狼疮的由抗体介导的自身免疫性疾病[199]。bcl-2 转基因小鼠的 B 细胞死亡也受到损害，其 B 细胞系可表达高水平的 bcl-2 蛋白[200]，这些小鼠还患有 B 细胞淋巴瘤[201]和自身免疫病[202]。根据这些间接实验可推测凋亡所引起的细胞死亡是 B 细胞对外源性抗原产生免疫应答过程的正常现象，而且这种凋亡至少有一部分是由 Fas/FasL 介导的。这些观察结果也提示 Fas 依赖的细胞死亡可清除已产生自身反应性受体的外周 B 细胞，从而有助于保持自身耐受。

一部分活化的 B 细胞也可迁移到生发中心，在此经历体细胞高突变过程[203]。也可能存在另一种迁移进生发中心独立的 HSA^{lo} B 细胞亚群[204]。在上述两种情况下，这些 B 细胞首先去除其表面的 BCR，经过几轮分裂后重新表达突变的 Ig 受体[205]，然后经历与未成熟 B 细胞类似的阴性选择过程，抗原的供给来自于滤泡树突细胞上的抗原-抗体复合物[206]。细胞的存活需要高亲和力的受体足以竞争排除循环的抗体，使 B 细胞摄取处理抗原将肽呈现给已接触过抗原的辅助 T 细胞[203]，这些辅助 T 细胞也已迁移进生发中心[207]。如果受到 T 细胞辅助，B 细胞就能够存活，并可被激活，经历另一轮扩增和分化，否则 B 细胞将发生无反应性或凋亡[208,209]。当适当的生发中心形成时给予大量的可溶性抗原可证明凋亡的存在。这些抗原要么是经过筛选使其缺失起辅助作用所需的关键性 T 细胞决定簇，要么通过超速离心(同 Dresser 的方法)去除聚合物以减弱 T 细胞活化所需的 APC 处理过程。在以上每一种情况下，位于生发中心和 T 细胞富集淋巴区附近的高亲和力 B 细胞均发生了凋亡，而不是存在 T 细胞辅助时所观察到的亲和力成熟。因此，同未成熟 B 细胞一样，缺乏 T 细胞辅助的信号可导致的成熟 B 细胞耐受，这与 Bretscher 和 Cohn 的模型一致。

非胸腺依赖性抗原

迄今的所有实验均表明成熟 B 细胞的活化和耐受均遵从 Bretschert 和 Cohn 模型的一般原则。但是也存在一类能以 T 细胞非依赖(TI)方式诱发抗体反应的抗原[210]，这些抗原可分为两类，TI-1 抗原代表与 B 细胞丝裂原(如 LPS)偶联的半抗原[211]，LPS 不需要 T 细胞辅助即可使 B 细胞完全活化、增殖并分化成抗体形成细胞(包括 Ig 类型的转换)。在限制条件下，TI-1 抗原可通过高亲和力的半抗原特异性 Ig 受体与特异 B 细胞结合。当遇到特殊的细菌产物(标志感染存在)时，对 TI-1 抗原的应答可能代表一种不需要 T 细胞辅助的特殊适应过程。

TI-2 抗原代表一类更令人迷惑的分子[212]。这些抗原不是 B 细胞的有丝分裂原，它们由大分子量的聚合物组成，如具有重复性抗原决定簇的多糖[175,213]。这些抗原通常不易降解并可通过替代途径活化补体[214]，在大多数情况可激活成熟 B 细胞，而且在新生或 CBA/N 小鼠[其 btk 激酶存在基因缺陷(*xid*)]体内通常不能诱发免疫应答。目前已构建了几种模型来研究这些抗原是如何工作的。首先，接触过环境中抗原的 B 细胞可能已经处于活化状态[216]，这种已处于细胞周期 G_1 期的“大的”B 细胞，可能将 TI-2 抗原的 Ig 受体占据看作是阳性信号而非阴性信号；其次，当 B 细胞处于 G_0 休眠期时，除了 TI-2 抗原外通常还需要其他因素才能产生应答，例如 T 细胞分泌的细胞因子(如 IL-2 和 IL-5)可加强对 TI-2 抗原的分泌性反应[217]，并在特定模型中阻

止 B 细胞克隆清除[218]。由某些 TI-2 抗原激活的诸如 C3d 之类的补体成分可与 B 细胞上的 CDR2(CD21)受体结合,并通过降低由 Ig 受体介导的信号阈值从而显著增强抗体反应[219]。甚至由抗原刺激 B 细胞自身产生的细胞因子也可能在其中起作用,例如,已证明 B 细胞产生的 TNFα 参与了抗 Ig 刺激所引起的 B 细胞增殖反应[220]。最后,IL-2 活化的 NK 细胞可加强 TI-2 抗原诱导的 Ig 分泌,其机制尚不清楚[221]。

第三种可能是 TI-2 抗原上重复排列的抗原决定簇以一种独特的方式与 B 细胞 Ig 受体结合,从而传递活化信号而不是无反应性或细胞死亡信号。对泡状口炎病毒(VSV)的免疫应答可以辅助性 T 细胞非依赖方式诱导产生针对病毒上糖蛋白(G)的早期 IgM 中和抗体。相反,VSV-G 感染细胞不能呈现一种有序的蛋白晶体结构,因此,用此细胞免疫诱导的抗体反应大部分为 T 细胞依赖性的[222]。寻找由病毒颗粒产生的隐性第二信号未发现任何与补体、TNF 或 NK 细胞活化有关的多克隆 B 细胞刺激[223]。因此,作者认为病毒颗粒严格的类晶体结构(决定簇之间具有 5 ~ 10nm 的空隙)能够活化 B 细胞,而不是诱导耐受。

最后一种可能性是反应的 B 细胞代表一组散在的细胞亚群,并不遵循 Bretscher-Conh 规则。对某些 TI-2 抗原的应答位于脾的边缘区,这些区域反应的 B 细胞为 $CD23^-$、IgM^{bright}、IgD^{dull}[224],这是 B-1($CD5^+$)B 细胞亚群的表型[225]。在不对 TI-2 抗原反应的 CBA/N 小鼠体内不存在这些细胞。另外,正常小鼠和人类的 B-1 细胞大部分负责产生低亲和力的 IgM 自身反应性抗体(前面已讨论过)。这类亚型的细胞在体外对抗-Ig 诱导的耐受表现抵抗性,而且,由于 B 细胞并未经历体细胞高突变[227],因此可能不需要双信号控制。遗憾的是在组织培养中纯化的 B-1 细胞对 TI-2 抗原 TNP-Ficoll 不反应,这提示或许一种或多种上述其他特性也是 B-1 细胞反应所必需的。

总之,上述结果提示在缺乏同种 T 细胞辅助情况下,B 细胞免疫系统的确可与某些特殊抗原直接产生免疫应答。保留这种直接的或许更原始的免疫应答形式意味着有时仍有必要产生快速的抗体反应(或许是胚系基因编码的)来中和某种迅速增殖的感染因子[229]。产生这些抗体的 B 细胞的耐受可能由上述的受体阻断机制所介导。

成熟 T 细胞的耐受诱导机制

Bretscher 和 Cohn 的双信号模式(图 20.3)认为淋巴细胞需接受两种不同的抗原特异性信号才能被活化。 717
但是 Dresser 的实验表明在体内的某些情况下第二信号(如 CFA)可能是非抗原特异性的(表 20.4)。随后对鼠 $CD4^+$ Th1 克隆的研究结果也支持这一观点[230]。这些细胞的活化增殖需要具有免疫活性的 APC。用多聚甲醛之类的固定剂对 APC 进行化学处理后再用来呈递肽抗原,T 细胞不发生增殖[231],相反,24 小时后 T 细胞进入一种新的状态,此时用正常 APC 和抗原再刺激时这些细胞不增殖或不产生 IL-2。这些 T 细胞并未死亡,因为加入 IL-2 后能够增殖。这种不反应状态在组织培养中至少持续 2 周。同时进行的实验是将 MHCⅡ类分子构成的脂质体膜平铺于塑料表面,并加肽抗原刺激可诱导同样状态出现[232]。这表明 TCR 占据是诱导这种状态所需的充分条件,也就是说单独给予抗原特异性的信号 1,对细胞来说是抑制性信号。

尽管上述这些观察结果 Bretscher 和 Cohn 的模型一致,但后来鉴定第二信号的实验结果则不然。将未经处理的同种异体 APC(不能呈递肽)加入经化学固定的同源 APC 和肽可阻止不反应状态的诱导[233],并可恢复起初的增殖反应。这一结果提示固定的细胞可正确地呈递抗原,只要这种固定作用不阻断由 APC 所传递的其他信号。加入同种异体 APC 可使这些第二信号被传递,尽管这一过程相对来说效率不高,抗原浓度需要增加 100 倍才能获得同等程度的增殖反应。尚没有任何可溶性的细胞因子可有效地替代同种 APC 的作用。而且有关信号传导的生化研究表明协同刺激信号并不依赖于 TCR 占据所产生的信号[234]。后来的研究证明对 IL-2(T 细胞增殖所必需的)的产生来说,CD28 是接受共刺激信号的受体,而 APC 上配体是 B7-1(CD80)或 B7-2(CD86)[235~238]。因此,第二信号显然不是直接的抗原特异性,也并非来源于抗原特异性细胞。实事上,$CD4^+$ 细胞的活化与 Lafferty 和 Cunningham 最初提出的模型[239]更为相似,在这个模型中 TCR 占据可导致 APC 表面 MHCⅡ类分子的交联,反过来诱导 APC 上的协同刺激分子表达,后者是 T 细胞活化所需的第二信号。 718
目前,有证据表明 TCR 介导的信号可上调 T 细胞上 CD40 配体的表达,T 细胞可通过 *CD40 刺激 APC 表达*

B7-2,B7-2 反过来又可通过 CD28 共刺激 T 细胞(图 20.5)。但是,值得注意的是这一模型将协同刺激的诱导置于抗原特异性受体的控制之下,这将意味着单独给予信号 1 是阳性信号。如果要维护双信号模型,可能需要通过另一种机制提供协同刺激。

重要的是,应该意识到在这种第二信号为非抗原特异性的模型中,需要重新考虑耐受诱导中区分自己和非己的重要性,因为 APC 无法辨别正在呈递的是自身抗原还是外源抗原。第一位正视这一问题的是 Janevay[240,241],他认为协同刺激事实上是控制机体是否产生免疫反应的开关。在这一事件中,B7/CD28 的相互作用是后来才能发生的,并且需要 TCR 占据以外的其他信号来启动。Janeway 推测这一开关由受体或刺激物(二者是天然或非获得性免疫系统的一部分)所控制。起初他们的工作是通过识别感染性病原体上独特的化学标志物来检测此类有机体的入侵。对细菌来说,这将涉及到对某些分子的识别,如 LPS、含有甲酰蛋氨酸的肽和其 DNA 中非甲基化 CpG 序列。对病毒来说,将涉及到检测双链 RNA 及 IFN-α 或 IFN-β 的产生和释放。受体可能就位于专职 APC 上,以便其传递的信号直接开启协同刺激途径。另外,受体也可能位于其他细胞上,通过释放第二媒介物(如趋化因子、TNFα、IL-1、IL-6)间接激活 APC。事实上,由病原体激活的天然免疫系统的任何一种途径(如补体替代途径的活化)都在这一过程中发挥作用。因此,这一理论首次提示获得性和非获得性免疫反应之间的存在必然联系。

Matzinger[242] 扩展了这些概念,将所有形式的获得性免疫反应融合进来。她认为通常与暴露于感染性病原体无关的移植物排斥也只能由“危险”信号所启动,从而启动 APC 传递协同刺激信号。在这种情况下,由坏死细胞启动的损伤反应将传递诱导信号。尽管在分子水平仍不明确,但这条通路将损伤和感染一起归结为启动获得性免疫反应的一种途径,从而完成了与原始防御机制的衔接。由此可见,正是由抗原参与的这一系列事件决定了免疫反应的产生与否。

图 20.6 总结了这些观点,并试图将其与 Bretscher 和 Cohn 的 B 细胞活化模型整合在一起。损伤或感染

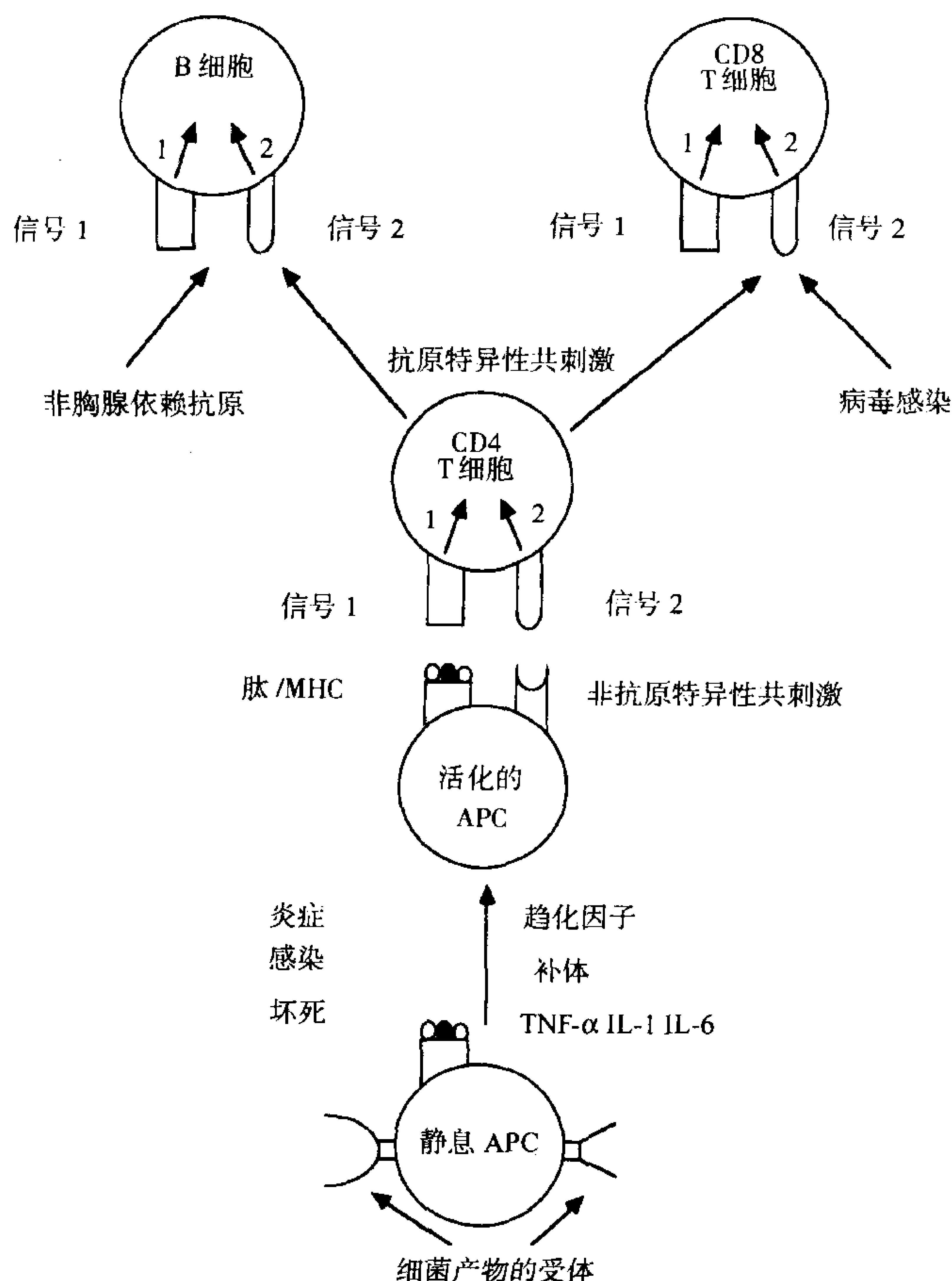


图 20.6 抗原特异性和非特异性共刺激的整合。静息 APC 被细菌产物或炎症刺激(细胞因子、趋化因子、补体活化)激活后能够传递非抗原特异性共刺激信号,此时,活化的 APC 可将肽-MHC 复合物呈递给 CD4⁺ 辅助 T 细胞,后者一旦活化就可向 B 细胞或 CD8⁺ T 细胞提供辅助作用,这种相互作用被认为是共刺激信号的一种抗原特异性形式,胸腺非依赖抗原或病毒似乎不需要 CD4⁺ T 细胞辅助,因此不经过这种共刺激途径。

通过炎症过程以抗原非特异性形式激活 APC 的协同刺激途径,从而启动天然免疫反应。以肽-MHC 复合物形式呈现在 APC 上的环境中任何抗原可以免疫原形式呈递给 T 细胞群。专职 APC 上自身肽特异性 T 细胞大部分在胸腺已被清除,所有其他肽特异性的 $CD4^+$ T 细胞将被激活。一旦被激活后,这些 T 细胞将辅助 B 细胞和 $CD8^+$ 细胞毒性 T 细胞增殖并分化成效应细胞。尽管由辅助性 T 细胞传递的第二信号并非抗原特异性,但启动这一信号的细胞间相互作用参与了抗原的特异性识别过程,因此这与 Bretscher 和 Cohn 模型是一致的,即活化需要两种抗原特异性信号。图 20.6 中涉及的其他内容将在下面讨论。

活化诱导的细胞死亡(内环境稳定与克隆耗竭)

在 MLR 中反应 T 细胞所占的比例相当高,占 $CD4^+$ T 细胞群的 2% ~ 5%[243]。抗原刺激后的增殖反应并未增加细胞所占比例[244],这提示许多分裂细胞必定发生了死亡。Sprent 和 Miller[245,246] 在实验中给 F_1 小鼠注射其亲代的细胞,然后从其胸导管中分离 4 天的未成熟细胞(blast),将细胞标记后重新输回到同系的亲代宿主体内,追踪反应性细胞的结局,发现这些细胞归巢到脾和肠内,然后大部分消失,在原位死亡并被巨噬细胞降解或在 2 周内被分泌到肠腔内,只有存活的一小部分变成反应更加迅速的记忆细胞。

用超抗原刺激 T 细胞研究其结局已证实了这些早期发现。将表达 Mtv-7 的脾细胞注射进缺乏 Mtv-7 的小鼠体内[247],或将葡萄球菌肠毒素 B 型(SEB)注射进表达 $V_\beta8$ 和(或)$V_\beta3$ T 细胞的鼠系体内[248],结果均导致反应性 T 细胞先扩增,然后大量细胞发生凋亡。不只是用超抗原可以观察到这种现象,将表达 TCRαβ 抗 H-Y 受体的雌性转基因鼠的脾细胞输入雄性裸鼠体内可导致类似的扩增反应和 $CD8^+$ T 细胞的消失[249]。对所有这些刺激物反应的一般模式可用图 20.7 来表示。

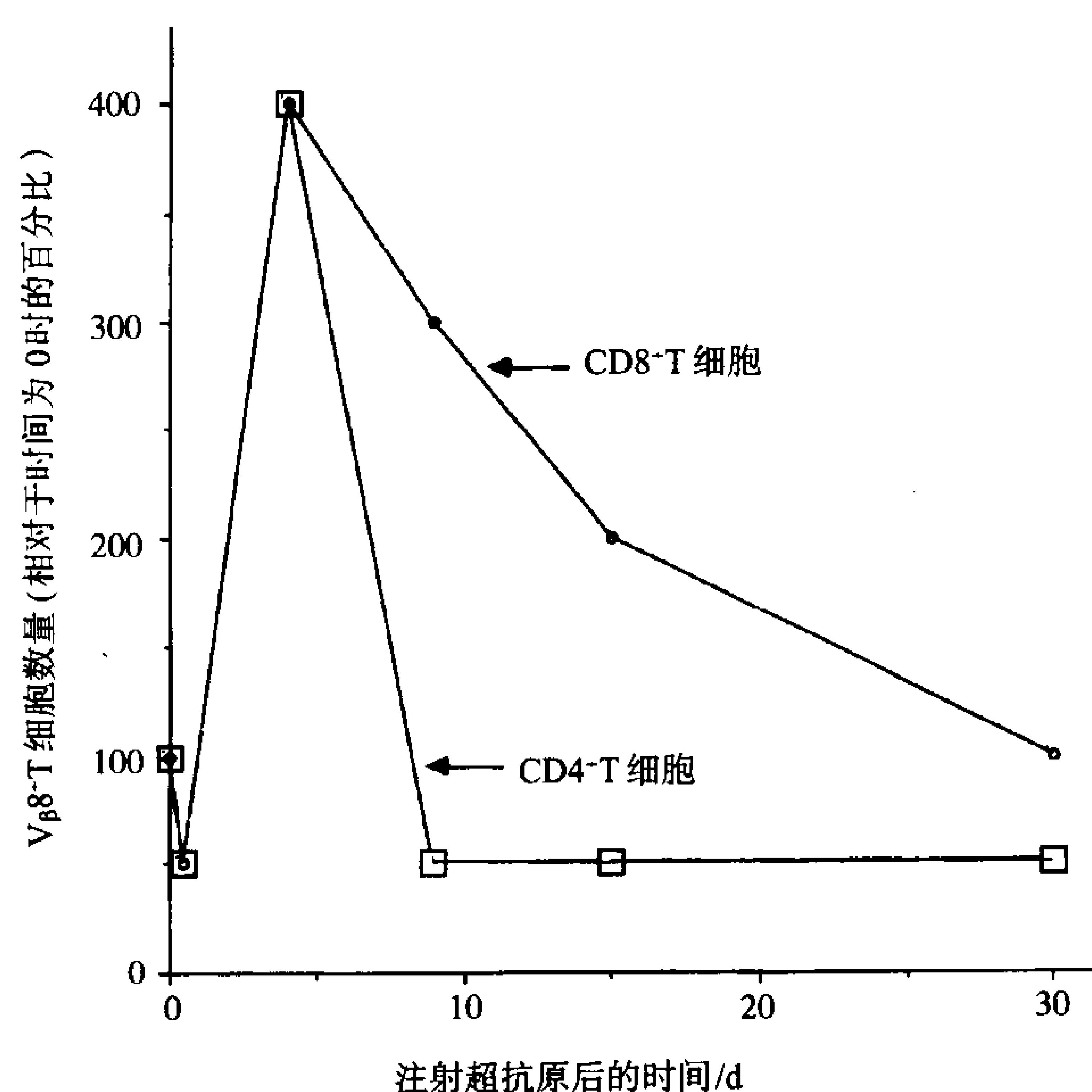


图 20.7 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞在体外对超抗原反应的一般模式。以 $V_\beta8^+$ T 细胞对 SEB 的反应为例,反应可分为 3 期,在最初的 12 小时内,细胞因子大量释放导致刺激细胞发生明显死亡。在反应的第 2 期,剩余的细胞开始分裂,在 4 天内细胞数量可增加 4 ~ 8 倍。在第 3 期,$CD4^+$ T 细胞迅速死亡,残余的细胞表现为无反应性;相反,$CD8^+$ T 细胞缓慢减少,30 天后恢复至正常水平。

主要是 Fas-Fas 配体的相互作用启动了细胞的死亡信号[250],尽管 TNF 及其受体也起一定作用[251]。最初的 TCR 刺激可诱导 Fas 配体表达,三聚体复合物(肽-MHC-TCR)脱离于细胞表面,与 Fas 相互作用,Fas 可在同一细胞或邻近细胞上组成型地表达[252]。在刺激后最初几天内,活化的 T 细胞可抵抗细胞死亡,可能因为 T 细胞刺激也可增加 bcl-2 家族成员(诸如 bcl-X_L)的合成[253]。在随后的衰退期,细胞对 Fas 介导的死亡变得敏感。如果环境中存在 T 细胞生长激素(如 IL-2 或 IL-4)[254,255],或者 Fas 配体的表达减弱,细胞可免于死亡。如果通过抗原受体再次刺激,细胞可被迅速重新表达的 Fas 配体杀死("固有"效应)[255]。其他的细胞只有在 IL-2 消退时才会死亡[254]。

细胞增殖和死亡之间存在着微妙的平衡，影响细胞命运的参数尚不完全清楚。重要的是，CD28/B7 相互作用介导的协同刺激信号起着关键作用。这一信号可增加 T 细胞内 bcl-X_L[252] 和其他可能的 bcl-2 家族成员的水平，而且也可显著增加 IL-2 的产生(通过稳定 mRNA 和增加基因转录)[256,257]。所有这些 CD28 的效应可阻止细胞死亡。可见双信号学说符合这些观察结果，这一学说认为抗原特异性第一信号导致 T 细胞死亡，而提供 CD28 第二信号可使其活化。但是关于第一信号的组成仍存在争议。用初始 T 细胞进行的一些实验提示只存在肽-MHC 复合物的受体占据尚不足以向细胞传递信号[258]。另外，在固有效应中，CD28 信号不能保护细胞免于由 TCR 再次刺激诱导的 Fas 配体介导的死亡[259]。在体内，只有 LPS 或前炎症细胞因子(如 IL-1 和 TNF-α)能保护细胞在注射超抗原后免于死亡[260,261]，而 CD28 和 B7 是无效的。最后，在许多体内试验中，只有 $CD4^+$ T 细胞在注射 SEB 后第 4 天迅速死亡，而 $CD8^+$ T 细胞不死亡[262]。Jiang 及其同事在注射 SEB 之前用抗 CD8 抗体处理小鼠去除其 $CD8^+$ T 细胞，这种处理阻止了 $CD4^+$ T 细胞在第 4 天快速消失。因此，他们对 $CD4^+$ T 细胞的清除作出了完全不同的解释[262]，认为正常情况下活化的 $CD8^+$ T 细胞可通过穿孔素或颗粒酶介导的细胞毒机制杀死活化的 $CD4^+$ T 细胞。

这些观察结果最令人感兴趣的一方面是对抗原或超抗原反应的 T 细胞中有 90%以上发生死亡，这一现象在免疫系统的自稳调节(而不是自身的抗原特异性耐受)中最容易理解。在机体内只有淋巴细胞才拥有如此大的活动空间，而且必须在较长时间内保持胸腺内新的初始细胞流入和保存记忆 T 细胞的空间。将脾脏 T 细胞输入裸鼠体内证明细胞(假定与环境中的抗原反应)只有达到一严格的数量(每只鼠大约 2×10^8)时才能扩增[263~265]。奇怪的是，记忆 T 细胞和初始 T 细胞是单独被调节的，即每一亚群不影响另一亚群的扩增[266]。它们的半寿期也以不同的方式被调控，由于初始 T 细胞的存活依赖于 TCR 识别自身 MHC 分子，而记忆 T 细胞则不然[267]。在对病毒的免疫应答中，反应的抗原特异性细胞数量在 8 天内急剧增加，在脾脏内达到总 $CD8^+$ T 细胞的 10%[268]。但是当这些细胞开始有效清除病毒时，其比例开始下降，在反应的记忆期，只占总 $CD8^+$ 细胞的 1/300 ~ 1/1000。在转基因模型中追踪细胞的结局，发现 $CD8^+$ T 细胞凋亡而死[269]。因此，一旦抗原被清除后，机体可使新产生的细胞死亡来保持自稳。

自稳本身并不是一种耐受机制，但当通过实验或严重感染将自稳状态推向极点时，最终可以诱导这种耐受状态。低剂量的 LCMV 颗粒感染可诱导清除病毒的 CTL 反应。但给予大量的病毒可导致不反应，随后出现耐受状态，病毒在体内持续存在[270]。这种现象曾被称为克隆耗竭，用 TCR 转基因小鼠证明是由抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞克隆清除所致[270]。

T 细胞克隆无反应性

给予小鼠 SEB 或 Mtv-7^+ 脾细胞，其 $CD4^+$ T 细胞死亡后，剩余的一群 $V_\beta8^+$ $CD4^+$ T 细胞对 SEB 的再次刺激不发生增殖[271,272](图 20.7)。这些细胞可在数周内保持这种功能性不反应状态，尤其是胸腺被切除的动物。在 H-Y 转基因模型中，残存的 $CD8^+$ T 细胞也不反应[249]。只有当细胞处于其识别的雄性抗原被高表达(例如被输入雄性裸鼠体内时)的环境中时才会发生上述现象[273]。如果从这一环境中将细胞移出，放入一雌性裸鼠体内，$CD8^+$ T 细胞可恢复其功能[274]。也有报道认为 $CD4^+$ T 细胞的不反应依赖于抗原的持续存在[275]。$CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的不反应状态均被称为无反应性，因为这种状态与组织培养中无反应性的 T 细胞克隆模型表现出一些相似性，培养中的 T 细胞对再刺激不产生 IL-2，而且这种不反应状态是可以逆转的[276]。

有几种模型在未转型的 $CD4^+$ T 细胞克隆中可诱导 T 细胞无反应性。较早的研究是在缺乏共刺激的情况下通过抗原特异性受体刺激(人或鼠的)细胞[230,276~278](图 20.8)，结果导致由 TCR 刺激后 Ras/MAP 激酶途径信号传导的阻断[279,280]，并通过增加 GTP 结合形式 Rap1 的数量[282]从而干扰转录因子 AP-1 的形成和活化[281]，反过来又阻止 IL-2 的生成，同时细胞产生 IL-3 和 TNF-β 的能力也受损，但 IFN-γ 的产生只受到轻微影响[283]。Th0 细胞的 IL-4 产生未受到抑制，但有趣的是 Th0 细胞对 IL-4 反应的能力受阻[284]。由此可见，这种状态代表淋巴细胞的一种生长停滞而不是所有反应被完全阻断。

奇怪的是,即使存在充分的协同刺激,用低亲和力的肽配体刺激T细胞克隆也能达到类似上述的状态[285](图20.8)。这似乎是由于不适当的TCR信号传导所致,这一信号足以诱导Ras途径的抑制物,但不足以诱导IL-2的产生[286~289]。而正是IL-2信号和随后的细胞分裂在正常情况下阻止了无反应性状态的诱导[289]。另一不同的无反应性模型是用高浓度的肽抗原在协同刺激存在时刺激人细胞克隆[290,291],与鼠类模型相反,这种无反应性状态表现为Ca-钙调磷酸酶介导的信号传导途径被阻断,从而阻止细胞产生所有的细胞因子(包括IL-4)[291~293]。在鼠细胞克隆也存在同样的阻断作用,但在这一模型中,阻断作用是在IL-2刺激后产生的,并且这一状态在细胞培养中可被快速自动地逆转[294]。为了区分无反应性的两种生化模式,有人提议将其中之一称为阻断ras的无反应性,另一种称为阻断Ca的无反应性[295]。

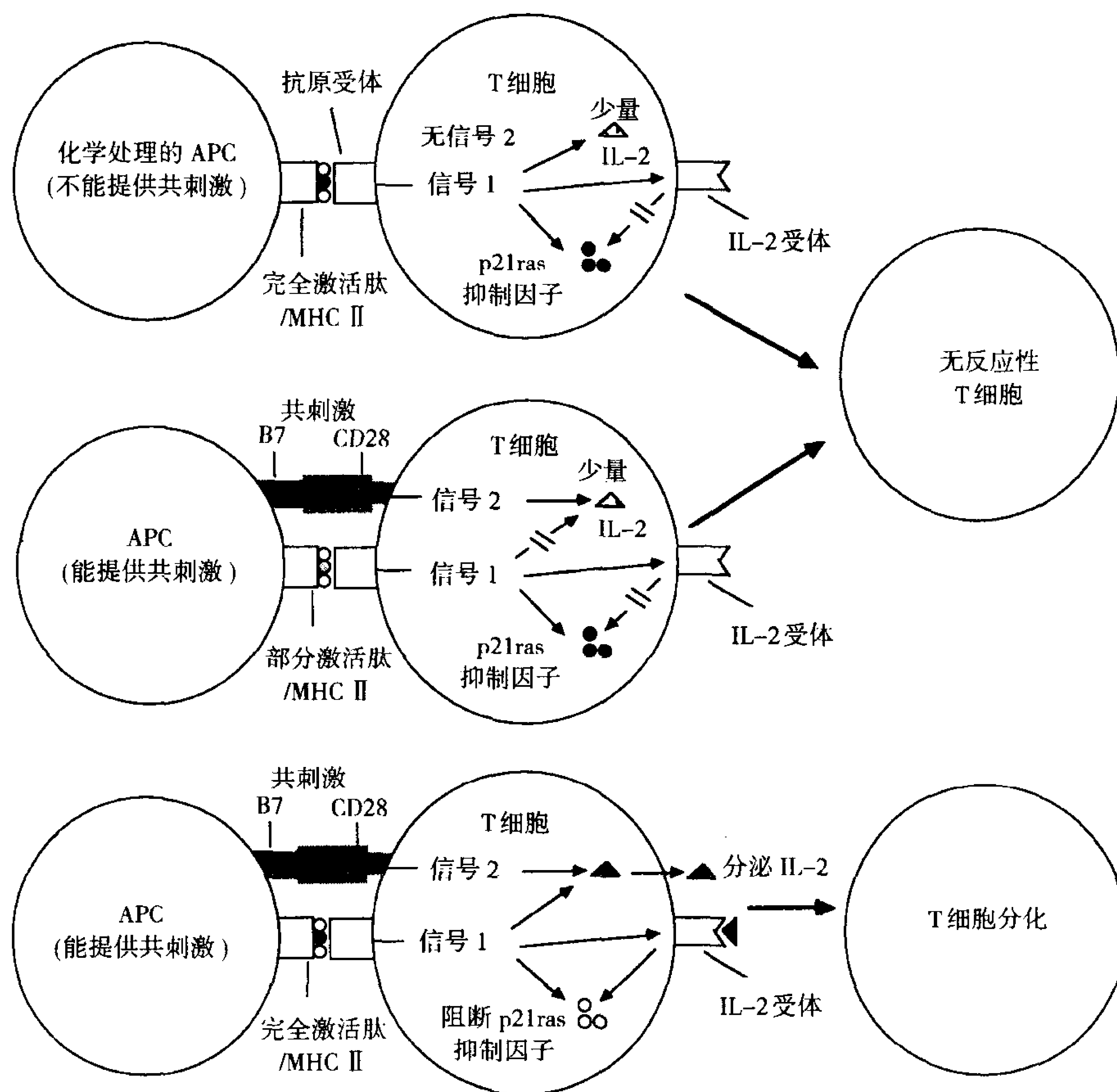


图20.8 由部分激活肽(存在共刺激)或完全激活肽(不存在共刺激)在CD4⁺ Th1克隆中诱导的T细胞无反应性。传统的无反应性可用完全激活肽和化学固定的APC来诱导,这种无反应性与Ras/MAP激酶信号途径的抑制有关。部分激活肽即使存在共刺激时也同样可诱导无反应性。关键因素是通过TCR占据诱导抑制因子的产生,同时并未阻断抑制因子形成和通过IL-2的产生(在正常活化情况下)诱导T细胞分化的功能。

对大多数无反应性的体内模型尚未从生化角度进行研究,因此尚不清楚其真正的内在机制。惟一例外的一种模型是将Mtv-7⁺脾细胞注射进Mtv-7⁻ TCR转基因小鼠体内(其90%的T细胞均表达$V_{\beta}8.1$)[296]。经过这种处理的小鼠在抗CD3和Mtv-7刺激的增殖实验中反应低下,加入IL-2时细胞也表现出反应程度的减弱,这表明除了IL-2产生受阻外,IL-2受体及其信号传导也存在部分阻断。对早期信号传导事件的生化分析表明酪氨酸磷酸化作用的受损与无反应性T细胞克隆中观察到的模式相似,提示这种状态在体内存在。但是并非所有的研究者都能证明对Mtv-7的反应中可诱导无反应性[297]。此外,分析其他的体内无反应性模型发现细胞因子如IL-10[298]或IFN-γ[299]可介导抑制机制。但是,无论何种机制,这些体内调控作用均可产生重

要的生物学影响,例如,针对病毒感染的有效免疫反应受到损害[300]。

问题是T细胞无反应性是否是细胞死亡的前奏(是否正如在"B细胞无反应性"一节所讨论的那样)。对T细胞克隆来说,用抗CD95阻断Fas信号的情况下体外诱导无反应性可使无反应性T细胞的数量增加[301];但是,至今仍无法在不降低凋亡的情况下来抑制无反应性的诱导。既然ras被阻断的无反应性表现出一种不伴随细胞分化的生长停滞状态,因此作者认为它代表了TCR占据的另一种结局,不同于增殖、分化或细胞死亡。

CD8⁺细胞毒性T细胞活化的双信号模式

初始CD8⁺T细胞可由抗原和呈递细胞直接活化增殖[302]。但在最适的刺激条件下CD8⁺T细胞产生的IL-2水平比CD4⁻T细胞大约低10倍[303],在一典型的免疫反应中,大多数抗原特异性细胞所占比例和TCR占据的程度均较低,因此由CD8⁺细胞产生的IL-2水平通常不足以维持免疫反应,所以,大多数的细胞毒性反应需要依赖于同时被激活的CD4⁺ T细胞才能有效。Keene和Forman研究的一种模型[304]证明了CD8⁺T细胞对Ⅰb类MHC分子Qa1的细胞毒反应依赖于同时发生的CD4⁻T细胞对雄性特异抗原H-Y的反应,这可能是由于Qa1特异性CD4⁺辅助细胞所占比例太低的缘故。在这一系统中如果H-Y抗原和Qa1分子在同一APC上被呈递则可以提供最有效的辅助作用。因此,这种细胞毒效应细胞的最佳活化需要3种细胞之间的相互作用。

即使通过注射脾细胞[305]或皮肤移植[306]引入Qa1抗原本身,也由于缺少辅助作用不能产生细胞毒反应(表20.5)。有趣的是,这种提前暴露于抗原可阻止随后存在H-Y特异性辅助的情况下对Qa1分子的免疫反应。动物对皮肤移植不发生排斥,其细胞在体外也不产生细胞毒反应。这些结果提示初始CD8⁺前细胞毒T细胞在缺乏辅助作用时对抗原的识别可能是一耐受事件。这一资料与Bretscher和Cohn提出的CD8⁺T细胞活化的双信号模式一致(图20.6)。单独给予抗原特异性信号1是耐受原性的,而这种信号1加上抗原特异性T细胞辅助作为第2信号是活化性的。有人推测CD4⁺T细胞辅助作用的分子特征是在CD8⁺前细胞毒性T细胞附近产生IL-2及其他细胞生长和分化因子。

表20.5 缺乏CD4辅助时CD8 T细胞的耐受

注射Qa1-b细胞	H-Y特异性CD4辅助细胞	Qa1-b特异性CD8细胞毒性细胞	第二次体内注射	杀死Qa1-b靶细胞
雄性细胞	有	有	无	有
雌性细胞	无	有	无	无
雌性细胞	无	无	雌性细胞	无

表中数据引自参考文献[305]。

然而,这些原则似乎适用于针对次要组织相容性抗原如Qa1产生的CTL,对病毒感染的研究得出了完全不同的结果。对仙台病毒和流感病毒来说,在完全缺乏CD4⁺辅助细胞的情况下即可产生CD8⁺ CTL[307,308]。尽管获得的细胞毒活性水平在数量上稍有差别,但仍证实了许多CD8⁺ T细胞并不需抗原特异性的第二信号。这的确有点出人意料,因为体外实验已清楚地表明TCR转基因小鼠初始CD8⁺T细胞的活化绝对需要由B7/CD28或I-CAM/LFA-1相互作用提供的非抗原特异性协同刺激信号,而且当这两种协同刺激都存在时可提供最佳的活化信号[258]。对这些相互矛盾的结果Guerder和matzinger提出了一种折中的解释[305]。他们推测病毒通过感染APC并直接诱导非抗原特异性协同刺激分子的表达,借此避开了对T细胞辅助的需要。Wu和Liu证实了这种潜在的旁路机制[309],他们的实验证明以流感病毒的CD4⁺辅助细胞非依赖形式感染小鼠可诱导B7-2在APC上表达,而大部分依赖于CD4⁺T细胞辅助产生CTL的病毒株则无此作用。B7-2的诱导可为CD8⁺前细胞毒性T细胞产生IL-2提供足够而直接的协同刺激作用,使这些细胞增殖成熟。因此,Dresser的双信号模式可能适用于这种情况(图20.6)。

受体下调

除了 CD8⁺ T 细胞的活化是否需要协同刺激外，有几项研究还对 CD8⁺ T 细胞是否总是由于单独给予信号 1 而不活化提出了质疑。在 Lafferty 及其同事所进行的经典实验中，被移植的甲状腺事先在体外经过培养去除过路的白细胞(可能为树突细胞)，结果接受这种移植很长一段时间后除了某些情况外受者并未产生耐受，在这一模型中，清除树突细胞即去除了能够传递协同刺激信号的专职 APC，但剩余的表达同种异体 MHC Ⅰ类分子的供体组织细胞并未由于只传递信号 1 而使宿主 T 细胞失活。在后来的实验中，Ohashi[311] 和 Oldstone 等[312] 构建了一种可在胰腺 β 细胞内表达 LCMV 包膜糖蛋白的转基因小鼠，并用基因工程技术使转基因受控于大鼠胰岛素启动子。尽管 β 细胞可表达 LCMV 包膜糖蛋白，但这些动物并未产生针对 β 细胞的反应。即使将这种小鼠与表达糖蛋白衍生肽-MHC 复合物特异性受体的 TCR 转基因小鼠交配也未启动自身免疫反应[311]。CD8⁺ T 细胞也未被清除，事实上小鼠并未产生耐受。病毒感染可活化 T 细胞，然后通过破坏胰腺的 β 细胞导致糖尿病的发生。因此，在静息状态下免疫系统中存在能够识别组织特异性抗原的 T 细胞，但这些细胞既不被激活也不被灭活。这种状态被称为"免疫忽视"(immunologic ignorance)。

Schonrich 等[313,314] 所进行的一系列实验与这些观察结果相反，他们的研究证明在三种不同的外周组织(肝、皮肤或中枢神经系统)表达 MHC Ⅰ类分子(K^b)的小鼠的 CD8⁺ T 细胞处于耐受状态，对表达 K^b 的皮肤移植不能产生排斥。将每种转基因小鼠与表达 K^b 特异性受体的另一种 TCR 转基因小鼠交配来检测 T 细胞的变化。受白蛋白启动子控制在肝细胞内表达 K^b 可使外周 T 细胞的 TCR 和 CD8 分子下调。在第二种模型中，由原纤维酸性蛋白启动子控制在神经胶质细胞中表达 K^b 也可导致受体下调；但在细胞培养中用同种抗原刺激可逆转这一现象。在第一种模型中，受体下调不能被同种抗原的刺激逆转，但可被抗 CD2 刺激逆转。受体下调和逆转的分子机制仍不清楚。第三种模型是在角蛋白Ⅳ启动子的控制下在上皮细胞内表达 K^b，这种模型的 T 细胞受体和 CD8 水平均正常，在这种情况下将脾细胞输入不表达抗原的裸鼠体内，2 周后可获得耐受状态的逆转[315]。

另外几项研究表明在胸腺以外的特定组织内表达某种抗原可导致 CD8⁺ T 细胞亚群的耐受，这与 Schonrich 等的观察结果一致，而其他研究则不然[316~318]。因此，对 CD8⁺ T 细胞来说，单独给予信号 1 对是否是阴性信号仍处于争议之中。导致不同实验结果的可能原因是 T 细胞与外周组织接触的机会不同[319]。像 β 细胞胰岛之类的小组织可能没有机会接触到许多初始 T 细胞，因此在 TCR 转基因动物中这些组织不能有效地使所有 T 细胞耐受。相反，肝的体积较大，而且从血液学角度来看是更加暴露的组织，因此，它更有可能为免疫系统提供较大范围的抗原暴露。然而，最使人惊讶的结果是在 TCR 转基因小鼠体内任何外周组织都能够使所有 T 细胞耐受。这提示与抗原的相遇(当它存在时)只向 T 细胞的一个亚群传递信号，而且这些细胞可由某些方式的免疫调节保持耐受(详见"免疫调节")。

反抑细胞

Miller 及其同事[320,321] 描述了向初始 CD8⁺ 前细胞毒性 T 细胞传递阴性信号的另一机制。最初的观察结果是如果裸鼠表达与刺激细胞相同的 MHC 分子，那么裸鼠的脾脏细胞能抑制对同种异体刺激的初次 CTL 反应，而胸腺机能正常的小鼠脾细胞则不然。而在 Miller 及其同事的模型中，这种不同寻常的细胞可被培养的反应 T 细胞所识别，而可使后者失活(图 20.9)，因此被命名为反抑细胞[320]。

后来的研究[322,333] 表明培养之前的 T 细胞能够获得反抑能力，而且，克隆的 CD8⁺ T 也具有这一特性[324~326]。在混合刺激培养中，只有对一种刺激物特异的 CTL 才受到抑制，这种 CTL 与反抑细胞具有同样的 MHC Ⅰ类分子。反抑细胞在培养后期才起作用(20 小时后)，通过细胞与细胞相互作用(不是通过分泌产物)发挥其功能，而且在 CTL 实验中不能对抗靶细胞的溶解(因为它们在用抗 MHC 抗体进行实验之前可能已被清除，同时并无逆转效应)。受抗原刺激的反应 T 细胞和 T 细胞克隆可抵抗反抑效应。在诱导期间提供含有 T 细胞生长因子(如 IL-2)的培养上清并不能阻止这一现象，而且被反抑制的细胞群与正常诱导的 CTL 细胞

723

群混合后，不能抑制后者死亡。对克隆的 CD8⁺ 反抑细胞来说，反抑细胞的 TCR 特异性显然并不重要，而且其反抑功能的发挥并不需要 TCR 的参与，反而由反应 T 细胞对反抑细胞表面 MHC Ⅰ 抗原的识别导致前者的不活化(图 20.9)。

有关反抑现象能在体内起作用的证据大部分来自 Rammensee、Fink 和 Bevan 的实验[323,327,328]。将脾脏 T 细胞注射进 MHC Ⅰ 不同的小鼠体内可导致随后体外针对这些Ⅰ类分子的 CTL 反应的抑制。同样地，将亲代 A 的脾细胞(只有次要组织相容性抗原存在差异)注射进(A × B)F_1 宿主体内可抑制随后在 A 系 MHC Ⅰ 类分子环境中(而非 B 系 MHC Ⅰ 类分子环境)对这些次要抗原的 CTL 反应。反抑作用最有效的细胞类型是 CD8⁺ T细胞。但是，裸鼠的 Thy-1 阴性脾细胞也可能诱导这一效应，这种细胞可能是 NK 细胞(已被证明具有反抑活性)[329]。受反抑现象影响的原始细胞是前细胞毒性 T 细胞。在含有 T 细胞生长因子的上清中(避免 T 细胞辅助的任何限制)进行有限稀释分析表明功能性 CTL 前体细胞减少了 200 倍。另外，反抑细胞的特异性并不重要，只是反抑细胞可表达被反抑的 CTL 识别的Ⅰ类分子和肽。事实上，注射了反抑细胞的宿主可能对这种细胞完全耐受。

有人认为反抑的分子机制与 CD8 相互作用后通过 MHC Ⅰ 类分子的信号传导有关(图 20.9)[330,331]。具有反抑能力的细胞克隆其 CD8 阴性突变体则失去了反抑能力。此外，用 CD8 基因转染表达正确的肽-MHC 复合物的细胞系(不是反抑细胞)可使其变为反抑细胞。最后用肽-MHC 阳性、CD8 阴性细胞加上针对 MHC Ⅰ α3 区(结合 CD8 的部位)的单抗可激活反抑效应。相反，针对 CD8 的单抗可阻止 CD8 与 MHC 相互作用，从而保护 CD8⁺ 反抑细胞免于死亡。这些结果提示通过反抑细胞上的 CD8 与靶细胞上的 MHC Ⅰ 类分子的 α3 区相互作用来传递反抑信号，但只有当后一种细胞通过其 TCR 识别反抑细胞上的肽-MHC 分子，并同时被激活时才会发生上述现象(图 20.9)。这事实上是一种双信号模型，需要两种信号(TCR 交联和 MHC Ⅰ 交联)才能使细胞耐受。由于 NK 细胞被激活时可表达低水平的 CD8，因此可由同样的机制产生反抑作用。反抑细胞这种双信号的效应是 T 细胞发生凋亡被清除[332]。这种机制在耐受中的作用尚不清楚，但它在清除自身反应性 CD8⁺ T 细胞中具有一定作用。

724

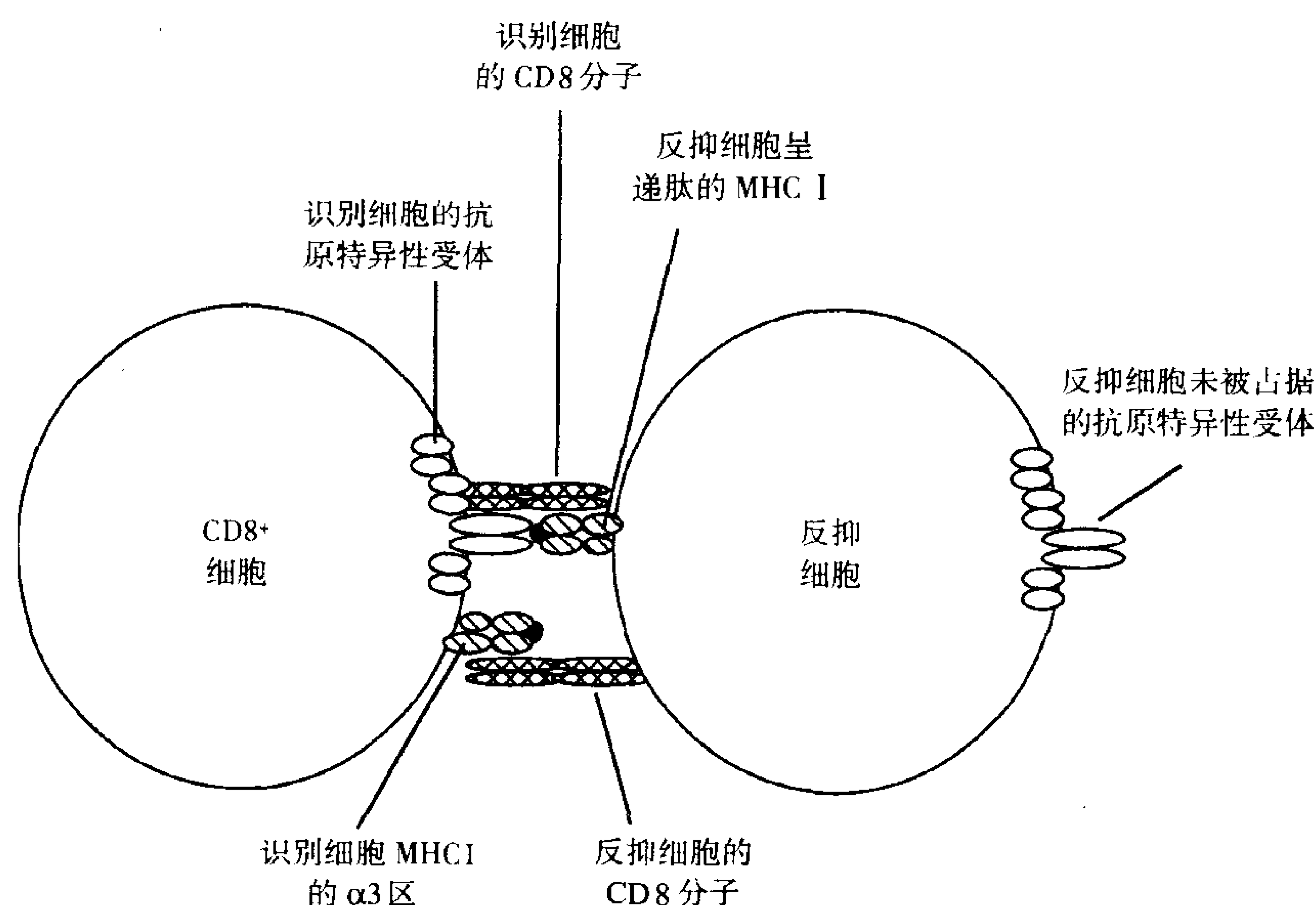


图 20.9 反抑的分子机制。CD8⁺ T 细胞通过其抗原特异性受体和 CD8 分子识别 CD8⁺ 反抑细胞表面的肽-MHC Ⅰ 复合物。同时反抑细胞的 CD8 分子与识别细胞上的 MHC Ⅰ 类分子的 α3 区相互作用，通过 MHC 和 TCR 介导的信号共同诱导细胞凋亡。

免疫调节

在过去几年中，已经清楚的是向成熟的免疫系统引入抗原后观察到的许多不反应状态实际上是一种类型的免疫应答受到另一种免疫应答阴性调节的结果。这种情况有时被称为“分离”(split)耐受。本节将对这些各种不同的机制进行总结，因为耐受从最广泛的意义上来讲包括免疫系统的所有无害状态。读者可在其他章节中读到关于免疫应答中的辅助和抑制作用更为详尽的介绍。

免疫偏离(Th1 与 Th2 $CD4^+$ 辅助细胞)

Asherson 和 Stone 首次描述了免疫偏离现象[33]。他们事先将可溶性或明矾沉淀的抗原注射给豚鼠，2 周后用同样的抗原加 CFA 再次刺激。这种预处理可阻止再次刺激时通常发生的 DTH 反应(24 小时皮肤反应)。相反，抗体的产生是正常的，尽管抗体类型由 IgG2 向 IgG1 偏移。Parish 和 Liew[334]后来发现抗体产生和 DTH 反应之间存在着普遍的固有联系，而这种联系与抗原剂量有关。当给予低剂量抗原时，免疫应答以 DTH 占优势，当抗原剂量增加时，可观察到抗体反应，而 DTH 反应消失。在抗原剂量非常高时，抗体反应也会衰退，而在一些情况下，DTH 反应会重现。Bretscher[335]认为这些现象是两种相互作用的 T 细胞群之间的固有调节的结果，这两种细胞群对同一种抗原特异，但具有不同的效应功能。随着 T 细胞克隆技术的引入，Mosmann 及其同事[366]发现有两种完全分化的小鼠 T 细胞克隆可产生两种不同的淋巴因子类型。Th1 细胞产生 IL-2、IFN-γ 和 TNF-β，而 Th2 细胞产生 IL-4、IL-5 和 IL-6[337]。由于这两种细胞类型之间可以交互调节，因此为免疫偏离提供了可能的解释。Th1 产生的淋巴因子是通过诱导 IFN-γ 和补体结合的 IgG2a 抗体从而刺激巨噬细胞活化的主要介质，而 Th2 细胞产生的淋巴因子是辅助 B 细胞产生 IgG1、IgA 和 IgE 的辅助 T 细胞的主要介质[338]。两种细胞间的相互调节也是由这些淋巴因子所介导的。因此，IFN-γ 通过阻断 IL-1 的共刺激作用[340]抑制 Th2 细胞的增殖[339]，而 IL-10 通过阻止 APC 的功能[341]和 IL-2 的产生[342]抑制 Th1 的激活。

在免疫反应中决定 Th1 和 Th2 哪一种起主导作用的因素尚不十分清楚。抗原的剂量是关键因素，但反应个体的基因组成决定特定剂量的高低。在利什曼原虫感染模型中，BALB/c 小鼠主要产生无保护作用的 Th2 反应，而 C3H 和 C57BL/6 小鼠则主要产生保护性的 Th1 反应[343]。但是，如果用小量的寄生虫(<30)接种 BALB/c 小鼠，由于向 IFN-γ 反应的偏移，小鼠对正常刺激剂量表现出保护性反应[344]。反应的抗原特异性也是一种关键因素。在 BALB/c 小鼠反应早期可识别利什曼原虫的单个免疫优势决定簇[345]。如果诱导针对含有这种决定簇的蛋白质的耐受，那么小鼠可产生保护性 Th1 反应。另一关键因素是细胞因子环境，高浓度的 IL-4 可使反应向 Th2 偏移，而高浓度的 IL-12 则使反应向 Th1 偏移[348]。最后，抗原的分子形式也是一种影响因素，有利于巨噬细胞吞噬和 IL-12 产生的特定抗原使反应向 Th1 表型倾斜[348,349]。

Th1 或 Th2 细胞系的分化开始于初始 $CD4^+$ T 细胞(只能产生 IL-2)。受抗原刺激后，细胞首先经历 Th0 期，在此期间细胞对再次刺激能产生许多不同的细胞因子[350]，然后，如果抗原持续存在而且细胞因子的环境合适，细胞可不同程度地分化成 Th1 或 Th2 细胞系。$CD4^+$ T 细胞向 Th2 细胞的分化常常与克隆无反应性的诱导相混淆，因为这两种情况均有 IL-4 的产生[284,351]。但是这两种情况是可以被区分的，因为无反应性可导致对 IL-4 的增殖反应受阻，相反 Th2 细胞仍保持对 IL-4 的反应性，因为 Th2 细胞的自分泌生长依赖于 IL-4。最后，有报道存在类似于 Th1 和 Th2 CD4 细胞的 CD8 亚群(Tc1 和 Tc2)[352,353]。产生 IL-4 的 $CD8^+$ T 细胞的作用仍不清楚，但它们可能具有免疫调节功能(见“抑制”)。但是对 $CD4^+$ T 细胞来说，已经明确某种“不反应”状态与产生 IL-4 的 Th2 细胞有关(见“新生期耐受”和“母胎关系”)。

口服耐受

抗原进入的途径是决定免疫反应结局的关键因素。经静脉给予通常有利于诱导耐受[354,355]，而皮下给予有利于诱导免疫[356]。静脉注射可能使脾内缺乏共刺激分子的初始 B 细胞来呈递抗原[357]，而皮下注射将有

利于朗格汉斯细胞吞噬和呈递抗原，这在激活后能够非常有效地启动免疫反应[358]。有趣的是，暴露于紫外光下暂时去除表皮的朗格汉斯细胞，并在同一部位的皮肤中引入抗原时对耐受诱导变得敏感[358,359]。

有报道经口给予抗原也有利于耐受诱导[360]。从 Wells 在 1911 年进行的最早研究中可清楚知道这种途径可诱导免疫调节的某些形式。经口免疫动物通常首先产生系统性抗体反应，随后即消失[362]。耐受状态常常与肠内 IgA 的大量产生有关[363]。在另一种情况下，抗原(如髓磷脂碱性蛋白)以一种有利于 T 细胞而非 B 细胞识别的形式给予[364]，此时，要么由抗原刺激后分泌 TGF-β 的 T 细胞[365]，要么由克隆无反应性和清除[366,367]来介导免疫调节。这种机制依赖于抗原的剂量，高剂量可直接诱导抗原特异性 T 细胞失活，低剂量诱导 TGF-β 介导的免疫调节[368]。

725

肠内的 T 细胞不同寻常，因为它们受抗原刺激后可产生大量的 TGF-β[369]。这种细胞因子是 B 细胞转型的关键因子，有利于 IgA 的产生[370]。TGF-β 也是一种抗炎症因子，主要在 T 细胞从 G_1 到 S 期转变时阻止其增殖[371]。因此，当这些活化的肠内 T 细胞迁移到机体的其他部位(如实验型过敏性脑脊髓炎的 CNS)，如果在此部位识别其肽-MHC 配体并释放 TGF-β，它们可作为抑制细胞[372]。临床实验已提供了用口服组织特异性抗原治疗自身免疫性疾病的一些成功的例子。

抑制

对免疫调节和耐受中抑制 T 细胞的研究是 20 世纪 70 年代细胞免疫的主要课题。已建立了许多模型，但在分子水平具有特征的为数不多。现在重新回顾这些系统，有可能将其中的一些归类为免疫偏离。例如，在 Okumura 和 Tada 的经典抑制实验中[373]，注射用 DNP-蛔虫(而非 DNP-BSA)超免疫的大鼠的胸腺细胞可使 DNP-蛔虫的 IgE 反应受到抑制。现在我们知道 IgE 反应高度依赖于 IL-4 的产生[374]。因此，对这一早期实验一种可能的解释为超免疫反应的胸腺细胞群包含有再循环的成熟 Th1 细胞，可使受者体内初始 T 细胞偏离 IgE 产生所需的 Th2 反应。在一典型的免疫偏离模型中，$CD4^+$ Th1 细胞分泌的 IFN-γ 可抑制 Th2 细胞增殖[339]。另一种可能的解释是存在一种新的 $CD4^+$ 细胞类型，这种细胞可产大量的 IL-5、IL-10 和 TGF-β，并抑制初始 T 细胞增殖[375]。曾有报道发现了 $CD4^+$ 抑制诱导细胞的存在[376]，而更加典型抑制 T 细胞是 $CD8^+$[337]。既然 $CD8^+$ T 细胞也可分泌 IFN-γ[378]，它们应该能够在免疫偏离模型中起有效的抑制作用。实验证明在某种条件下也能产生 Th2 样的 $CD8^+$ T 细胞[352,353]。这些细胞可能在一些抑制模型中发挥作用，在这些模型中 $CD4^+$ Th1 DHT 反应受到抑制[379]。

Qin 等报道的一种新的抑制模型由于与器管移植有关而受到普遍关注[380]。他们通过注射不被清除的抗 CD4 和抗 CD8 单抗(加上供者的骨髓)，成功地诱导了针对 MHC Ⅰ 和多种次要移植抗原的耐受。用这种方法处理的小鼠可不受限制地接受供者皮肤移植。将正常 T 细胞注入这种动物体内可导致对随后(第二天)皮肤移植的排斥，但只发生在转入 T 细胞后的短时间内[381]，2 周后，小鼠又能接受皮肤移植。将正常细胞注射进淋巴细胞上表达人 CD2 的耐受转基因小鼠体内，2 周后用抗人 CD2 清除宿主 T 细胞，表明被注射的正常细胞自身变的耐受[381]。此外，用抗 CD2 清除宿主细胞后，新注射的 T 细胞反应也受到抑制。因此，这一现象真正代表了"感染性的"耐受，正如起初由 Gershon 和 Kondo 所定义的那样[382]。部分耐受过程与 IL-4 的抑制效应有关，因为在过继转移实验中应用抗 IL-4 抗体可导致移植物排斥[383]，而且排斥发生的时间与不具有抑制细胞的对照组相比明显延迟。

总之，现在看来调节性细胞因子大体上可为以前的许多抑制模型提供充分的解释，而且，将以稳定的方式分泌这些细胞因子的细胞称为抑制性 T 细胞似乎仍然合乎情理。

新生期耐受

在受到 Owen[2] 和 Burnet[8] 影响的学术环境下，Medawar 及其同事开展了新生期耐受的实验(在本章的开头曾论述过)。事后看来，这些实验的成功取决于实验条件的选择。*Billingham 等所用的鼠种组合是 A 和* CBA，这种配对只在 MHC 复合物 D 末端和多个次要组织相容性位点存在基因上的差异，试图将这些观察结

果扩展至存在 MHC 差异的鼠种组合的努力总是失败,因为供者的淋巴组织发生了移植物抗宿主反应[136]。为避免这一问题,后来的所有实验都是将(AB)F_1 成年鼠的脾或淋巴细胞注射进 A 系新生儿体内。在这一模型中,供者和受者都具有免疫活性,一个来自自身耐受,另一个来自免疫系统中的少量成熟淋巴细胞。

早期实验的成功也非常依赖于抗原的选择。Burnet 等[384]和后来的 Nossal[385]试图用病毒或 RBC 作为新生儿的耐受原,但未获得成功。Medawar 使用的脾细胞接种物的关键成分包含有造血干细胞,输入这种干细胞可建立一种永久的嵌合状态。现在我们能够对持续存在于耐受宿主体内的供体细胞进行常规检测[386]。因此,正如 Billingham 等[6]提出的那样,这一模型与异卵双胞胎牛的自然耐受状态具有相似性。

建立一种嵌合状态的关键因素是允许抗原持续存在。Lubaroff 和 Silvers[386](图 20.10)首次证明了这一

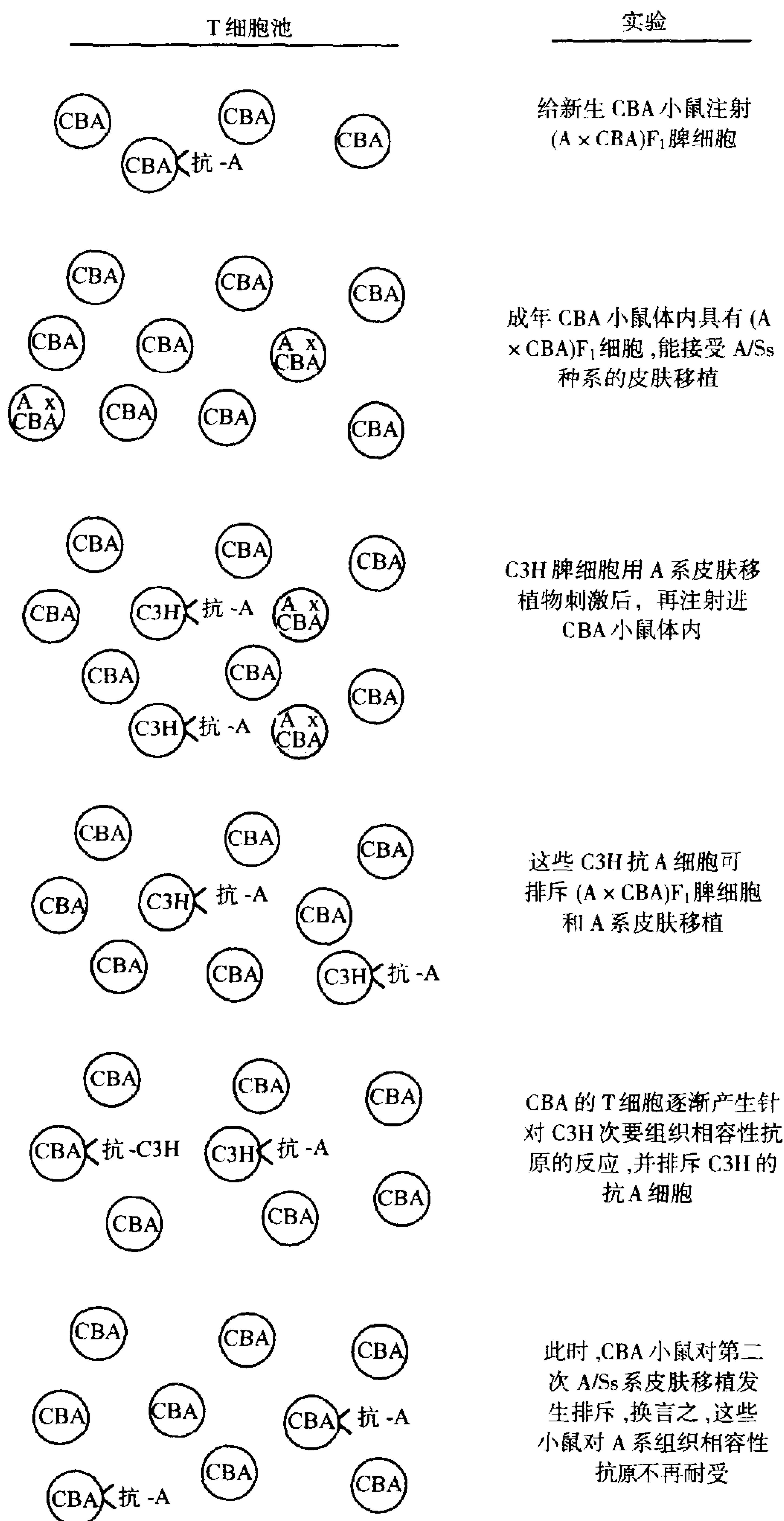


图 20.10　新生期耐受需要抗原的持续存在。新生小鼠只有极少的外周成熟 T 细胞,注射表达外源组织相容性抗原的 F_1 脾细胞很容易诱导其耐受。耐受的小鼠成年时可接受来自外源供体亲代的皮肤移植。但是注射用外源亲代组织相容性抗原活化的同种 T 细胞可逆转这种耐受状态,这些细胞对皮肤移植和 F_1 脾细胞(保持耐受状态所必需的)均产生排斥(见参考文献[386])。

因素在维持耐受中的重要性。用(A × CBA)F_1 的脾细胞诱导 CBA 小鼠的新生期耐受，这种耐受小鼠在成年时可接受 A 系的皮肤移植。事先用 A 系 MHC Ⅰ 和次要抗原激活的 C3H 淋巴细胞可导致对嵌合体 F_1 细胞和皮肤移植的排斥，因为 CBA 对 C3H 次要组织相容性抗原不耐受，随后出现 CBA 宿主对 CH3 淋巴细胞的排斥。如果进行第 2 次 A 系的皮肤移植，可发生排斥。他们由此得出结论：一旦(A × CBA)F_1 细胞被清除，CBA 宿主即失去对 A 抗原的耐受。

727

为决定破坏嵌合状态导致耐受消失的机制，Silvers[387] 在注射接触过抗原的 C3H 淋巴细胞之前将小鼠的胸腺切除，60%的小鼠对第 2 次的 A 皮肤移植不发生排斥。这提示在这些动物体内诱导的耐受是一种不可逆转的过程(如克隆清除)，逆转未切除胸腺小鼠的体内耐受与胸腺内新的 T 细胞产生有关。另外 40%的小鼠对第 2 次皮肤移植发生了排斥，提示在这些情况下外周调节机制与耐受的形成有关，维持这种耐受状态需要抗原的持续存在。

诱导新生期耐受只是克服了 MHC Ⅱ 类分子的障碍，结果可接受皮肤移植，并在成年时不能产生同种异体 CTL 反应，但这些小鼠的淋巴细胞仍能产生混合白细胞增殖反应[388]。但是与正常的 MLR 相反，耐受小鼠的细胞反应大部分由产生 IL-4 的细胞所介导[389]。此外，在涉及 MHC 完全不同的更为传统的模型中，将(B6 × BALB/c)F_1 的淋巴细胞输入 BALB/c 小鼠体内，耐受动物表现出一种狼疮样自身免疫病，包括高丙种球蛋白血症、免疫复合物介导的肾小球性肾炎以及产生 IgG1 独特型抗单链 DNA 抗体[390]，这种抗体是由嵌合性的 F_1 B 细细与宿主 CD4$^+$ T 细胞相互作用后产生[391]。IL-4 在这一过程中起关键性作用，由于在注射耐受 F_1 的脾细胞 24 ~ 48 小时后，给予低剂量的抗 IL-4 抗体可阻止自身免疫症状的发生[392]。有趣的是，高剂量的抗体也可阻止耐受的诱导。这些结果提示产生 IL-4 的 Th2 细胞与耐受过程的启动有关。与这一观点一致的是在新生期接触抗原时给予 IFN-γ 可阻止耐受诱导[393]。此外，用可溶性抗原加弗氏不完全佐剂免疫新生儿时其体内可产生 Th2 细胞[394]。因此，新生期移植耐受似乎是供体细胞嵌合体建立后免疫偏离和克隆清除联合作用的结果，但并不排除其他免疫机制的参与[395]。

抗体介导的耐受(原始的抗原过失)

给初始动物被动输入抗体常常可阻止随后注射抗原引起的激活状态[396]。高亲和力抗体比低亲和力抗体更有效[397]。这种效应中有一部分是由于抗原-抗体复合物的形成和清除所引起的。抗体也能阻止 T 细胞识别所需的特定肽的形成[398,399]。抗原-抗体复合物也可能与这种被称为原始的抗原过失(original antigenic sin)现象有关[400]，其中在事先暴露于交叉反应性抗原期间产生的记忆 B 细胞可阻止或下调对抗原上独特的新决定簇的反应。最初在对流感病毒的免疫反应中发现了这种现象，感染了第一株病毒的人当随后受到第二株病毒感染时可优先产生针对第一株病毒的抗体反应[401]。记忆 B 细胞反应中的交叉反应在对 TNP 和 DNP 的脾聚集试验中得到证实[402]。原代 B 细胞可选择性地对 DNP 或 TNP 产生反应，但次级 B 细胞可由任一种半抗原刺激分泌抗体。有人认为由于体细胞高突变增加了亲和力或者由于类型转换，原始 B 细胞比记忆 B 细胞对活化更具有交叉反应性[402]。相反，Linton 等的实验证明了次级 B 细胞来源于独立的原始细胞群[201]，不论其机制如何，记忆 B 细胞似乎有利于快速活化，这种早期活化产生的抗体可反馈抑制新生 B 细胞(具有第二种免疫原特异性的受体)被抗原激活，这种反馈机制最有可能通过抗原-抗体复合物来介导，抗原-抗体复合物可与初始 B 细胞上的 FcγRⅡb1 相互作用，而且可能通过将磷酸酯合成酶带进受体复合物[404]抑制 IgM 受体介导的信号传导[403]。

抗独特型 B 细胞调节

1974 年，Jerne 提出抗体的产生可能受另一种识别第一种抗体 V 区独特型决定簇的另一种抗体的调节[405]。他推测第一种抗体产生的增加可能对抗独特型抗体产生阴性调节，反之亦然。由于这个网络中相互联系的途径，一个片段的失常可被另一片段所补偿，使原始的稳定状态得以维持。

最近几年的研究集中在分析未经免疫的新生小鼠[406]的 IgM 杂交瘤或 EB 病毒转化的人脐带血 B 细

胞[77,102,103,407]，有趣的是，抗体表现出与几种不同的自身配体反应的能力，这种自身配体许多是细胞内蛋白，如细胞骨架蛋白[74~76,103,408,409]。在两种动物中，它们的主要来源似乎是 B1($CD5^+$)B 细胞[104,105]。关于免疫网络有趣的一面是这些抗体也与其他成员相互作用[406,408]。将这种抗体给予新生小鼠可扰乱 B 细胞池，从而影响成年时对特定抗原的反应[410]。这种效应要么是阳性要么是阴性，取决于给予的时间和抗体类型。表达特定独特型 B 细胞的自然优势是否与这种网络相互作用有关[411]，或者与最早暴露于相应的细菌有关[412]，对此仍存在在争议。将骨髓转入经射线处理的同系宿主体内的试验支持前一种观点，在这一试验中独特型优势消失了，除非在转入骨髓的同时注射少量的抗独特型抗体[413]。此外，优势独特型克隆出现在感染细菌的动物体内[414,415]，而且用热致死的细菌抗原刺激可使抗体出现时即被扰乱。有趣的是已证明早期受抗原刺激产生的非独特型抗体对随后的细菌感染不能产生保护作用，这提示网络在宿主防御中起至关重要的作用[416,417]。

抗独特型 T 细胞调节

标准的 T 细胞活化涉及对 MHC 分子结合的抗原肽的识别。调节性 T 细胞的产生需要识别由 TCR 衍生的独特肽，这种调节性 T 细胞可通过识别反应 T 细胞上的受体从而抑制免疫反应。对实验型过敏性脑脊髓炎的研究[418,419]证明了上述现象。$CD4^+$ T 细胞反应以表达 $V_\beta8$ 与 $V_\alpha2$、4 的细胞为主。用 TCR $V_\beta8$ 链 CDR2 区的合成肽免疫可保护动物免于患脱髓鞘疾病。可能因为不能与动物的 MHC 分子结合，因此不是所有的 TCR 肽都有效。调节机制仍不清楚，一种可能是与 $CD8^+$ 细胞毒性 T 细胞有关[420]。致病性 $CD4^+$ T 细胞的活化可导致其 TCR 的清除和循环，新受体的合成被启动，能够与 MHC Ⅰ 分子结合的内源性肽的水平升高。如果 $CD4^+$ T 细胞产生的 IL-2 作为第二信号，那么这种复合物(内源性肽- MHC Ⅰ)能够激活 $CD8^+$ T 细胞，CD8 细胞一旦被激活即能特异性溶解 $CD4^+$ 细胞。Sun 等[421]建立了 Lewis 大鼠的 $CD8^+$ T 细胞系，这些细胞具有上述的一些特性，而且在体内能介导对疾病诱导的抵性。

728

免疫特赦部位

移植外科医生很久以前就知道体内的特定区域比其他区域更利于移植。尤其是大脑、眼房前部和睾丸在易于接受移植物能力方面似乎被授予特权[422]。有人认为这些组织内的抗原不能被免疫系统所发现，因为它们以某种方式被隔绝，例如血-脑屏障。但是后来的研究表明淋巴细胞的确可进入这些组织，被激活的 T 细胞可表达黏附分子(如 α4、β1 整合素)使细胞能通过血管内皮进入大脑[423]。T 细胞的抗原特异性并不重要，但是，如果细胞识别大脑内由小神经胶质细胞（骨髓来源的 APC)呈递的肽抗原，它们能够释放淋巴因子，导致组织损伤[242]。另一方面，神经系统的确有多种机制来阻止免疫反应的产生。这种组织内几乎没有树突细胞(表达大量的 MHC Ⅱ)，而树突细胞被认为是大多数 T 细胞反应的主要启动细胞[425,426]。这种组织内也没有淋巴管引流(正常情况下将抗原带到淋巴结刺激 T 细胞)[422]。最后，神经元不表达任何 MHC 分子，甚至在炎症淋巴因子存在时，它们也只表达低水平的 MHC Ⅰ 分子[426,427]。许多其他组织(如肌肉)也不表达 MHC Ⅱ 分子，而且只有极低水平的 MHC Ⅰ，因此可阻止 T 细胞反应的发生，但在涉及淋巴细胞因子(如 IFN-γ)的炎症反应存在时，它们可增加 MHC Ⅰ 的表达而变成内源性肽更有效的呈递者[428,429]。

有研究提示一种组织(即使暴露于活化的 T 细胞)获得特赦身份的有趣机制：即在其细胞上表达 Fas 配体。尽管这不会防碍新活化的 T 细胞进入组织或移植物内并在最初时产生效应，但这种机制可通过 Fas-Fas 配体相互作用杀死 T 细胞，阻止炎症反应的持续，并有助于降低免疫病理。睾丸的 Sertoli 细胞是第一个被证明表达 Fas 配体的非淋巴部位[430]。在移植模型中，正常小鼠的睾丸移植物可在同种受者的肾囊下不受限制地存活，而携带 Fas 配体突变基因(*gld*)的同样移植物可被排斥。在组织破坏模型中，*gld* 小鼠眼房前部的病毒感染可导致大量的组织损伤，而在正常小鼠中的同样感染可通过 Fas/FasL 依赖途径杀死炎症性淋巴细胞[431]。在角膜的上皮和内皮细胞上可检测到 Fas 配体的表达[432]。有趣的是，甚至在一些肿瘤细胞上也发

现 Fas 配体的表达,从而有助于其逃避免疫监视[433]。

另一种参与眼部特赦的机制被称为前房相关的免疫偏离(anterior chamber-associated immune deviation, ACAID)[434]。向前房内注射外源抗原可导致抗体的产生和 DTH 受到系统性损害,即 Th1 反应被阻断[435]。这种机制似乎是眼部虹膜和睫状体细胞分泌的 TGF-β 在起作用,改变了 APC 的呈递,以至于在脾内诱导MHC Ⅰ限制性 $CD8^+$ 调节 T 细胞的产生[436]。这些细胞如何抑制 DTH 反应尚有待阐明,但是,有趣的是胸腺切除和脾切除实验提示这两种器官中的 B 细胞在这一过程中起关键作用[437,438]。

母胎关系

在脊椎动物的生殖过程中存在着许多这样的例子:一种机体可成功地将其自身移植进一另机体中作为联体者共存,可完全防止被宿主免疫系统的排斥[439]。在这种天然耐受的诱导中最令人感兴趣的或许是胎生的哺乳动物,其中胚胎可成功地种植在子宫内[440]。当任何近交的哺乳动物雌性 A 系与雄性 B 系交配时,其 $(A \times B)F_1$ 胎儿表达父亲的组织相容性抗原,母亲对这种抗原并不耐受,但胎儿不被排斥。通过胚胎转移实验建立的完全同种异体胎儿也可发生上述现象[441,442]。

Witebski 和 Reich[443] 首先提出免疫特赦现象的存在,因为胎盘并不表达组织相容性抗原。灵长类动物为支持这一观点提供了很好的证据。人胚胎的合胞滋养层并不表达多态性 MHC Ⅰ类或Ⅱ类分子[444,445],这些细胞与胎盘绒毛内的母体血管的距离最接近,既使用 IFN-γ 刺激,它们也不表达Ⅰ类[445]。剩余的细胞滋养层细胞只表达非多态性 Ib MHC 分子 HLA-G[446],实验证明这一分子的主要功能是为母亲 NK 细胞上的抑制性受体提供配体,从而阻止其杀死胚胎细胞[447]。HLA-G 也表达在胸腺髓质上皮,在此可能确保 T 细胞对这一分子产生耐受[448]。最后,在胎盘中未发现任何表达大量 MHC Ⅱ分子的细胞(树突细胞)。这种限制性 MHC 分子表达的结果可能是同种胚胎不激活移植免疫,正如后来用皮肤移植检测到的那样[449]。但是一个令人迷惑不解的事实是啮齿类动物的胎盘细胞的确表达典型的多态性 MHC Ⅰ类分子[450],但是这些动物通常能生产活胎。因此一定还有其他的机制在胎儿存活也起作用。

已用雌性 TCR 转基因小鼠证明了胎儿对母亲免疫系统的影响,这种小鼠的 T 细胞特异性针对亲代的

729

MHC Ⅰ类分子分子(K^b)[451]。在妊娠期间,这些细胞数量降低并表现出受体水平下调,其功能也受到损害,因为母亲在此期间不能对表达 K^b 的肿瘤移植物产生排斥。出生后,免疫系统变为正常。此外,这些效应是抗原特异性的,由于在同系或非 K^b 同种妊娠中未观察到这些效应。可见,妊娠导致机体暂时处于对亲代抗原的特异性耐受。

有人提出有两种机制导致这种暂时的耐受状态,一种机制是在胎盘表达 Fas 配体(与在其他免疫特权区的作用相似),Fas 配体将杀死进入组织的活化 T 细胞[452]。在人胎盘 Fas 配体早期表达在细胞滋养层,末期表达在合胞体滋养层[452,453]。在缺乏功能性 Fas 配体的 *gld* 小鼠体内,胚胎吸收部位相同,幼仔的体积较小[453]。第二种机制是由胎盘产生细胞因子和激素,使 T 细胞失活或使这些细胞向 Th2 反应偏移[454]。在多次妊娠后,母亲经常产生针对父亲组织相容性抗原的抗体反应[455]。在偶尔情况下,形成的抗体对胎儿有害,例如在 Rh 不相容的个体可导致红细胞破坏[456],但在大多数情况下抗体不具有破坏性。有几家实验室[457,458]已证明许多这些抗体不与补体结合。此外,在对经产的啮齿类动物的实验中,同种亲代皮肤移植在与同种的雄性交配过几次的母亲身上比在与同系的雄性交配过的母亲身上被排斥的较为缓慢[459,460]。因此,胎胚能诱导非细胞毒性的抗亲代 MHC 抗体,但并不激活或偶尔抑制对亲代皮肤移排斥。这表明在胎盘中发挥作用的机制使免疫反应偏离,从而使母亲产生趋向 Th2 样的反应。

支持这一观点是在胎盘中已检测到通常与 Th2 有关的细胞因子,如 IL-4、IL-5、IL-10[454,461,462] 以及与 TGF-β2 相关的免疫抑制细胞因子[463]。此外,以高浓度存在于胎盘中的黄体酮已被证明可延长同种皮肤移植的存活[464],而且还有利于抗原特异性 T 细胞系或克隆的 Th2 反应的发展[465]。在 B6 小鼠(通常可产生强烈的 Th1 反应来对抗寄生虫)体内研究妊娠对利什曼原虫易感性的影响,证明由于 IFN-γ 反应的减弱导致机体清

除病原体功能受损[466]。相互地，利什曼原虫感染增加了自然流产和植入失败的概率，并且使胎盘内 IL-4 和 IL-10 产生减少[467]。在人类中，自然流产也与产生 IL-2 和 IFN-γ 的能力提高和 IL-10 产生降低有关[468]。最后，在 CBA 和 DBA/2 小鼠交配联合体中观察到的过量胎儿死亡与 IL-4 和 IL-10 产生下降有关，加入 IL-10 和抗-IFN-γ 抗体可逆转这种状况[469]。因此胎盘内的细胞因子环境似乎在母亲对胚胎的接受中起重要作用，也可能为免疫偏离导致耐受提供了另一佐证。

耐受中断

Ehrilch 信奉的“自身中毒禁忌”在将近 40 年内未受到挑战，直到几个研究小组开始用含有外周组织蛋白匀浆的 CFA 来免疫动物[470,471]，表明免疫系统并非对所有自身抗原都完全耐受，而且当系统以某种方式发生紊乱时可能会产生免疫病理(自身免疫)。在第 33、34 章中将详细讨论诱导和自发的自身免疫性疾病。在此只讨论耐受中断的一般概念。

正如较早时发现的那样，不是所有能证明的自身反应性 B 细胞克隆都能在发育中被清除。因此，如果含有自身决定簇或者模拟自身决定簇的外来抗原被引入成年个体时，B 细胞水平的耐受将被中断。B 细胞可结合并内在化蛋白，而且如果产生的任何外源肽能与机体的 MHC 分子结合，抗原将激活产生自身抗体所需的 T 细胞辅助，以这种方式避开 T 细胞水平的耐受[78~81,113~115]。正常情况下，这种使耐受中断的急性反应并不是什么严重的问题，因为抗体反应有助于清除感染性病原体，当外来抗原被清除后抗体可消失，因为此时不存在 T 细胞辅助了。但在一些情况下可发生自身免疫性疾病，例如，当针对 A 组链球菌 M 蛋白上决定簇的抗体与心脏肌浆球蛋白发生交叉反应时即可发生风湿性心肌炎，导致急性损伤和炎症，也可能导致心脏瓣膜功能受损[472,473]。

在 T 细胞水平，免疫系统似乎格外慬慎以确保自身反应性 T 细胞克隆在胸腺内被清除，机体通过建立比外周 T 细胞活化所需的阈值较低的阳性选择亲和力阈值来达到目的[63~66]。尽管如此，低亲和力的抗自身 T 细胞仍可从胸腺内逃逸。此外，也存在能识别组织特异性外周抗原的 T 细胞，这些外周抗原不能大量到达胸腺。Cibotti 等[474]研究了一系列表达不同水平鸡蛋清溶菌酶的转基因小鼠，证明了优势决定簇特异性的 T 细胞总是能被克隆清除，但是那些亚优势决定簇特异性的 T 细胞只有当循环溶菌酶浓度较高时才能被清除。最后，甚至对像髓鞘质碱性蛋白这样的外周抗原[已证明其在胸腺内低水平表达[476,476]]，低亲和力的 T 细胞也被确证可逃逸胸腺的阴性选择[477]，可能是因为由胸腺树突细胞呈递抗原的量不足。正是这种 T 细胞在给予抗原加 CFA 时被激活，并启动许多自身免疫性疾病。

那么弗氏佐剂的功能是什么？在“正常”环境条件如何导致自身免疫？就此问题已提出了三种基本模型，第一种认为包括细胞坏死、细胞因子产生以及共刺激分子的炎症过程在外周组织中可诱导低亲和力的自身反应性 T 细胞活化[478]。第二种认为这种 T 细胞首先由感染性病原体的决定簇(与 T 细胞的亲和力较高)活化，T 细胞一旦活化后，对自身肽的低亲和力交叉反应足以维持慢性免疫反应而存在。Fujinami 和 Oldstone 在最初提出的模型中将第二种模式称为分子模拟[479]。第三种模型也与感染性病原体有关，但可能是由病原体产生的超抗原激活了低亲和力的自身反应 T 细胞[480~482]。

为检验关于炎症的假设并搞清楚弗氏完全佐剂的可能作用，已建立了许多在组织特异性启动子控制下表达细胞因子和共刺激分子的转基因动物(表 20.6)。在此集中讨论自身免疫性糖尿病，其中免疫系统通过 Fas 介导的机制[484]破坏胰腺 β 细胞[483]。尽管在转基因小鼠体内这种破坏作用是通过 $CD4^+$ T 细所介导的，但在 NOD 小鼠体内是由 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞共同介导的。 *730*

在较早报道的 Ohashi 等的模型中，LCMV 糖蛋白表达在 β 细胞内，免疫系统中存在大量对此蛋白质衍生的肽特异性的 $CD8^+$ T 细胞，但并不识别此蛋白质，除非 T 细胞被病毒激活。有趣的是，如果这种双重转基因小鼠与在 β 细胞中表达 B7.1 共刺激分子的第三种转基因小鼠交配，那么三重转基因动物可发生自发性糖尿病[487](表 20.6)，而双重转基因不患病。这些结果证明即使没有病毒激活，T 细胞也可到达组织，只是未受到

足够的刺激,因此未诱导疾病发生。具有正常T细胞池的小鼠即使B7.1在其胰岛中组成型表达也不患病,这提示迁移到胰岛的T细胞所占的比例或受到的刺激是疾病发生过程中的另一关键因素。在一系列不同的实验中已证明如果前炎症因子TNF-α也表达[488],表达在胰岛上的B7.1可引起自发性糖尿病。在胰岛中只有TNF-α转基因的小鼠不患糖尿病,尽管小鼠发生胰岛炎,并可见T细胞和巨噬细胞在胰腺内浸润[489]。因此,在限制性条件下,当正常胰岛抗原低亲和力的少数T细胞存在时,将T细胞募集到这一部位的炎症信号和保持其活化的异常共刺激信号对诱导胰岛损害都是必要的。

表20.6 利用转基因诱导自身免疫性糖尿病

T细胞	共刺激	炎症	糖尿病
LCMV TCR转基因	—	—	无
LCMV TCR转基因	Islet B7	—	有
正常	Islet B7	—	无
K^bTCR转基因	Islet IL-2	—	有
正常	Islet B7	Islet TNF-α	有
正常	—	Islet TNF-α	无
正常	—	Islet TNF-α	有
正常	—	Islet TNF-γ	有

数据来自参考文献[311]、[487]~[497]、[499]。

其他两项研究证明,IFN单独在胰岛内表达足以诱导疾病发生。要么是IFN-γ要么是IFN-α诱导了糖尿病[490,491]。已知道IFN-γ可上调大多数细胞上MHC的表达,从而加强胰岛抗原的呈递,尚不清楚是否通过与炎症(由IFN-γ活化巨噬细胞诱导的)协同作用导致疾病发生。已证明IFN-γ和TNF-α可共同诱导β细胞上MHCⅡ分子的表达,从而有利于将局部抗原呈递给胰岛抗原特异性$CD4^+$T细胞。这是否有助于还是阻碍免疫反应的发生可能取决于共刺激分子的存在[493]。人[494]或小鼠[495]表达的MHCⅡ分子的特定等位基因在疾病的易感性方面起关键作用,但是这是否在胰岛的抗原呈递[496]或胸腺内耐受诱导中[497,498]起重要作用尚不清楚。最后,在另一转基因模型中[499],IL-2在β细胞内的表达有助于糖尿病的诱导,提示局部活化和自身反应性T细胞存活时间的延长可能是产生自身免疫的主要因素。

总之,这些研究提示产生自身免疫过程的关键因素与局部产生的炎症细胞因子激活足够多的T细胞以及MHC和共刺激分子的上调有关。CFA可能模拟这种情况,研究者在免疫部位提供CFA和抗原可激活足够数量的低亲和力T细胞,这些细胞可向抗原正常表达的组织有效的迁移。一旦进入组织,活化的T细胞即可开始损伤组织和引起炎症,使组织内抗原释放,并大量呈递给免疫系统以维持免疫反应。Lehmann等[500]的实验为这一过程提供试验支持。用CFA加髓磷脂碱性蛋白(MBP)的免疫优势肽免疫小鼠,起初被抗原激活的T细胞对这种肽具特异性,但3周后可检测到MBP上亚优势决定簇的特异性T细胞,尽管这些决定簇在所用的免疫乳剂中并不存在。这被称为决定簇扩展的现象在随后用非自身抗原溶菌酶的肽免疫时并未被观察到。他们对这一现象的解释是起初活化的T细胞在大脑内产生炎症过程,最终允许小鼠自身MBP的抗原呈递,并激活其他MBP决定簇特异性的初始T细胞。

有人推测在非实验条件下这一过程由感染性病原体所诱发。例如有人认为柯萨奇B3病毒通过诱导血管内的局部炎症而启动心脏内的自身免疫病[478],结果导致心脏肌浆球蛋白向免疫系统的呈递,自身特异性T细胞的激活可产生自身免疫病[501]。起初出现的心脏肌浆球蛋白特异性T细胞是否确实由病毒所激活尚不清楚。自身蛋白与外源蛋白之间分子模拟的证据给人留下深刻的印象[502,503],但是,用感染性病原体的肽免疫诱导自身免疫病的证据并不多。在关于分子模拟的原始论著中[479],用强的病毒肽模拟物(6/8的氨基酸与MBP的免疫优势肽相同)免疫,结果在少数兔子体内只产生非常轻微的免疫病理组织学表现。事实上,大多数实验只是证明病毒或细菌的T细胞表位能够激活从患有自身免疫病的人或动物体内分离的T细胞克隆[504]。

在分子模拟的实验模型中,通常的假设是外源抗原决定簇激活的T细胞能与自身蛋白的肽交叉反应。Lin等[505]的实验提示了可能有另一种不同的机制在起作用。用含有人细胞色素c的CFA免疫小鼠,当其T细胞在培养中用抗原再次刺激时可产生强烈的增殖反应,但用含有小鼠细胞色素c的CFA免疫时则不然。但是如果同时给予小鼠和人的细胞色素c则可观察到强烈的小鼠特异性T细胞增殖反应。有趣的是,这种反应不是人细胞色素c直接活化T细胞引起的,因为这种抗原不能激活来自混合培养的小鼠细胞色素c特异性T细胞克隆。更确切地说,似乎与B细胞水平的交叉反应有关,使小鼠细胞色素c被更有效地呈递。因此人细胞色素c激活的B细胞产生的抗体可与鼠细胞色素c交叉反应。将这种B细胞输入初始的同系小鼠体内,当用小鼠细胞色素C加CFA免疫动物时可产生针对小鼠细胞色素c的T细胞增殖反应。因此,即使在T细胞水平无交叉反应,B细胞水平的分子模拟也有利于自身抗原特异性$CD4^+$ T细胞的活化或扩增。

最后,完全不相关的蛋白也可能激活T细胞使其成为自身反应性细胞。因为许多T细胞表达的受体不只一种,一些具有自身反应性受体的细胞由于自身反应性TCR的低表达而逃避胸腺内的克隆清除。在表达C5和其受体的C5特异性TCR转基因模型中已证实了这一现象。在Rag-1基因敲除的情况下T细胞可全部被清除,这可防止内源性受体重排。相反,如果这种小鼠与其他非自身抗原特异性的TCR转基因小鼠交配,许多T细胞可逃避清除[506]。这些具有两种受体的动物似乎对循环中的C5自身抗原产生了耐受,原因可能是外周T细胞上C5特异性受体的低水平表达。有趣的是,用动物体内不存在的抗原使这些T细胞活化,产生的细胞能杀死表达C5抗原的靶细胞。这些结果提示用可被细胞上第二种受体识别的无关环境抗原刺激T细胞(其受体下调)可产生自身反应。

从糖尿病患者体内分离到一种人类内源性反转录病毒[482],这一发现支持超抗原可能诱发自身免疫过程的观点。在两例糖尿病患者的胰腺内观察到大量产生$V_\beta7$的T细胞,这一发现使人们在MMTV相关的人类逆转录病毒的外壳糖蛋白N端鉴定出一种超抗原[482]。作者推测环境或激素刺激可使内源性反转录病毒活化,并表达超抗原,从而激活具有胰岛抗原低亲和力受体的T细胞,使其向胰腺迁移,并启动自身免疫。但是,超抗原的表达和疾病之间仅在这一点上有一定关联,因果关系的建立尚需要进一步的研究。

这种有关耐受中止的讨论只适用于器官特异性自身免疫病。相反,系统性自身免疫病似乎是整个系统失调的结果。要么是正常免疫反应未受到阴性反馈机制的调控,要么是正在发育的免疫系统未充分清除掉自身反应性细胞。基因突变体如*lpr*/*lpr*小鼠可出现这些状况[508],在这种小鼠体内,Fas功能受损干扰了在正常情况下活化后所经历的细胞凋亡,使淋巴细胞的存活超过其正常寿命[509]。通过交配使*lpr*基因进入表达双链DNA特性BCR的转基因 小鼠体内,动物可异常分泌大量的抗DNA抗体(系统性红斑狼疮的特征之一)[510]。相反,表达这种受体的B细胞在非*lpr*环境中可被诱导耐受。这种类型的许多其他疾病将在第33章中讨论,其中免疫系统失调的遗传和环境因素都将被涉及。

致谢

感谢Helen Quill博士对稿件的校对和许多有益的建议。衷心感谢Colin博士的评论。谨以此文献给A,愿他事业有成,健康长寿。

(李亚斐 译)

参考文献

1. Ehrlich P, Morgenroth J. On haemolysins: third and fifth communications. In: *The Collected Papers on Paul Ehrlich*, vol 2. London: Pergamon, 1957:205–212, 246–255.
2. Owen RD. Immunogenetic consequences of vascular ananstomoses between bovine twins. *Science* 1945;102:400–401.
3. Lillie FR. The theory of the free-martin. *Science* 1916;43:611–613.
4. Burnet FM, Fenner F. In: *The production of antibodies*, 2nd ed. London: Macmillan, 1949:102–105.
5. Traub E. Factors influencing the persistence of choriomeningitis virus in the blood of mice after clinical recovery. *J Exp Med* 1938;68:229–250.
6. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953;172:603–606.
7. Hăsek M. Parabiosis of birds during embryonic development. *Cesk Biol* 1953;2:265–270.

8. Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust J Sci* 1957;20:67–69.
9. Triplett EL. On the mechanism of immunologic self recognition. *J Immunol* 1962;89:505–510.
10. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987;49:273–280.
11. Blackman MA, Lund FE, Surman S, Corley RB, Woodland DL. Major histocompatibility complex-restricted recognition of retroviral superantigens by Vβ17⁺ T cells. *J Exp Med* 1992;176:275–280.
12. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected *in situ* during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994;372:100–103.
13. MacDonald HR, Schneider R, Lees RK, et al. T-cell receptor V beta use predicts reactivity and tolerance to Mls^a-encoded antigens. *Nature* 1988;332:40–45.
14. Guidos CJ, Danska JS, Fathman CG, Weissman IL. T cell receptor-mediated negative selection of autorective T lymphocyte precursors occurs after commitment to the CD4 or CD8 lineages. *J Exp Med* 1990;172:835–845.
15. Hugo P, Boyd RL, Waanders GA, Petrie HT, Scollay R. Timing of deletion of autoreactive Vβ6⁺ cells and down-modulation of either CD4 or CD8 on phenotypically distinct $CD4^+8^+$ subsets of thymocytes expressing intermediate or high levels of T cell receptor. *Int Immunol* 1990;3:265–272.
16. Kisielow P, Blüthmann H, Staerz UD, Steinmetz M, Von Boehmer H. Tolerance in T-cell receptor transgenic mice involves deletion of nonmature $CD4^+8^+$ thymocytes. *Nature* 1988;333:742–746.
17. Blüthmann H, Kisielow P, Uematsu Y, et al. T-cell-specific deletion of T-cell recptor transgenes allows functional rearrangement of endogenous alpha- and beta-genes. *Nature* 1988;334:156–159.
18. Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, Loh DY. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 1988;336:73–76.
19. Dent AL, Matis LA, Hooshmand F, Widacki SM, Bluestone JA, Hedrick SM. Self-reactive γδ T cells are eliminated in the thymus. *Nature* 1990;343: 714–719.
20. Takahama T, Kosugi A, Singer A. Phenotype, ontogeny, and repertoire of $CD4^-$ $CD8^-$ T cell receptor $\alpha\beta^+$ thymocytes. *J Immunol* 1991;146:1134–1141.
21. Singer PA, Balderas RS, McEvilly RJ, Bobardt M, Theofilopoulos AN. Tolerance-related Vβ clonal deletions in normal $CD4^-8^-$, TCR-α/β^- and abnormal lpr and gld cell populations. *J Exp Med* 1989;170:1869–1877.
22. Bendelac A, Killeen N, Littman D, Schwartz RH. A subset of CD4⁺ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* 1994;263:1174–1178.
23. Poussier P, Edouard P, Lee C, Binnie M, Julius M. Thymus-independent development and negative selection of T cells expressing T cell receptor alpha/beta in the intestinal epithelium: evidence for distinct circulation patterns of gut- and thymus-derived T lymphocytes. *J Exp Med* 1992;176:187–199.
24. Takahama Y, Shores EW, Singer A. Negative selection of precursor thymocytes before their differentiation into $CD4^-CD8^+$ cells. *Science* 1992;258:653–656.
25. Pircher H, Bürki K, Lang R, Hengartner H, Zinkenagel RM. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 1989;342:559–561.
26. MacDonald HR, Lees RK. Programmed death of autoreactive thymocytes. *Nature* 1990;343:642–644.
27. D'Adamio L, Awad KM, Reinherz EL. Thymic and peripheral apoptosis of antigen-specific T cells might cooperate in establishing self tolerance. *Eur J Immunol* 1993;23:747–753.
28. Kishimoto H, Sprent J. Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med* 1997;185:263–271.
29. Sprent J, Lo D, Gao E-K, Ron Y. T cell selection in the thymus. *Immunol Rev* 1988;101:173–190.
30. Marrack P, Lo D, Brinster R, et al. The effects of thymus environment on T cell development and tolerance. *Cell* 1988;53:627–634.
31. Kyewski BA, Rouse RV, Kaplan HS. Thymocyte rosettes: multicellular complexes of lymphocytes and bone marrow-derived stromal cells in the mouse thymus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:5646–5650.
32. Matzinger P, Guerder S. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell. *Nature* 1989;338:74–76.
33. Swat W, Ignatowicz L, Von Boehmer H, Kisielow P. Clonal deletion of immature $CD4^+8^+$ thymocytes in suspension culture by extrathymic antigen-presenting cells. *Nature* 1991;351:150–153.
34. Sprent J, Von Boehmer H, Nabholz M. Association of immunity and tolerance to host H-2 determinants in irradiated F_1 hybrid mice reconstituted with bone marrow cells from one parental strain. *J Exp Med* 1975;142:321–331.
35. Jenkinson EJ, Jhittay P, Kingston R, Owen JJT. Studies on the role of the thymic environment in the induction of tolerance to MHC antigens. *Transplantation* 1985;39:331–333.
36. Von Boehmer H, Schubiger K. Thymocytes appear to ignore class I major histocompatibility complex antigens expressed on thymus epithelial cells. *Eur J Immunol* 1984;14:1048–1056.
37. Gao E-K, Lo D, Sprent J. Strong T cell tolerance in parent → F1 bone marrow chimeras prepared with supralethal irradiation: evidence for clonal deletion and anergy. *J Exp Med* 1990;171:1101–1121.
38. Speiser DE, Pircher H, Ohashi PS, Kyburz D, Hengartner H, Zinkernagael RM. Clonal deletion induced by either radioresistant thymic host cells or lymphohemopoietic donor cells at different stages of class I-restricted T cell ontogeny. *J Exp Med* 1992;175:1277–1283.
39. Salaún J, Bandeira A, Khazaal I, et al. Thymic epithelium tolerizes for histocompatibility antigens. *Science* 1990;247:1471–1474.
40. Flajnik MF, Du Pasquier L, Cohen N. Immune responses of thymus/lymphocyte embryonic chimeras: studies on tolerance and major histocompatibility complex restriction in *Xenopus*. *Eur J Immunol* 1985;15:540–547.
41. Bonomo A, Matzinger P. Thymus epithelium induces tissue specific tolerance. *J Exp Med* 1993;177:1153–1164.
42. Jenkinson EJ, Anderson G, Owen JJT. Studies on T cell maturation on defined thymic stromal cell populations *in vitro*. *J Exp Med* 1992;176:845–853.
43. Berg LI, Fazekas de St Groth B, Pullen AM, Davis MM. Phenotype differences between αβ versus β T-cell receptor transgenic mice undergoing negative selection. *Nature* 1989;340:559–562.
44. Oehen S, Feng L, Xia Y, Surh CD, Hedrick SM. Antigen compartmentation and T helper cell tolerance induction. *J Exp Med* 1996;183: 2617–2626.
45. Schönrich G, Momburg F, Hämmerling GJ, Arnold B. Anergy induced by thymic medullary epithelium. *Eur J Immunol* 1992;22:1687–1691.
46. Hoffmann MW, Allison J, Miller JFAP. Tolerance induction by thymic medullary epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2526–2530.
47. Van Ewijk W, Ron Y, Monaco J, et al. Compartmentalization of MHC class II gene expression in transgenic mice. *Cell* 1988;53:357–370.
48. Laufer TM, DeKoning J, Markowitz JS, Lo D, Glimcher LH. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 1996;383:81–85.
49. Shimonkevitz RP, Bevan MJ. Split tolerance induced by the intrathymic adoptive transfer of thymocyte stem cells. *J Exp Med* 1988;168:143–156.
50. Pircher H, Müller K-P, Kyewski BA, Hengartner H. Thymocytes can tolerize thymocytes by clonal deletion *in vitro*. *Int Immunol* 1992;4:1065–1069.
51. Pircher H, Brduscha K, Steinhoff U, et al. Tolerance induction by clonal deletion of $CD4^+8^+$ thymocytes *in vitro* does not require dedicated antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 1993;23:669–679.
52. Lederberg J. Genes and antibodies: do antigens bear instructions for antibody specificity or do they select cell lines that arise by mutation? *Science* 1959;129: 1649–1653.
53. Scollay R, Shortman K. Cell traffic in the adult thymus: cell entry and exit, cell birth and death. In: Watson JD, Marbrook J, eds. *Recognition and regulation in cell-mediated immunity.* New York: Marcel Dekker Inc, 1985:3–30.
54. Page DM, Kane LP, Allison JP, Hedrick SM. Two signals are required for negative selection of $CD4^+8^+$ thymocytes. *J Immunol* 1993;151:1868–1880.
55. Punt JA, Osborne BA, Takahama Y, Sharrow SO, Singer A. Negative selection of $CD4^+8^+$ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *J Exp Med* 1994;179:709–713.
56. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 1993;261:609–612.
57. Nelson AJ, Hosier S, Brady W, Linsley PS, Farr AG. Medullary thymic epithelium expresses a ligand for CTLA4 *in situ* and *in vitro*. *J Immunol* 1993;151: 2453–2461.
58. Van Parijs L, Ibraghimov A, Abbas AK. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity* 1996;4:321–328.
59. Douni E, Akassoglu K, Alexopoulou L, et al. Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. *J Inflamm* 1995;47:27–38.
60. Amakawa R, Hakem A, Kündig TM, et al. Impaired negative selection of T cells in Hodgkins disease antigen CD30-deficient mice. *Cell* 1996;84:551–562.
61. Bill J, Kanagawa O, Woodland D, Palmer E. The MHC molecule I-E is necessary but not sufficient for the clonal deletion of V(11 bearing T cells. *J Exp Med* 1989;169:1405–1419.
62. Gao E-K, Kanagawa O, Sprent J. Capacity of unprimed CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing Vβ11 receptors to respond to I-E alloantigens *in vivo*. *J Exp Med* 1989;170:1947–1957.
63. Yagi J, Janeway CA Jr. Ligand thresholds at different stages of T cell development. *Int Immunol* 1990;2:83–89.
64. Vasquez NJ, Kaye J, Hedrick SM. *In vivo* and *in vitro* clonal deletion of double-positive thymocytes. *J Exp Med* 1992;175:1307–1316.
65. Robertson K, Simon K, Schneider S, Timms E, Mitchison A. Tolerance of self induced in thymus organ culture. *Eur J Immunol* 1992;22:207–211.
66. Pircher H, Rohrer UH, Moskophidis D, Zinkernagel RM, Hengartner H. Lower receptor avidity required for thymic clonal deletion than for effector T-cell function. *Nature* 1991;351:482–485.
67. Robey EA, Ramsdell F, Gordon JW, et al. A self-reactive T cell population that is not subject to negative selection. *Int Immunol* 1992;4:969 974.
68. Auphan N, Jézo-Brémond A, Schönrich G, et al. Threshold tolerance in H-$2K^b$-specific TCR transgenic mice expressing mutant H-$2K^b$ conversion of helper-independent to helper-dependent CTL. *Int Immunol* 1992;4:1419–1428.
69. Von Boehmer H. Developmental biology of T cells in T cell receptor transgenic mice. *Annu Rev Immunol* 1990;8:536–537.
70. Malissen M, Trucy J, Letourneur F, et al. A T cell clone expresses two T cell receptor alpha genes but uses one alpha beta heterodimer for allorecognition and self MHC-restricted antigen recognition. *Cell* 1988;55:49–59.
71. Padovan E, Casorati G, Dellabona P, Meyer S, Brockhaus M, Lanzavecchia A.

Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science* 1993;262:422–424.

72. Bankhurst AD, Torrigiani G, Allison AC. Lymphocytes binding human thyroglobulin in healthy people and its relevance for autoantigens. *Lancet* 1973;1: 226–229.
73. Primi D, Smith CI, Hammarström L, Möller G. Sera from lipopolysaccharide (LPS)-injected mice exhibit complement-dependent cytotoxicity against syngeneic and autologous spleen cells. *Cell Immunol* 1977;32:252–262.
74. Dresser DW. Most IgM-producing cells in the mouse secrete auto-antibodies (rheumatoid factor). *Nature* 1978;274:480–483.
75. Steele EJ, Cunningham AJ. High proportion of Ig-producing cells making autoantibody in normal mice. *Nature* 1978;274:483–484.
76. Underwood JR, Pedersen JS, Chatmers PJ, Toh BH. Hybrids from normal, germ free, nude and neonatal mice produce monoclonal autoantibodies to eight different intracellular structures. *Clin Exp Immunol* 1985;60:417–426.
77. Prabhakar BS, Saegusa J, Onodera T, Notkins AL. Lymphocytes capable of making monoclonal antibodies that react with multiple organs are a common feature of the normal B cell repertoire. *J Immunol* 1984;133:2815–2817.
78. Iverson GM, Lindenmann J. The role of a carrier-determinant and T cells in the induction of liver-specific autoantibodies in the mouse. *Eur J Immunol* 1972:2: 195–197.
79. Lane DP, Silver DM. Isolation of a murine liver-specific alloantigen, F antigen, and examination of its immunogenic properties by radioimmunoassay. *Eur J Immunol* 1976;6:480–485.
80. Haba S, Nisonoff A. Induction of high titers of anti-IgE by immunization of inbred mice with syngeneic IgE. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5009–5013.
81. Harris DE, Cairns L, Rosen FS, Borel Y. A natural model of immunologic tolerance. Tolerance to murine C5 is mediated by T cells, and antigen is required to maintain unresponsiveness. *J Exp Med* 1982;156:567–584.
82. Reichlin M. Localizing antigenic determinants in human haemoglobin with mutants: molecular correlations of immunological tolerance. *J Mol Biol* 1972; 64:485–496.
83. Urbanski GJ, Margoliash E. Topographic determinants on cytochrome c. 1. The complete antigenic structures of rabbit, mouse and guanaco cytochromes c in rabbits and mice. *J Immunol* 1977;118:1170–1180.
84. Pierres M, Devaux C, Dosseto M, Marchetto S. Clonal analysis of B- and T-cell responses to Ia antigens. 1. Topology of epitope regions on I-A^b and I-E^b molecules analyzed with 35 monoclonal alloantibodies. *Immunogenetics* 1981;14:481–495.
85. Stamatoyannopoulos G, Farquhar M, Lindsley D, Brice M, Papayannopoulou T, Nute PE. Monoclonal antibodies specific for globin chains. *Blood* 1983;61: 530–539.
86. Tsubata T, Nishikawa S, Katsura Y, Kumagai S, Imura H. B cell repertoire for anti-DNA antibody in normal and lupus mice: differential expression of precursor cells for high and low affinity anti-DNA antibodies. *Clin Exp Immunol* 1988; 71:50–55.
87. Nemazee DA, Bürki K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 1989;337:562–566.
88. Raff MC, Owen JJT, Cooper MD, Lawton AR, Megson M, Gathings WE. Differences in susceptibility of mature and immature mouse B lymphocytes to anti-immunoglobulin-induced immunoglobulin suppression *in vitro*: possible implications for B-cell tolerance to self. *J Exp Med* 1975;142:1052–1064.
89. Sidman CL, Unanue ER. Receptor-mediated inactivation of early B lymphocytes. *Nature* 1975;257:149–151.
90. Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, et al. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 1993; 72:325–335.
91. Hertz M, Nemazee D. BCR ligation induces receptor editing in IgM^+ IgD^- bone marrow B cells *in vitro*. *Immunity* 1997;6:429–436.
92. Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 1993;177:1009–1020.
93. Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med* 1993;177:999–1008.
94. Prak EL, Weigert M. Light chain replacement: a new model for antibody gene rearrangement. *J Exp Med* 1995;182:541–548.
95. Norvell A, Mandik L, Monroe JG. Engagement of the antigen-receptor on immature murine B lymphocytes results in death by apoptosis. *J Immunol* 1995:154: 4404–4413.
96. Kincade PW, Lawton AR, Bockman DE, Cooper MD. Suppression of immunoglobulin G synthesis as a result of antibody-mediated suppression of immunoglobulin M synthesis in chickens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970;67: 1918–1925.
97. Lawton AR, Asofsky R, Hylton MB, Cooper MD. Suppression of immunoglobulin class synthesis in mice. I. Effects of treatment with antibody to μ-chain. *J Exp Med* 1972;135:277–297.
98. Hartley SB, Crosbie J, Brink R, Kantor AB, Basten A, Goodnow CC. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* 1991;353:765–769.
99. Osmond DG. Population dynamics of bone marrow B lymphocytes. *Immunol Rev* 1986;93:103–124.
100. Metcalf ES, Klinman NR. *In vitro* tolerance induction of neonatal murine B cells. *J Exp Med* 1976;143:1327–1340.
101. Nemazee D, Büerki K. Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8039–8043.
102. Guilbert B, Dighiero G, Avrameas S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in normal humans. I. Detection, isolation and characterization. *J Immunol* 1982;128:2779–2787.
103. Dighiero G, Lymberi P, Holmberg D, Lundquist I, Coutinho A, Avrameas S. High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. *J Immunol* 1985; 134:765–771.
104. Hayakawa K, Hardy RR, Honda M, Herzenberg LA, Steinberg AD, Herzenberg LA. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2494–2498.
105. Lehuen A, Bartels J, Kearney JF. Characterization, specificity, and IgV gene usage of anti-lymphocyte monoclonal antibodies from perinatal mice. *Int Immunol* 1992;4:1073–1084.
106. Okamoto M, Murakami M, Shimizu A, et al. A transgenic model of autoimmune hemolytic anemia. *J Exp Med* 1992;175:71–79.
107. Erikson J, Radic MZ, Camper SA, Hardy RR, Carmack C, Weigert M. Expression of anti-DNA immunolobulin transgenes in non-autoimmune mice. *Nature* 1991;349:331–334.
108. Radic MZ, Erikson J, Litwin S, Weigert M. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptor. *J Exp Med* 1993;177:1165–1173.
109. Madaio MP, Hodder S, Schwartz RS, Stollar BD. Responsiveness of autoimmune and normal mice to nucleic acid antigens. *J Immunol* 1984;132:872–876.
110. Conger JD, Pike BL, Nossal GJV. Clonal analysis of the anti-DNA repertoire of murine B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2931–2935.
111. Gilkeson GS, Grudier JP, Karounos DG, Pisetsky DS. Induction of anti-double stranded DNA antibodies in normal mice by immunization with bacterial DNA. *J Immunol* 1989;142:1482–1486.
112. Rumore PM, Steinman CR. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1990;86:69–74.
113. Adelstein S, Pritchard-Briscoe H, Anderson TA, et al. Induction of self-tolerance in T cells but not B cells of transgenic mice expressing little self antigen. *Science* 1991;251:1223–1225.
114. Chiller JM, Habicht GS, Weigle WO. Kinetic differences in unresponsiveness of thymus and bone marrow cells. *Science* 1971;171:813–815.
115. Basten A, Brink R, Peake P, et al. Self tolerance in the B-cell repertoire. *Immunol Rev* 1991;122:5–19.
116. Teale JM, Layton JE, Nossal GJV. *In vitro* model for natural tolerance to self antigens: inhibition of the development of surface-immunoglobulin-negative lymphocytes into T-dependent responsive B cells by antigen. *J Exp Med* 1979; 150:205–217.
117. Carman JA, Wechsler-Reya RJ, Monroe JG. Immature stage B cells enter but do not progress beyond the early G1 phase of the cell cycle in response to antigen receptor signaling. *J Immunol* 1996;156:4562–4569.
118. Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonself discrimination: paralysis and induction involve the recognition of one and two determinants on an antigen, respectively. *Science* 1970;169:1042–1049.
119. Ovary Z, Benacerraf B. Immunological specificity of the secondary response with dinitrophenylated proteins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1963;114:72–76.
120. Mitchison NA. Induction of immunological paralysis in two zones of dosage. *Proc R Soc Lond [Biol]* 1964;161:275–292.
121. Cudkowicz G, Bennett M. Peculiar immunobiology of bone marrow allografts. I. Rejection of parental grafts by resistant F_1 hybrid mice. *J Exp Med* 1971;134: 1513–1528.
122. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 1975;16:216–223.
123. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cell. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975;5:112–117.
124. NK cells, MHC class I antigens and missing self. *Immunol Rev* 1997;155: 11–221.
125. Öhlén C, Kling G, Höglund P, et al. Prevention of allogeneic bone marrow graft rejection by H-2 transgene in donor mice. *Science* 1989;246:666–668.
126. Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2 deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy. *Nature* 1986;319:675–678.
127. Bix M, Liao NS, Zijlstra M, Lorring J, Jaenisch R, Raulet D. Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature* 1991;349:329–331.
128. Sykes M, Harty MW, Karlhofer FM, Pearson DA, Szot G, Yokoyama W. Hematopoietic cells and radioresistant host elements influence natural killer cell differentiation. *J Exp Med* 1993;178:223–229.
129. Olsson MY, Kärre K, Sentman CL. Altered phenotype and function of natural killer cells expressing the major histocompatibility complex receptor Ly-49 in mice transgenic for its ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1649–1653.
130. Held W, Dorfman JR, Wu MF, Raulet DH. Major histocompatibility complex class I dependent skewing of the natural killer cell Ly 49 receptor repertoire. *Eur J Immunol* 1996;26:2286–2290.
131. Salcedo M, Diehl AD, Olsson-Alheim MY, et al. Altered expression of Ly 49 inhibitory receptors on natural killer cells from MHC class I-deficient mice. *J*

Immunol 1997;158:3174–3180.
132. Held W, Cado D, Raulet DH. Transgenic expression of the Ly 49A natural killer cell receptor confers class I major histocompatibility complex (MHC)-specific inhibition and prevents bone marrow allograft rejection. *J Exp Med* 1996;184: 2037–2041.
133. Johansson MH, Bieberich C, Jay G, Kärre K, Höglund P. Natural killer cell tolerance in mice with mosaic expression of major histocompatibility complex class I transgene. *J Exp Med* 1997;186:353–364.
134. Anderson D, Billingham RE, Lampkin GH, Medawar PB. The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle. *Heredity* 1951;5:379–397.
135. Billingham RE, Brent L. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease. *Proc R Soc Lond [Biol]* 1959;242:439–477.
136. Boyse EA, Lance EM, Carswell EA, Cooper S, Old LJ. Rejection of skin allografts by radiation chimeras: selective gene action in the specification of cell surface structure. *Nature* 1970;227:901–903.
137. Boyse EA, Carswell EA, Scheid MP, Old LJ. Tolerance of Sk-incompatible skin grafts. *Nature* 1973;244:441–442.
138. Wachtel SS, Thaler HT, Boyse EA. A second system of alloantigens expressed selectively on epidermal cells of the mouse. *Immunogenetics* 1977;5:17–23.
139. Steinmuller D, Lofgreen JS. The "sk" (skin-specific) rejection phenomenon as evidence of the natural role of acquired tolerance. *Transplant Proc* 1977;9: 1385–1391.
140. Emery D, McCullagh P. Immunological reactivity between chimeric cattle twins. I. Homograft reaction. *Transplantation* 1980;29:4–9.
141. Chen H-D, Silvers WK. Influence of Langerhans cells on the survival of H-Y incompatible skin grafts in rats. *J Invest Dermatol* 1983;81:20–23.
142. Rollins-Smith LA, Cohen N. Self-pituitary grafts are not rejected by frogs deprived of their pituitary anlagen as embryos. *Nature* 1982;229:820–821.
143. McCallagh P. Interception of the development of self tolerance in fetal lambs. *Eur J Immunol* 1989;19:1387–1392.
144. Mathisen PM, Pease S, Garvey J, Hood L, Readhead C. Identification of an embryonic isoform of myelin basic protein that is expressed widely in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10,125–10,129.
145. Kraal G, Breel M, Janse M, Bruin G. Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1986;163:981–997.
146. Kyewski BA, Fathman CG, Kaplan HS. Intrathymic presentation of circulating non-major histocompatibility complex antigens. *Nature* 1984;308:196–199.
147. Lo D, Burkly LC, Widera G, et al. Diabetes and tolerance in transgenic mice expressing class I MHC molecules in pancreatic beta cells. *Cell* 1988;53: 159–168.
148. Lo D, Burkly LC, Flavell RA, Palmiter RD, Brinster RL. Tolerance in transgenic mice expressing class II major histocompatibility complex on pancreatic acinar cells. *J Exp Med* 1989;170:87–104.
149. Burkly LC, Lo D, Kanagawa O, Brinster RL, Flavell RA. T-cell tolerance by clonal anergy in transgenic mice with nonlymphoid expression of MHC class II I-E. *Nature* 1989;342:564–566.
150. Böhme J, Haskins K, Stecha P, et al. Transgenic mice with I-A on islet cells are normoglycemic but immunologically intolerant. *Science* 1989;244:1179–1183.
151. Miller J, Daitch L, Rath S, Selsing E. Tissue-specific expression of allogeneic class II MHC molecules induces neither tissue rejection nor clonal inactivation of alloreactive T cells. *J Immunol* 1990;144:334–341.
152. Murphy KM, Weaver CT, Elish M, Allen PM, Loh DY. Peripheral tolerance to allogeneic class II histocompatibility antigens expressed in transgenic mice: evidence against a clonal-deletion mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86: 10034–10038.
153. Morahan G, Brennan FE, Bhathal PS, Allison J, Cox KO, Miller JFAP. Expression in transgenic mice of class I histocompatibility antigens controlled by the metallothionein promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3782–3786.
154. Jones-Youngblood SL, Wieties K, Forman J, Hammer RE. Effect of the expression of a hepatocyte-specific MHC molecule in transgenic mice on T cell tolerance. *J Immunol* 1990;144:1187–1195.
155. Wieties K, Hammer RE, Jones-Youngblood S, Forman J. Peripheral tolerance in mice expressing a liver-specific class I molecule: inactivation/deletion of a T cell subpopulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6604–6608.
156. Russell DM, Dembic Z, Morahan G, Miller JFAP, Bürki K, Nemazee D. Peripheral deletion of self reactive B cells. *Nature* 1991;354:308–311.
157. Felton LD. Significance of antigen in animal tissues. *J Immunol* 1949;6: 107–117.
158. Dixon FJ, Maurer PH. Immunological unresponsiveness induced by protein antigens. *J Exp Med* 1955;101:245–257.
159. Dresser DW. Specific inhibition of antibody production. II. Paralysis in adult mice by small quantities of protein antigen. *Immunology* 1962;5:378–388.
160. Frei PC, Benacerraf B, Thorbecke GJ. Phagocytosis of the antigen, a crucial step in the induction of the primary response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965;53:20–23.
161. Havas HF. The effect of the carner protein on the immune response and on the induction of tolerance in mice to the 2,4-dinitrophenyl determinant. *Immunology* 1969;17:819–829.
162. Golan DT, Borel Y. Nonantigenicity and immunologic tolerance: the role of the carner in the induction of tolerance to the hapten. *J Exp Med* 1971;134: 1046–1061.
163. Katz DH, Hamaoka T, Benacerraf B. Induction of immunological tolerance in bone marrow derived lymphocytes of the IgE antibody class. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:2776–2780.
164. Nossal GJV, Pike BL, Katz DH. Induction of B cell tolerance *in vitro* to 2,4-dinitrophenyl coupled to a copolymer of D-glutamic acid and D-lysine (DNP-D-GL). *J Exp Med* 1973;138:312–317.
165. Katz DH, Davie JM, Paul WE, Benacerraf B. Carrier function in anti-hapten antibody responses. IV. Experimental conditions for the induction of hapten-specific tolerance or for the stimulation of anti-hapten anamnestic responses by "nonimmunogenic" hapten-polypeptide conjugates. *J Exp Med* 1971;134:201–233.
166. Diener E, Paetkau VH. Antigen recognition: early surface-receptor phenomena induced by binding of a tritium-labeled antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69:2364–2368.
167. Aldo-Benson M, Borel Y. Hapten-bearing cell in carrier-determined tolerance. *Eur J Immunol* 1977;7:175–179.
168. Aldo-Benson M, Borel Y. Loss of carrier-determined tolerance *in vitro* with loss of receptor blockade. *J Immunol* 1976;116:223–226.
169. Howard JG, Mitchison NA. Immunological tolerance. *Progr Allergy* 1975;18: 68–72.
170. Parish CR, Ada GL. Tolerance inducing properties in rats of bacterial flagellin cleaved at the methionine residues. *Immunology* 1969;17:153–164.
171. Andersson B. Induction of immunity and immunologic paralysis in mice against polyvinyl pyrrolidone. *J Immunol* 1969;102:1309–1313.
172. Miranda JJ, Zola H, Howard JG. Studies on immunological paralysis. X. Cellular characteristics of the induction and loss of tolerance to levan (polyfructose). *Immunology* 1973;23:843–855.
173. Feldmann M. Induction of immunity and tolerance to the dinitrophenyl determinant *in vitro*. *Nature New Biol* 1971;231:21–23.
174. Dintzis HM, Dintzis RZ, Vogelstein B. Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:3671–3675.
175. Dintzis RZ, Okajima M, Middleton MH, Greene G, Dintzis HM. The immunogenicity of soluble haptenated polymers is determined by molecular mass and hapten valence. *J Immunol* 1989;143:1239–1244.
176. Waldschmidt TJ, Borel Y, Vitetta ES. The use of haptenated immunoglobulins to induce B cell tolerance in vitro. The roles of hapten density and the Fc portion of the immunoglobulin carrier. *J Immunol* 1983;131:2204–2209.
177. Sinclair, NRStC, Chan PL. Regulation of the immune response. IV. The role of the Fc-fragment in feedback inhibition by antibody. *Adv Exp Med Biol* 1971;12: 609–615.
178. Daëron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 1997;15:203–234.
179. Katz DH, Hamaoka T, Benacerraf B. Immunological tolerance in bone marrow-derived lymphocytes. I. Evidence for an intracellular mechanism of inactivation of hapten-specific precursors of antibody-forming cells. *J Exp Med* 1972;136: 1404–1429.
180. Hamaoka T, Katz DH. Immunological tolerance in bone marrow-derived lymphocytes. II. Effects of allogeneic cell interactions and enzymatic digestion with trypsin on inactivated hapten-specific precursors of antibody-forming cells. *J Exp Med* 1974;139:1446–1463.
181. Klinman NR, Schrater AF, Katz DH. Immature B cells as the target for *in vivo* tolerance induction. *J Immunol* 1981;126:1970–1973.
182. Möller G, Gronowicz E, Persson U, et al. Spleen cells from animals tolerant to a thymus-dependent antigen can be activated by lipopolysaccharide to synthesize antibodies against the tolerogen. *J Exp Med* 1976;143:1429–1438.
183. Pike BL, Abrams J, Nossal GJV. Clonal anergy: inhibition of antigen-driven proliferation among single B lymphocytes from tolerant animals, and partial breakage of anergy by mitogens. *Eur J Immunol* 1983;13:214–220.
184. Nossal GJV, Pike BL. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:1602–1606.
185. Goodnow CC, Crosbie J, Adelstein S, et al. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 1988;334:676–682.
186. Bell SE, Goodnow CC. A selective defect in IgM antigen receptor synthesis and transport causes loss of cell surface IgM expression on tolerant B lymphocytes. *EMBO J* 1994;13:816–826.
187. Goodnow CC, Crosbie J, Jorgensen H, Brink RA, Basten A. Induction of self tolerance in mature peripheral B lymphocytes. *Nature* 1989;342:385–391.
188. Eris JM, Basten A, Brink RA, Doherty K, Kehry MR, Hodgkin PD. Anergic self-reactive B cells present self antigen and respond normally to CD40-dependent T cell signals but are defective in antigen-receptor mediated functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4392–4396.
189. Goodnow CC, Brink R, Adams E. Breakdown of self-tolerance in anergic B lymphocytes. *Nature* 1991;352:532–536.
190. Lenschow DJ, Sperling AI, Cooke MP, et al. Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. *J Immunol* 1994;153:1990–1997.
191. Cooke MP, Heath AW, Shokat KM, et al. Immunoglobulin signal transduction guides the specificity of B cell-T cell interactions and is blocked in tolerant self-

reactive B cells. *J Exp Med* 1994;179:425–438.
192. Healy JI, Dolmetsch RE, Timmerman LA, et al. Different nuclear signals are activated by the B cell receptor during positive versus negative signaling. *Immunity* 1997;6:419–428.
193. Fulcher DA, Basten A. Reduced life span of anergic self-reactive B cells in a double-transgenic model. *J Exp Med* 1994;179:125–134.
194. Cyster JG, Hartley SB, Goodnow CC. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature* 1994;371: 389–395.
195. Rathmell JC, Cook MP, Ho WY, et al. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature* 1995;376:181–184.
196. Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA, Goodnow CC. Expansion or elimination of B cells *in vivo*: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 1996;87:319–329.
197. Tarlington DM, Smith KG. Apoptosis and the B cell response to antigen. *Int Rev Immunol* 1997;15:53–71.
198. Matiba B, Mariani SM, Krammer PH. The CD95 system and the death of a lymphocyte. *Semin Immunol* 1997;9:59–68.
199. Mountz JD, Zhou T, Su X, et al. Autoimmune disease results from multiple interactive defects in apoptosis induction molecules and signaling pathways. *Behring Inst Mitt* 1996;97:200–219.
200. Nunez G, Hockenbery D, McDonnell TJ, Sorensen CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature* 1991;353:71–73.
201. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14;18). *Nature* 1991; 349:254–256.
202. Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, et al. Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8661–8665.
203. Jacob J, Kelsoe G. *In situ* studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med* 1992;176: 679–687.
204. Linton PJL, Decker DJ, Klinman DR. Primary antibody-forming cells and secondary B cells are generated from separate precursor cell subpopulations. *Cell* 1989;59:1049–1059.
205. MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994;12:117–139.
206. Tew JG, Wu J, Qin D, Helm S, Burton GF, Szakal AK. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol Rev* 1997;156:39–52.
207. Kearney ER, Pape KA, Loh DY, Jenkins MK. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction *in vivo*. *Immunity* 1994;1: 327–339.
208. Shokat KM, Goodnow CC. Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses. *Nature* 1995;375:334–338.
209. Pulendran B, Kannourakis G, Nouri S, Smith KG, Nossal GJ. Soluble antigen can cause enhanced apoptosis of germinal-centre B cells. *Nature* 375:331–334.
210. Coutinho A, Möller G. Thymus-independent B-cell induction and paralysis. *Adv Immunol* 1975:21:114–236.
211. Coutinho A, Gronowicz E, Möller G. Mechanisms of B-cell activation and paralysis by thymus-independent antigens. Additive effects between NNP-LPS and LPS in the specific response to the hapten. *Scand J Immunol* 1975:4:89–94.
212. Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* 1995;13:655–692.
213. Feldmann M, Basten A. The relationship between antigenic structure and the requirement for thymus-derived cells in the immune response. *J Exp Med* 1971; 134:103–119.
214. Pryjma J, Humphrey JH, Klaus GGB. C3 activation and T-independent B cell stimulation. *Nature* 1974;252:505–506.
215. Mosier DE, Mond JJ, Goldings EA. The ontogeny of thymic-independent antibody responses *in vitro* in normal mice and mice with an X-linked B lymphocyte defect. *J Immunol* 1977;119:1874–1878.
216. Schreier MH, Andersson J, Lernhardt W, Melchers F. Antigen-specific T-helper cells stimulate H-2 compatible and H-2-incompatible B cell blasts polyclonally. *J Exp Med* 1980;151:194–203.
217. Pecanha LMT, Snapper CM, Finkelman FD, Mond JJ. Dextran-conjugated anti-Ig antibodies as a model for T cell-independent type 2 antigen-mediated stimulation of Ig secretion *in vitro*. I. Lymphokine dependence. *J Immunol* 1991;146:833–839.
218. Ales-Martinez JE, Cuende E, Gaur A, Scott DW. Prevention of B cell clonal deletion and anergy by activated T cells and their lymphokines. *Semin Immunol* 1992:4:195–202.
219. Carter H, Spycher MO, Ng YC, Hoffman R, Fearon DT. Synergistic interaction between complement receptor type 2 and membrane IgM on B lymphocytes. *J Immunol* 1988;141:457–463.
220. Boussiotis VA, Nadler LM, Strominger JL, Goldfield AE. Tumor necrosis factor α is an autocrine growth factor for normal human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7007–7011.
221. Snapper CM, Yamaguchi H, Moorman MA, Sneed R, Smoot D, Mond JJ. Natural killer cells induce activated murine B cells to secrete Ig. *J Immunol* 1993; 151:5251–5260.
222. Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM. T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction? *Eur J Immunol* 1995;25:3445–3451.
223. Fehr T, Bachmann MF, Bluethmann H, Kikutani H, Hengartner H, Zinkernagel RM. T-independent activation of B cells by vesicular stomatitis virus: no evidence for the need of a second signal. *Cell Immunol* 1996;168:184–192.
224. Lane PJL, Gray D, Oldfield S, MacLennan ICM. Differences in the recruitment of virgin B cells into antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent type-2 antigens. *Eur J Immunol* 1986;16:1569–1575.
225. Hayakawa K, Hady RR. Normal autoimmune and malignant CD5 B cells: the Ly-1 B lineage. *Annu Rev Immunol* 1988;6:197–218.
226. Liou L-B, Warner GL, Scott DW. Can peritoneal B cells be rendered unresponsive? *Int Immunol* 1992;4:15–21.
227. Rajewsky K, Förster I, Cumano A. Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science* 1987;238:1088–1094.
228. Ying-Zi C, Rabin E, Wortis HH. Treatment of murine CD5− B cells with anti-Ig but not LPS induces surface CD5: two B cell activation pathways. *Int Immunol* 1991;3:467–476.
229. Zinkernagel RM. Immunology taught by viruses. *Science* 1996;271:173–178.
230. Schwartz RH, Mueller DL, Jenkins MK, Quill H. T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54:605–610.
231. Jenkins MK, Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med* 1987;165:302–319.
232. Quill H, Schwartz RH. Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferation nonresponsiveness. *J Immunol* 1987;138: 3704–3712.
233. Jenkins, MK, Ashwell JD, Schwartz RH. Allogeneic non-T spleen cells restore the responsiveness of normal T cell clones stimulated with antigen and chemically modified antigen presenting cells. *J Immunol* 1988;140:3324–3330.
234. Meuller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. An accessory cell-derived costimulatory signal acts independently of protein kinase C activation to allow T cell proliferation and prevent induction of unresponsiveness. *J Immunol* 1989;142: 2617–2628.
235. Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 1991;147:2461–2466.
236. Linsley PS, Brady W, Grosmarie L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 1991;173:721–730.
237. Freeman GJ, Gray GS, Gimmi CD, et al. Structure, expression and T cell costimulation activity of the murine homologue of the B lymphocyte activation antigen. B7. *J Exp Med* 1991;174:625–631.
238. Nabavi N, Freeman GJ, Gault A, Godfrey D, Nadler LM, Glimcher LH. Signalling through the MHC class II cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression. *Nature* 1992;360:266–268.
239. Lafferty KJ, Cunningham AJ. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1975;53:27–42.
240. Janeway CA Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54 Pt 1:1–13.
241. Janeway CA Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992;13:11–16.
242. Matzinger P. Tolerance, danger and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994;12:991–1045.
243. Ryser JE, MacDonald HG. Limiting dilution analysis of alloantigen-reactive T lymphocytes. I. Comparison of precursor frequencies for proliferative and cytolytic responses. *J Immunol* 1979;12:1691–1696.
244. Wilson D, Blyth J, Nowell P. Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats. V. Tempo and specificity of the proliferative response and the number of reactive cells from immunized donors. *J Exp Med* 1971;133: 442–453.
245. Sprent J. Fate of H-2 activated T lymphocytes in syngeneic hosts. I. Fate in lymphoid tissues traced with ^{3}H-thymidine, ^{125}I-deoxyuridine and ^{51}chromium. *Cell Immunol* 1976;21:278–302.
246. Sprent J. Miller JFAP. Fate of H-2-activated T lymphocytes in syngeneic hosts. III. Differentiation into long-lived recirculating memory cells. *Cell Immunol* 1976;21:314–326.
247. Webb S, Morris C, Sprent J. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 1990;63:1249–1256.
248. Kawabe Y, Ochi A. Programmed cell death and extrathymic reduction of Vβ8+ CD4+ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature* 1991;349:245–248.
249. Rocha B, Von Boehmer H. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 1991;251:1225–1228.
250. Russell JH, Rush B, Weaver C, Wang R. Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen stimulated suicide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:4409–4413.
251. Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 1995;377: 348–351.
252. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell

suicide mediated by APO-1 *Nature* 1995;373:438–441.
253. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-X_L. *Immunity* 1995;3:87–98.
254. Duke RC, Cohen JJ. IL-addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res* 1986;5:289–299.
255. Lenardo M. Interleukin-2 programs mouse αβ T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 1991;353:858–861.
256. Lindsten T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 1989;244:339–343.
257. Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 1991;251: 313–316.
258. Cai Z, Brunmark A, Jackson MR, Loh D, Peterson PA, Sprent J. Transfected Drosophila cells as a probe for defining the minimal requirements for stimulating unprimed CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14736–14741.
259. Boehme SA, Zheng L, Lenardo MJ. Analysis of the CD4 coreceptor and activation-induced costimulatory molecules in antigen-mediated mature T lymphocyte death. *J Immunol* 1995;155:1703–1712.
260. Vella AT, McCormack JE, Linsley PS, Kappler JW, Marrack P. Lipopolysaccharide interferes with the induction of peripheral T cell death. *Immunity* 1995;2: 261–270.
261. Nakata Y, Matusda K, Uzawa A, Nomura M, Akash M, Suzuki G. Administration of recombinant human IL-1 by Staphylococcus enterotoxin B prevents tolerance induction *in vivo*. *J Immunol* 1995;155:4231–4235.
262. Jiang H, Ware R, Stall A, Flaherty L, Chess L, Pernis B. Murine CD8⁻ T cells that specifically delete autologous CD4⁺ T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule. *Immunity* 1995;2:185–194.
263. Miller RA, Stutman O. T cell repopulation from functionally restricted splenic progenitors: 10,000-fold expansion documented by limiting dilution analysis. *J Immunol* 1984;133:2925–2932.
264. Rocha BB. Population kinetics of precursors of IL-2 producing peripheral T lymphocytes: evidence for short life expectancy, continuous renewal and postthymic expansion. *J Immunol* 1987;139:365–372.
265. Rocha B, Penit C, Baron C, Vasseur F, Dautigny N, Freitas AA. Accumulation of bromodeoxyuridine-labeled cells in central and peripheral lymphoid organs: minimal estimates of production and turnover rates of mature lymphocytes. *Eur J Immunol* 1990;20:1697–1708.
266. Tanchot C, Rocha B. The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8⁺ T cells pools. *Eur J Immunol* 1995;25: 2127–2136.
267. Tanchot C, Lemonnier FA, Perarnau B, Freitas AA, Rocha B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 1997;276:2057–2062.
268. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996;272:54–60.
269. Moskophidis D, Laine E, Zinkernagel RM. Peripheral clonal deletion of antiviral memory CD8⁺ T cells. *Eur J Immunol* 1993;23:3306–3311.
270. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 1993;362:758–761.
271. Kawabe Y, Ochi A. Selective anergy of Vβ8⁻ CD4⁺ T cells in staphylococcus enterotoxin B-primed mice. *J Exp Med* 1990;172:1065–1070.
272. Rellahan BL, Jones LA, Kruisbeek AM, Fry AM, Matis LA. *In vivo* induction of anergy in peripheral Vβ8⁻ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J Exp Med* 1991;172:1091–1100.
273. Rocha B, Grandien A, Freitas AA. Anergy and exhaustion are independent mechanisms of peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 1995;181:993–1003.
274. Rocha B, Tanchot C, Von Boehmer H. Clonal anergy blocks *in vivo* growth of mature T cells and can be reversed in the absence of antigen. *J Exp Med* 1993; 177:1517–1521.
275. Lanoue A, Bona C, Von Boehmer H, Sarukhan A. Conditions that induce tolerance in mature CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1997;185:405–414.
276. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990;248:1349–1356.
277. Boussiotis VA, Freeman GJ, Gray G, Gribben J, Nadler LM. B7 but not intercellular adhesion molecule-1 costimulation prevents the induction of human alloantigen-specific tolerance. *J Exp Med* 1993;178:1753–1763.
278. Boussiotis VA, Barber DL, Nakarai T, et al. Prevention of T cell anergy by signaling through the gamma c chain of the IL-2 receptor. *Science* 1994;266: 1039–1042.
279. Li W, Whaley CD, Mondino A, Mueller DL. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4⁺ T cells. *Science* 1996;271: 1272–1276.
280. Fields PE, Gajewski, TF, Fitch FW. Blocked ras activation in anergic CD4⁺ T cells. *Science* 1996;271:1276–1278.
281. Kang S-M, Beverly B, Tran A-C, Brorson R, Schwartz RH, Lenardo MJ. Transactivation by AP-1 is a molecular target of T cell clonal anergy. *Science* 1992; 257:1134–1138.
282. Boussiotis VA, Freeman GJ, Berezovskaya A, Barber DL, Nadler LM. Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* 1997;278:124–128.
283. Beverly B, Kang S-M, Lenardo MJ, Schwartz RH. Reversal of *in vitro* T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *Int Immunol* 1992;4:661–671.
284. Mueller DL, Chiodetti L, Bacon PA, Schwartz RH. Clonal anergy blocks the response to IL-4, as well as the production of IL-2, in dual-producing helper T cell clones. *J Immunol* 1991;147:4118–4125.
285. Sloan-Lancaster J, Evavold BD, Allen PM. Induction of T cell anergy by altered T-cell receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* 1993;363:156–159.
286. Sloan-Lancaster J, Shaw AS, Rothbard JB, Allen PM. Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of Zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* 1994;79:913–922.
287. Madrenas J, Wange RL, Wang JL, Isakov N, Samelson LE, Germain RN. Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* 1995;267:515–518.
288. Sloan-Lancaster J, Steinberg TH, Allen PM. Selective activation of the calcium signaling pathway by altered peptide ligands. *J Exp Med* 1996;184:1525–1530.
289. Madrenas J, Schwartz RH, Germain RN. Interleukin 2 production, not the pattern of early T-cell antigen receptor-dependent tyrosine phosphorylation, controls anergy induction by both agonists and partial agonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9736–9741.
290. Lamb JR, Skidmore BJ, Green N, Chiller JM, Feldmann M. Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. *J Exp Med* 1983;157:1434–1447.
291. O'Hehir RE, Yssel H, Verma S, de Vries JE, Spits H, Lamb JR. Clonal analysis of differential lymphokine production in peptide and superantigen induced T cell anergy. *Int Immunol* 1991;3:819–826.
292. LaSalle JM, Hafler DA. T cell anergy. *FASEB J* 1994;8:601–608.
293. Wotton D, Higgins JA, O'Hehir RE, Lamb JR, Lake RA. Differential induction of the NF-AT complex during restimulation and the induction of T-cell anergy. *Hum Immunol* 1995;42:95–102.
294. Otten G, Herold KC, Fitch FW. Interleukin 2 inhibits antigen stimulated lymphokine synthesis in helper T cells by inhibiting calcium-dependent signaling. *J Immunol* 1987;139:1348–1353.
295. Schwartz RH. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 1996;184:1–8.
296. Bhandoola A, Cho EA, Yui K, Saragoui HU, Greene MI, Quill H. Reduced CD3-mediated protein tyrosine phosphorylation in anergic CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol* 1993;151:2355–2367.
297. Hayden LA, Tough DF, Webb SR. *In vivo* response of mature T cells to Mls antigens. Long-term progeny of dividing cells include cells with a naive phenotype. *J Immunol* 1996;156:48–55.
298. Sundstedt A, Hoiden I, Rosendahl A, Kalland T, van Rooijen N, Dohlsten M. Immunoregulatory role of IL-10 during superantigen-induced hyporesponsiveness *in vivo*. *J Immunol* 1997;158:180–186.
299. Cauley LS, Cauley KA, Shub F, Huston G, Swain SL. Transferable anergy: superantigen treatment induces CD4⁺ T cell tolerance that is reversible and requires CD4⁻ CD8⁻ cells and interferon gamma. *J Exp Med* 1997;186:71–81.
300. Kündig TM, Shahinian A, Kawai K, et al. Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* 1996;5:41–52.
301. Hargreaves RG, Borthwick NJ, Montani MS, et al. Dissociation of T cell anergy from apoptosis by blockade of Fas/Apo-1 (CD95) signaling. *J Immunol* 1997; 158:3099–3107.
302. Singer A, Munitz TI, Golding H, Rosenberg AS, Mizuochi T. Recognition requirements for the activation, differentiation and function of T-helper cells specific for class I MHC alloantigens. *Immunol Rev* 1987;98:143–170.
303. Pfizenmaier K, Scheurich P, Däubener W, Krönke M, Röllinghoff M, Wagner H. Quantitative representation of all T cells committed to develop into cytotoxic effector cells and/or interleukin 2 activity-producing helper cells within murine T lymphocyte subsets. *Eur J Immunol* 1984;14:33–39.
304. Keene J, Forman J. Helper activity is required for the *in vitro* generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1982;155:768–782.
305. Guerder S, Matzinger P. Activation versus tolerance: a decision made by T helper cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54:799–805.
306. Rees MA, Rosenberg AS, Munitz TI, Singer A. *In vivo* induction of antigen-specific transplantation tolerance to Qa1 by exposure to alloantigen in the absence of T-cell help. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2765–2769.
307. Hou S, Mo XY, Hyland L, Doherty PC. Host response to Sendri virus in mice lacking class II major histocompatibility complex glycoproteins. *J Virol* 1995;69: 1429–1434.
308. Tripp RA, Sarawar SR, Doherty PC. Characteristics of the influenza virus-specific CD8⁻ T cell response in mice homozygous for disruption of the H-2I-A^b gene. *J Immunol* 1995;155:2955–2959.
309. Wu Y, Liu Y. Viral induction of co-stimulatory activity on antigen-presenting cells bypasses the need for CD4⁺ T-cell help in CD8⁺ T-cell responses. *Curr Biol* 1994;4:499–505.
310. Lafferty KJ, Prowse SJ, Simeonovic CJ, Warren HS. Immunobiology of tissue transplantation: a return to the passenger leukocyte concept. *Annu Rev Immunol* 1983;1:143–173.
311. Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, et al. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 1991;65:305–317.
312. Oldstone MBA, Nerenberg M, Southern P, Price J, Lewicki H. Virus infection

triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* 1991;65:319–331.
313. Schönrich G, Kalinke U, Momburg F, et al. Downregulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 1991;65:293–304.
314. Schönrich G, Momburg F, Malissen M, et al. Distinct mechanisms of extrathymic T cell tolerance due to differential expression of self antigen. *Int Immunol* 1992;4:581–590.
315. Alferink J, Schittek B, Schönrich PG, Hämmerling GJ, Arnold B. Long life span of tolerant T cells and the role of antigen in maintenance of peripheral tolerance. *Int Immunol* 1995;7:331–336.
316. Hanahan D, Jolicouer C, Alpert S, Skowronski J. Alternative self or nonself recognition of an antigen expressed in a rare cell type in transgenic mice: implications for self-tolerance and autoimmunity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54:821–835.
317. Lo D, Freedman J, Hesse S, Palmitter RD, Brinster RL, Sherman LA. Peripheral tolerance to an islet cell-specific hemagglutinin transgene affects both CD4⁻ and CD8⁺ T cells. *Eur J Immunol* 1992;22:1013–1022.
318. Kündig TM, Bachmann MF, DiPaolo C, et al. Fibroblasts as efficient antigen presenting cells in lymphoid organs. *Science* 1995;268:1343–1347.
319. Mackay CR, Marston WL, Dudler L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med* 1990;171:801–817.
320. Miller RG. The veto phenomenon and T cell regulation. *Immunol Today* 1986;7:112–114.
321. Miller RG, Derry H. A cell population in *nu/nu* spleen can prevent generation of cytotoxic lymphocytes by normal spleen cells against self antigens of the *nu/nu* spleen. *J Immunol* 1979;122:1502–1509.
322. Muraoka S, Ehman DL, Miller RG. Irreversible inactivation of activated cytotoxic T lymphocyte precursor cells by "anti-self" suppressor cells present in murine bone marrow T cell colonies. *Eur J Immunol* 1984;14:1010–1016.
323. Rammensee HG, Nagy ZA, Klein J. Suppression of cell-mediated lymphocytotoxicty against minor histocompatibility antigens mediated by Lyt1⁺ Lyt2⁺ T cells of stimulator strain origin. *Eur J Immunol* 1982; 12:930–934.
324. Fink PJ, Rammensee HG, Bevan MJ. Cloned cytolytic T cells can suppress primary cytotoxic responses directed against them. *J Immunol* 1984;133:1775–1781.
325. Claesson MH, Miller RG. Functional heterogeneity in allospecific cytotoxic T lymphocyte clones I. CTL clones express strong anti-self suppressive activity. *J Exp Med* 1984;160:1702–1716.
326. Fink PJ, Rammensee HG, Benedetto JD, Staerz UD, Lefrancois L, Bevan MJ. Studies on the mechanisms of suppression of primary cytotoxic responses by cloned cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1984;133:1769–1774.
327. Rammensee HG, Fink PJ, Bevan MJ. Functional clonal deletion of class I-specific cytotoxic T lymphocytes by veto cells that express antigen. *J Immunol* 1984;133:2390–2396.
328. Fink PJ, Weissman IL, Bevan MJ. Haplotype specific suppression of cytotoxic T cell induction by antigen inappropriately presented on T cells. *J Exp Med* 1983; 157:141–154.
329. Cassell DJ, Forman J. Regulation of the cytotoxic T lymphocyte response against Qa-1 alloantigens. *J Immunol* 1990;144:4075–4081.
330. Hambor JE, Kaplan DR, Tykocinski ML. CD8 functions as an inhibitory ligand in mediating the immunoregulatory activity of CD8⁺ cells. *J Immunol* 1990;145:1646–1652.
331. Sambhara SR, Miller RG. Programmed cell death of T cells signaled by the T cell receptor and the domain of class I MHC. *Science* 1991;252:1424–1427.
332. Zhang L, Martin DR, Fung-Leung W-P, Teh H-S, Miller RG. Peripheral deletion of mature CD8⁺ antigen-specific T cells after *in vivo* exposure to male antigen. *J Immunol* 1992;148:3740–3745.
333. Asherson GL, Stone SH. Selective and specific inhibition of 24 hour skin reactions in the guinea pig. I. Immune deviation: description of the phenomenon and the effect of splenectomy. *Immunology* 1965;9:205–217.
334. Parish CR, Liew FY. Immune response to chemically modified flagellin. III. Enhanced cell-mediated immunity during high and low zone antibody tolerance to flagellin. *J Exp Med* 1972;135:298–311.
335. Bretscher P. Hypothesis. On the control between cell-mediated, IgM and IgG immunity. *Cell Immunol* 1974;13:171–195.
336. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone: I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348–2357.
337. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145–173.
338. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787–793.
339. Gajewski TF, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 1988;140:4245–4252.
340. Oriss TB, McCarthy SB, Morel BF, Campana MA, Morel PA. Crossregulation between T helper cell (Th)1 and Th2: inhibition of Th2 proliferation by IFN-gamma involves interference with IL-1. *J Immunol* 1997;158:3666–3672.
341. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081–2095.
342. de Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 1993;150:4754–4765.
343. Locksley RM, Scott P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis induction, expansion and effector function. *Immunol Today* 1991;12:A58–A61.
344. Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania* major. *Science* 1992;257:539–542.
345. Mougneau E, Altare F, Wakil AE, et al. Expression cloning of a protective Leishmania antigen. *Science* 1995;268:563–566.
346. Julia V, Rassoulzadegan M, Glaichenhaus N. Resistance to Leishmania major induced by tolerance to a single antigen. *Science* 1996;274:421–423.
347. Seder RA, Paul WE, Davis MM, de St Groth BF. The presence of interleukin 4 during *in vitro* priming determines the lymphokine-producing potential of CD4⁺ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992;176:1091–1098.
348. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of Th1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993;260:547–549.
349. Gieni RS, Yang X, Kelso A, Hayglass KT. Limiting dilution analysis of CD4 T-cell cytokine production in mice administered native versus polymerized ovalbumin: directed induction of T-helper type-1-like activation. *Immunology* 1996; 87:119–126.
350. Kamogana Y, Minasi LA, Carding SR, Bottomly K, Flavell RA. The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell* 1993;75:985–995.
351. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing pheontype by CD4⁺ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994;12:635–673.
352. Bloom BR, Salgame P, Diamond B. Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol Today* 1992;13:131–136.
353. Seder RA, Boulay JL, Finkelman F, et al. CD8⁺ T cells can be primed *in vitro* to produce IL-4. *J Immunol* 1992;148:1652–1656.
354. Cremer MA, Hernandez AD, Townes AS, Stuart JM, Kang AH. Collagen-induced arthritis in rats: antigen-specific suppression of arthritis and immunity by intravenously injected native type II collagen. *J Immunol* 1983;131:2995–3000.
355. Scherer MT, Chan BMC, Ria F, Smith JA, Perkins DL, Gefter ML. Control of cellular and humoral immune responses by peptides containing T-cell epitopes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54:497–504.
356. Ptak W, Rozycka D, Askenase PW, Gershon RK. Role of antigen-presenting cells in the development and persistence of contact hypersensitivity. *J Exp Med* 1980; 151:362–375.
357. Eynon EE, Parker DC. Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens. *J Exp Med* 1992;175:131–138.
358. Streilein JW, Toews GT, Gilliam JN, Bergstresser PR. Tolerance or hypersensitivity to 2,4-dinitro-1-fluorobenzene: the role of Langerhans cell density within epidermis. *J Invest Dermatol* 1980;74:319–322.
359. Alcalay J, Craig JN, Kripe ML. Alterations in Langerhans cells and Thy1⁺ dendritic epidermal cells in murine epidermis during the evolution of ultraviolet radiation-induced skin cancers. *Cancer Res* 1989;49:4591–4596.
360. Chase M. Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent. *Proc Soc Exp Biol* 1946;61:257–259.
361. Wells HG. Studies on the chemistry of anaphylaxis (III). Experiments with isolated proteins, especially those of the hen's egg. *J Infect Dis* 1911;9:147–171.
362. Asherson GL, Zembala M, Perera MACC, Mayhew B, Thomas WR. Production of immunity and unresponsiveness in the mouse by feeding contact sensitizing agents and the role of suppressor cells in the Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and other lymphoid tissues. *Cell Immunol* 1977;33:144–155.
363. André C, Heremans JF, Vaerman JP, Cambiaso CL. A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: antigen-antibody complexes. *J Exp Med* 1975;142:1509–1519.
364. Higgins PJ, Weiner HL. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. *J Immunol* 1988;140:440–445.
365. Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both *in vitro* and *in vivo* immune responses by the release of transforming growth factor β after antigen-specific triggering. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:421–425.
366. Whitacre CC, Gienapp IE, Orosz CG, Bitar DM. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. *J Immunol* 1991;147:2155–2163.
367. Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 1995;376:177–180.
368. Friedman A, Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:6688–6692.
369. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;265:1237–1240.
370. Coffman RL, Lebman DA, Shrader B. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lym-

phocytes. *J Exp Med* 1989;170:1039 1044.
371. Bright JJ, Kerr LD, Sriram S. TGF-beta inhibits IL-2-induced tyrosine phosphorylation and activation of Jak-1 and Stat 5 in T lymphocytes. *J Immunol* 1997; 159:175–183.
372. Weiner HL, Friedman A, Miller A, et al. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol* 1994;12:809–837.
373. Okumura K, Tada T. Regulation of homocytotropic antibody response in the rat. VI. Inhibitory effect of thymocytes on the homocytotropic antibody response. *J Immunol* 1971;107:1682–1689.
374. Finkelman FD, Katona IM, Urban JF Jr, Snapper CM, Ohara J, Paul WE. Suppression of *in vivo* polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine BSF-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9675–9678.
375. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737–742.
376. Asano Y, Hodes RJ. T cell regulation of B cell activation. Cloned Lyt-1⁺2⁻T suppressor cells inhibit the major histocompatibility complex-restricted interaction of T helper cells with B cells and/or accessory cells. *J Exp Med* 1983;158: 1178–1190.
377. Cantor H, Shen FW, Boyse EA. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II. Activation by antigen: after immunization, antigen-specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T-cell subclasses. *J Exp Med* 1976:143:1391–1401.
378. Sandrig S, Laskay T, Anderson J, De Ley M, Andersson U. Gamma-interferon is produced by CD3⁺ and CD3⁻ lymphocytes. *Immunol Rev* 1987;97:51–65.
379. Bach BA, Sherman L, Benacerraf B, Greene MI. Mechanisms of regulation of cell-mediated immunity. II. Induction and suppression of delayed-type hypersensitivity to azobenzenearsonate-coupled syngeneic cells. *J Immunol* 1978;121: 1460–1468.
380. Qin S, Cobbold S, Benjamin R, Waldmann H. Induction of classical transplantation tolerance in the adult. *J Exp Med* 1989;169:779–794.
381. Qin S, Cobbold SP, Pope H, et al. "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 1993;259:974–977.
382. Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 1971; 21:903–914.
383. Davies JD, Martin G, Phillips J, Marshall SE, Cobbold SP, Waldmann H. T cell regulation in adult transplantation tolerance. *J Immunol* 1996;157:529–533.
384. Burnet FM, Stone JD, Edney M. The failure of antibody production in the chick embryo. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1950;28:291–297.
385. Nossal GJV. The immunological response of foetal mice to influenza virus. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1957;35:549–558.
386. Lubaroff DM, Silvers WK. Importance of chimerism in maintaining tolerance of skin allografts in mice. *J Immunol* 1973;111:65–71.
387. Silvers W. Is the presence and persistence of antigen required? In: *The tolerance workshop*, 1986, vol 1. Basel: Editiones Roche, 1987:122–126.
388. Mohler KM, Streilein JW. Tolerance to class II major histocompatibility complex molecules is maintained in the presence of endogenous, interleukin-2-producing, tolerogen-specific T lymphocytes. *J Immunol* 1987;139:2211–2219.
389. Powell TJ, Streilein JW. Neonatal tolerance induction by class II alloantigens activates IL-4-secreting, tolerogen-responsive T cells. *J Immunol* 1990;144: 854–859.
390. Goldman M, Feng H, Engers H, Hochman A, Louis J, Lambert PH. Autoimmunity and immune complex disease after neonatal induction of transplantation tolerance in mice. *J Immunol* 1983;131:251–258.
391. Merino J, Schurmans S, Duchosal M, Izui S, Lambert PH. Autoimmune syndrome after induction of neonatal tolerance to alloantigens: CD4⁺ T cells from the tolerant host activate autoreactive F_1 B cells. *J Immunol* 1989;143:2202–2208.
392. Schurmans S, Heusser CH, Qin H-Y, Merino J, Brighouse G, Lambert P-H. *In vivo* effects of anti-IL-4 monoclonal antibody on neonatal induction of tolerance and on an associated autoimmune syndrome. *J Immunol* 1990;145:2465–2473.
393. Chen N, Gao Q, Field EH. Prevention of Th1 response is critical for tolerance. *Transplantation* 1996;61:1076–1083.
394. Forsthuber T, Yip HC, Lehmann PV. Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice. *Science* 1996;271:1728–1730.
395. Coutinho A, Salaun J, Corbel C, Bandeira A, Le Douarin N. The role of thymic epithelium in the establishment of transplantation tolerance. *Immunol Rev* 1993; 133:225–240.
396. Uhr JW, Möller G. Regulatory effect of antibody on the immune response. *Adv Immunol* 1968;8:81–127.
397. Siskind GW, Dunn P, Walker JG. Studies on the control of antibody synthesis. II. Effect of antigen dose and of suppression by passive antibody on the affinity of antibody synthesized. *J Exp Med* 1968;127:55–66.
398. Ozaki S, Berzofsky JA. Antibody conjugates mimic specific B cell presentation of antigen: relationship between T and B cell specificity. *J Immunol* 1987;138: 4133–4142.
399. Manca F, Fenoglio D, Kunkl A, Cambiaggi C, Sasso M, Celada F. Differential activation of T cell clones stimulated by macrophages exposed to antigen complexed with monoclonal antibodies. A possible influence of paratope specificity on the mode of antigen processing. *J Immunol* 1988;140:2893–2898.
400. Fazekas de St Groth B, Webster RG. Disquisitions on original antigenic sin. I. Evidence in man. *J Exp Med* 1966;124:331–345.
401. Davenport FM, Hennessy AV, Francis T. Epidemiologic and immunologic significance of age distribution of antibody to antigenic variants of influenza virus. *J Exp Med* 1953;98:641–656.
402. Klinman NR, Press JL, Segal GP. Overlap stimulation of primary and secondary B cells by cross-reacting determinants. *J Exp Med* 1973;138:1276–1281.
403. Amigorena S, Bonnerot C, Drake JR, et al. Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* 1992;256:1808–1812.
404. D'Ambrosio D, Hippen KL, Minskoff SA, et al. Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc gamma RII B1. *Science* 1995;268:293–297.
405. Jerne N. Toward a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)* 1974;125C:373–389.
406. Holmberg D, Forsgren S, Forni L, Ivars F, Coutinho A. Reactions among IgM antibodies derived from normal neonatal mice. *Eur J Immunol* 1984;14: 435–441.
407. Logtenberg T, Kroon A, Gemlig-Meyling FHJ, Ballieux RE. Analysis of the human tonsil B cell repertoire by somatic hybridization: occurrence of both "monospecific" and "multispecific" (auto) antibody-secreting cells. *Eur J Immunol* 1987;17:855–859.
408. Vakil M, Kearney JF. Functional characterization of monoclonal auto-anti-idiotype antibodies isolated from the early B cell repertoire of BALB/c mice. *Eur J Immunol* 1986:16:1151–1158.
409. Souroujon M, White-Scharff ME, André-Schwartz J, Gefter ML, Schwartz RS. Preferential autoantibody reactivity of the preimmune B cell repertoire in normal mice. *J Immunol* 1988;140:4173–4179.
410. Lundkvist I, Coutinho A, Varela F, Holmberg D. Evidence for a functional idiotypic network among natural antibodies in normal mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5074–5078.
411. Pollok BA, Kearney JF. Identification and characterization of an apparent germline set of auto-anti-idiotypic regulatory B lymphocytes. *J Immunol* 1984; 132:114–121.
412. Marion TN, Dzierzak EA, Lee HS, Adams RL, Janeway CA Jr. Non-dinitrophenyl-binding immunoglobulin that bears a dominant idiotype (Id460) associated with antidinitrophenyl antibody is specific for an antigen on *Pasteurella pneumotropica*. *J Exp Med* 1984;159:221–233.
413. Augustin AA, Julius MH, Cosenza H. Changes in the idiotypic pattern of an immune response following syngeneic haemopoietic reconstitution of lethally irradiated mice. In: Sercarz E, Herzenberg LA, Fox C, eds. *ICN-UCLA symposia on molecular and cellular biology. Immune system: genetics and regulation*, vol VI. New York: Academic Press, 1977:195–199.
414. Sigal NH, Pickard AR, Metcalf ES, Gearhart PJ, Klinman NR. Expression of phosphorylcholine-specific B cells during murine development. *J Exp Med* 1977;146:933–948.
415. Etlinger HM, Heusser CH. T15 dominance in BALB/c mice is not controlled by environmental factors. *J Immunol* 1986;136:1988–1991.
416. Vakil M, Briles DE, Kearney JF. Antigen-independent selection of T15 idiotype during B-cell ontogeny in mice. *Dev Immunol* 1991;1:203–212.
417. Briles DE, Nahm M, Schroer K, et al. Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med* 1981;153:694–705.
418. Vandenbark A, Hashim G, Offner H. Immunization with a synthetic T-cell receptor V-region peptide protects against EAE. *Nature* 1989;341:541–544.
419. Howell MD, Winters ST, Olee T, Powell HC, Carlo DJ, Brostoff SW. Vaccination against experimental allergic encephalomyelitis with T cell receptor peptides. *Science* 1989;246:668–670.
420. Gaur A, Haspel R, Mayer PJ, Fathman CG. Requirement for CD8⁺ cells in T-cell receptor peptide-induced clonal unresponsiveness. *Science* 1993:259:91–94.
421. Sun D, Qin Y, Chluba J, Epplen JT, Wekerle H. Suppression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T cell interactions. *Nature* 1988;332:843–845.
422. Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 1977;25:1–54.
423. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 1992;356:63–66.
424. Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 1990;8:579–621.
425. Hart DNJ, Fabre JW. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* 1981;154:347–361.
426. Wong GHW, Barlett PF, Clark-Lewis I, Battye F, Schrader JW. Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature* 1984;310:688–691.
427. Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris JP. The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation* 1984;38: 287–292.
428. Mantegazza R, Gebbia M, Mora M, et al. Major histocompatibility complex class II molecule expression on muscle cells is regulated by differentiation: implications for the immunopathogenesis of muscle autoimmune diseases. *J Neuroimmunol* 1996;68:53–60.
429. Ohba Y, Fujikura Y, Sawada T, Tokuda N, Morimatsu M, Fukumoto T. Major histocompatibility complex expression in muscle of rats with graft-versus-host dis-

ease. *Histol Histopathol* 1996;11:97–102.
430. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995;377:630–632.
431. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;270:1189–1192.
432. Wilson SE, Li Q, Weng J, et al. The Fas-Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1582–1592.
433. Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, et al. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 1997;57:1007–1012.
434. Streilein JW. Immunological non-responsiveness and acquisition of tolerance in relation to immune privilege in the eye. *Eye* 1995;9:236–240.
435. Kosiewicz MM, Streilein JW. Intraocular injection of class II-restricted peptide induces an unexpected population of CD8 regulatory cells. *J Immunol* 1996;157:1905–1912.
436. Okamoto S, Hara Y, Streilein JW. Induction of anterior chamber-associated immune deviation with lymphoreticular allogeneic cells. *Transplantation* 1995;59:377–381.
437. Niederkorn JY, Mayhew E. Role of splenic B cells in the immune privilege of the anterior chamber of the eye. *Eur J Immunol* 1995;25:2783–2787.
438. Wang Y, Goldschneider I, Foss D, Wu DY, O'Rourke J, Cone RE. Direct thymic involvement in anterior chamber-associated immune deviation: evidence for a nondeletional mechanism of centrally induced tolerance to extrathymic antigens in adult mice. *J Immunol* 1997;158:2150–2155.
439. Beer AE, Billingham RE. Transplantation in nature. *Perspect Biol Med* 1979;22:155–169.
440. Medawar PB. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 1953;7:320–338.
441. Heape W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. *Proc R Soc Lond [Biol]* 1891;48:457–458.
442. Mintz B. Gene control of mammalian pigmentary differentiation. I. Clonal origin of melanocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967;58;344–351.
443. Witebsky E, Reich H. Zur gruppenspezifischen differenzierung der placentarorgane. *Klin Wochenschr* 1932;11:1960–1961.
444. Faulk WP, Temple A. Distribution of beta-2-microglobulin and HLA in chorionic villi of human placentae. *Nature* 1976;262:799–802.
445. Hunt JS, Yelavarthi KK, Yang Y, Fishback JL. Class I major histocompatibility genes in trophoblast cells: studies on expression, regulation and function. In: Chaouat G, Mowbray J, eds. *Cellular and molecular biology of the materno-fetal relationship*. Colloque Inserem, vol 212. London: John Libbey, Eurotex Ltd, 1991:51–59.
446. Wei X, Orr HT. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum Immunol* 1990;29:131–142.
447. Pazmany L, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis DM, Reyburn HT, Strominger JL. Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. *Science* 1996;274:792–795.
448. Crisa L, McMaster MT, Ishii KJ, Fisher SJ, Salomon DR. Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. *J Exp Med* 1997;186:289–298.
449. Billingham RE. Immunobiology of the maternal-fetal relationship. In: *Reproductive immunology*. New York: Alan R. Liss, 1981:63–75.
450. Hedley ML, Drake BL, Head JR, Tucker PW, Forman J. Differential expression of the class I MHC genes in the embryo and placenta during midgestational development in the mouse. *J Immunol* 1989;142:4046–4053.
451. Tafuri A, Alferink J, Moller P, Hämmerling GJ, Arnold B. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* 1995;270:630–633.
452. Runic R, Lockwood CJ, Ma Y, Dipasquale B, Guller S. Expression of Fas ligand by human cytotrophoblasts: implications in placentation and fetal survival. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3119–3122.
453. Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA, Miller L. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J Immunol* 1997;158:4122–4128.
454. Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993;151:4562–4573.
455. Doughty RW, Gelsthorpe K. An initial investigation of lymphocyte antibody activity through pregnancy and in eluates prepared from placental material. *Tissue Antigens* 1974;4:291–298.
456. Levine P, Burnham L, Katzin EM, Vogel P. The role of isoimmunization in the pathogenesis of erythroblastosis fetalis. *Am J Obstet Gynecol* 1941;49:925–937.
457. Voisin GA, Chaouat GJ. Demonstration, nature and properties of maternal antibodies fixed on placenta and directed against paternal antigens. *J Reprod Fertil* 1974;21[Suppl]:89–103.
458. Rocklin RE, Kitzmiller JL, Kaye MD. Immunobiology of the maternal-fetal relationship. *Annu Rev Med* 1979;30:375–404.
459. Breyere EJ, Barrett MK. Prolonged survival of skin homografts in parous female mice. *J Natl Cancer Inst* 1960;25:1405–1410.
460. Beer AE, Head JR, Smith WG, Billingham RE. Some immunoregulatory aspects of pregnancy in rats. *Transplant Proc* 1976;8:267–273.
461. Delassus S, Coutinho GC, Saucier C, Darche S, Kourilsky P. Differential cytokine expression in maternal blood and placenta during murine gestation. *J Immunol* 1994;152:2411–2420.
462. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996;106:127–133.
463. Clark DA, Flanders KC, Banwatt D, et al. Murine pregnancy decidua produces a unique immunosuppressive molecule related to transforming growth factor β-2. *J Immunol* 1990;144:3008–3014.
464. Clemens LE, Siiteri PK, Stites DP. Mechanism of immunosuppression on maternal lymphocyte activation during pregnancy. *J Immunol* 1979;122:1978–1985.
465. Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol 1995;155:128–133.*
466. Krishnan L, Guilbert LJ, Russell AS, Wegmann TG, Mosmann TR, Belosevic M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to Leishmania major infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J Immunol* 1996;156:644–652.
467. Krishnan L, Guilbert LJ, Wegmann TG, Belosevic M, Mosmann TR. T helper 1 response against Leishmania major in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. *J Immunol* 1996;156:653–662.
468. Hill JA, Polgar K, Anderson DJ. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA* 1995;273:1933–1936.
469. Chaouat G, Assal-Meliani A, Martal J, et al. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA and DBA/2 mating combination and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by *in vivo* injection of IFN-tau. *J Immunol* 1995;154:4261–4268.
470. Kabat EA, Wolf A, Bezer AE. The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *J Exp Med* 1947;85:117–130.
471. Rose NR, Witebsky E. Studies on organ specificity: V. Changes in the thyroid glands of rabbits following acute immunization with rabbit thyroid extracts. *J Immunol* 1956;76:417–427.
472. Dale JB, Beachey EH. Sequence of myosin-cross-reactive epitopes of streptococcal M proteins. *J Exp Med* 1986;164:1785–1790.
473. Kaplan MH, Bolande R, Rakita L, Blair J. Presence of bound immunoglobulins and complement in the myocardium in acute rheumatic fever. *N Engl J Med* 1964:271:637–645.
474. Cibotti R, Kanellopoulos JM, Cabaniols J-P, et al. Tolerance to a self-protein involves its immunodominant but does not involve its subdominant determinants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:416–420.
475. Pribyl TM, Campagnoni C, Kampf K, Handley VW, Campagnoni AT. The major myelin protein genes are expressed in the human thymus. *J Neurosci* 1996;45:812–819.
476. Fritz RB, Zhao ML. Thymic expression of myelin basic protein (MBP). Activation of MBP-specific T cells by thymic cells in the absence of exogenous MBP. *J Immunol* 1996;157:5249–5253.
477. Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 1990;8:579–621.
478. Rose NR, Herskowitz A, Neumann DA, Neu N. Autoimmune myocarditis: a paradigm of post-infection autoimmune disease. *Immunol Today* 1988;9:117–119.
479. Fujinami RS, Oldstone MB. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 1985;230:1043–1045.
480. Cole BC, Griffiths MM. Triggering and exacerbation of autoimmune arthritis bt the Mycoplasma arthritidis superantigen MAM. *Arthritis Rheum* 1993;36:994–1002.
481. Brocke S, Gaur A, Piercy C, et al. Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature* 1993;365:642–644.
482. Conrad B, Weissmahr RN, Böni J, Arcari R, Schüpbach J, Mach B. A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* 1997;90:303–313.
483. Castano L, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annu Rev Immunol* 1990;8:647–679.
484. Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, et al. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* 1997;89:17–24.
485. Katz JD, Wang B, Haskins K, Benoist C, Mathis D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 1993;74:1089–1100.
486. Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, Bach JF. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both $L3T4^+$ and $Lyt2^+$ T cells. *J Exp Med* 1987;166:823–832.
487. Harlan DM, Hengartner H, Huang ML, et al. Mice expressing both B7-1 and viral glycoprotein on pancreatic beta cells along with glycoprotein-specific transgenic T cells develop diabetes due to a breakdown of T-lymphocyte unresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3137–3141.
488. Guerder S, Picarella DE, Linsley PS, Flavell RA. Costimulator B7-1 confers antigen-presenting-cell function to parenchymal tissue and in conjunction with tumor necrosis factor α leads to autoimmunity in transgenic mice. *Proc Natl*

Acad Sci USA 1994;91:5138–5142.

489. Picarella DE, Kratz A, Li CB, Ruddle NH, Flavell RA. Transgenic tumor necrosis factor (TNF)-alpha production in pancreatic islets leads to insulitis, not diabetes. Distinct patterns of inflammation in TNF-alpha and TNF-beta transgenic mice. *J Immunol* 1993;150:4136–4150.
490. Sarvetnick N, Shizuru J, Liggitt D, et al. Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. *Nature* 1990;346:844–847.
491. Stewart TA, Hultgren B, Huang X, Pitts-Meek S, Hully J, MacLachlan NJ. Induction of type I diabetes by interferon-alpha in transgenic mice. *Science* 1993:260: 1942–1946.
492. Pujol-Borrell R, Todd I, Doshi M, et al. HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumor necrosis factor or lymphotoxin. *Nature* 1987;326:304–306.
493. Campbell IL, Oxbrow L, Harrison LC. Reduction in insulitis following administration of IFN-gamma and TNF-alpha in the NOD mouse. *J Autoimmun* 1991;4: 249–262.
494. Todd JA. Genetic control of autoimmunity in type-1 diabetes. *Immunol Today* 1990;11:122–129.
495. Acha-Orbea H, McDevitt HO. The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-Aβ chain is unique. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2435–2439.
496. Ridgway WM, Fasso M, Lanctot A, Garvey C, Fathman CG. Breaking self-tolerance in nonobese diabetic mice.*J Exp Med* 1996;183:1657–1662.
497. Reich EP, Sherwin RS, Kanagawa O, Janeway Jr CA. An explanation for the protective effect of the MHC class II I-E molecule in murine diabetes. *Nature* 1989; 341:326–328.
498. Schmidt D, Verdaguer J, Averill N, Santamaria P. A mechanism for the major histocompatibility complex-linked resistance to autoimmunity. *J Exp Med* 1997; 186:1059–1075.
499. Heath WR, Allison J, Hoffmann MW, et al. Autoimmune diabetes as a consequence of locally produced interleukin-2. *Nature* 1992:359:547–549.
500. Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 1992;358:155–157.
501. Smith SC, Allen PM. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *J Immunol* 1991;147:2141–2147.
502. Baum H, Davies H, Peakman M. Molecular mimicry in the MHC: hidden clues to autoimmunity? *Immunol Today* 1996;17:64–70.
503. Roudier C, Auger I, Roudier J. Molecular mimicry reflected through database screening: serendipity or survival strategy? *Immunol Today* 1996:17:357–358.
504. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80:695–705.
505. Lin R-H, Mamula MJ, Hardin JA, Janeway CA Jr. Induction of autoreactive B cells allows priming of autoreactive T cells. *J Exp Med* 1991;173:1433–1439.
506. Zal T, Weiss S, Mellor A, Stockinger B. Expression of a second receptor rescues self-specific T cells from thymic deletion and allows activation of autoreactive effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9102–9109.
507. Conrad B, Weidmann E, Trucco G, et al. Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature* 1994;371:351–355.
508. Murphy ED, Roths JB. Autoimmunity and lymphoproliferation: induction by mutant gene lpr and acceleration by a male-associated factor in strain BXSB mice. In: Rose NR, Bigazzi PE, Warner NL, eds. *Genetic control of autoimmune disease*. Amsterdam: Elsevier Science, 1979:207–220.
509. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991;66:233–243.
510. Roark JH, Kuntz CL, Nguyen KA, Canton AJ, Erikson J. Breakdown of B cell tolerance in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1995; 181:1157–1167.

第 21 章　Ⅰ型细胞因子、干扰素及其受体

Warren J. Leonard[①]

---

① W. J. Leonard: Laboratory of Molecular Immunology, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Heaith, Bethesda, Maryland 2089w-1964.

This chapter was written by Dr. Warren J. Leonard in his private capacity. No official support or endorsement by the NHLBI or NIH is intendednd none should be inferred.

概述及命名

741 细胞因子是由细胞分泌的蛋白质,通过自分泌或旁分泌的方式作用于自身或邻近细胞。细胞因子通过与细胞表面特异性受体结合,进而引起一系列细胞内信号传导,最终发挥其生物学活性。显然基于这种观742 点,不能将细胞因子、生长因子与激素严格地区分开来。现在普遍认为细胞因子与生长因子非常相近,不同的是细胞因子作用于白细胞,而生长因子则作用于其他体细胞;但是细胞因子与激素间则存在很大差异,细胞因子的作用较为局限,如T细胞与抗原呈递细胞(APC)相互作用时,产生的细胞因子仅在局部发挥效应,其在血循环中的半衰期亦很短,相反激素一旦被释出,便可通过血循环分布于全身,进而广泛作用于远处的靶器官。

在免疫系统中,最初"淋巴因子"、"单核因子"等概念被用来区分细胞因子的来源[1]。如首先发现白细胞介素-1(IL-1)由单核细胞分泌,故其称为单核因子;IL-2作为一种T细胞生长因子,被称为淋巴因子。但研究发现许多细胞因子可由不同类型的细胞分泌,逐渐暴露出这种命名法的不足。Stanley Cohen于1974年首次提出了"细胞因子"的概念。此概念是指一种由细胞分泌并作用于细胞,并产生多种生物学效应的因子,这些效应包括诱导细胞生长、分化、溶破、凋亡以及趋化等。"白细胞介素"这一概念指由白细胞分泌并作用于另一些白细胞的细胞因子,但有些白细胞介素(如IL-1、IL-6)亦可由其他细胞产生,IL-7则主要由基质细胞分泌。

在众多不同的细胞因子中,所有的Ⅰ型细胞因子具有相似的4个α螺旋(详见下文),相应地,它们的受体也具有特征性结构,因此被定义为受体超家族或Ⅰ型细胞因子受体[5~8]。多数细胞因子属于Ⅰ型细胞因子,仅少数不属于Ⅰ型细胞因子,如促炎因子IL-1、TNF-α和IL-6,前两者均不属于Ⅰ型细胞因子(第22章)。IL-8是一种趋化因子(第22章)。因此白细胞介素这一术语反映了对于白细胞的一种相关性,而Ⅰ型细胞因子的定义不仅要考虑其三维结构,还要考虑其受体结构及信号传导机制。

除了这些具有免疫功能的分子以外,另外有一些不具免疫功能的重要蛋白质,如生长激素、催乳素、红细胞生成素、血栓生成素及肥胖因子亦属于Ⅰ型细胞因子,它们的受体也属同一受体超家族成员。这些非免疫分子与具免疫功能的Ⅰ型细胞因子享有共同的信号传导通路。对于这组非免疫功能性细胞因子而言,本章更强调其进化过程与信号通路,而不是其共同功能,所以,尽管IL-6与IL-1、TNF-α有着许多相同的功能,但后两者的信号传导通路异于Ⅰ型细胞因子及其受体,故不将它们放在本章讨论。这里引出了一个重要概念,即不同的终末效应可通过多种信号传导通路来介导。

干扰素的研究可谓与细胞因子齐头并进。最初干扰素被认为是一种抗病毒因子,因而曾引起基础医学及临床应用医学的极大关注。后来人们逐渐认识到Ⅰ型细胞因子与干扰素具有一些共同的特征,因此本书首次将两者放在一起来介绍。国际干扰素协会已经更名为国际干扰素与细胞因子研究协会,国际细胞因子协会也将干扰素同其他细胞因子一起作为研究重点。

Ⅰ型细胞因子及受体

Ⅰ型细胞因子:结构概述

尽管不同Ⅰ型细胞因子间存在非常有限的氨基酸序列相似性,但通过核磁共振及X射线晶体照相技术证实Ⅰ型细胞因子具有相似的三维结构。对于部分结构尚未明了的Ⅰ型细胞因子,根据其模型及与已知结构比较分析,亦证实其具有相似的三维结构[5~8]。这些细胞因子的三维结构包含4个α螺旋(如图21.1所示),因此被称为4α螺旋束细胞因子。前2个螺旋(A与B)和后2个螺旋(C与D)通过长交叉环相互连接,若从N端到C端的方向看,A与B位于上方,C与D位于下方,从而形成"上上下下"的拓扑结构。图21.1中743 可见细胞因子分子的N端与C端位于分子的同一部位。

根据分子大小，可将Ⅰ型细胞因子分为短链组和长链组[8]。短链细胞因子包括IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、粒细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-7、IL-9、IL-13、IL-15、单核细胞集落刺激因子(M-CSF)及干细胞因子(SCF)，长链细胞因子则包括生长激素、泌乳激素、红细胞生成素、血栓生成素、肥胖因子、IL-6、IL-11、白血病抑制因子(LIF)、抑瘤素M(OSM)、毛状亲神经因子(CNTF)、心营养素-1(CT-1)及G-CSF(表21.1)[8,9]。短链细胞因子中螺旋长度为15个氨基酸，而长链组含有25个氨基酸。两组间除了螺旋长度的差异外，每对螺旋间的角度亦有差别：短链细胞因子中AB环位于CD环之下，而长链组恰好相反(图21.1)[7,8,10]。短链细胞因子的AB及CD环中还具有β折叠结构，而长链细胞因子则无此结构。该分组方法有进化上的意义，亦与Ⅰ型细胞因子两个亚家族的受体链的分类有关。现已证实短链细胞因子有61个氨基酸残基参与了组建家族框架，其中包括形成分子内部隐匿性核心的31个氨基酸残基的绝大部分。IL-2、IL-4与GM-CSF分子结构间的异同已被详细阐明[6]，这些分子中起稳定结构作用的二硫键存在着极大的多样性，例如：IL-4含3个链内二硫键，GM-CSF中有2个，IL-2仅含1个；在IL-4中，第1个二硫键(24与65残基之间)将AB环与BC环相连，第2个二硫键(位于46与99残基之间)连接B螺旋与CD环，第3个二硫键(位于3与127残基间)将B螺旋之前的残基连接到D螺旋上；在GM-CSF分子中，其中1个二硫键连接B螺旋的N端与CD环β片层的N端，而另1个二硫键则连接C螺旋的C端与D螺旋的延展部分；在IL-2中，位于58与105残基间惟一二硫键将B螺旋连接在CD环上。虽然在这些细胞因子中包含不同的二硫键以稳定其结构，但它们都有一典型特征即B螺旋均连接在C、D螺旋间的环上。由于螺旋内角度不同，A、D螺旋形成的结构较B、C螺旋更具高度保守性。D螺旋及其连接区在这三种细胞因子分子中是最保守的[6]。基于生长激素受体的结构分析发现，Ⅰ型细胞因子中A、D螺旋以及AB、CD环上的残基对于细胞因子β受体间的相互作用非常关键，而B、C螺旋并不参与直接作用[6]。

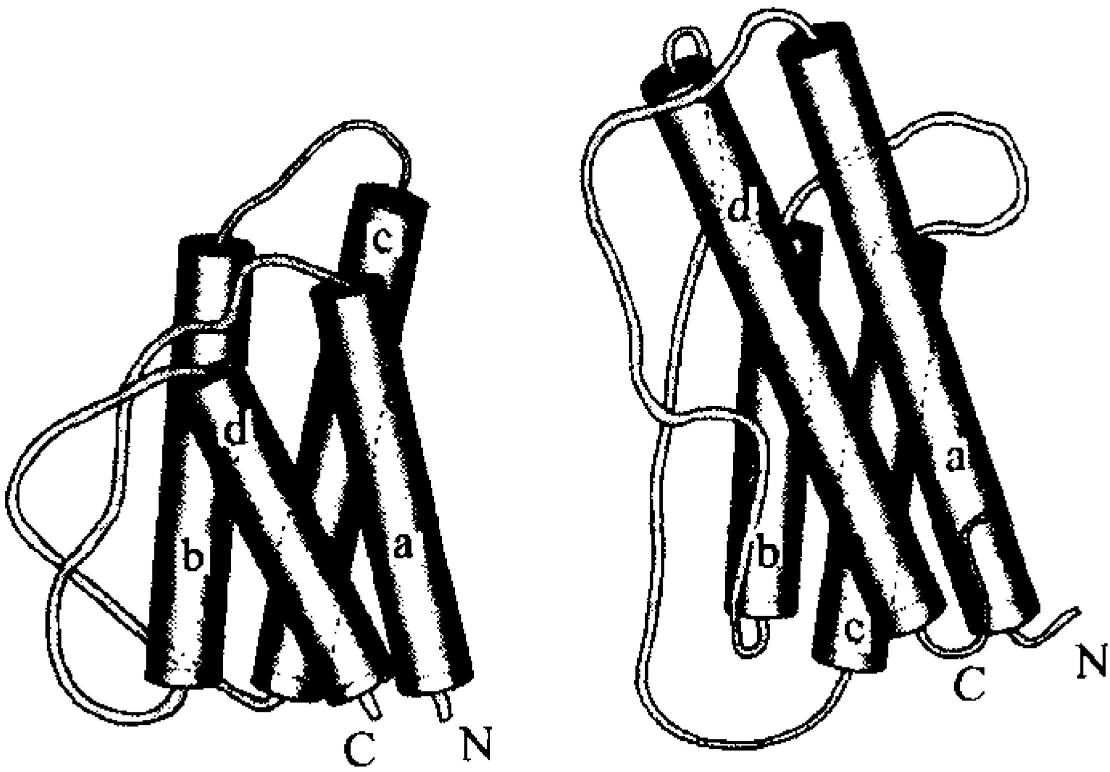


图21.1 4α螺旋束细胞因子。图中显示了典型的短链及长链的4螺旋束细胞因子结构。尽管它们的α螺旋均显示了一种"上上下下"的拓扑结构，但在短链细胞因子中，AB环在CD环之后，而长链细胞因子则正好相反。

表21.1 具有4螺旋结构束的细胞因子

短链型细胞因子	长链型细胞因子
IL-2	IL-6
IL-4	IL-11
IL-7	抑瘤素 M
IL-9	白血病抑制因子
IL-13	CNTF
IL-15	心营养素-1
IL-3	生长激素
IL-5[a]	泌乳刺激素
GM-CSF	EPO
M-CSF[a,b]	TPO
SCF[b]	leptin
	G-CSF

[a]二聚体。

[b]与其他4螺旋束细胞因子不同的是，M-CSF及SCF的受体(分别是CSF-1R和c-kit)具有酪氨酸激酶活性，不是Ⅰ型细胞因子受体。

上述典型结构也会发生某一特定变化。例如，IL-5为二聚体，N、C端并列[11]，D螺旋在两个共价连接的单体分子间"互换"，使得每个单体含有对方分子的一部分[11]。M-CSF亦为二聚体，但并不发生D螺旋的交换。干扰素(IFN)虽在结构上与Ⅰ型细胞因子有一些相似性，但仍有显著差异，故被划为Ⅱ型细胞因子。IFN-β另含有一螺旋取代CD片层的位置[12]，IFN-γ是由2个含6螺旋的单体组成的二聚体，每个单体中有1个螺旋与对方发生内部交换，如图21.2所示。IL-10与IFN-γ具有相似的结构[14]。有趣的是大多数螺旋形细胞因子含有4个外显子，A螺旋位于外显子1，B、C螺旋位于外显子3，D螺旋位于外显子4[7]。在IFN-γ、长链螺旋细胞因子、生长激素与G-CSF中已经发现了相关结构。但也有例外，如IL-15含有5个外显子，IFN-β仅含1个外显子，无内含子[7]。

744

Ⅰ型细胞因子受体

最初人们仅认识到Ⅰ型细胞因子受体与红细胞生成素受体及IL-2受体β链具有某些共同特征[15]，但有

关大量Ⅰ型细胞因子受体的研究使得人们对于这个全新的超家族有了更为清楚的认识[16]。Ⅰ型细胞因子受体一般是跨膜糖蛋白(N端位于胞外,C端位于胞内),惟一例外是CNTF受体α链,该蛋白质分子缺少胞内区,但含有糖基化磷酸肌醇(GPI)锚位,其定位与Ⅰ型膜蛋白相似。Ⅰ型细胞因子受体胞外区具有相似性(表21.2),包括4个保守的半胱氨酸残基(可能参与组成链内二硫键)及色氨酸残基(是位于第二个保守性半胱氨酸后两个氨基酸的C端)。另外发现近膜处的WSXWS(trp-ser-X-trp-ser)基序亦有保守性,生长激素受体是一例外,其相应位置的基序是YGEFS(trp-gly-glu-phe-ser)。

表21.2 Ⅰ型细胞因子受体的共性

胞外结构域
4个保守的氨基酸残基参与链中二硫键的形成
WSXWS基序
Ⅲ型纤维素模式
胞质结构域
盒1/盒2区——盒1区富含脯氨酸,参与受体和Janus家族酪氨酸激酶的相互作用

对于一些受体的分析提示:两组半胱氨酸由2个相邻的外显子编码,含WSXWS基序的外显子位于编码跨膜功能域的外显子5′端。尽管丝氨酸可由6种密码子编码(即六重简并密码子用法),而用于编码WSXWS基序中丝氨酸的密码子却极有限,仅有6种可能中的2种密码子(AGC、AGT)。通过特定配体及克隆表达技术可以克隆出许多已知受体,而对于一些新发现的受体如IL-11R[17、18]、IL-13R[19]及抑瘤素M受体[20],则可根据WSXWS基序的有限退化,应用PCR技术将其cDNA克隆出来。Ⅰ型细胞因子受体的另一个共同的特征是含有纤维连接蛋白Ⅲ型结构域。简并密码子IL-2、IL-5及GM-CSF受体享有共同细胞因子受体β链(βc),其胞外区较长,包括含4个保守半胱氨酸及WSXWS基序的重复序列。

总之,同细胞因子类似,不同的受体分子如已知结构的生长激素受体、泌乳激素受体及促红细胞生长素受体[21~23],和其他细胞因子受体模型,其序列相似性是极有限的,然而,它们却形成了相似的结构,亦即:不同的Ⅰ型细胞因子尽管有着大相径庭的序列,但具有密切相关的结构,不同的Ⅰ型细胞因子受体亦如此。但应注意,目前惟一被弄清楚结构的细胞因子受体是长链Ⅰ型细胞因子受体。基于不同细胞因子具有可与相应同源受体作用的不同氨基酸序列,可推断细胞因子与其受体是共同进化的。下面还会阐明,有时尽管氨基酸序列不同,但许多细胞因子可与同一受体作用,因此可将这些细胞因子及其受体划分为亚家族。

除了上述胞外区具有相同点外,较为保守的胞内序列亦有相似点。尤其是近膜区如Box1/Box2保守区,其中富含脯氨酸的Box1区显示出高度保守性,这将在以后作详细讨论。

结构为同型二聚体、异型二聚体或多聚体的Ⅰ型细胞因子

生长激素受体是第一个结构被阐明的细胞因子受体,最初认为生长激素与其受体是按1:1的比例结合的,但后来应用X射线晶体衍射分析证实单个生长激素分子与受体二聚体结合,其中每个受体单体中有7个β片层参与结合作用。最惊人的发现是生长激素分子中不同的部分可与受体单体上相同的区域作用,图21.2中显示了生长激素与受体的三维X射线晶体结构,弄清楚结构也有助于阐明生长激素受体聚合的基础[21]。从动力学角度讲,生长激素首先与第一受体单体通过一个较大且高亲和力的接触面(面积约1230Å^2)相作用(位点Ⅰ);然后,第二单体与先前形成的生长激素-受体复合体作用,有2个接触位点:一个在生长激素上(约900Å^2,位点Ⅱ),另一个在第一受体单体上(约500Å^2,位点Ⅲ),非常接近胞膜。经过这三步胞外作用,最终形成生长激素-受体复合物。理论上讲,位点Ⅰ的变异可阻止受体结合,位点Ⅱ变异可潜在地阻止二聚体形成及信号转导,这就为拮抗剂的设计提供了理论依据。

从生长激素受体结构分析中可看出,其胞外结构域由2个纤维连接蛋白Ⅲ型模块(module)构成,每个约100个氨基酸,,包含7个β片层,形成一种免疫球蛋白(Ig)样结构,受体与配体接触位点位于铰链区,后者将2个模块分开。从生长激素-催乳素受体复合物的结构分析中发现催乳素受体具有相似的结构[22]。

在生长激素研究领域,对生长激素-生长激素受体结构的研究无疑是重要的,然而该结构作为所有Ⅰ型生长因子受体的结构模型显得更为重要。可将生长因子受体形成的同型二聚体作为其他受体同型二聚体如EPO受体(其结构已阐明)[23]的模式,EPO受体复合体利用一种EPO模拟物,即一个小分子蛋白质(含20个

745

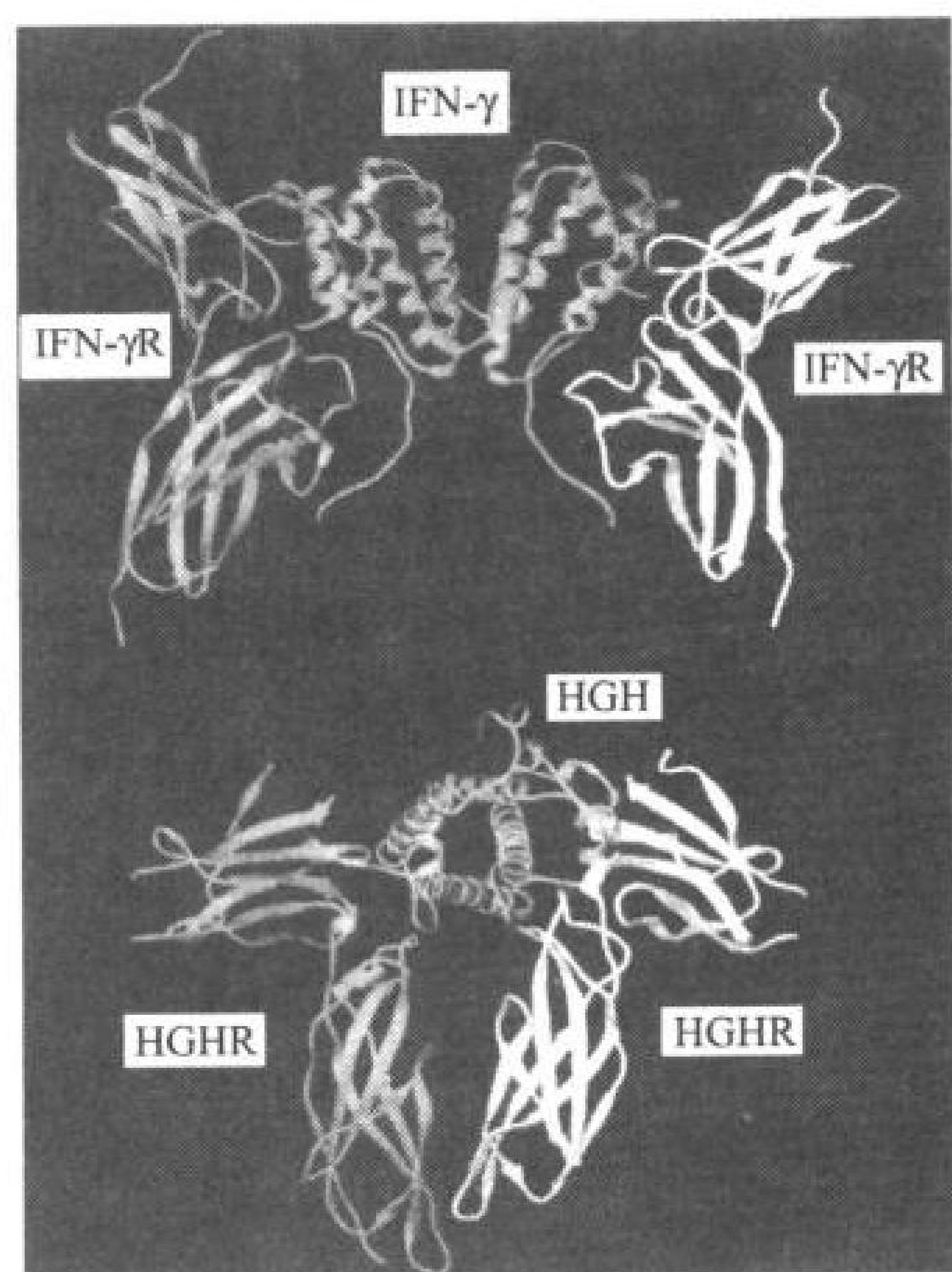


图 21.2 生长激素和 IFN-γ 受体结构的带状图。上为 IFN-γ 受体结构，代表Ⅱ型细胞因子受体；下为生长激素受体，为Ⅰ型细胞因子受体的代表。在 IFN-γ 受体结构图中，仅显示了 IFNGR-1 与 IFN-γ 二聚体结合形成的复合体，因为目前尚未发现该复合体与 IFNGR-2 形成的完整结构。生长激素受体结构图显示了 2 个受体单体。生长激素-生长激素受体结构出自参考文献[21]，IFN-γ-IFNGR-1 结构来自参考文献[221]。

氨基酸的多肽）得已阐明，这种模拟物是由随机噬菌体展示肽库及亲和力选择方法得来的[25]。这直接证明了一个小分子不但可以模拟 EPO 的功能，而且可诱导 EPO 受体二聚体形成一种类似生长激素受体的结构，但两者间有一个最大的差别是：EPO 受体位点Ⅲ作用表面只有 75Å^2，远小于生长激素受体[23]。

从有关生长激素-生长激素受体/催乳素受体（即一个生长激素受体单体被催乳素受体取代而形成的异型二聚体）的结构研究中[22]，发现异型二聚体亦可具有与生长激素受体[21]、EPO 受体[23]及其他一些同型二聚体相似的结构。生长激素及其受体系统中，生长激素的 2 个部位可与同一受体链作用，因而被视为一个特殊系统。从生物进化的角度上讲，我们有理由认为同型二聚体的出现早于异型二聚体，而 2 条不同受体链间的协调反映了受体特化水平的提高。因为Ⅰ型细胞因子及其受体是同一超家族的成员，假设所有受体分子皆由原始的Ⅰ型受体分子衍化而来，那么认为原始的Ⅰ型受体系统包括同型二聚体受体，也是合理的。生长激素与红细胞生成素分别对于身体发育及红细胞生成至关重要，与之结合的受体均为同型二聚体，然而后来异型二聚体的出现代表了免疫系统的进化，其功能更加特异化。

有趣的是，几乎所有与同型二聚体作用的螺旋型细胞因子（如生长激素、催乳素、红细胞生成素及 G-CSF）皆为长链细胞因子，但也有个别长链螺旋细胞因子（如受体中含有糖蛋白（gp）130 的细胞因子），与异型二聚体或异多聚体作用。与同二聚体发生作用的短链细胞因子包括 SCF 与 M-CSF，但它们的受体（c-kit 与 CSF-1R）与Ⅰ型细胞因子受体不同，区别在于这些受体分子分子内包含固有的酪氨酸激酶功能域，因此 SCF 与 M-CSF 也不属于典型的Ⅰ型细胞因子。

从对生长激素受体结构的分析中，容易设想受体异型二聚体的形成是由于细胞因子与之结合的相应位点Ⅱ发生了演变，与位点Ⅰ相比，变化了的位点Ⅱ可结合不同的受体分子。这种假说对于许多细胞因子，包括几乎所有的短链Ⅰ型细胞因子（SCF 与 M-CSF 除外），亦成立。很明显，细胞因子可被分为若干组，每组中至少共有一种受体成分即共同链，对于一些特殊的细胞因子而言，共同链既与位点Ⅰ作用，又与位点Ⅱ作用。

Ⅰ型细胞因子受体家族及近亲

共享受体 γ 链的细胞因子

IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 和 IL-15 等 5 种短链 4 螺旋因子具有重要的免疫学功能（其基本特征列于表 21.3），它们的受体均含有受体 γ 链——γc（CD132）[26~27]。本节先简要介绍这些细胞因子及其受体特有链的性质，

然后再讨论共同链的发现及其意义。

最初被发现并视为T细胞生长因子(TCGH)[38]的成熟IL-2是含133个氨基酸的多肽,仅由活化的T细胞产生,是主要的T细胞生长因子。其他重要功能包括促进B细胞合成免疫球蛋白及J链的转录[39~41]、促进NK细胞的溶胞作用[42~45]、诱导淋巴因子活化的杀伤细胞(lymphokine-activated killer,LAK)溶胞活性(表21.3)。

表21.3 具有共同链γc的细胞因子的特征

细胞因子	主要来源	大小[a]	功能[b]	染色体定位(h/m)	基因组成
IL-2	活化的T细胞(Th1)	h153aa/20aa m169aa/20aa 15.5kDa	T细胞生长因子 促B细胞生长、Ig产生、J链表达 诱导Lak活性 诱导肿瘤浸润性淋巴细胞活性 增强NK细胞活性;刺激巨噬/单核细胞抗瘤效应	4q26-27/3	4个外显子
IL-4	活化的T细胞(Th2)CD4$^+$ NK1.1$^+$自然T细胞	h153/24aa m140aa/20aa 18kDa	促进B细胞增殖,IgG1、IgE、MHC Ⅱ、FcεRⅡ、IL-4Rα、IL-2Rβ的表达;促进Th2细胞分化及抗瘤效应	5q31.1/11	4个外显子
IL-7	体细胞	h177aa/25aa m154aa/25aa 17~25kDa	促进胸腺细胞、T细胞、小鼠前B细胞生长	8q12-13/3	6个外显子
IL-9	活化的Th细胞	h144aa/18aa m144a/18aa 14kDa	促进Th克隆生长;促进干红细胞、B细胞、肥大细胞、胎儿胸腺细胞生长	5q31.1/13	5个外显子
IL-15	单核细胞和许多非免疫细胞	h162aa/48aa m162aa/48aa 14~15kDa	促进肥大细胞生长,NK细胞发育及活化,T细胞增殖	4q31/8	5个外显子

[a] h与m分别指人和鼠。氨基酸数量指读框长度/信号肽长度。成熟蛋白的氨基酸数目不同与这些数目。IL-15的第1~29位残基为信号肽,30~48位残基为前肽。

[b] 与胸腺或脾比较,骨骼肌、肾、胎盘及肺产生更多的IL-15mRNA。值得一提的是,IL-15mRNA被广泛表达,但并不都伴随IL-15蛋白的产生,因此表达IL-15mRNA的细胞并非都必须产生具有生物学功能的IL-15。

IL-2是第一个被克隆的Ⅰ型细胞因子[46],其受体亦是第一个被克隆的受体分子[47,48],因而具有重要的历史性意义。在对IL-2的研究中,发现了一些普遍规律:该因子与内分泌及生物化学研究中的生长因子类似,可与高亲和力的特异性受体结合,并以一种生长因子样模式发挥作用[49]。

静止状态的T细胞不分泌IL-2,一旦其受到抗原呈递的刺激后,便能快速而大量的分泌IL-2。因此IL-2的转录与合成常被用来作为T细胞活化的标志。尽管T细胞免疫反应的特异性由抗原决定,但其反应的强度和持续时间却是由IL-2与IL-2受体相互作用来调节的,这种调节是基于IL-2产生的量、高亲和力受体的表达水平及IL-2分泌和其受体表达的维持时间等因素[49]。IL-2以自分泌或旁分泌的方式发挥作用,编码IL-2的基因定位于4号染色体[50],含有4个外显子[7]。

IL-2可与三种受体结合,这三种受体分别由3条链——α[47,48,51]、β[52~55]与γ链交错连接而形成的。其中的γ链即为共同链γc(gc)[28,34~37],后面将详细讲述。

IL-4与IL-2类似,主要由活化的CD4$^+$T[56]细胞产生,亦可由CD4$^+$NK1.1$^+$T细胞、肥大细胞及嗜碱性粒细胞分泌[57]。IL-4是主要的B细胞生长因子,在Ig类型转换中起关键作用,能增强IgG1及IgE的产生和分泌[56~60],可诱导MHC Ⅱ类分子的表达,并可增强FcεRⅡ(CD23)在B细胞表面的表达。除了对B细胞的作用外,IL-4亦可作为T细胞生长因子,诱导人与小鼠T细胞增殖。另外,IL-4可抑制细胞与IL-2间的特异性反应,还可作用于MΦ、造血前体细胞、基质细胞和成纤维细胞。人IL-4含129个氨基酸,定位于5号染色体

746

(5q23.3 ~ 31.2)，而鼠 IL-4 定位于 11 号染色体，与 IL-3、IL-5、GM-CSF 定位区域相同。T 细胞及其他造血细胞上的 IL-4 受体由分子质量为 140kDa 的 α 链及 γc 组成，被称为Ⅰ型 IL-4 受体。IL-4 受体 α 链的表达很低，即使是与 IL-4 作用较强的细胞也仅表达几百个受体分子。IL-4 受体的另一种形式由 IL-4Rα 与 IL-13Rα(现称为 IL-13Rα1)组成，不在 T 细胞上表达，而是表达在其他细胞上，可将 IL-4 信号传递给这些细胞。

IL-7 不属于淋巴因子，它由基质细胞产生，主要作用是促进胸腺细胞生长、发育及分化，对于成熟 T 细胞的生长亦有一定作用，是重要的鼠前 B 细胞生长因子，但对人前 B 细胞的作用还不确切。研究表明，在人 IL-7 信号传导缺陷(X 连锁重症联合免疫缺陷)的患者体内，B 细胞虽离开了 IL-7 的作用，但仍可正常发育，提示 IL-7 对人前 B 细胞的生长发育并非必需。IL-7 含有 152 个氨基酸，定位于 8 号染色体，其功能受体由分子质量为 75kDa 的 IL-7Rα 及 γc 组成。化学交联实验及斯卡查德分析(Scatchard analysis)表明，可能存在第三种受体成分。

IL-9 最初被视为鼠的 T 细胞生长因子[78]，人、鼠的 IL-9 皆含 126 个氨基酸[78,79]。它由活化的 T 细胞产生，可促进 Th 克隆的发育，但对 Tc 克隆无作用[80,81]，其出现较 IL-2 晚，提示它可能是后期出现的第二信号。研究认为小鼠的 IL-9 存在于脾细胞提取物中，可作用于红系祖细胞、B 细胞、肥大细胞及胚胎胸腺细胞 IL-9 可促进肥大细胞的发育，IL-9 亦可协同 IL-3 促进细胞的最大增殖[80]。体外可观察到 IL-9 对胸腺细胞的作用，IL-9 转基因小鼠可发生胸腺肉瘤(thymomas)，同时 IL-9 亦是胸腺淋巴肉瘤(thymic lymphomas)的主要抗凋亡因子。与 IL-2 相反，小鼠 IL-9 亦可对人起作用，但人的 IL-9 对小鼠却无作用。人的 IL-9 定位于 5 号染色体 5q31 ~ 35[84]，与 IL-3、IL-4、IL-13、GM-CSF 定位区域相同。而鼠的 IL-9 单独定位于 13 号染色体[80]，IL-3、IL-4 与 6M-GSF 则均定位于 11 号染色体。IL-9 与分子质量为 64kDa 的 IL-9Rα 结合蛋白(BP)相结合，BP 大小与 γc 类似[85]，其功能性受体 IL-9Rα 由 IL-9R 及 γc 组成，它可与 IL-9 以 100pM 的 K_d 结合[31,32]。

IL-15 是这些细胞因子中最晚发现的一个[86,87]，其受体表达广泛，其 mRNA 可在多种非淋巴细胞中转录，但检测 IL-15 蛋白的产生却很困难，其生理性来源尚需进一步研究。现已认识到 IL-15 对 NK 细胞的发育及其溶胞功能有促进作用[89~92]。T 细胞上的 IL-15 受体由 IL-2Rβ、γc[93] 及 IL-15Rα 组成，IL-15R 与 IL-2Rα 在结构上有某些相似之处[94]，编码它们的基因紧密连锁[95]。从肥大细胞上已检测到还有另一种形式的 IL-15R 存在，记为 IL-15RX[96]，它具有特异的信号传导特征，但其 mRNA 尚未克隆出。多种受体形式存在的现象表明，不同细胞系可诱导产生不同的 IL-15 信号。

总之，这 5 种细胞因子对于 T 细胞、NK 细胞、B 细胞及肥大细胞发挥了共同的促进发育、维持细胞正常生理功能的作用。这 5 种细胞因子含有共同的成分——γc，在此做一个历史性的回顾是有意义的。

γc 突变引起的 X 连锁重症联合免疫缺陷病

在弄清仅有 IL-2Rα、β 链不足以正常传递一个 IL-2 信号之后，证实了 IL-2 受体中还存在第三种成分即 γ 链[26]。在对 IL-2 及 γc 表达缺陷患者的临床表现对比中提出了 γ 链是共同链的假说。1993 年，有人报道定位于 X 染色体上的 γ 链发生突变，可导致 X 连锁重症联合免疫缺陷病(X-linked severe combind immunodeficiency，XSCID，最初被命名为 SCIDX1[97]，见第 43 章)。XSCID 的特征有：T 细胞和 NK 细胞数量显著减少(表 21.4)，B 细胞虽数量正常，但由于缺乏 T 细胞辅助及 B 细胞自身缺陷，而丧失正常功能，单纯辅加 T 细胞不能纠正。与 XSCID 表现相反，IL-2 缺陷时人及小鼠 T 细胞数量正常(Ⅰ、Ⅱ型细胞因子及受体，Jak 激酶，STAT 蛋白等缺陷的小鼠表型见表 21.5)。这一现象似乎表明 XSCID 并非由 IL-2R 某种组分缺陷而引起的，所以更难将其归因于 γ 链的缺陷[97]。故产生了这样一个疑问：为什么仅是受体某一组分的缺陷所引起的后果竟比整个细胞因子缺陷更为严重呢？显然可以推测，γ 链同样也是其他重要细胞因子受体的组成部分，γ 链缺陷引起的多种细胞因子信号通路失活是 XSCID 发病的原因[35,97,100,104]。最初人们认为 γ 链在 IL-4 及 IL-7 的信号传导中发挥重要作用，其理由如下[35,100]。

① IL-7 为主要的胸腺生长因子，因此，IL-7 的信号传导缺陷便成为 T 细胞发育缺陷的基础。

② IL-4 与 IL-7 的信号传导缺陷可用来解释 B 细胞功能缺陷，理由是：a. 将 T 细胞行骨髓移植后，并不能改善

XSCID 患者的 B 细胞功能，说明 B 细胞存在一种自身缺陷；b. 基于 XSCID 女性携带者体内的表面 IgM + 初始 B 细胞表现出 X 染色体随机失活，而表面 IgM^- 的成熟 B 细胞却出现非随机的 X 染色体失活的现象（即具有活性携带野生型 γ 链的 X 染色体的 B 细胞才能成熟）[98]，发现 γ 链是 B 细胞终末分化所必需的。

表 21.4 XSCID 的特征

表 21.4 XSCID 的特征
T 细胞缺乏或数量深度减少，丝裂原反应减弱；
缺乏 NK 细胞；
B 细胞数目正常，但 B 细胞功能不全；
IgM 正常，但其他类型 Ig 缺乏；
XSCID 女性携带者表现出 T、NK 细胞的非随机 X 染色体失活。在 IgM^+ B 细胞中，X 染色体失活表现为随机，而在更多的终末分化的 B 细胞中，仍为非随机

③研究的同时，人们证实了 IL-4[63~65] 和 IL-7[77] 两者受体共享一条链，可合理推测存在第二条Ⅰ型细胞因子受体链可能组成受体的一部分。

④像 IL-2 一样，IL-4、IL-7 都有 T 细胞生长因子的作用，其共同的作用可能由“共同链”来完成。

⑤有时 IL-2 与 IL-4 的作用相反，从它们竞争有限数量的共同受体组分的角度，有助于解释两者作用相拮抗的机制。

通过化学交联实验和对 IL-4Rαγc 或 IL-7Rαγc 重组细胞的 Scatchard 分析及功能性分析，证实 γ 链是 T 细胞上 IL-4 受体与 IL-7 受体中必需的功能性组分[27~30]。考虑到 γ 链在多方面的作用，将其重新命名为细胞因子受体共同链 γc[28,29]。后来相继发现：另一种 T 细胞生长因子 IL-9 的受体中也含有 γc；T 细胞上 IL-15 受体的组成与 IL-2 类似，两者均含有 IL-2 受体 β 链及 γc，但含有不同的 α 链，与 IL-2 相比，IL-15 在与其受体的结合作用中，更依赖受体中的 α 链，原因是 IL-15-IL-2Rβ-γc 复合体的稳定性比 IL-2-IL-2Rβ-γc 差[105]。这样，至少有 5 种细胞因子的受体包含 γc（图 21.3）。

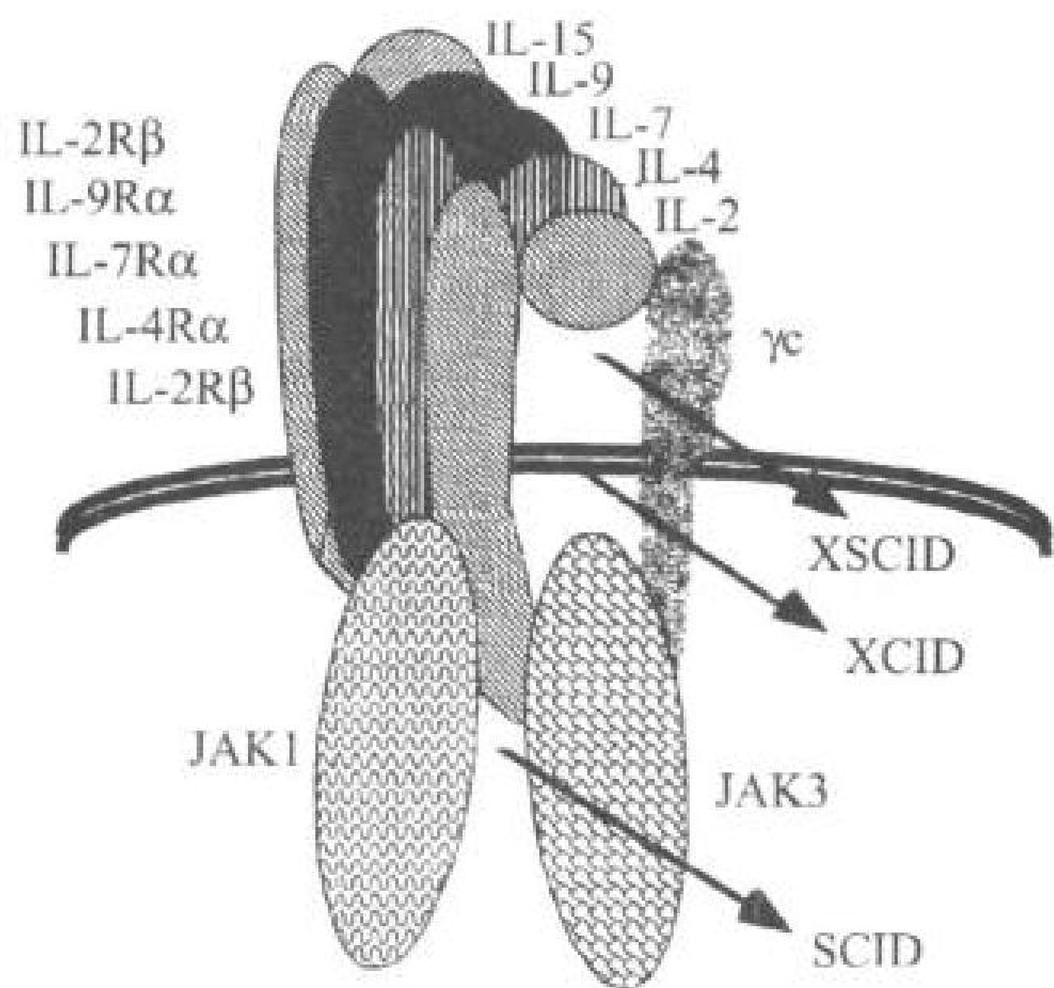


图 21.3 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 及 IL-15 受体的示意图，图中显示了它们与 Jak1、Jak3 的相互作用。IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 与 IL-15 都享有 γc。IL-2Rα 与 IL-15Rα 未被显示。尽管不同的受体链与 Jak1 作用，γc 与 Jak3 作用。γc 的突变可导致 XSCID 或更加缓和的 X 连锁免疫缺陷（XCID）。Jak3 的突变可导致常染色体隐性 SCID。

从 5 种不同细胞因子受体都享有共同链 γc 这一事实中可以看出，XSCID 明显是一种细胞因子信号缺陷病，可用信号传导通路阻断的模式来解释 XSCID 发病机理。实验发现，在 IL-7[71] 或 IL-7Rα[70] 缺陷的小鼠体内 T 细胞大幅度减少，而在 IL-2[103] 或 IL-4[106,107] 或两者同时缺失[108] 的小鼠体内 T 细胞发育却正常，这说明绝大多数 XSCID 患者体内 T 细胞缺陷是因为 IL-7 信号传导缺陷。如果可得到 IL-9 及 IL-15 缺陷小鼠模型，将可提供更多的证据。当然，从胸腺细胞对 IL-9 存在反应性及 IL-9 转基因小鼠体内形成了胸腺肉瘤的事实中，说明 IL-9 可能对于胸腺发育有部分促进作用。

XSCID 患者体内除了 T 细胞减少外，还有 NK 细胞缺陷，这可能与某些依赖 γc 的细胞因子信号传导缺陷有关。由于 IL-2、IL-4 与 IL-7 缺陷的小鼠体内均含有 NK 细胞，IL-9 对于 NK 细胞的作用仍不清楚，可推测 IL-15 信号缺陷导致了 NK 细胞发育正常，这亦与有关 IL-15 促进 NK 细胞发育的研究结果相符[89~92]。

XSCID 患者体内 T 细胞数量剧减，NK 细胞缺失，但 B 细胞数正常；而 γc 缺陷小鼠[109~111] 和 IL-7 或 IL-7 受体 α 链缺陷的小鼠体内 B 细胞数量却剧减，提示人的前 B 细胞发育不需要 IL-7。尽管 B 细胞数量正常但却丧失功能，一方面是由于缺乏 T 细胞辅助，另一方面是由于 B 细胞内在的缺陷，表现在 XSCID 患者体内 B 细胞对 IL-4 的反应中信号转导与转录活化因子（signal transducer and activators of transcription，STAT）活化受

阻[112]。事实上,对 XSCID 女性携带者体内表面 IgM^+ 及 IgM^- B 细胞中 X 染色体失活从随机到非随机方式的转变,亦可从 γ 依赖的信号传导缺陷(或许与 IL-4 信号缺陷一起)来解释。

共同链 γc 存在的理论基础

共同链的存在会使物种在发生突变时面临更大的危险,那么在生物进化中为何还要保证 γc 的存在? 这里至少有两种不同的模式[35,104]。其一,γc 是细胞因子发挥共同作用的物质基础。如 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 及 IL-15 都具有 T 细胞生长因子样作用,这可能由于其中的 γc 与相应信号传导分子结合,促进该功能的发挥。其二,γc 的存在是 γc 依赖性细胞因子间信号调节的方式。需特别指出的是,细胞因子受体作为靶分子存在于细胞表面,不同受体复合物的形成和(或)稳定依赖于特异的配基。如前所述的生长激素受体(GHR),其第二个单体能识别 GH 与第一个单体形成的结合面[21]。对于 IL-2 受体来讲,其 γc 在 IL-2 存在的情况下可与 IL-2Rβ 结合形成异型二聚体[IL-2 不存在时则不能结合][113],该异型二聚体是 IL-2 信号传递中所必需的[114,115],只有在细胞因子存在时才能使其受体形成异型二聚体并保持其稳定。然而,BIA 核心光学生物传感器实验表明,在适当条件下,IL-2Rα 与 IL-2Rβ(后者仅限于Ⅰ型细胞因子受体)可在无 IL-2 时形成异型二聚体[116,117]。在 γc 不与其他受体链形成稳定复合物的情况下,容易设想 γc 可依存在的细胞因子的不同,而与不同的受体链结合。这使得 γc 与受体链的结合取决于细胞因子的种类、数量及自身的结合效率。在 γc 数量有限的情况下,细胞因子在发挥自身效应的同时,可通过与其他细胞因子竞争 γc 而抑制这些因子的作用。以上这两种模式对于理解 γc 的存在很重要。

对 IL-2[103]、IL-2Rα[118]、IL-2Rβ[119]及 γc[109~111]缺陷小鼠的观察结果表明,尽管 γc 缺陷可引起 5 种细胞因子信号传导通路受阻,但在无特殊病原体(specific pathogen free, SPF)级饲养条件下,IL-2、IL-2Rα 及 IL-2Rβ 缺陷小鼠的健康状况比 γc 基因除者更差。尽管所有小鼠体内都有活化的 T 细胞,但 γc 缺陷引起的自身免疫性疾病程度明显较轻,提示正常情况下 IL-2 产生的信号 可被其他 γc 依赖的细胞因子所抗衡。因此,当 γc 自身失活时,可通过 IL-2 及其抗衡细胞因子的共同失活,来达到信号平衡的正常化。还有一些及其他资料也显示 γc 在维持淋巴系统的自身平衡中发挥重要作用[120]。

749

共享受体 βc 链的细胞因子

造血因子 IL-3、IL-5 及 GM-CSF(表 21.5)由 T 细胞合成,作用于造血细胞[121~124],这些细胞因子对于骨髓前体细胞的增殖与分化起关键作用。其中 IL-3 的功能最多[121,124],可作用于许多细胞系,历史上曾被称作多细胞集落刺激因子(multi-CSF)。它能促进造血多能干细胞以及那些最终发育为粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、巨核细胞、红细胞的细胞系发育、增殖并维持其生存。IL-3 还能发挥终末功能效应,如增强细胞的吞噬功能和细胞毒作用。GM-CSF 主要作用于粒细胞及单核细胞/巨噬细胞系,除此之外它还具有较为广泛的作用[122],它既是生长因子,又是维持因子,而且它可扩增抗原呈递细胞如树突细胞的数目,也能增强宿主对抗原的反应能力。与 IL-5 相比,IL-3 与 GM-CSF 作用于嗜酸性粒细胞的时间较早,可能是扩增嗜酸性前体粒细胞的数目,然而IL-5主要作用于嗜酸性粒细胞系,促进其从骨髓中释放出来[123],还可增强嗜酸

表 21.5 受体具有 βc 的细胞因子性质

细胞因子	主要来源	大小	靶细胞	染色体定位(h/m)	外显子
IL-3	T 细胞	h152/19aa m166/26aa 22~43kDa	多种细胞系	5q31.1/11	5
IL-5	T 细胞	h139/22aa m132/21aa 45kDa 二聚体	嗜酸性粒细胞 β 细胞	5q31.1/11	4
GM-CSF	T 细胞	h144/17aa m141/17aa	粒细胞 巨噬细胞	5q31.1/11	4

性粒细胞对孟氏裂体吸虫(血吸虫)(*Schistosoma mansoni*)幼虫的杀伤活性。IL-5 还可增强鼠体内由 Th 细胞活化的 B 细胞产生免疫球蛋白的能力,但它并不能促进 B 细胞生长。

在表达多种细胞因子受体的细胞上,如表达 IL-3、IL-5、GM-CSF 受体的嗜酸性粒细胞祖细胞,以及表达 IL-3、IL-5 受体的鼠前体 B 细胞,所诱导出的信号几乎不能分辨[124]。因此,我们认为:这些细胞因子对不同细胞系的特异性作用取决于相应受体在细胞上的分布,而不是每种细胞因子所诱导的信号差异。有关研究证实了这三种细胞因子受体各自含有分子质量为 60 ~ 80kDa 的特异 α 链,分别是 IL-3Rα、IL-5Rα 与 GM-CSFRα[125~130],但它们却具有共同的 β 链,即 βc,分子质量为 120 ~ 130kDa[131~133]。α 链具有基本的结合细胞因子的活性,共同链 βc 能增强结合的亲和力,但在相应 α 链缺失的情况下,βc 不能发挥结合活性。α 链具有相对较短的胞质区(IL-3Rα、IL-5Rα 与 GM-CSFRα 各自的胞质区含 55 个氨基酸),不具有主要的信号传导功能;而 βc 含有长度为 432 个氨基酸的胞质区,具有主要的信号传导功能,所以 IL-3、IL-5 与 GM-CSF 所诱导的信号非常相似。这些细胞因子受体形成了 2 个相对独立的区域来分别行使结合配体与信号传导功能,但研究发现 IL-5Rα 与 GM-CSFRα(以及类似的 IL-3Rα)的胞质区至少具有调节转染细胞生长信号的功能[134~136]。βc 细胞因子受体家族的情况与 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 及 IL-15 的受体完全不同,其中含有最长胞质区的受体链(IL-2Rβ、IL-4Rα、IL-7Rα 和 IL-9Rα)不仅决定着信号传导的特异性,而且具有与配体结合的功能(如 IL-2 与 IL-15 中,IL-2Rα 或 IL-15Rα 与 IL-2Rβ 协同行使与配体结合的功能)。共同链 γc 具有关键的辅助功能,它一旦缺陷便导致 XSCID,但它不具有结合配体的作用,也不具信号传导的特异性。

造血因子具有一个另人惊讶的特征,即它们在体外或体内具有相同的、但似乎为多余的功效,因此 GM-CSF、IL-3 与 IL-5 缺陷的基因敲除小鼠仍表现出相对正常的造血作用。这一现象并没有缩小这些细胞因子的功效,反而强调了它们一系列特异的重要功能冗余[124,137,138]。这些基因敲除小鼠表现出对某些感染性病原体的防御能力下降,表明这些造血因子在促进免疫功能方面有重要作用。

750

共享受体 gp130 的细胞因子

现已知 6 种细胞因子利用 gp130 作为信号传导分子[17,139~143]。这些细胞因子的一些特性归纳于广泛的表 21.6 中。该家族有时也被叫做 IL-6 家族,包括 IL-6、IL-11、OSM、LIF、CNTF 及 CT-1。这组细胞因子有着多种作用范围,从造血组织、免疫系统到中枢神经系统、心血管系统,其功能多样性远远超过了作用于淋巴系统和造血系统的 γc 及 βc 细胞因子家族。

表 21.6 受体具有 gp130 的细胞因子特性

细胞因子	染色体定位/(h/m)					
IL-6	7p21/5					
IL-11	19q13.3-13.4/7					
LIF	22q12.1-12.2/11					
OSM	22q12.1-12.2/11					
CNTF	11q12.2/19					
CT-1	16p11.1-11.2/?					
主要功能	**IL-6**	**IL-11**	**LIF**	**OSM**	**CNTF**	**CT-1**
促进骨髓瘤细胞生长	+	−	+	+	+	?
维持 ES 细胞多能性	−	−	+	+	+	+
诱导肝急性时相蛋白	+	+	+	+	+	+
引起心脏肥大	−	+	+	+	+/−	+
诱导成骨细胞生成	−	+	+	+	?	?
增加神经元寿命/分化	+	+	+	+	+	+
抑制脂肪合成	?	+	+	?	?	?

该表中大部分资料摘自 Taga 和 Kishimoto[147]。

IL-6是该家族中首先被证实的成员，最初它被当作B细胞分化因子而被克隆，因为它可刺激终末阶段B细胞分化为产生抗体的浆细胞[144]。然而，IL-6还可促进T细胞生长与分化（因此也是胸腺细胞共同因子），诱导髓细胞分化为巨噬细胞，诱导肝细胞合成急性时相蛋白，对角化细胞、肾小球系膜细胞、造血干细胞、破骨细胞的形成及神经系统中PC12细胞的分化有一定作用[145~147]。IL-6与分子质量为80kDa的IL-6结合蛋白结合，该结合蛋白即为IL-6Rα，含相对较短的胞质区（长度为82个氨基酸）[148]。该IL-6-IL-6Rα复合物可与分子质量为130kDa的信号传导分子gp130作用，gp130与IL-6Rα一起组成IL-6的功能性受体[139,149]。gp130即为本节讨论的细胞因子家族受体的共同成分。从结构上观察，gp130包含6个纤维连接蛋白Ⅲ型模块，4个保守半胱氨酸残基及位于第二、三模块中的WSXWS基序（始于N端）[139]。所以，这些胞外区域的拓扑学位置远离细胞膜，其胞外距离大于前面所述的其他Ⅰ型细胞因子受体。

很明显，IL-6系统表现出了其主要结合蛋白分子特性的异常扭转：IL-6Rα的胞质区与信号传导功能无关；IL-6Rα胞外区的可溶性形式为结合配体和与gp130作用的充足条件。因此，在可溶性IL-6Rα与IL-6存在时，多种表达gp130而不表达IL-6Rα的细胞可产生IL-6信号。有人观察到IL-6信号传导需要gp130发生二聚化[150,151]。事实上，后来有证据表明IL-6信号传导需要一个分别含2分子的IL-6、IL-6Rα与gp130（三聚体中的2个分子）的复合体[152]，为IL-6家族其他成员提供了可能的亚单位化学计量学模型。

IL-11定位于19号染色体q13.3~13.4，最初认为它是基质细胞受IL-1刺激后产生的因子[153,154]，后来发现它对造血有多种生物学效应，尤其是在IL-3和干细胞因子的协助下。鉴于IL-11具有IL-6样活性，在抗IL-6抗体存在但仍能测出IL-6样活性的体系中分离得到IL-11cDNA[155]。IL-11的其他活性包括刺激淋巴组织及造血组织祖细胞增殖；刺激巨核干细胞和巨核细胞成熟；刺激祖红细胞成熟（IL-6不具这些作用）。与IL-6相似，IL-11可诱导急性时相蛋白生成，增强抗原特异性B细胞的反应，但不能刺激人骨髓瘤细胞[153~156]。后来发现克隆出的脂肪合成抑制因子与IL-11一样[157]，显示出IL-11的又一活性。IL-11通过受体复合物传递信号，其受体复合物包含IL-11Rα和gp130[17]。有趣的是，IL-11R α mRNA选择性剪接后的产物缺乏胞质区，与IL-6Rα相似，IL-11Rα的可溶性形式可与IL-11结合，将信号传递给表达gp130的细胞[158]。IL-11受体复合物的化学计量学研究未显示出gp130的二聚体化。故可设想它形成了一个六聚体受体复合物，现已知其中的5个组分：IL-11和IL-11Rα各两分子，一分子gp130。还有一个组分仍待进一步研究[159]。

白血病抑制因子（LIF）是另一种多功能细胞因子，最初基于其抑制白血病的活性而被克隆[160]。LIF可抑制多能胚胎干细胞分化，抑制脂肪合成，诱导M1小鼠白血病细胞系的单核细胞分化，与IL-6的许多活性相似[161]。另外，它对中枢神经系统也有一些作用，现已发现LIF即为胆碱能神经原分化因子[162]，可诱导乙酰胆碱合成，同时抑制儿茶酚胺生成，可通过抑制产生去甲肾上腺素的功能来诱导胆碱能活性[162]。LIF可与受体（LIFRβ）结合，后者在结构上与gp130相关[163]，但功能性LIF受体是由LIFRβ与gp130形成的异型二聚体[140]。

751

表21.7 细胞因子IL-6家族的受体成分

受体中不含LIFRβ的细胞因子	
IL-6	IL-6Rα + gp130
IL-11	IL-11Rα + gp130
OSM	OSMRβ + gp130[a]
受体中含LIFRβ的细胞因子	
LIF	LIFRβ + gp130
OSM	LIFRβ + gp130[b]
CNTF	CNTFRα + LIFRβ + gp130
CT-1	LIFRβ + gp130 + ？ CT1Rα

[a] 人或小鼠的OSM。

[b] 人OSM。

纤毛神经营养因子（CNTF）的发现是基于其促进神经细胞生长的功能[164,165]。CNTF信号传递由LIFRβ与gp130形成的受体以及一种特异性结合蛋白（CNTFRα）[166,167]来完成。CNTFRα链无穿膜区和胞质区，取而代之的是一个GPI-连接的受体分子，其功能是为gp130与LIFRβ提供可与细胞因子作用的表面。所以，CNTF与IL-6相似，它们只需要初始结合的受体组分（CNTFRα或IL-6Rα），这些受体组分不需要胞质区来传递信号。不同的是：IL-6信号传导还需要gp130二聚体参与；而CNTF（与LIF相似）信号传导需要LIFRβ与gp130形成的异型二聚体参与。事实上，功能性CNTF受体为一个六聚物，包含2分子CNTF，2分子CNTFRα以及LIFRβ、gp130各1分子[168]。该受体广泛表达于神经系统与骨骼肌组织，说明CNTF大部分功

能受到限制[166]。

抑瘤素 M(OSM)最初得以证实是基于其抑制人黑素瘤细胞 A375 生长的功能[169],克隆技术证实了它是一种生长调节因子[170]。人 OSM 是 AIDS 患者体内卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)的生长因子[171,172],人 OSM 可直接与 gp130 结合,再通过 gp130 与 LIFRβ 的联合受体传递信号[140],它还有另外一个受体,由特异的 OSM 受体亚单位(OSMRβ)和 gp130 组成[20]。鼠 OSM 只能通过第二种受体形式发挥作用[172a]。

最初心营养素 1(CT-1)基于其对于心肌细胞的作用而被分离得到[173],现已清楚它是一种多功能细胞因子,可作用于造血组织与神经系统,有促发育功能,还具有促心脏发育及肥大效应[174]。研究发现 CT-1 的多功能作用基础与 OSM 及 LIF 类似,CT-1 也是通过由 LIFRβ 与 gp130 形成的异型二聚体传递信号[143]。最近的研究指出运动神经元上的 CT-1 受体含有第三种成分,可能连接有 GPI[175,176]。

这 6 种细胞因子(IL-6、IL-11、LIF、CNTF、OSM 和 CT-1)的受体均依赖 gp130,它们可分为两组:一组为 IL-6 与 IL-11,其受体不需要 LIFRβ;另一组则 gp130 和 LIFRβ 两者均需要(如 LIF、CT-1 与 CNTF)(表 21.7),再加上具有两种受体形式的人 OSM。在这两组细胞因子中,每种细胞因子可对效应靶细胞发挥相同的作用。现已弄清 IL-6Rα、IL-11Rα 及 CNTFRα 的存在(无论是在细胞表面还是可溶性形式)决定着细胞是否对 IL-6、IL-11 及 CNTF 发生反应。但又出现了这样一个问题:功能性 IL-6Rα、IL-11Rα 及 CNTFRα 同系物的存在是否也决定着 LIF、OSM 与 CT-1 效应的发挥。如前面所述,CT-1 存在此现象。人 OSM 的情况更为复杂,它通过 OSMRβ/gp130 异型二聚体传递信号,而完全不依赖 LIFRβ。

受体链共享的意义

前面提到的共有链 γc、βc 以及 gp130,均参与细胞因子信号传递,而无与细胞因子结合的活性,但它们可增加每种细胞因子与其结合蛋白间的结合亲和力。总之,细胞对某一细胞因子反应的能力取决于某特异的受体结合链,而信号传导通路则可共享。

与 gp130 相似的其他受体

如前所述,LIFRβ、OSMRβ 与 gp130 具有某些类似处[20]。另外,G-CSFR 肥胖因子(leptin)受体,(也叫肥胖受体,OB-R)和 IL-12 受体也与 gp130 类似。这些不同受体中氨基酸相似性为 18% ~ 32%,其中 LIFRβ 与 OSMRβ 最相近。

leptin

leptin 是肥胖(*ob*)基因的产物,来源于脂肪组织,在身体重量维持动态平衡中有重要作用[177]。其受体 OB-R 与信号传导分子 gp130、G-CSFR 及 LIFRβ 非常近似[178]。有趣的是,该受体由 db/db 小鼠突变的糖尿病基因编码[179]。嵌和体结构提示其胞质区的同型低聚化足以传递信号[180],但是否存在其他的受体成分尚不清楚。

IL-12

IL-12 已在第 17、26 和 38 章讨论过。然而在此再次提到它,是因为它的受体链属 Ⅰ 型细胞因子受体。IL-12 主要由吞噬细胞在对细菌及胞内寄生虫[如鼠弓形虫(*Toxoplasma gondii*)]的反应过程中产生的,它还能被其他抗原呈递细胞(如 B 细胞)及中性粒细胞分泌[181]。最初发现 IL-12 时,认为它是自然杀伤细胞刺激因子(natural killer cell stimulatory factor,NKSF)[182],IL-12 可有效诱导 NK 细胞与 T 细胞产生 IFN-γ,可促进处于活化前状态的 NK 细胞和 T 细胞生长,但对静息状态的 NK 细胞和 T 细胞无此作用。IL-12 是惟一可诱导 Th1 细胞分化的因子,它还能诱导 IL-2、IL-3、GM-CSF、IL-9、TNF-α 和 M-CSF 的生成,但它最重要的活性还是诱导 IFN-γ 的产生[181]。

IL-12 在天然免疫与后天获得性免疫反应中均有重要作用。NK 细胞与 T 细胞先后在对抗原及外来病原

752

体的免疫反应中快速产生 IL-12,这一快速反应促进了宿主抗感染的第一道防御作用。另外,IL-12 为后来特异性 T 细胞群的分化所必需,包括 Th1 细胞的激活,为 IL-2 及 IFN-γ 的生成提供有利条件(下面将讨论)。IL-12 可增强造血生长因子如 IL-3、干细胞因子的作用,促进造血干细胞的增殖并维持其生存[181]。IL-12 是一个由分子质量分别为 35kDa 和 40kDa 的 2 条多肽共价形成的二聚体[181],因此,只有可同时转录 p35 和 p40 基因的细胞才能产生 IL-12[183]。尽管 p35 的氨基酸序列与 IL-6、G-CSF 近似,p40 与 IL-6Rα、CNTFRα、G-CSFRα 的胞外区相似,具有某些Ⅰ型受体的典型特征,包括 4 个保守的半胱氨酸、1 个保守的色氨酸及 1 个 WSEWAS 基序(与典型的 WSXWS 基序非常相似)[181]。而且,因为 IL-12 的 2 个受体链(IL-12Rβ1 和 IL-12Rβ2)都与 gp130 有些相似[184~186],故可认为 p40 是可溶性 p80IL-6R α 链的功能同系物。因此,对于该细胞因子而言,受体的一部分已成为细胞因子的一部分。所有分泌 IL-12 的细胞合成 p40 的量远大于 p35,提示 IL-12 信号的调节在于原始 p35 因子的水平。P40 定位于人染色体 5q31~33,p35 则定位于 3p12~13.2[181]。

其他共享受体的实例

IL-7 与胸腺基质来源的淋巴细胞增殖素共享 IL-7Rα

尽管有关证据还很有限,但现已证实除了 IL-7 外,源于胸腺基质的淋巴细胞增殖素(thymic stromal derived lympho poietin,TSLP)作为第二种基质因子,具有一些与 IL-7 相同的功能,并与 IL-7 共享 IL-7Rα 链[70]。迄今为止,TSLP 仅在小鼠体内被得到证实。

IL-4 的两种受体形式,其一可对 IL-13 起反应

如前所述,IL-4 通过 T 细胞上由 IL-4Rα 与 γc 组成的Ⅰ型 IL-4 受体发挥作用[27,29]。然而,现已证实 IL-4 还能通过不表达 γc(或 Jak3,属于贾纳斯(Janus)家族酪氨酸激酶家族,可与 γc 结合)的非 T 细胞上的Ⅱ型受体发挥作用[187]。其他研究提示,IL-13 与 IL-4 具有相同的功能,能在可与 IL-4 反应的非 T 细胞上诱导与 IL-4 相同的信号,但对 T 细胞却无此作用,因为 T 细胞不能结合 IL-13[188]。IL-4 与 IL-13 共同的功能包括:①下调炎症因子的表达;②诱导 MHC Ⅱ类分子的表达;③诱导 CD23 表达及 IgE 在 B 细胞中的生成;④抑制 IL-2 诱导的 B 细胞源性慢性淋巴性白血病细胞的增殖效应;⑤与抗 CD40 抗体的共刺激作用。

还有研究表明,IL-4 与 IL-13 除了具有对非 T 细胞的相同生物学活性外,它们的受体还共同含有 IL-4Rα[187~190],但 IL-4Rα 仅能与 IL-4 结合。抗 IL-4Rα 抗体可特异性抑制 IL-4 与 IL-13 诱导的增殖效应,而可溶性 IL-4Rα 仅能阻断由 IL-4 诱导的增殖效应。IL-13 与 IL-4 均可诱导 IL-4Rα 磷酸化,也说明 IL-4Rα 为 IL-13 受体的一部分。故可设想Ⅱ型 IL-4 受体由 IL-4Rα 与 IL-13Rα1 组成[187],后来这点已得以证实[19,191],并发现由 IL-4 与 IL-13 在表达该受体的细胞上产生的信号几乎没有差异。有趣的是,IL-4 主要与 IL-4Rα 结合,而 IL-13 主要与 IL-13Rα1 结合,这点与 LIF、CT-1 及人 OSM 类似,它们的受体都含有 LIFRβ 和 gp130,但它们直接作用的受体部位却不同。近来又克隆出一种新的 IL-13 结合蛋白,现命名为 IL-13Rα2,它与 IL-13 的亲和力远高于 IL-13Rα1[192],但它是否为功能性 IL-13 受体的一部分还待进一步研究。

一些研究者利用嵌合受体人工诱导出 IL-4Rα 二聚化,并发现由此产生的信号与 IL-4 在同一细胞上诱导出的信号非常相似[193,194]。但这并不意味着 IL-4 自身信号传导依赖 IL-4Rα 的二聚化,因为 IL-4 不能诱导纯化的可溶性 IL-4Rα 二聚化,而是诱导出 IL-4Rα 与 γc 的异型二聚体形成[195]。而且 IL-4 不能诱导仅表达 IL-4Rα 的鼠成纤维细胞中胰岛素受体底物-1(IRS-1)的酪氨酸磷酸化作用[29]。嵌合体可使第二 Jak 激酶向 Jak1 靠拢,后者与 IL-4Rα 相联,这样便具有了介导信号传导的功能。

同一细胞因子存在多种亲和力受体的实例:IL-2 受体的 3 种类型

尽管细胞因子代表性地与细胞表面的高亲和力受体结合,但也有例外,IL-2 系统研究得较为清楚,现已知 IL-2 有三种不同受体(表 21.8)。先前,我们已讨论过由 IL-2Rα、IL-2Rβ 及 γc 组成的高亲和力 IL-2 受体($K_d = 10^{-11}$mol/L),除此之外,还有低亲和力受体(仅含 IL-2Rα, $K_d = 10^{-8}$mol/L)及中度亲和力受体(由 IL-2Rβ

及 γc 组成，$K_d = 10^{-9}$mol/L)[34~37,196]。低和高亲和力受体表达于活化的淋巴细胞上，而中度亲和力受体表达于静息淋巴细胞，尤其是 NK 细胞上。中度及高亲和力受体可介导信号传递，提示 IL-2Rβ 与 γc 对于信号传递是必要的，这点与前面提到的二聚化理论相一致。非Ⅰ型细胞因子受体的胞质区非常短，无信号传递功能，但具有信号传递功能的中度亲和力受体为何具有 α 链？α 链的重要性已在 IL-2Rα 缺陷小鼠出现的严重异常表型——自身免疫疾病、肠道炎症及幼年死亡[118]，以及近来发现的由于 IL-2Rα 突变而引起的人 SCID[197] 中得以证实。其中线索之一源于 IL-2 与各受体链的结合动力学。尽管 α 链缺乏直接的信号传递功能，但它与 IL-2 的结合速率相当快[49]。所以，快的结合率加上 IL-2Rα 与 IL-2Rβ/γc 二聚体慢的解离率，使得 IL-2Rα 具有与 IL-2 高度结合力，这对于细胞能在体内生理浓度非常低的 IL-2 产生反应是极其重要的。而且，因为活化 T 细胞上表达低亲和力受体的量是高亲和力受体的 10 倍多，所以 IL-2Rα 是细胞表面吸引并浓缩 IL-2 的有效方式，促使 IL-2/IL-2Rβ/γc 复合体有效形成。

表 21.8　IL-2 受体类型

亲和力	K_d	表达的细胞	成分	功能性
低	10^{-8}mol/L	活化的细胞	IL-2Rα	无
中度	10^{-9}mol/L	静息的细胞	IL-2Rβ 和 γc	有
高	10^{-11}mol/L	活化的细胞	IL-2Rα、IL-2Rβ 及 γc	有

前面已经提到，IL-2Rα 不是Ⅰ型细胞因子受体。在 20 世纪 80 年代中期，人们发现 IL-2Rα 与补体因子 B 的识别区相同[198]。近来又证实了第二种也有类似结构的细胞因子受体，命名为 IL-15Rα[94]。这使得认为 IL-2 与 IL-15 间关系密切的观点，以及两者受体都包含 IL-2Rβ 与 γc 的事实变得较有意义。IL-2Rα 自身不能传递信息，故检测其在细胞表面的表达量未必反映了 IL-2 反应能力。因为 IL-2Rα 发现最早，许多早期评价 IL-2Rα 的文章并没有研究过 IL-2Rβ 或 γc，如，双阴性胸腺细胞亚群上 IL-2Rα 的表达是细胞发育阶段有用的表型标志，但它并不反映 IL-2 反应能力。IL-2 受体中的每一组分定位于不同染色体：人 IL-2Rα 定位于染色体 10p14-15[199]；IL-2Rβ 定位于染色体 22q[200,201]；γc 定位于 Xq13.1[97]。

红细胞生成素、血小板生成素与干细胞因子

红细胞生成素及血小板生成素分别对于红细胞及血小板生成非常重要。这两种细胞因子的受体均为同型二聚体[23,202~204]。但有人发现红细胞生成素的信号传导需要其受体与 c-kit 的协同作用[205]，c-kit 是干细胞因子受体[206]，它具有固有的酪氨酸激酶活性。这是Ⅰ型细胞因子受体中惟一需要其他受体辅助来实现其完整功能的例子[205]。

细胞因子多效性与冗余以及细胞因子受体多效性与冗余

现已弄清许多细胞因子具有多效性及冗余的现象[207]。多效性是指一种细胞因子可具有多种不同效应，而冗余则指多种不同的细胞因子可产生相似的信号。一些相应受体中含有 γc 的细胞因子可对多种不同淋巴细胞群发挥效应，表现出多效性，例如，IL-2 可诱导 T 细胞生长，促进 B 细胞合成免疫球蛋白及诱导 LAK、NK 细胞活化；IL-4 可诱导 B 细胞生长及免疫球蛋白类型的转换；IL-7 对于淋巴细胞发育很重要，它可刺激成熟 T 细胞，也可促进前 B 细胞生长。IL-6 具有更加广泛的作用，从促进胸腺细胞活化到介导肝细胞的急性时相反应。但这些相应受体中含有 γc 的细胞因子都可作为 T 细胞生长因子，表现出了冗余的现象，如 IL-3、IL-5 与 GM-CSF 具有相同的功效。

基于对细胞因子不仅具有相同的功能，而且共享相同受体组分的认识，产生了细胞因子受体多效性及冗余的概念[34]。细胞因子受体多效性表现在一个受体亚单位可在多种受体中发挥功能，包括前面讲过的共同链 γc、βc 及 gp130，以及 IL-2 与 IL-15 受体中含有的 IL-2Rβ，Ⅱ型 IL-4 受体及 IL-13 受体共享的 IL-4Rα 和 IL-

13Rα。从另一角度看,该多效性即表现为某些受体链可作为有用的工具,换言之,SH2 和 SH3 虽只是蛋白分子中的一个结构域,但可被多种不同蛋白分子利用,因而可将共同受体链视作多种分子利用的模具。

细胞因子受体的冗余现象并不多见,只有一例在鼠体内得以证实,即 IL-3 的功能性受体由 IL-3Rα 及 βc,或 IL-3Rβ 组成[208],IL-3Rβ 有 91%的氨基酸与 βc 相同,它对于 IL-3 信号传导而言是完全的功能性冗余蛋白。但在 IL-5 或 GM-CSF 信号传导中,IL-3Rβ 却不能代替 βc[133]。可能还有其他的例子存在:①在Ⅰ、Ⅱ型 IL-4 受体中,IL-13Rα 或 γc 均可与 IL-4Rα 作用;②人 OSM 的两种受体均含有 gp130,但其中一个含有特异性 OSM 受体,而另一个则含 LIFRβ;③IL-15 可根据细胞系的不同,而通过完全不同的两种受体传导信号。是否由于这些不同受体介导的细胞因子信号相同,因而认为有冗余现象呢? 还是 IL-4、OSM 及 IL-15 通过不同受体诱导的信号具不同的特征? 答案仍未弄清。

754

可溶性受体

现已证实许多细胞因子,包括 IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、GM-CSF、TNF 及Ⅰ、Ⅱ型 IFN,具有可溶性受体形式[209,210]。可溶性受体并非仅限于Ⅰ型细胞因子受体,如 IL-2 的主要可溶性受体蛋白是 IL-2Rα,它不是Ⅰ型细胞因子受体。将 N 端到跨膜区截去,再选择性剪接后可获得可溶性受体,IL-4Rα、IL-5Rα、IL-6Rα、IL-7Rα、IFNαRβ 链(IFNAR-2)及 GM-CSFRα 等分泌型蛋白就是这样产生的。它们还可被膜受体的蛋白酶水解而成,如 IL-2Rα、TNFRⅠ与 TNFRⅡ是通过这种方式产生的[210](表 21.9)。尽管理论上编码可溶性受体的基因可能与编码膜受体的基因不同,但还未找到证据支持这一观点。在蛋白裂解位点,蛋白酶的特性还未被证实。有关可溶性受体的三个主要问题是:

① 它们是否具有生理或病理生理学功能?

② 与它们在细胞表面的相应受体比较,其亲和力怎样?

③ 它们能否应用于诊断、预后及治疗?

遗憾的是,对这些可溶性受体在体内的作用知之甚少。一般而言,在体外研究中,可溶性受体可与相应的细胞表面受体竞争结合细胞因子,产生负调控作用。然而,可溶性 IL-6Rα 虽有竞争作用,但当更多的可溶性 IL-6Rα 与 IL-6 结合时,该信号传导过程仍可很好地通过 gp130 来完成。不过,突变的 IL-6Rα 虽不能与 gp130 结合,但仍可结合 IL-6,因而具有效的抑制作用[211]。对于可溶性 IL-2Rα 而言,其生理功能还未被发现,因为推测它与 IL-2 的亲和力与低亲和力受体相似($K_d = 10^{-8}$ mol/L),使得它不可能与细胞表面高亲和力受体竞争($K_d = 10^{-11}$ mol/L)。这些可溶性受体都可作为细胞因子载体蛋白,可通过避免蛋白酶

表 21.9　可溶性细胞因子受体

由选择性拼接产生的	由成熟受体经蛋白水解而产生的
sIL-4Rα	sIL-2Rα
sIL-5Rα	sTNFR
sIL-6Rα	
sIL-7Rα	
sGM-CSFRα	
sIFNARα	

表 21.10　人类疾病中的可溶性 IL-2R

恶性病
血液系统的恶性病
成人 T 细胞性白血病
多毛细胞白血病
急性淋巴细胞性白血病
慢性淋巴细胞性白血病(B 细胞)
急性髓细胞性白血病
慢性髓细胞性白血病
恶性淋巴瘤
霍奇金病
非-霍奇金病
非造血系统的恶性病
肺、乳腺、膀胱腺癌
小细胞性支气管腺癌
卵巢癌、子宫颈癌、子宫内膜癌
鼻咽癌
黑色素瘤
感染性疾病
HIV
结核
麻疹
传染性单核细胞增多症
其他疾病
肾病末期
风湿性关节炎
系统性红斑狼疮
硬皮病
肉状瘤病
移植术后
用 IL-2 后

在成人中,sIL-2Rα 平均水平为 280 ± 161u/ml(> 儿童)。ALT、多毛性白血病、CML 及使用过 IL-2 的患者 sIL-2Rα 水平大于 5000 u/ml。AML、CLL、非霍奇金淋巴瘤、AIDS 合并卡波西肉瘤、结核、麻疹及肾病末期患者 sIL-2Rα 水平为 1000 ~ 5000u/ml。

的作用,而潜在地增加细胞因子的稳定性[210]。表 21.10 中列举了检测可溶性 IL-2 受体在诊断及预后中的应用。

干扰素(Ⅱ型细胞因子)及其受体

干扰素(IFN)代表着一个在进化上较为保守的细胞因子家族(表 21.11),与Ⅰ型细胞因子关系较为密切。IFN 发现于 40 年以前,这主要基于它们的抗病毒活性[212]。因为存在着Ⅰ、Ⅱ型 IFN[213~216],故有必要首先回顾一下命名法。Ⅰ型 IFN 包括 IFN-α(以前所认识的白细胞 IFN)、IFN-β(以前称为成纤维细胞 IFN)和 IFN-ω。IFN-ω 与 IFN-α 的关系非常密切,以前被当作 IFN-α。出乎意料的是,现已发现有许多种 IFN-α,相应至少有 13 种功能性基因[216]。相反,IFN-β 与 IFN-ω 分别由人和小鼠的单个基因编码,这些基因靠近 IFN-α 基因丛,有 12 个假基因与编码 IFN-α 和 IFN-ω 的基因非常相似[216]。Ⅰ型 IFN 基因丛定位于人 9 号染色体和鼠 4 号染色体。Ⅱ型 IFN 是 IFN-γ,它的单个编码基因定位于人 12 号染色体及鼠 10 号染色体[213,215]。有关其他 IFN,如 IFN-δ 也有报道[217,218]。

755

表 21.11　Ⅱ型细胞因子[a]

		染色体定位/(h/m)
Ⅰ型干扰素		
IFN-α	13	9/4
IFN-β	1	9/4
IFN-ω	1	9/4
IFN-δ		
Ⅱ型干扰素		
IFN-τ		12/10
IL-10	1	
IL-10	1	1/1

[a] 在 IFN-α 与 IFN-ω 基因附近有 12 个假基因。

将 IFN-α 与 IFN-β 归于Ⅰ型 IFN,不仅是因为它们具有相似的氨基酸序列及结构,而且还因为它们享有同一受体并且诱导相似的信号[219],这些信号包括抗增殖、抗病毒及促进淋巴细胞、NK 细胞、巨噬细胞的溶细胞活性。相反,IFN-γ 因具有不同的受体,而被划为Ⅱ型 IFN。Ⅰ、Ⅱ型 IFN 受体之间的相似程度足以将它们归于同一家族[220]。IFN-γ 受体的结构如图 21.2 所示。被视作Ⅱ型细胞因子受体的 IFN 受体与Ⅰ型细胞因子受体有着本质的区别[8]。因Ⅰ、Ⅱ型 IFN 均与Ⅱ型细胞因子受体结合,故有时把 IFN 看作Ⅱ型细胞因子。IL-10 被认为是Ⅱ型细胞因子,是因为 IL-10 受体与 IFN-γ 受体相似[8]。IL-10 的 X 射线晶体结构的确表明了其拓扑学结构与 IFN-γ 相关[14]。在Ⅱ型细胞因子中,IFN-γ 具有与Ⅰ型短链螺旋细胞因子相似的螺旋结构,但占据了 AB 与 CD 环位置的螺旋却表现出了长链Ⅰ型细胞因子中典型的 AB 位于 CD 之上的拓扑学结构。IL-10 与 IFN-α/β 都具有长链结构[8]。

Ⅰ型 IFN 通过Ⅰ型 IFN 受体传导信号[222,223],该受体至少由 2 条链构成[224~227]。Ⅰ型细胞因子受体命名法与 α、β 链之类的命名法相似,干扰素命名委员会将这些受体链命名为 IFNAR-1(以前也叫作 IFN-αR1、IFNAR1 与 IFN-Rα)和 IFNAR-2(以前也叫作 IFN-α/βR、IFN-αR2、IFNAR2 与 IFN-Rβ)[218]。此命名法也将用于本章。

有趣的是,IFNAR-2 及其可溶性形式都有短链与长链两种形式[227],长链形式因具有更长的胞质区,故在信号传导中起重要作用。而 IFNAR-1 不能与 IFN-α 结合,IFNAR-2 与之仅有低的亲和力,但这两条链结合起来可产生与 IFN-α20 高亲和力结合[222]及信号传导功能。IFNAR-1 可与 Janus 家族酪氨酸激酶 Tyk2 结合,而 IFNAR-2 可与 Jak1 结合。另外,由牛痘病毒和其他病毒编码的Ⅰ型 IFN 受体可溶形式与 IL-1 受体近似,可与 IFN-α、IFN-β 及 IFN-ω 结合[228,229]。这种受体不属于Ⅱ型细胞因子受体家族中的成员,而属于免疫球蛋白超家族。IFN-α 具种属特异性,故人 IFN-α 不能与鼠的 IFN-α 受体结合,其中 IFN-α8 却是罕见的甚至是惟一的例外。IFNAR-1 在结合上具有种属特异性[224]。

30 年前,IFN-γ 最早被发现,于 1982 年被克隆[213,230,231]。IFN-γ 由位于 12 号染色体上的 4 个外显子编码,IFN-γ 通常形成分子质量为 34kDa 的二聚体形式,几乎很难检测出其单体形式,而且该形式没有生物学活性。每个单体含 6 个 α 螺旋,其中 4 个装配成短链螺旋细胞因子,但不含 β 折叠结构。这 2 个亚单位以一种反平行方式相互作用。IFN-α 可由多种细胞表达,而 IFN-γ 却仅由 NK 细胞、$CD8^+$ T 细胞和 $CD4^+$ T 细胞 Th1 亚群产生[213]。IFN-γ 通过广泛表达的特异性受体(除了红细胞上不表达)发挥作用。有趣的是,血小板上也表达 IFN-γ 受体,为 IFN-γ 在血循环中的运输增加了可能性[213]。人 IFN-γ 受体由 2 条链组成[232]:IFNGR-1 及

IFNGR-2。IFNGR-1 也叫作 IFNγR1 或 IFNγRα[218,233]，分子质量为 90kDa，为结合配体所必需，其基因定位于人染色体 6q16-22 或鼠 16 号染色体[231]；IFNGR-2 又叫做 IFNγRβ[218,234,235]，主要参与信号传导，其基因定位于人染色体 21q22.1 或鼠 16 号染色体[231]。Jak1 与 IFNGR-1 胞质结构域近膜区中的 Leu-Pro-Lys-Ser 序列发生作用[236]，而 Jak2 与 IFNGR-2 结合[237]。IFN-γ 为二聚体，所以 IFN-γ 的结合可诱导 IFNGR-1 二聚化，进一步与 IFNGR-2 结合。所以，功能性 IFN 受体应该包含 2 分子 IFNGR-1 及 1 分子 IFNGR-2。

IFN 受体家族除了 IFN-α/β 和 IFN-γ 受体成分外，还有一个成员 CRF2-4，它定位于含有 35kb 的 IFNGR-2 的 21 号染色体上[238,239]，现已知它为 IL-10 受体的组分[239a,b]。

IL-10，一种Ⅱ型细胞因子

755

IL-10 由活化的 T 细胞、B 细胞、单核细胞与角化细胞产生[240]。IL-10 基因可分为 5 个外显子，定位于人或鼠的 1 号染色体上[240]。IL-10 有一个含 178 个氨基酸可读框，包括信号肽，成熟的蛋白分子质量为 18kDa。人 IL-10 受体定位于 11q23.3[241]。IL-10 可抑制许多细胞因子生成，包括 IL-2、IL-3、IFN-γ、GM-CSF 及肿瘤坏死因子，但却促进 Th2 型细胞因子产生[240]。IL-10 抑制单核细胞依赖性的 T 细胞增殖，部分原因是降低了一些细胞因子的合成水平。IL-10 除了这些对 T 细胞的间接影响外，它在体外对于胸腺细胞及 T 细胞还有直接的刺激作用。由 Epstein-Barr(EB)病毒编码的 BCRF1 蛋白与 IL-10 非常相似，并享有许多相同的生物学特性，它们均是巨噬细胞失活因子与 B 细胞增殖因子[240,242]。EBVIL-10 尽管与 IL-10 受体的结合能力稍微弱一些，但仍是可选择的拮抗剂[242]。IL-10 是 Th1 细胞功能的主要抑制剂[240]，尽管它可通过抑制 IL-12 间接促进 Th2 细胞分化，但 IL-4 才是 Th2 细胞发育中的主要分化因子。

756

前面已经提到，IL-10 受体与 IFN 受体非常近似，故将 IL-10 受体列入Ⅱ型细胞因子受体行列[243,244]，这也反映出 IL-10 与 IFN 在结构上的相关性。CRF2-4 也是 IL-10 受体中的组分。

细胞因子的种属特异性

对于人或鼠细胞因子的种属特异性，以及这些细胞因子和它们的受体链是怎样共同进化的，没有普遍的原则。例如，人 IL-2 可刺激人和鼠的细胞，而鼠 IL-2 对于人体细胞几乎没有作用[40]。相反，人 IL-12 对鼠的细胞没有影响，但鼠 IL-12 却对鼠和人的细胞均具有生物学活性[181]。IL-12 的这种选择特性取决于 p35 的种属来源。IL-4 具有严格的种属特异性，人 IL-4 只能对人体细胞发挥效应，而鼠 IL-4 亦如此[56,62]。事实上，种属特异性的合并现象已被发现。

干扰素及细胞因子受体的信号传导

人们关于干扰素及细胞因子受体信号传导的认识，在过去几年里有了长足的进步。现已发现多种通路及分子参与了各种细胞因子的信号传导过程，包括 Jak-STAT 通路、Src 与 Zap70 及相关蛋白、PI3-激酶、IRS-1 和 IRS-2，以及磷酸酶。每种通路将在以后依次介绍。

Jak 与 STAT 概述

Jak-STAT 通路[230,245-254]作为一种将细胞膜信号迅速传至细胞核的机制而特别受到重视。已知 Jak 激酶是 Janus 家族酪氨酸激酶，STAT 蛋白是信号传导因子以及 Jak 激酶底物的转录活化因子。现有大量有关 Jak 与 STAT 的资料证实它们在细胞发育、分化、增殖、转化及肿瘤发生中有着重要作用。

Jak

图 21.4 为 Jak 激酶的结构示意图。Jak 激酶分子质量为 116～140kDa，由大约 1150 个氨基酸残基组成，含 7 个序列保守的区域，即 JH1 到 JH7。Jak 激酶有一个显著特征，即分子内除含有具催化活性的酪氨酸激酶结构域(JH1)外，还有一个假激酶结构域(JH2)。“Janus 激酶”这一名字反映了传说中罗马神灵的两面性，其中一面代表着真正的激酶，而另一面却代表了假激酶。尽管 JH 命名法曾被使用，但它却有着明显不足，因为除了 JH1 催化结构域及 JH2 假激酶域适用外，现仍不清楚其他 JH 结构域是否为离散的区域。序列分析提示，Jak 可能具有一个几乎跨度为 2 个 JH 的 JH2 结构域。

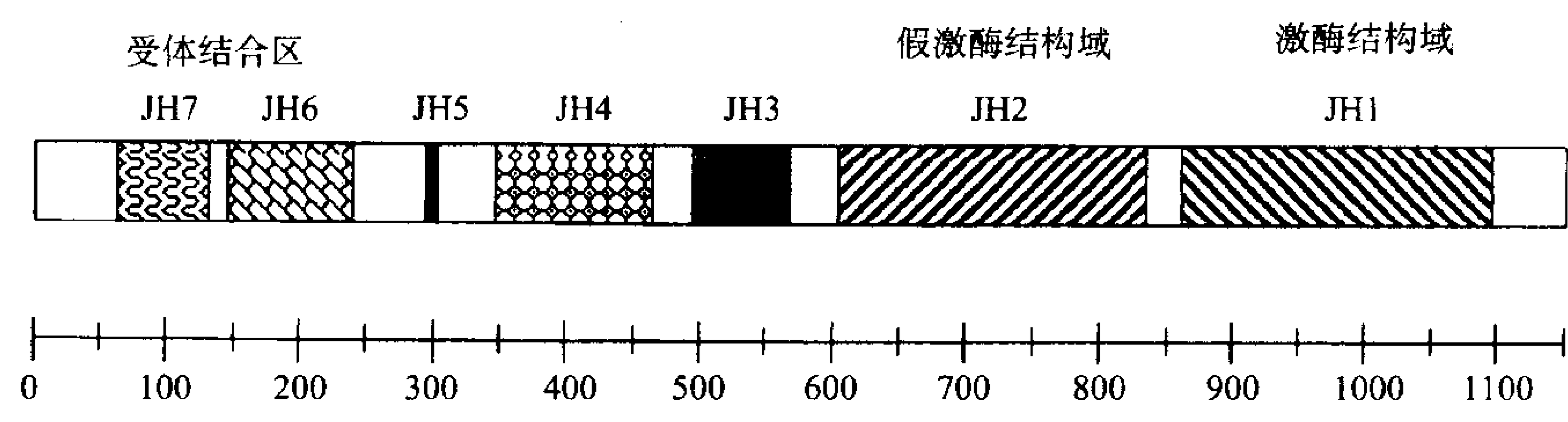


图 21.4　Jak 激酶结构图。JH1 是催化结构域、JH2 为假激酶结构域。如文中所述，JH 命名法存在一定局限性，实际上掩饰了跨越 JH3 和 JH4 结构域的 JH2 的存在。图中还显示了保守酪氨酸位点(Jak2 中的 Y1007)，该位点的磷酸化为实现最大催化活性所必需。

表 21.12　Janus 家族激酶的特性

激酶	诱导型与组成型	大小/kDa	染色体定位/(h/m)
Jak1	组成型	135	1p31.3/4
Jak2	组成型	130	9p24/19
Jak3	诱导型	116	19p13.1/8
Tyk2	组成型	140	19p13.2/?

表 21.13　细胞因子与其活化的 Jak

细胞因子	Jak 激酶
IFN-α/β	Jak1，Tyk2
IFN-γ	Jak1，Jak2
生长激素	Jak2
泌乳刺激素	Jak2
红细胞生成素	Jak2
血小板生成素	Jak2
IL-10	Jak1，Tyk2
IL-12	Jak2，Tyk2
G-CSF	Jak1，Jak2
γc 家族	Jak1，Jak3
IL-2，IL-4[a]，IL-7，IL-9，IL-15[b]	
βc 家族	
IL-3，IL-5，GM-CSF	Jak2，？Jak1
gp130 家族	
IL-6，IL-11，CNTF，LIF，OSM，CT-1	Jak1，Jak2，Tyk2

757

[a]当 IL-4 通过Ⅰ型细胞因子受体(IL-4Rα + γc，表达于 T 细胞上)发挥作用时，可使 Jak1、Jak3 活化。当 IL-4 通过Ⅱ型受体(IL-4Rα + IL-13Rα1，表达于非 T 细胞，包括成纤维细胞)起作用时，不能活化 Jak3。

[b]当 IL-15 通过Ⅰ型细胞因子受体(IL-15Rα + IL-2Rβ + γc，表达于 T 细胞上)发挥作用时，可使 Jak1、Jak3 活化。当 IL-4 通过Ⅱ型受体(IL-15RX，表达于肥大细胞上)起作用时，则活化 Jak2。

已知有 4 种 Jak 激酶：Jak1[255]、Jak2[256]、Jak3[257,258]与 Jak4[259]，但它们都未能根据功能或纯化而得以克隆，相反它们均是在新酶研究中得以证实的[253]。现已发现，至少一种 Jak 激酶可被所有 IFN 和细胞因子活化，有些细胞因子可活化 2～3 种 Jak 激酶，但能同时活化这 4 种 Jak 激酶的细胞因子还未被发现[245～254]。表21.12中列举了各种 Jak 激酶的特性，每种细胞因子所能活化的 Jak 激酶总结于表 21.13 中。

一般而言，同一细胞至少表达 3 种 Jak 激酶(因为 Jak1、Jak2 与 Tyk2 广泛表达)，能与相应受体链结合的 Jak 激酶可被活化。Jak 激酶与胞质区的近膜 Box1/Box2 区结合[260～263]，Jak 激酶的 N 端区域为功能必需区[264～266]。Box1 区富含脯氨酸[24,147]，表明 Jak 激酶的 N 端可能具有一个可介导交互作用的 SH3 样结构域。因为所有受体都是以二聚体、异型二聚体或多聚体，所以可假设至少有 2 分子的 Jak 被活化(或者是 2 个相同的 Jak 激酶分子，或是 2 个不同的 Jak 分子)。Jak1、Jak2与Tyk2广泛表达，可被多种细胞因子活化

(表21.12、21.13)。例如,Jak1不仅可被Ⅰ、Ⅱ型IFN活化,还能被许多白细胞介素活化(如IL-2、IL-4、IL-7、IL-9及IL-15),Jak2不仅能被IFN-8活化,还能被生长激素、红细胞生成素、催乳激素、造血细胞因子、IL-3、IL-5及GM-CSF活化[245~250,253]。Tyk2的活化较为严格,它能被IFN-α/β和IL-12活化。有趣的是,Jak1、Jak2与Tyk2可与所有以gp130作为信号传导分子的细胞因子结合,于是产生这样一个问题:这3种Jak激酶是否缺一不可或者仅需其中任何一种或两种就足够呢?有研究显示,至少对于IL-6而言,只有Jak1是必需的[267]。

Jak3因其合成易于被诱导,而不同于其他成员,而且它只被相应受体中含γc的细胞因子活化[35],但受体中含γc的细胞因子却还能活化Jak1。Jak1、Jak3可被IL-2、IL-4、IL-7、IL-9及IL-15活化的分子基础是Jak1与各特异信号链(如IL-2Rβ、IL-4Rα、IL-7Rα和IL-9Rα)发生作用[31,268-271],而Jak3则与γc作用[31,268,269]。尽管这可能同时发生,但这些现象表明Jak1是与Jak3协同效应最强的Jak激酶。由于许多细胞因子可活化所有特异的Jak激酶,以及在某些情况下,多种细胞因子可活化同一种Jak,故Jak并不决定信号传导的特异性。例如,IL-2、IL-4、IL-7、IL-9与IL-15都能使Jak1和Jak3活化,但却诱导出一系列不同信号。另外,Jak2是惟一可由生长激素及红细胞生成素活化的Jak激酶,而这两种细胞因子在功能上相差甚远;与Jak2作用的所有细胞因子受体是同型二聚体。

Jak激酶在信号传导中的重要作用

除了Jak激酶可被各种细胞因子激活外,大量资料显示Jak激酶对于信号传导亦有重要作用。最初IFN信号传导缺陷的突变细胞株对于最初证实Jak激酶在IFN信号传导中的作用是至关重要的,该细胞株的信号传导缺陷可通过基因修补得以恢复[246]。在Tyk2缺陷细胞株(U1细胞)中发现了IFN-α、IFN-β信号传导缺陷;Jak1缺陷细胞株(γ1细胞)中发现了IFN-γ信号传导缺陷[246]。其他资料也显示了Jak激酶对其他细胞因子信号传导的重要性:①无功能的Jak2或Jak3结构可抑制红细胞生成素、生长激素及IL-12的信号传导[272-274],Jak1对于IL-6的信号传导也很重要[267];②人[275,276]、鼠[277~279]Jak3缺陷者表现出发育及信号传导功能缺陷;③在果蝇中,*hopscotch*基因编码一种某些功能性等位基因丢失的Jak激酶,常引起果蝇死亡和繁殖力降低;而获得性功能性等位基因即*hopscotch*(Tumorous-lethal),可引发黑色素瘤及造血器官肥大[280,281];④在斑马鱼中,Jak1对于正常细胞迁移及前期特化至关重要[282];⑤在许多被病毒(包括HTLV-1、v-Abl、脾病毒及v-src)感染的细胞中,Jak激酶仍可被活化[283-286];⑥Jak2抑制剂可抑制急性淋巴母细胞白血病细胞在体外生长[287]。由此可见,Jak激酶在细胞因子信号传导中起了关键作用。特殊的Jak激酶借助特异细胞因子的功能(如发育、分化或增殖)而参与多种过程,当其调节异常时,至少会有某些细胞因子显示出促进细胞转化的功能。

Jak3突变导致一种与XSCID不易区分的自身隐匿性重症联合免疫缺陷

如前述,在人类,γc的突变可引起XSCID。在XSCID中,至少已经发现96种不同突变(这是万维网上统计的数字,网址是http:/www.nhgri.nih.gov/DIR/LGT/SCID/IL2Rgbase.html)。如所预料的,在已检测的γc胞外区位置进行氨基酸取代,可导致与细胞因子的结合功能缺陷[35]。相反,发生在γc胞质区的突变或断裂可导致信号传导障碍。对一种男性X连锁中度联合免疫缺陷病的家系分析中,提示该病源于γc突变[31]。γc中Leu271→Gln的突变可导致疾病,但并未完全丧失与Jak3作用的能力相反,γc胞质区突变,可丧失与Jak3作用的能力,从而也可导致XSCID。因为此免疫缺陷的严重程度与Jak3活化程度呈负相关,XSCID的确是一种细胞因子信号传导缺陷性疾病[35]。另外可推测T细胞与NK细胞的发育也需要Jak3,Jak3的突变可导致一种临床表现与XSCID相似的疾病[31]。这种情况在人类的确存在[275,276],现已发现Jak3存在许多不同的突变。可设想任何干扰Jak3与γc作用、影响其催化活性或与底物作用的突变均可导致临床疾病。

758

γc或Jak3缺陷的小鼠表现型与XSCID及Jak3缺陷引起的SCID相似[109~111,277~279]。这些体内实验资料进一步强调了Jak3在介导γc依赖性功能中的重要作用,并提示Jak3几乎对所有γc功能的发挥是必需的。

一些体外研究结果显示 γc 除能募集 Jak3 外,还有其他功能[274,288],但募集 Jak3 是必需的。由 γc 或 Jak3 缺陷导致的 T 细胞及 NK 细胞发育缺陷很难区分。理论上讲,Jak3 还可能与其他尚未证实的细胞因子受体链发生作用。然而,Jak3 缺陷型的临床表现并不比 γc 缺陷者的表现差,这些体内研究证实 Jak3 只与 γc 有关。有人报道 Jak3 可与 CD40 作用[289],尽管 Jak3 在 CD40 信号传导中的作用未被证实,但这为 Jak3 在一种与细胞因子受体完全不同的系统中发挥作用提供了可能。

Jak 的活化与 Jak-STAT 模式

尽管 Jak 激酶的重要性已被阐明,但对其如何活化、如何调节、如何使其底物磷酸化等的理解同样重要,Jak-STAT 活化模式如图 21.5 所示，该图显示了 IL-2 信号传导通路。在 IFN 或细胞因子作用下,受体形成二聚体或多聚复合物,依次出现 Jak 激酶的并列、转磷酸作用及活化。对于仅含 2 条链的受体而言,其中一条 Jak 链可使另一条 Jak 链直接转磷酸化。在结构更复杂的受体中,可能存在细微的差别,如在 IFN-γ 系统中,因为其受体是由 2 条 a(IFNGR-1)链(均与 Jak1 结合)及 2 条 β(IFNGR-2)链(均与 Jak2 结合)构成的异型四聚体,故仍未弄清是 Jak1 与 Jak2 相互活化,还是其中之一起主要作用。有资料显示可能是 Jak2 起主导作用，因其可使自身和 Jak1 磷酸化，从而使两种酶的催化活性增加[290]。Jak1 使 IFNGR-1 磷酸化，后者可招募 Stat1。此模式还提示 Jak2 可使 Stat1 磷酸化[290]。有趣的是，Jak1 激酶的一种致死突变型可介导特定的 IFN-γ 诱导基因表达,显示出 Jak1 潜在的构成性功能，但具有催化活性的 Jak1 对于抗病毒状态的建立是必需的[290],强调了 Jak1 与 Jak2 的酶催化活性对于正常的 IFN-γ 功能是很重要的。

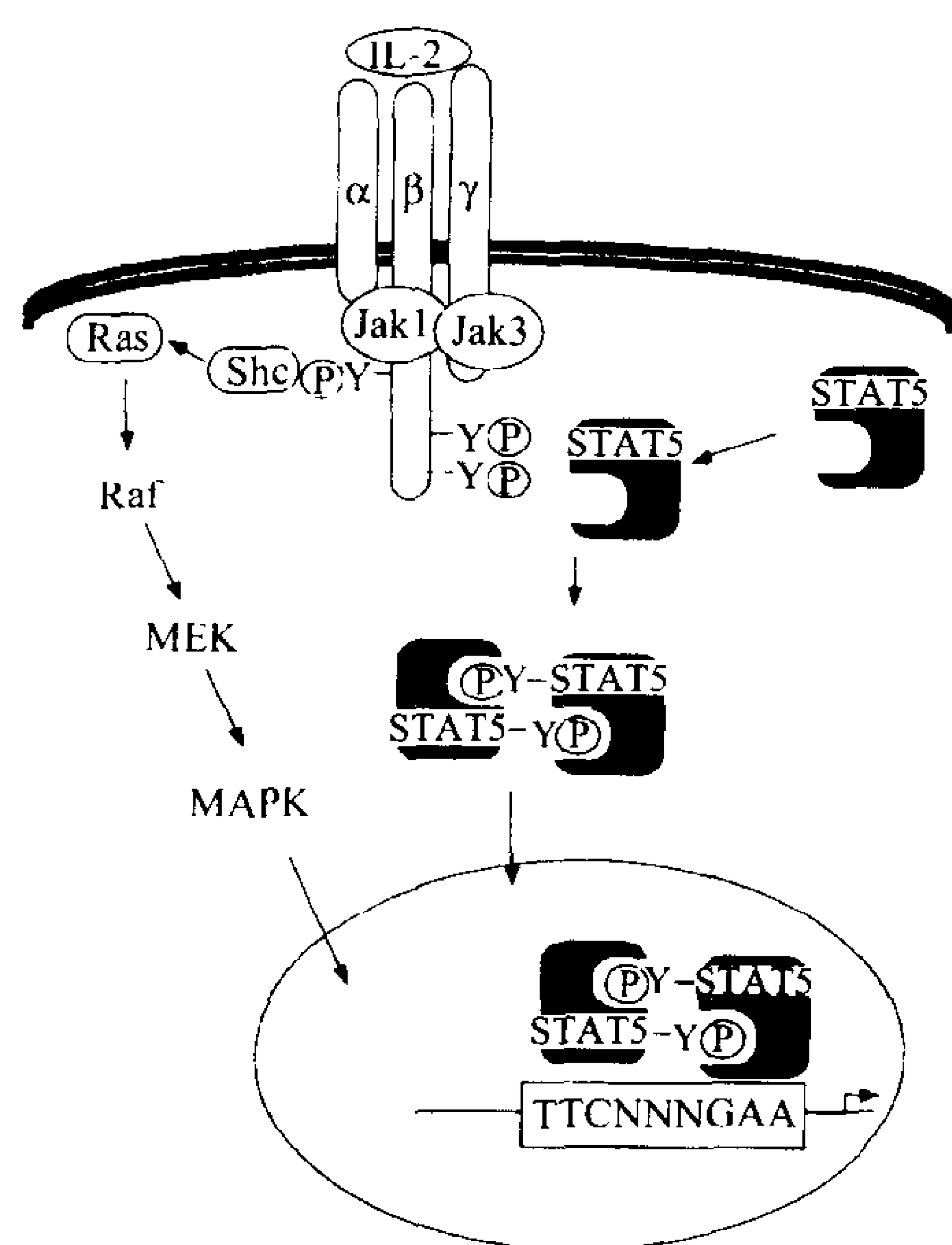


图 21.5　在 IL-2 信号传导通路中的 Jak-STAT 模式图。图中显示了具有不同受体链的两种不同 Jak 激酶家族的协作。Jak1 与 IL-2Rβ 作用,而 Jak3 与 γc 作用。Jak 激酶的活化引起 IL-2Rβ 的酪氨酸磷酸化,使得它可经 SH2 区与 STAT5α 或 STAT5β 结合,STAT 发生自身磷酸化、二聚化并转运至核内,从而调节靶基因的表达。图中还显示了由其他磷酸化的酪氨酸介导的 Shc 招募,后者可参与 Ras/Raf/MEK/MAP 激酶途径。这些途径由许多 I 型细胞因子活化。

上述讨论假定 Jak 激酶的交叉磷酸化是其催化活性放大的机制。除非涉及其他激酶,此假设指 Jak 激酶通过自身磷酸化或转磷酸化作用将自身基本活性扩大到了一个较高水平。Tyk2[291] 或 Jak2[292] 激酶功能区活化环中的一个关键酪氨酸发生突变(如 Jak2 中的酪氨酸 1007),可抑制激酶活性,这与 Jak 激酶靠自身磷酸化得以活化的结论吻合。可见,Jaks 上其他酪氨酸磷酸化可为招募其他信号传导分子产生合适的基序,然而至今为止,其他酪氨酸的突变对于激酶功能的发挥并无明显影响[293]。

假激酶(JH2)区的功能仍不清楚,其他多细胞蛋白酪氨酸激酶不包含此区。JH2 区为何不具激酶功能有以下几个原因说明:①它缺乏 Gly-X-Gly-X-X-Gly 基序中的第三个甘氨酸;②它缺失 1 个酪氨酸和丝氨酸激酶

催化环中保守的、且作为质子接受者的天冬氨酸;③它缺乏结合 ATP[253] 的 Asp-Phe-Glu 基序中的保守性脯氨酸。这些关键氨基酸的缺失可能导致 JH2 区丧失酶催化功能[255]。尽管 JH2 区缺乏催化活性,但已有越来越多的资料显示该区有着重要功能。虽然激酶功能区可单独发挥催化功能,但有趣的是, Jak 激酶 JH2 区的突变可使果蝇(*hopTum-l*/*D-stat*) Jak-STAT 途径过度活化,小鼠 Jak2 区中的谷氨酸 695 到赖氨酸的突变也可导致转染细胞中 Jak2 过度的自身磷酸化及 STAT5 的磷酸化[294]。此外,JH2 区在介导 Jak 与 STAT 蛋白相互作用中有重要功能[295]。

因 Jak 与细胞因子受体相关,故 Jak 激酶在传导各种细胞因子信号中发挥重要功能:包括促进发育(由 Jak3 缺陷表现为至少发生 IL-7 信号传导缺陷这一事实得以证实), 对促有丝分裂的生长因子(如 IL-2、IL-3 等)信号传导作用, 以及抗病毒效应(IFN)。对于斑马鱼 Jak1 的功能分析显示其在早期脊椎发育中的作用, 以及在早期发育中 Jak1 激酶为母源性的[282]。Jak1 在斑马鱼发育中的作用与 Jak 激酶在果蝇早期发育中的作用同样重要[296]。

存在其他 Jak 吗?

很自然,在其他 Jak 被发现之前,没人可能预测它们的存在。迄今为止, 没有发现明显的类似物,提示如果存在其他 Jak,可能它们更具分歧性,或者被较为罕见的或种系限制的基因编码。有趣的是,至少发现了 Jak3 的剪接产物变体[297],该 Jak 最初被发现时,是作为乳腺癌一个表达基因[298]。

作为 Jak 底物的 STAT 蛋白至少决定了部分特异性

已知 Janus 激酶家族自身不能决定特异性(正如已经证实有不同功能的不同细胞因子可活化同一 Jak), 对此有一合理的假说: 同一 Jak 可能根据相应受体而有不同的底物。了解最为清楚的 Jak 底物是 STAT[246~254]。在 IFN 信号传导缺陷的突变细胞系中,除了上述的 Jak 缺陷者外,还有 STAT 蛋白缺陷者,这是最初证实 STAT 蛋白有重要作用的资料之一。

STAT 蛋白是潜在的转录调节因子,最初存在于细胞质中,然后被转运至细胞核。最初发现 STAT 是一种可与 IFN-可诱导基因启动子相结合的因子[254]。现已证实了有 7 种 STAT 蛋白: STAT 1[299], STAT 2[300], STAT 3[301,302], STAT 4[303,304], STAT 5a[305~309], STAT 5b[307~310] 以及 STAT 6[311]。表 21.14 中列举了活化各 STAT 的细胞因子。尽管 STAT 保持了较为合理的相似性, STAT5a 与 STAT5b 异乎寻常地近似, 人 STAT5a 与 STAT5b 在氨基酸水平有 91%的相同性[307~310]。尽管有人认为这些蛋白可能有着冗余的功能,但有趣的是,鼠和人的 STAT5a 比人 STAT5a 和人 STAT5b 或鼠 STAT5a 和鼠 STAT5b 更为接近,鼠与人的 STAT5b 亦是如此。总之,这些资料提示存在着进化上的强制力使 STAT5a 和 STAT5b 之间保持差异,并使它们具有不同的重要功能,选择性活化不同的靶基因。因为活化的 STAT 蛋白以二聚体形式存在,至少一些 STAT 可形成异型二聚体(如,STAT1 与 STAT2 或 STAT3[254], STAT5a 与 STAT5b[307]),这使得可形成的不同复合物

表 21.14 细胞因子与其所活化的 STAT

细胞因子	Jak 激酶
IFN-α/β	STAT1、STAT2
IFN-γ	STAT1
生长激素	STAT5α、STAT5β
泌乳刺激素	STAT5α、STAT5β
促红细胞生成素	STAT5α、STAT5β
促血小板生成素	STAT5α、STAT5β
IL-10	STAT3
IL-12	STAT4、STAT3
G-CSF	STAT3
γc 家族	
IL-2, IL-7, IL-9, IL-15	STAT5a、 STAT5b、STAT3
IL-4	STAT6
IL-13[a]	STAT6
βc 家族	
IL-3, IL-5, GM-CSF	STATa、STATb
gp130 家族	
IL-6, IL-11, CNTF, LIF, OSM, CT-1, Leptin	STAT3
	STAT3

[a]IL-13 与 IL-4 关系十分密切,但 IL-13R 不含 γc。

数量增加。由于一些 STAT 存在两种不同的拼接形式又增加了复杂程度[310,312]。一些 STAT 形式是无活性的,如果这些形式的选择性拼接受到某种调控,则会产生负调节效应。

图 21.6A 为 STAT 蛋白示意图。STAT 可被分为两组:一组分子较长(包括 STAT2 与 STAT6,大约有 850 个氨基酸),另一组较短(包括 STAT1、STAT3、STAT4、STAT5a 及 STAT5b,有 750~800 个氨基酸)。有趣的是,STAT 在染色体上的定位提示有三种基因丛。鼠 STAT2 与 STAT6 都定位于 10 号染色体上,STAT1 与 STAT4 定位于 1 号染色体上,STAT3、STAT5a 及 STAT5b 定位于 11 号染色体[313]。对应地,人 STAT5a 与 STAT5b 彼此靠近地位于染色体 17q[310]。

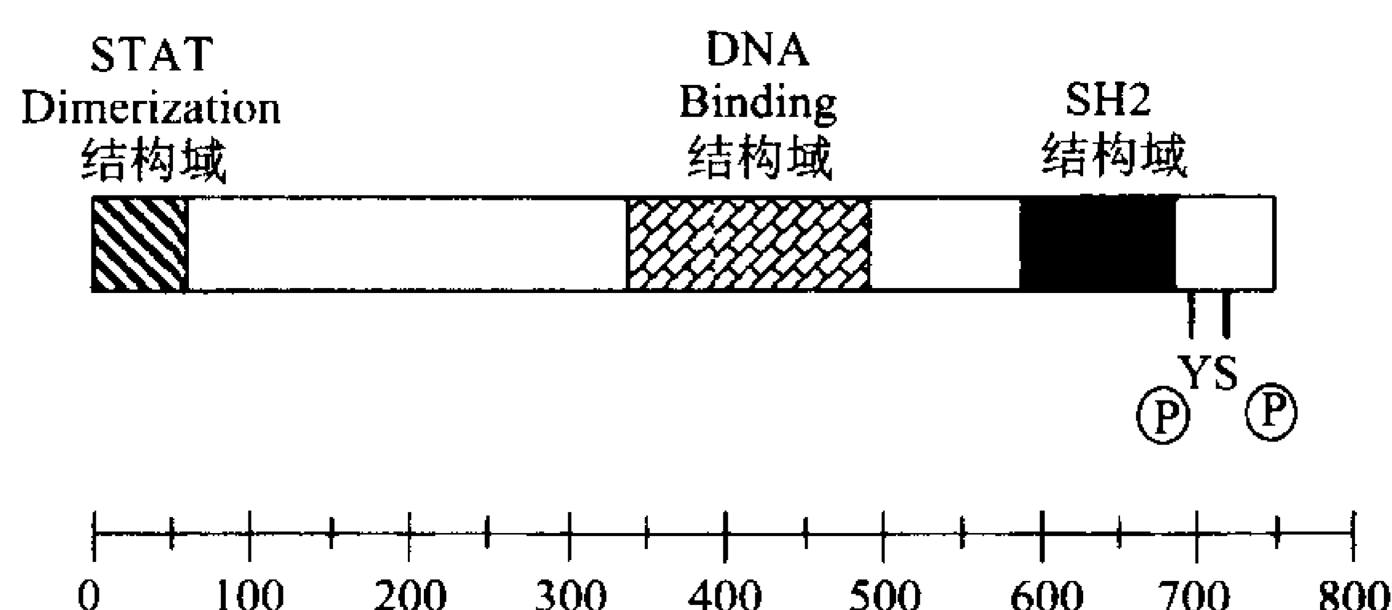


图 21.6 典型的 STAT 蛋白结构图。图中显示了以下几个重要功能区的定位:①N 端介导结合在邻近 GAS 位点的 STAT 二聚体的相互作用;②DNA 结合区;③SH2 结构域介导 STAT 与受体结合,以及 STAT 酪氨酸磷酸化后的二聚体/异型二聚体的形成;④保守的酪氨酸残基位点,该残基的磷酸化可诱导由 SH2 介导的 STAT 二聚化。在 STAT1 和 STAT3 中,位于保守酪氨酸 C 端的丝氨酸 727 对于磷酸化作用十分重要。在 Stat1 中,p48 与 STAT 二聚化结构域下游作用。CBP/p300 可与 N 和 C 端作用。尽管有研究提示在 DNA 结合区与 SH2 结构域之间存在 SH3 结构域,但该说法仍未被证实,也无与富含脯氨酸区域相互作用的报道。该结构为 STAT1、STAT3、STAT4、STAT5α 及 STAT5b 的典型结构。STAT2 与 STAT6 中仍保留其主要特征,但该结构在长度上约多出 50~100 个氨基酸。

STAT 活化后即作为转录活化因子发挥功能,继而细胞会发生一系列事件。它们可与磷酸化酪氨酸位点结合,可使自身酪氨酸磷酸化,继而二聚化,然后从细胞质转运至细胞核,与靶 DNA 序列结合,促进基因表达。所有 STAT 共有的一些保守性结构特征有助于解释这些功能,包括 SH2 结构域、保守的酪氨酸残基、DNA 结合区、C 端活化区及 N 端 STAT 四聚化区。其他结构域对于功能同样重要。STAT 的特殊性质将在以后讨论。

760

STAT 与受体或其他分子的结合,STAT 的酪氨酸磷酸化及二聚化

每种 STAT 蛋白都有 1 个 SH2 结构域,该结构域有两种重要功能:①参与结合受体,例如,STAT1 结合于 IFNGR-1[314]上、STAT2 结合于 IFNAR-1[315]上,STAT3 结合于 gp130[316]上、STAT5 结合于 IL-2Rb 与 IL-7Ra[187,317]上,STAT6 结合于 IL-4Ra[318]上;② 介导 STAT 二聚化。已经证实 IFN-α 受体 IFNAR-1 或 IFNAR-2 上无 STAT1 结合位点,STAT1 可能在 STAT2 自身酪氨酸磷酸化后即与 STAT2 作用[290]。由于 Jak 与 STAT 可发生直接共沉淀作用,说明 STAT 可能与 Jak 结合[283,295]。在 STAT 与受体结合后,保守的酪氨酸(STAT1 中的酪氨酸 701,STAT5a 中的酪氨酸 694 等)可被磷酸化。该磷酸化为 SH2 结构域介导的 STAT 二聚化所必需。STAT 磷酸化后,便即解离,然后与相同的或其他 STAT 形成二聚体,这样更利于它与受体链的再度作用,其原因之一是 STAT 二聚化涉及 2 个磷酸化 SH2 的相互作用(二价结合),而它与受体的结合仅涉及 1 个磷酸化 SH2 的作用(单价结合)。因此,STAT 中保守的 SH2 结构域及一个关键的酪氨酸是实现 STAT 的有效活化的关键。

尽管 IFNGR-1[314]和 IL-7Ra[187]各含 1 个 STAT 结合位点(分别与 Stat1 和 Stat5 结合),许多受体分子,包括 IL-2Rβ[187,317]、IL-4Rα[318]、gp130[316]、红细胞生成素受体[319]和 IL-10Rα[320],具有 2 个以上 STAT 结合位点,这似乎显得功能冗余,但它们具有使 2 个 STAT 同时活化的潜能,可给局部提供较高浓度的磷酸化 STAT,从而促进 STAT 二聚化。

STAT 核转运及其与 DNA 结合

STAT 二聚化后,便转运至细胞核内。该过程的分子基础尚不清楚,可能是否二聚体暴露出核定位区,还是由于单体 STAT 在某种限制性蛋白作用下以活化形式保留于细胞质中,或者是由于 STAT 二聚体与某种分

子伴侣结合促进它们的核转运。

尽管多数 STAT 二聚体直接与 DNA 结合，但对于 IFN-α/β，相应形成的是 STAT1-STAT2 二聚体，它们通过 1个 48kDa 的 DNA 结合蛋白与 DNA 交联[254]。其他 STAT 二聚体与 DNA 结合则不需要附加蛋白的作用。STAT1-STAT2-p48 复合体识别含有 AGTTTNCNTTTCC 基序（即 IFN-刺激反应元件，ISRE）的结构，而其他 STAT 复合体更趋于结合半回文结构的 TTCNmGAA 基序，m = 3 或 4，其数值在这些序列中可在一些变动。

与 DNA 结合的区域被定义为 DNA 结合区[318]。应用由不同 STAT 互换结构域形成的一系列嵌合体发现一种约含 180 个氨基酸的区域，含 2 个保守的亚结构域，赋予 DNA 结合特异性。尽管许多 STAT 可与同一基序结合，它们结合的相对效率相差显著，提示不同的 DNA 结合区赋予了结合的特异性。例如，STAT1 二聚体特异识别 $TTCN_3GAA$ 基序，STAT6 则与 TTCN4GAA 基序[318]。不同 STAT 依据它们与 DNA 结合特异性的而存在的差异可从某种角度解释不同 STAT 调节不同靶基因表达的分子基础的解释。

当多个 STAT 结合位点非常接近时，其 N 端可介导 STAT 蛋白与 DNA 间的协作结合[321,322]。这种情况见于 IFN-γ 基因，该基因含多个 DNA 结合位点；IL-2 受体 α 链基因亦是如此，该基因有 2 个紧密并置的 IFN-γ 活化基序[GAS]，与 IL-2 可诱导的 IL-2Rα 转录[323~325]有关。

761

从历史角度看，STAT 蛋白是最先被认识的酪氨酸磷酸化的转录因子。以前认为，酪氨酸磷酸化主要与近膜事件有关。STAT 的一个重要性质是酪氨酸磷酸化实际上虽与近膜事件有关，但该磷酸化可引起 STAT 形成二聚体，而该二聚体的形成是核定位及 DNA 结合的先决条件。STAT 可直接与 Jak 激酶作用，如开始讲到的 STAT 5 与 Jak3[283]，为 STAT 被 Jak 激酶磷酸化提供佐证，并提示有时 STAT 更趋于与 Jak 结合，而不是受体。

STAT 的转录活性

STAT 蛋白怎样激发初始转录是一个需要思考的问题。除酪氨酸可被磷酸化外，一些 STAT 上的丝氨酸也可被磷酸化，例如，对于 STAT 1 和 STAT 3，已经证实丝氨酸磷酸化是发挥完整的活性所必需的[326,327]，而 STAT 2 却不发生丝氨酸磷酸化[254]。这些 STAT 的磷酸化位点（Ser 727）T 位于蛋白的 C 端的交叉活化区[328,329]。有趣的是，Ser 727 区域类似 MAP 激酶识别位点，有研究发现 MAP 激酶活性是 IFN-α/β 可诱导基因表达所必需[330]。

除了 STAT 蛋白的调控修饰外，值得注意的是 STAT 与其他因子相互作用的能力。正如前所述，STAT1-STAT2 异型二聚体仅在 DNA 结合蛋白存在的情况下与 DNA 发生结合；该 STAT1-STAT-p48 复合体即 ISGF3[247,254]，现已清楚 STAT1 中介于氨基酸 150～250 的区域为与 p48 相互作用所必需的[254]。据报道，在 *ICAM-*1 基因转录活化过程中，STAT1 与 Sp1 作用，有增效作用[331]。在酵母双杂交试验中发现 STAT3 一个较短的选择性剪接形式 STAT3β 与 c-Jun 相互作用，而该作用可增强报告基因的转录活性[332]。此外，发现 STAT1 与 STAT2 可与高效转录活化因子 CREB 结合蛋白（CREB binding protein，CBP）及 p300 相互作用[333~335]。对于 STAT1，其 N 末端及 C 末端 、循环 AMP 反应元件结合蛋白（cyclin Aup response element binding protein，CREB），以及 CBP 的 E1A 结合区各自间的相互作用介导了转录活化效应[334]。已发现 STAT 5a 与糖皮质激素受体有关[336]。另外，在 IL-2Rα 基因中已定义的 IL-2 反应元件不仅需要与 STAT 5 结合，而且还需要其邻近位点结合 Elf-1（一个 Ets 家族转录因子）[324]。因此，有活性的 STAT 复合体包括 STAT 蛋白与其他因子。

STAT 的特异性

通过分析 STAT 蛋白对不同细胞因子的活化反应，发现与 Jak 类似，同一 STAT 可由多种细胞因子活化。现仍不清楚不同的 STAT 具有怎样的特异度。目前为止至少报道了 7 种 STAT 中的 6 种蛋白（STAT1、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b 和 STAT6）表达缺陷的小鼠部分表现型（表 21.15）。STAT1 敲除小鼠表现出 I 、II 型 IFN 作用缺陷，提示 STAT1 对于 IFN 的作用非常关键，即使其他一些细胞因子也可活化 STAT1[337,338]。尽管对于其他细胞因子而言，STAT1 具有重要却又是冗余的功能，STAT1 缺陷小鼠的表型提示有必要谨慎解释使用高浓度细胞因子和表达多种受体的细胞系的体外试验，因为这些试验并不总是服从生理上相关的 STAT 活化模式。STAT3 缺陷小鼠不能出生，在早期胚胎就有明显的致死性[339]。有趣的是，胚胎植入后，其发育和

763

生长会发生缺陷。STAT4 缺陷小鼠 表现出与 IL-12 缺陷小鼠十分相似的表型(Th1 发育缺陷),与 STAT4 仅可被 IL-12 活化这一现象一致[340,341]。同样,STAT6 缺陷小鼠显示出与 IL-4 缺陷小鼠相似的表型(Th2 发育缺陷)[342~344],与 STAT6 仅被 IL-4 和关系密切的 IL-13 活化相一致。STAT5a 缺陷小鼠表现出催乳素效应缺陷,包括肺小叶增殖缺陷[345],而 STAT5b 缺陷小鼠生长缺陷,与侏儒近似[346]。因此,尽管 STAT5a 与 STAT5b 表面上总是被同时诱导,但已非常清楚这些相似 STAT 的选择性删除将导致选择性缺陷。

表 21.15 Ⅰ、Ⅱ型细胞因子及受体 Jaks 和 STAT 缺陷小鼠的表型

Ⅰ型细胞因子及受体	
γc 家族	
IL-2[103,431,432]	胸腺细胞与外周血 T 细胞发育正常,体外多克隆 T 细胞反应减弱,体内正常。自身免疫性疾病合并血浆免疫球蛋白同种型水平显著改变。溃疡性结肠炎样炎症反应
IL-4[106,107]	Th2 细胞因子反应缺失,类型转换;IgG1 和 IgE 缺失
IL-2/IL-4[108]	T 细胞发育基本正常
IL-7[71]	胸腺及外周血 T 淋巴细胞发育和 B 细胞增殖显著削弱,导致深度淋巴球减少症
IL-2Rα[118]	最初淋巴结发育正常,但随着年龄的增长,外周淋巴器官扩大,多克隆 T、B 细胞增殖,活化的 T 细胞凋亡作用减弱,自身免疫性疾病,包括溶血性贫血、炎症
IL-2Rβ[119]	严重自身免疫性疾病。包括溶血性贫血。约 3 个月内死亡。T 细胞活化处于无调节状态,B 细胞分化调节障碍,免疫球蛋白类型转换
γc[109~111,120]	胸腺发育显著削弱,双阴性、双阳性及单阳性胸腺细胞同时存在。外周血中 CD4⁺记忆性 T 细胞呈年龄依赖性聚集。常规 B 细胞数量显著减少,B1 细胞存在,无 NK 或 γδ 细胞。缺乏 gut 相关的淋巴结组织,包括 Peyer'S 斑
IL-7Rα[70]	胸腺及外周血 T 淋巴细胞发育和 B 细胞增殖显著削弱,导致深度淋巴细胞减少症
βc 家族	
IL-5[433]	嗜酸性粒细胞的基础水平降低,感染后诱导嗜酸性粒细胞的能力削弱。CD5⁺ B1 细胞的发育缺陷。抗体及细胞毒性 T 细胞的反应正常
GM-CSF[434,435]	造血作用正常,肺畸形,肺功能动态失衡
IL-3Rβ[436]	无缺陷(原因归于 βc 的功能冗余)
βc[137,436]	机体对 IL-5 与 GM-CSF 的反应削弱,但对 IL-3 的反应正常。嗜酸性粒细胞的基础水平以及感染后水平均明显下降。肺畸形
gp130 家族	
IL-6[437]	在感染或组织损伤后,急性时相蛋白反应削弱,造血干细胞数量减少
gp130	于胚胎期死亡。心肌细胞发育不全,心室壁薄,三尖瓣正常,以 CFU-S、CFU-Gm、BFU-E 显著减少为特征的血液系统畸形,胸腺尺寸显著减少,胸腺细胞数目降低。胚胎生殖细胞显著减少,胎盘尺寸减少
LIF[440~442]	造血干细胞减少,交感神经正常,体外神经递质转换缺陷。胚泡培植缺陷
LIFRβ[443,444]	出生后死亡,造血及胚细胞正常。但多种神经元、骨骼肌、胎盘以及新陈代谢出现缺陷。该型小鼠表型较 LIF 缺陷小鼠更为严重,反映了 LIFRβ 由一些细胞因子包括 CNTF、LIF、CT1 共享
CNTF[445]	递增性萎缩,运动神经元缺失。
CNTFRα[446]	运动神经元严重缺陷导致围产期死亡。比 CNTF 缺陷小鼠表型更为严重,提示其他细胞因子可能也享用了 CNTFRα
IL-12	
IL-12p40[447]	产生 IFN-γ,诱导 Th1 反应的能力削弱,IL-4 水平升高,IL-12 与 IL-10 水平正常。CTL 应答削弱。
IL-12Rβ1[448]	IL-12 信号传导障碍,IL-12 无法增强 NK 细胞活性,但 IL-2 具此能力。在对 ConA 或抗 CD3 单抗的反应中,IFN-γ 产生不足
EPO,TPO,G-CSF,M-CSF	
EPO[449]	胚胎期死亡,胎肝红细胞增殖完全阻断。导致严重贫血,BFU-E 与 CFU-E 祖细胞发育正常
EPOR[449,450]	同上
TPOR[451]	巨核细胞、血小板数量显著降低,但其他血细胞数目正常
G-CSF[452]	中性粒细胞减少及中性粒细胞动员减弱,粒细胞、巨噬细胞前体缺失
M-CSF[138,453]	骨硬化症、无牙、雌鼠不孕
M-CSF + GM-CSF[138]	以上两种表型的合并,伴随骨硬化症、肺泡蛋白质沉积症,早期死于肺炎
Ⅱ型细胞因子及受体	
IFNAR-1[454~456]	发育正常。对于多数病毒感染表现为防御能力降低
IFN-γ[457,458]	淋巴结发育正常,对于利斯特氏单核细胞增多菌、鼠弓形虫、硕大利什曼原虫,牛型结核菌等的感染抵御能力下降、对于一些病毒可产生抗性反应。在利什曼原虫感染后,CD4⁺效应细胞表现为 Th2 应答
IFNGR-1[455,456,459]	淋巴结发育正常,对于利斯特氏单核细胞增多菌,鼠弓形虫、硕大利什曼原虫,牛型结核菌等的感染抵御能力下降、对于一些病毒可产生抗性反应
IL-10[460]	淋巴结发育正常及抗体反应正常,伴随慢性小肠结肠炎、贫血、生长迟缓,对败血症易感性增加

续表

STAT 和 Jak	
STAT1[337,338]	对Ⅰ型、Ⅱ型 IFN 不反应
STAT3[339]	胚胎期死亡，胚泡可培植但不可生长。该表型比 gp130 缺陷小鼠的表型更为严重，提示 STAT3 可通过一种 gp130 非依赖的方式发挥作用
STAT4[340,341]	Th1 发育缺陷，与 IL-2 缺陷小鼠有同样表型
STAT5α[345,346a]	由于泌乳刺激素信号缺陷而导致乳腺小叶发育不全。IL-2 诱导的 IL-2Rα 表达缺陷。超抗原诱导的 Vβ8 阳性 T 细胞扩增缺陷
STAT5β[346]	类似侏儒的身材矮小
STAT6[342~344]	Th2 发育缺陷，本质同 IL-4 缺陷小鼠
Jak1[461]	围产期死亡，IFN、γc 依赖的细胞因子以及 gp130 依赖的细胞因子信号缺陷
Jak2[462,463]	胚胎期死亡，对 EPO、TPO、IFN-γ、βc 依赖性细胞因子反应性丧失

STAT 属于古老的系统发生家族

正如果蝇具有 Jak 激酶，也存在果蝇 STAT，又表示为 DSTAT 或 STAT92E[347,348]。Jak 激酶与 STAT 蛋白存在于较为低等的生物体内提示该系统在进化上较为古老，其他系统可帮助阐明该系统某些细微之处。近来，已证实盘基网柄菌属（*Dictyostelium*）内存在于一种 STAT 可识别的 TTGA 序列[349]。该 STAT 具有与 STAT5b 高度相似的序列，并能结合哺乳动物的 ISRE[349]。有趣的是，酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）不具有 STAT，因为在其完整基因组中还未证实 SH2 区域的存在。

STAT 功能

已知 STAT 蛋白转运至细胞核内与 DNA 结合，不言而喻，它们可结合在靶基因的调节区，从而影响转录。迄今为止仅证明它们能作为基因表达的活化剂，并不能充当抑制剂的角色。STAT 蛋白的最初发现基于 IFN 可诱导基因的研究，该研究是作为在抗病毒状态下的细胞分化研究的一部分。然而，关于 STAT 蛋白是否仅作为分化因子，或者还像造血及免疫因子如 IL-3、IL-5、GM-CSF、IL-2、IL-4、及 IL-7 等一样参与细胞分裂和增殖反应，具有相当多的争议。事实上，多种现象提示 STAT 在细胞增殖中也有作用[252]：①现已证明在多种体外系统中，病毒或病毒的肿瘤基因与 Jak-STAT 途径的激活密切相关，提示 STAT 在细胞转化中具有作用[283~286]；②许多 STAT 基因敲除的小鼠表现为细胞增殖缺陷。例如，STAT4 缺陷小鼠表现出细胞对 IL-12 的增殖反应减弱[340,341]，而 STAT6 缺陷小鼠则表现出细胞对 IL-4 的增殖反应减弱[342~344]；③STAT5 的缺陷可削弱 IL-3 诱导的细胞增殖反应[350]；④IL-2 受体 β 链中介导 STAT 活化的酪氨酸位点突变，可导致细胞增殖效应削弱[317,351]。然而，也存在其他不同结论的实验数据；①有报道指出红细胞生成素受体中介导 STAT 活化的酪氨酸突变并不削弱红细胞的增殖反应[352]，从其他受体的突变实验中可得到相反的结论[353]，因此 STAT 在红细胞生成素诱导的增殖反应中的作用仍不清楚；②，STAT6 缺陷小鼠表现出 IL-4Rα 的表达降低，提示其对于增殖效应的影响是间接的[344]。类似地，IL-2Rβ 中关键的酪氨酸突变也可导致 IL-2Rα 表达减少[354]。这样，有较为充分的证据说明许多 STAT 在细胞增殖效应中起着重要作用，至少在一些情况下通过调节受体的表达水平，而产生间接的影响。最后，已证实 STAT1 与细胞生长障碍及 cdk 抑制剂 p21$^{WAF1/CIP1}$ 的产生有关[355]，可 STAT1 的活化发生在致死性Ⅱ型侏儒症患者中，这是由纤维母细胞生长因子受体（fibroblast growth factos receptor，FGFR3）的突变而引起的[356]。在这种发育不全个体中，FGFR3 的突变诱导 STAT1 的核转运、p21$^{WAF1/CIP1}$ 的表达，以及生长受阻，提示 STAT1 与该疾病相关。因而，不同 STAT 可潜在地介导生长过剩和生长过缓。而且，STAT 还可能具有其他作用，例如，STAT3 可作为连接磷脂酰肌醇（PI）-3-激酶（PI-3K）与Ⅰ型 IFN 受体 IFNAR-1 组分的衔接分子[357]。

还存在其他 STAT 吗？其他蛋白质可与 GAS 基序结合吗？

通过低严格杂交鉴定 STAT 的尝试还未取得普遍成功，但已经成功鉴定了 STAT4 与 STAT5b 克隆（实际

上后者是通过高严格杂交而得以发现的)。因此,如果有或更多不同的 STAT 存在,它们仍需通过提纯而得以克隆。因为每种被鉴定的 STAT 均表现出相关的特殊功能,所以那些被特殊 STAT 促进的其他特殊功能有可能被鉴定。此外,现已发现一种非 STAT 蛋白可与 GAS 基序的结合。在大细胞(B 细胞)淋巴瘤中可经常发现 *BCL-6* 基因的突变或转位,*BCL-6* 可与 GAS 基序结合,后者可结合 STAT6 并特异性抑制 IL-4 活性[358]。这些资料提示 IL-4/IL-13 信号调节失控可能促进这些淋巴瘤的发生。而且,BCL-6 表达缺陷的小鼠表现出不完全的生发中心形成,提示生发中心的形成依赖于 *BCL-6* 对某种 STAT-反应性基因的调节作用(可能是负向调节)[358]。

其他潜在的将信号从细胞质传递到细胞核的转录因子(NF-κB 与 NF-AT)

STAT 蛋白具有一个吸引人的特性,即它们在细胞质中以无活性形式存在并且快速向核转位,信号在几分钟内快速从细胞膜传到核 DNA 结合因子使得 STAT 的头一个大写字母运用得非常合适,这是考虑到在临床上"STAT"急救医生与紧急需要密切相关。STAT 蛋白的快速激活与 NF-κB 蛋白家族有些类似。然而,对于 NF-κB 而言,其快速核转移的机制却完全不同。STAT 蛋白的酪氨酸磷酸化是核转移的起始,而 NF-κB 丝氨酸磷酸化或 IkB 泛素化引起其裂解或破坏,最终使得 NF-κB 的释放和核转移[359,360]。第三个从胞质到核转移的例子发生在活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated Tcell,NF-AT)蛋白家族,该家族对于调节许多细胞因子(包括 IL-2、IL-4 与 GM-CSF)的转录非常重要[361,362]。NF-AT 被转运至核,与 AP-1 蛋白家族作用形成功能性复合体。钙调磷酸酶的活化与 NF-AT 的去磷酸化引起其核转移[361,362]。因此,潜在的转录因子可通过三种不同机制进行胞质到核的转移,且均与磷酸化或去磷酸化有关。

764

Jak 的其他底物

因为 Jak 是有效的胞质酪氨酸激酶,很明显活化 STAT 可能不是 Jak 的功能。许多资料显示 Jak 可使 STAT 蛋白受体及 STAT 自身的酪氨酸磷酸化。体外实验资料显示 Jak 激酶可使 STAT 受体上非 STAT 结合链上的酪氨酸磷酸化。例如,在 COS 细胞的过度表达试验中,Jak1 不仅可使 IL-2Rβ 上结合 STAT 蛋白所必需的第 392 和 510 位酪氨酸磷酸化,而且可使 Shc 结合位点第 338 位酪氨酸磷酸化[317]。有趣的是,在所报道的 3 个酪氨酸位点同时发生突变的系统中,细胞增殖能力丧失,提示发生在这些酪氨酸上的分子结合非常关键[317]。因此,Jak 激酶可促进这些受体的作用底物不断补充;另外,众所周知 Jak 激酶可发生自身磷酸化或使其他 Jak 发生磷酸化。因为 Jak 激酶含有许多保守的酪氨酸残基,可能其中的一些被磷酸化并为重要的信息分子提供结合位点。最近报道 STAM 衔接分子是 Jak 的一种新底物[363],该分子可能在细胞因子介导的细胞增殖中起着重要作用。还可能发现更多的新底物,这是一个需要深入研究的新领域。

其他对于细胞因子较为重要的信号传导分子

除 Jak 以外的其他酪氨酸激酶

一些细胞因子除了可活化 Jak 激酶以外,还可以活化 Src 家族激酶。例如,IL-2 可使 T 细胞中的 p56lck[364,365] 以及 B 细胞中的 p59fyn 和 p53/p56lyn 活化[366,367]。已有报道提出这些激酶的活化与 IL-2Rβ 的 A 区有关,而 IL-2Rβ 的 S 区 则被发现与 Syk 激酶的活化有关。然而人们对于细胞因子活化 Jak 激酶的意义的理解远不如对 Jak 激酶本身了解得深刻:第一,Lck 缺陷型细胞可产生对 IL-2 明显的增殖反应[369,370];第二,去掉 IL-2Rβ 的 A 区后,仍可产生增殖效应,但与野生型相比有一定程度的减弱[371]。尽管 IL-2Rβ 的第 355 及 358 位酪氨酸残基 Y355 和 Y358 被认为是 Lck 的酶作用底物[196],但有研究发现同时使这 2 个残基发生突变,仍不会影响细胞的增殖反应[317]。Y338 为 IL-2 经 PTB 结构域募集 Shc 所必需[317,372],并且该残基位于 A 区,该

位点的突变可导致细胞增殖效应的完全丧失[196]。因此,由 A 区缺失引起的增殖效应丧失与 Y338 的缺损关系更为密切,而不是由于缺少 Lck 的作用。很明显,要弄清 IL-2 活化 Src 家族激酶的生物学意义还需要更为深入的研究。有关 Syk 相互作用的生物学意义也未弄清。因为 Syk 与 Jak1 均与 IL-2Rβ 的 S 区密切相关,故删除 S 区后可同时阻断 IL-2 与两者的作用。Syk 缺陷型小鼠表现出对于 IL-2 的正常增殖效应[373],进一步提示 Syk 在由 IL-2 介导的增殖效应中并不起重要作用。相似地,G-CSF 受体与 Lyn 和 Syk 组成复合体[374],但 Syk 缺陷型小鼠并未表现出 G-CSF 信号传递缺陷[373]。关于其他激酶,如 βc 可与 Src 家族激酶作用[375]。研究发现 gp130 与许多其他激酶如 Btk、Tec 及 Fes 等密切相关[376-378],IL-4Rα 与 Fes 相互作用[379]。总之,有关酪氨酸激酶在细胞因子信号传递中的生物学意义知之甚少,它们可能有着重要功能,只是较难估计,部分原因归于存在冗余的途径。

IRS-1 与 IRS-2

最初认为 IRS-1 是胰岛素受体酪氨酸磷酸化底物[380],有趣的是,在造血细胞中,胰岛素和 IL-4 均可诱导 IRS-1 类分子的酪氨酸磷酸化[381]。此外,32D 祖粒细胞缺乏 IRS-1,,只能在转染 IRS-1 后才能对胰岛素或 IL-4 产生反应[382]。另一个相关分子 IRS-2 也具有相同功能[380]。胰岛素受体与 IL-4Rα 均含有 NPXY 序列,该序列对于结合 IRS-1 或 IRS-2 很重要;在 IL-4Rα 中,NPXY 序列包含在一个命为 I4R 基元中[383]。

后来证实其他的细胞因子可以活化 IRS-1 或 IRS-2。例如,生长激素可诱导 IRS-1[384]和 IRS-2[385]磷酸化,IFN-γ 和 LIF 可诱导 IRS-2 磷酸化[385],γc-依赖性细胞因子、IL-2、IL-7 以及 IL-15 可诱导 T 细胞中 IRS-1 与 IRS-2 的酪氨酸残基发生磷酸化[386]。这些发现的生物学意义仍不清楚,如仅转染了 IL-2Rβ 的 32D 细胞 cells(该细胞组成型表达 γc)可对 IL-2 产生强烈的增殖反应[369],相反,只有当 32D 细胞同时表达 IL-4Rα 和 IRS-1 时,该细胞才能产生对 IL-4 的增殖反应。因此,IL-2 增殖效应并不严格依赖于 IRS-1,而 IRS-1 及 IRS-2 在 IL-2 信号传导中的确切作用还未弄清。由于 IRS-1 与 IRS-2 具有许多磷酸化酪氨酸结合位点 ,尤其是对于 PI 3-激酶 的 p85 亚单位,它们可能用来募集一些重要的辅佐分子,或者它们在介导不同细胞因子的增殖信号中有着不同的重要性。

765

磷脂酰肌醇-3 激酶

磷脂酰肌醇-3 激酶(PI-3K)是一种脂酶,由一个 85kDa 的调节亚单位和一个 110kDa 催化亚单位[387]组成。许多细胞因子可诱导 PI-3K 磷酸化及活化[388~391],运用阻断剂如渥曼青霉素(wortmannin)或 LY294002 的研究表明,PI -3K 在细胞因子信号传导过程中有着重要作用[391]。IRS-1 具有与 PI -3K 结合的多种位点(YXXM 基序),因此一些细胞因子如 IL-4、与 IRS-1 的相互作用可能是 PI -3K 被募集的机制。

细胞因子信号下调

前面讨论的问题多集中于信号的产生及传导,细胞因子信号终止机制同样重要。信号终止可能发生的潜在水平包括:①在细胞因子(转录和翻译水平)、相应受体或下游信号分子的产生以及这些分子降解之间达到一种平衡水平;②调节受体及下游信号分子的活化状态水平。

细胞因子产生的转录调控机制被广泛采用。许多 T 细胞源性细胞因子如 IL-2、IL-3 及 IL-4 仅被活化的 T 细胞产生,当细胞失去活性时不再分泌细胞因子。IL-2 受体链的生成亦是如此,但有关大多数细胞因子受体的转录/翻译调控的研究并不深入。许多蛋白的表达为组成型的, 除了转录调节外,其他的调控机制可能同样重要。

因为磷酸化作用对于产生磷酸化酪氨酸的结合位点十分关键,显然,去磷酸化作用是一种调控机制。研究证实,两种酪氨酸磷酸酶 Shp-1(以前曾被认为是 SHP、HCP、SH-PTP1 和 PTP1C)及 Shp-2(以前名为 Syp 和 PTP1D)均参与了细胞因子信号传导[392,393]。研究得较为透彻的例子是 Shp-1,该基因的突变导致了 *me 型和*

mev 型小鼠产生[394,395]。mev 型小鼠表现出较轻微的原红细胞增多症及 EPO 高反应症[396]，提示 Shp-1 可能会减弱红细胞对 EPO 的反应。现已证实 Shp-1，可直接与 EPOR 中磷酸化的 Y429 结合[397]，此酪氨酸位于 EPOR 的负调节区结合，当 shp-1 突变后，EPO 反应性细胞可在 EPO 浓度较低时产生增殖反应。Shp-1 与 Y429 结合，促进 Jak2 的去磷酸化及失活[397]。因此，EPO 的负性调节信号可在受体依赖性 Jak 激酶失活时产生。Shp-1 同样也能与 βc 作用，削弱 IL-3 信号[398]，它还可与 Tyk-2[399] 和 Jak2[400] 作用。

普遍认为 Shp-2 更多是一种有活性的磷酸酶，但它也可与 Jak1、Jak2 及 Tyk2[401] 相互作用。磷酸酶除了可催化 Jak 激酶去磷酸化，也可催化 STAT 蛋白发生酪氨酸残基的去磷酸化[402]。研究进展表明：另一种磷酸酶，即磷酸脂酶 SHIP，作为细胞因子信号传导的负性调节因子同样十分重要[403,404]。

除了去磷酸化作用外，另一种负性调节方式是分子自身的降解。降解作用可发生在受体或其他信号分子水平。最近发现 STAT1 可通过泛素-蛋白酶体途径得以调节[405]。此外，γc 在 T 细胞受体受刺激后可被 calpain（一种钙活化的神经性蛋白酶）降解[405a]。在选择性剪接水平也可能产生调节作用；在这点上，现已有报道称 STAT 的选择性剪接翻译产物有 STAT1 和 STAT5[254,310,312]。

抑制性衔接蛋白-CIS 家族

最近研究证实一类新的蛋白可调节细胞因子的活性，分子原型称作细胞因子诱导性含 SH2 蛋白（cytokine-inducible SH2 containing protein，CIS）[406,407]。CIS 可被多种细胞因子包括 IL-2、IL-3、GM-CSF 及红细胞生成素等迅速诱导而产生，并可与 βc 及红细胞生成素受体作用，负向调节细胞因子活性[406,407]。新近发现了一种相关蛋白，目前有多种称谓，包括细胞因子信号抑制因子-1（suppressor of cytokine signal-1，SOCS-1）、Jak 结合蛋白（Jak-binding protein，JAB）以及 STAT 诱导的阻断剂-1（STAT-induced STAT inhibitor-1，SSI-1），该蛋白可调节其他细胞因子如 IL-6 的活性[408~410]。有趣的是，此蛋白还可与 Jak 激酶家族作用，但并没发现 CIS 有此功能。该家族的其他成员已相继被克隆[408,410a,410b]，目前正在研究它们的功能。

Th1/Th2 细胞：辅助性 T 细胞模式

最初基于小鼠辅助性 T 细胞产生的细胞因子种类不同，而将其分为 Th1 及 Th2[411]，该分类法对于人的 Th 细胞同样适用[412~414]（有关细节在第 26 章介绍）。Th1 细胞分泌 IL-2、IFN-γ 及淋巴毒素，而 Th2 细胞则产生 IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10 及 IL-13。Th1 和 Th2 细胞产生的细胞因子被分别称为 1 型和 2 型细胞因子，但由此产生了一种混淆，例如 IL-4 是 Ⅰ 型细胞因子（含 4 个螺旋结构），从功能意义上讲，它又是 2 型细胞因子（由 Th2 细胞产生）。

人类 Th1/Th2 模式亦是如此，但细胞因子区分没有很严格的限制[412~414]。IFN-γ 由 Th1 产生，而 IL-4、IL-5 和 IL-9 则由 Th2 产生，还有一些细胞因子如 IL-3 和 GM-CSF 可由两种细胞共同产生。现已证实 Th1/Th2 模式对于 Th 细胞存在功能上的不同是非常适用的：Th1 细胞功能与细胞介导的免疫应答（炎症反应，迟发性超敏反应及细胞毒作用）有关；而 Th2 细胞则与体液免疫有关，在 2 型细胞因子中，IL-4 对于促进 IgE 应答尤为重要。Th1/Th2 的划分模式并不完善，后来又将同时产生 Th1 型和 Th2 型细胞因子的 Th 细胞叫做 Th0，而把分泌高水平转移生长因子-β（lransforming growth factor β，TGF-β）的 Th 细胞称为 Th3 。

766

Th 细胞的分类是非常有意义的，因为小鼠或人类的某些生理或疾病状态往往与 Th1 或 Th2 应答相关[412~414]。一般来说，在感染性疾病中，机体对细胞内感染如细菌、真菌以及原生动物感染产生的保护性反应与 Th1 优势应答有关。Th1 应答还与一些病理状态如关节炎、结肠炎及其他炎症反应有关。Th2 应答则与机体对细胞外病原体感染如寄生虫感染产生有效保护性反应有关，因其可增强体液免疫，最终产生病原体特异性中和抗体，并消除病原体[412~414]。在人类，Th1 及 Th2 型细胞因子在麻风病不同类型的损害中分别起主导作用。Th1 型细胞因子主要在结核样损害中占优势，而 Th2 型细胞因子则在麻风结节样损害中占优势。

在人类免疫缺陷病毒(HIV)感染中,Th1/Th2 模式较为复杂,因为 IL-4 的表达相对短暂,而 IL-10 则持续表达[414],故目前认为在控制 AIDS 进展中,IL-10 与 IL-12 是最重要的细胞因子[414]。有趣的是,Th0 与 Th2 细胞对于 HIV 感染较 Th1 更为敏感,这或许可以解释为什么病毒能在机体缺乏 Th1 应答时得以复制生存[415]。

Th1 与 Th2 细胞由共同的前体细胞 Thp 分化而来。IL-12 和新近发现的 IFN-γ 诱导因子(IGIF)是 Th1 分化的主要动力[416],而 IL-4 则诱导 Th2 分化。从结构上讲,IGIF 又叫做 IL-1γ,因为它是由 IL-1β 转化酶(caspase-1)处理得到的产物[417,418]。本章前面所持观点与这些发现相符,在 STAT4-缺陷小鼠体内 IL-12 信号缺陷,故此型小鼠表现出了 Th1 发育缺陷,相反,在 STAT6-缺陷小鼠体内由于缺乏 IL-4 信号,所以表现为 Th2 细胞发育缺陷。

Th1 与 Th2 细胞之间的主要区别在于它们对于 IL-2 和 IL-4 的基因转录能力不同。弄清 IL-2 与 IL-4 基因的调节机制对于理解这两型细胞的区别十分重要。这两种基因均受一种或多种 NF-AT 家族成员调控,单一的 NF-AT 成员不能单独调控两种基因的表达。尽管目前尚未发现对于 Th1 细胞及 IL-2 转录的特异性因子,而 *c-maf* 原癌基因产物似乎对于 Th2 细胞和 IL-4 的转录是绝对特异的[419]。该产物与 NF-AT、NF-AT 协作蛋白(NIP-45)对于调节 IL-4 表达尤为重要[420],对于这些基因调控因子的研究将有助于理解 Th2 应答的调节。迄今为止,还未发现对于 IL-2 表达调节非常关键的类似的协作蛋白。

Th1 和 Th2 细胞除了在 IFN-γ 的产生上存在主要区别外,它们对于 IFN-γ 的反应能力也有显著区别[421]。尽管 Thp 细胞对于 IFN-γ 可产生增殖反应,但 IFNGR-2 表达却会降低。这种情况会在 Th2 细胞中有一定程度的体现,但在 Th1 细胞中却体现得更为明显,这与 Th1 产生 IFN-γ 以及 Th1 对于 IFN-γ 无反应性相符[422,423]。Th1 细胞产生 IFN-γ,因此可抑制 Th2 细胞增殖。如上所述,IL-12 是诱导 Th1 分化的主要因素,许多 Th2 细胞对 IL-12 无反应;IL-12 信号缺陷是由于 IL-4 介导的 IL-12 受体亚单位 IL-12Rβ 表达缺陷所致[424]。但这种变化是可逆的,如用 IFN-γ 与 Th2 细胞作用一段时间(4 小时),可使 Th2 恢复对 IL-12 的反应性[425]。小鼠的抗感染能力与细胞因子类型密切相关。例如,感染鼠弓形虫的小鼠的存活能力严格依赖于 IFN-γ/IL-12 的生成(Th1 模式)[412~414]。

细胞因子受体病及相关分子

SCID 的细胞因子相关性病因

如前所述,细胞因子受体共同链 γc 的突变将引起重症联合免疫缺陷 XSCID。已经证实 XSCID 是一种细胞因子信号缺陷性疾病,并认为下游信号传导通路中的分子缺陷也可导致临床疾病的发生。事实上,已直接证实 Jak3 突变也可引发 SCID。既然 STAT5α 与 STAT5β 是 Jak 的下游信号传导分子,是否 STAT 蛋白的突变能导致人类疾病,已成了一个公开的问题。尽管有人认为由于这些蛋白的功能相似性或冗余性,STAT5a 或 STAT5b 的突变可能并不能引发疾病;虽然这些蛋白有着不同的主要功能,例如,STAT5a 缺陷型雌性小鼠表现出相关性乳泌刺激素分泌不足[345],相反 STAT5b 缺陷型小鼠表现出生长迟缓及与 Laron 侏儒症相似的病症[346]。目前仍未弄清免疫缺陷是否与 STAT5a 或 STAT5b 缺陷有关。

不难想到,包含 γc 的细胞因子受体的突变或受体中其他组分的突变均可能导致免疫缺陷的发生事实上,前面已经讨论过,IL-2 缺陷患者表现出一种类似于 SCID 的综合征,其发病原因归于机体内 T 细胞功能不全;近来又发现 IL-2Rα 的突变可导致一种罕见的免疫缺陷病[197]。目前尚无有关人类 IL-2Rβ 突变的报道,但在小鼠中已有 IL-2Rβ 突变的报道,此型小鼠的表型提示某些人类 SCID 可能源于 IL-2Rβ 突变。IL-7[71] 和 IL-7Rα[70] 的突变也能引起人类免疫缺陷综合症,因此可以认为在 IL-15 信号传导正常的情况下,IL-7 或 IL-7Rα 缺陷患者可能表现出与 XSCID 或 Jak3 缺陷患者相似的 T 细胞发育不全,他们并无 NK 细胞发育障碍的表现。相反,IL-15 的突变可导致 NK 细胞的选择性缺陷[89~92]。IL-9 转基因小鼠可产生胸腺瘤的研究结果表明,IL-9 的突变也有可能引起免疫缺陷[81]。到目前为止,仅发现细胞因子中 IL-2、IL-2Rα、γc 和 Jak3 的突变可导致 SCID。而其他细胞因子及受体、Jak 或 STAT 突变是否也能引起 SCID 尚待进一步研究。

767

与细胞因子受体有关的其他疾病

目前已报道许多疾病与细胞因子受体有关[426]。首先，生长激素受体突变已在侏儒症中被发现，该侏儒患者体内的生长激素不能对相应靶细胞产生效应[427]。其次，一例先天性中性粒细胞减少症(科斯曼综合征，Kostmann symdrome)患者被发现其 G-CSF 受体等位基因上产生突变[428]。第三，家族性红细胞增多症患者自身存在 EPO 受体截断作用，导致红细胞对 EPO 的高反应性[429]。最后，当一病毒原癌基因 *v-mpl* 被证实为骨髓增殖性白血病病毒(myeloproliferative leakemia vinus，MPLV)的原癌基因时，血小板生成素受体(hrombopoietin receptor，*c-mpl*)也被证实为一种孤儿细胞因子受体[430]。

结论

Ⅰ型细胞因子与 IFN 可参与很多免疫学和非免疫学过程的调节。在过去的几年里，人们对这些分子有了新的认识：从将这些分子视作具有特异功能的独立因子转变为将其视为一个享有公共受体组分及共同信号传导通路的分子群体。对于细胞因子信号传导的研究已有了极大发展，但实际上，对于许多细胞因子的信号传导通路极为相似，即使它们的生物学功能大相径庭；尽管某些差异可归于细胞因子由不同细胞产生且不同细胞表达不同细胞因子受体，从而可对相应细胞因子产生反应，但仍需要进一步研究不同的信号是如何启动，以及每种细胞因子如何诱导一群基因的表达。这些研究可为理解Ⅰ型细胞因子和 IFN 发挥各自作用的机制提供线索。

(王　莉　译)

参 考 文 献

1. Dumonde DC, Wolstencroft RA, Panayi GS, Matthew M, Morley J, Howson WT. Lymphokines: non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte action. *Nature* 1969;224:38.
2. Cohen S, Bigazzi PE, Yoshida T. Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cell Immunol* 1974;12:150.
3. Waksman BH, Oppenheim JJ. The contribution of the cytokine concept to immunology, In: Gallagher RB, Gilder J, Nossal FJV, Salvatore G, eds. *Immunology, the making of a modern science.* San Diego: Academic Press, 1995:33.
4. Oppenheim JJ, Gery I. From lymphodrek to interleukin 1 (IL-1). *Immunol Today* 1993;14,232.
5. Bazan JF. Neurotropic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron* 1991;7:1.
6. Wlodawer A, Pavlovsky A, Gustchina A. Hematopoietic cytokines: similarities and differences in the structures, with implications for receptor binding. *Protein Sci* 1993;2:1373.
7. Rozwarski DA, Gronenborn AM, Clore GM, et al. Structural comparisons among the short-chain helical cytokines. *Structure* 1994;2:159.
8. Sprang SR, Bazan JF. Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement. *Curr Opin Struc Biol* 1993;3:815.
9. Zhang F, Basinski MB, Beals JM, et al. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 1997;387:206.
10. Davies DR, Wlodawer A. Cytokines and their receptor complexes. *FASEB J* 1995;9:50.
11. Milburn MV, Hassell AM, Lambert MH, et al. A novel dimer configuration revealed by the crystal structure at 2.4 resolution of human interleukin-5. *Nature* 1993;363:172.
12. Senda T, Shimazu T, Matsuda S, et al. Three-dimensional crystal structure of recombinant murine interferon-β. *EMBO J* 1992;11:3193.
13. Ealick SE, Cook WJ, Vijay-Kumar S, et al. Three-dimensional structure of recombinant human interferon-γ. *Science* 1991;252:698–702.
14. Zdanov A, Schalk-Hihi C, Gustchina A, Tsang M, Weatherbee J, Wlodawer A. Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon γ. *Structure* 1995;3:591.
15. D'Andrea AD, Fasman GD, Lodish HF. Erythropoietin receptor and interleukin-2 receptor β chain: a new receptor family. *Cell* 1989;58:1023.
16. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6934.
17. Hilton DJ, Hilton AA, Raicevic A, et al. Cloning of a murine IL-11 receptor α-chain: requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. *EMBO J* 1994;13:4765.
18. Cherel M, Sorel M, Lebeau B, et al. Molecular cloning of two isoforms of a receptor for the human hematopoietic cytokine interleukin-11. *Blood* 1995;86:2534.
19. Hilton DJ, Zhang J-G, Metcalf D, Alexander WS, Nicola NA, Wilson TA. Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:497.
20. Mosley B, De Imus C, Friend D, Boiani N, Thoma B, Park LS, Cosman D. Dual oncostatin M (OSM) receptors: cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem* 1996;271:32635.
21. de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 1992;255:306.
22. Somers W, Ultsch M, De Vos AM, Kossiakoff AA. The X-ray structure of a growth hormone-prolactin receptor complex. *Nature* 1994;372:478.
23. Livnah O, Stura EA, Johnson DL, et al. Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science* 1996;273:464.
24. Murakami M, Narazali M, Hibi M, et al. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:11349.
25. Wrighton NC, Farrell FX, Chang R, et al. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* 1996;273:458.
26. Takeshita T, Asao H, Ohtani K, et al. Cloning of the γ chain of the human IL-2 receptor. *Science* 1992;257:379.
27. Kondo M, Takeshita T, Ishii N, et al. Sharing of the interleukin-2 (IL-2) γ chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* 1993;262:1874.
28. Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, et al. Interleukin-2 receptor γ chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 1993;262:1877.
29. Russell SM, Keegan AD, Harada N, et al. Interleukin-2 receptor γ chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* 1993;262:1880.
30. Kondo M, Takeshita T, Higuchi M, et al. Functional participation of the IL-2 receptor γ chain in IL-7 receptor complexes. *Science* 1994;263:1453.
31. Russell SM, Johnston JA, Noguchi M, et al. Interaction of IL-2Rβ and γ_c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science* 1994;266:1042.
32. Kimura M, Ishii N, Nakamura M, Van Snick J, Sugamura K. Sharing of the IL-2 receptor γ chain with the functional IL-9 receptor complex. *Int Immunol* 1995;7:115.
33. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, et al. Utilization of the β and γ chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J* 1994;13:2822.
34. Leonard WJ, Shores EW, Love PE. Role of the common cytokine receptor γ chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunol Rev* 1995;148:97.
35. Leonard WJ. The Molecular basis of X-linked combined immunodeficiency: defective cytokine receptor signaling. *Annu Rev Med* 1996;47:229.

36. Sugamura K, Asao H, Kondo M, et al. The interleukin-2 receptor γ chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol* 1996;14:179.
37. Sugamura K, Asao H, Kondo M, et al. The common γ-chain for multiple cytokine receptors. *Adv Immunol* 1995;59:225.
38. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976;193:1007.
39. Mingari MC, Gerosa F, Carra G, et al. Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. *Nature* 1984;312:641.
40. Waldmann TA. The multi-subunit interleukin-2 receptor. *Annu Rev Biochem* 1989;58:875.
41. Blackman MA, Tigges MA, Minie ME, Koshland ME. A model system for peptide hormone action in differentiation: interleukin 2 induces a B lymphoma to transcribe the J chain gene. *Cell* 1986;47:609.
42. Siegel JP, Sharon M, Smith PL, Leonard WJ. The IL-2 receptor β chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science* 1987;238:75.
43. Leonard WJ, Siegel JP. The interleukin-2 receptor complex and its role in the induction of a nonspecific cytotoxicity. In: Lotzova E, Herberman RB, eds. *Interleukin-2 and killer cells in cancer.* Boca Raton, FL: CRC Press, 1990:305.
44. Lanier LL, Phillips JH. Natural killer cells. *Curr Opin Immunol* 1992;4:38.
45. Janssen RAJ, Mulder NH, The TH, de Leij L. The immunobiological effects of interleukin-2 in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 1994;39:207.
46. Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, et al. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 1983;302:305.
47. Leonard WJ, Depper JM, Crabtree GR, et al. Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. *Nature* 1984;311:625.
48. Nikaido T, Shimizu A, Ishida N, et al. Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor. *Nature* 1984;311:631.
49. Smith KA. The interleukin 2 receptor. *Ann Rev Cell Biol* 1989;5:397.
50. Siegel LJ, Harper ME, Wong-Staal F, Gallo RC, Nash WG, O'Brien SJ. Gene for T-cell growth factor: location on human chromosome 4q and feline chromosome B1. *Science* 1984;223:175.
51. Leonard WJ, Depper JM, Uchiyama T, Smith KA, Waldmann TA, Greene WC. A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor: partial characterization of the receptor. *Nature* 1982;300:267.
52. Sharon M, Klausner RD, Cullen BR, Chizzonite R, Leonard WJ. Novel interleukin-2 receptor subunit detected by cross-linking under high affinity conditions. *Science* 1986;234:859.
53. Tsudo M, Kozak RW, Goldman CK, Waldmann TA. Demonstration of a non-Tac peptide that binds interleukin-2: a potential participant in a multichain interleukin-2 receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9694.
54. Teshigawara K, Wang HM, Kata K, Smith KA. Interleukin-2 high affinity receptor expression requires two distinct binding proteins. *J Exp Med* 1987;165:223.
55. Hatakeyama M, Tsudo M, Minamoto S, et al. Interleukin-2 receptor β chain gene: generation of three receptor forms by cloned human α and β cDNAs. *Science* 1989;244:551.
56. Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991;77:1859.
57. Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE. Role of NK1.1+ T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science* 1995;270:1845.
58. Lee F, Yokota T, Otsuka T, et al. Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor-1 activities and T cell and mast cell stimulating activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2061.
59. Noma Y, Sideras P, Naito T, et al. Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using ST6 promoter. *Nature* 1986;319:640.
60. Yokota T, Otsuka T, Mosmann T, et al. Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor-1, that expresses B-cell and T cell stimulating activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5894.
61. Paul WE. The role of IL-4 in the regulation of B cell development, growth, and differentiation. In: Spits H, ed. *IL-4: structure and function.* Boca Raton, FL: CRC Press, 1992:57.
62. Boulay J-L, Paul WE. Hematopoietin sub-family classification based on size, gene organization and sequence homology *Curr Biol* 1993;3:573.
63. Mosley B, Beckmann MP, March CJ, et al. The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. *Cell* 1989;59:335.
64. Idzerda RL, March CJ, Mosley B, et al. Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J Exp Med* 1990;171:861.
65. Galizzi J-P, Zuber CE, Harada N, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding the human interleukin 4 receptor. *Int Immunol* 1990;2:669.
66. Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, et al. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 1988;333:571.
67. Goodwin RG, Lupton S, Schmierer A, et al. Human interleukin-7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Cell* 1990;60:940.
68. Watson JD, Morrissey PJ, Namen AE, Conlon PJ, Widmer MB. Effect of IL-7 on the growth of fetal thymocytes in culture. *J Immunol* 1989;143:1215.
69. Murray R, Suda T, Wrighton N, Lee F, Zlotnik A. IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets. *Int Immunol* 1989;1: 526.
70. Peschon J, Morrissey PJ, Grabstein KH, et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 1994;180: 1955–1960.
71. von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 1995;181:1519–1526.
72. Chazen GD, Pereira GMB, LeGros G, Gillis S, Shevach EM. Interleukin 7 is a T-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5923.
73. Morrissey PJ, Goodwin RG, Nordan RP, et al. Recombinant interleukin 7, pre-B cell growth factor, has costimulatory activity on purified mature T cells. *J Exp Med* 1989;169:707.
74. Namen AE, Schmierer AE, March CJ, et al. B cell precursor growth-promoting activity: purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *J Exp Med* 1988;167:988.
75. Leonard WJ. The defective gene in X-linked severe combined immunodeficiency encodes a shared interleukin receptor subunit: implications for cytokine pleiotropy and redundancy. *Curr Opin Immunol* 1994;6:631–635.
76. Brunton LL, Lupton SD. An STS in the human IL7 gene located at 8p12-13. *Nucleic Acids Res* 1990;18:1315.
77. Goodwin RG, Friend D, Ziegler SF, et al. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell* 1990;60:940.
78. Van Snick J, Goethals A, Renauld J-C, et al. Cloning and characterization of a cDNA for a new mouse T cell growth factor, (P40). *J Exp Med* 1989;169:363.
79. Yang Y, Ricciardi S, Ciarletta A, Kelleher K, Clark SC. Expression cloning of a cDNA encoding a novel human hematopoietic growth factor: human homologue of murine T-cell growth factor P40. *Blood* 1989;74:1880.
80. Renauld J-C, Kermouni A, Vink A, Louahed J, Van Snick J. Interleukin-9 and its receptor: involvement in mast cell differentiation and T cell oncogenesis. *J Leukoc Biol* 1995;57:353.
81. Renauld J-C, Houssiau F, Uyttenhove C, Vink A, Van Snick J. Interleukin-9: a T-cell growth factor with a potential oncogenic activity. *Cancer Invest* 1993;11: 635.
82. Hultner L, Moeller J, Schmitt E, et al. Thiol-sensitive mast cell lines derived from mouse bone marrow respond to a mast cell growth-enhancing activity different from both IL-3 and IL-4. *J Immunol* 1989;142:3440.
83. Renauld J-C, Vink A, Louahed J, Van Snick J. Interleukin-9 is a major anti-apoptotic factor for thymic lymphomas. *Blood* 1995;85:1300.
84. Modi WS, Pollock DD, Mock BA, Banner C, Renauld J-C, Van Snick J. Regional localization of the human glutaminase (GLS) and interleukin-9 (IL9) genes by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1991;57:114.
85. Renauld J-C, Druez C, Kermouni A, et al. Expression cloning of the murine and human interleukin 9 receptor cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5690.
86. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994;264:965.
87. Burton JD, Bamford RN, Peters C, et al. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4935.
88. Tagaya Y, Bamford RN, DeFllippis AP, Waldmann TA. IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 1996;4:329.
89. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 1994;180:1395.
90. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Role of interleukin-2 (IL-2), IL-7, and IL-15 in natural killer cell differentiation from cord blood hematopoietic progenitor cells and from γ_c transduced severe combined immunodeficiency X1 bone marrow cells. *Blood* 1996;88:3901.
91. Leclercq G, Debacker V, de Smedt M, Plum J. Differential effects of interleukin-15 and interleukin-2 on the differentiation of bipolotential T/natural killer progenitor cells. *J Exp Med* 1996;184:325.
92. Puzanov IJ, Bennett M, Kumar V. IL-15 can substitute for the marrow microenvironment in the differentiation of natural killer cells. *J Immunol* 1996;157:4282.
93. Bamford RN, Grant AJ, Burton JD, et al. The interleukin (IL) 2 receptor β chain is shared by IL-2, and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4940.
94. Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, et al. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the α chain of the IL-2 receptor. *EMBO J* 1995;14:3654.
95. Anderson DM, Kumaki S, Ahdieh M, et al. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor α chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem* 1995;270:29862.
96. Tagaya T, Burton JD, Miyamoto Y, Waldmann TA. Identification of a novel receptor signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells. *EMBO J* 1995; 15:4928.

97. Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, et al. Interleukin-2 receptor γ chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 1993; 73:147.
98. Conley ME. Molecular approaches to analysis of X-linked immunodeficiencies. *Annu Rev Immunol* 1992;10:215.
99. Fischer A, Cavazzana-Calvo M, de Saint Basile G, et al. Naturally occurring primary deficiencies of the immune system. *Annu Rev Immunol* 1997;15:93.
100. Leonard WJ, Noguchi M, Russell SM, McBride OW. The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: the role of the interleukin-2 receptor γ chain as a common γ chain, γ_c. *Immunol Rev* 1994;138:61.
101. Weinberg K, Parkman R. Severe combined immunodeficiency due to a specific defect in the production of interleukin-2. *N Engl J Med* 1990;322:1718.
102. Chatila T, Castigli E, Pahwa R, et al. Primary combined immunodeficiency resulting from defective transcription of multiple T-cell lymphokine genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:10033.
103. Schorle H, Holtschke T, Hunig T, Schimpl A, Horak I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 1991;352:621.
104. Leonard WJ. Dysfunctional cytokine receptor signaling in severe combined immunodeficiency. *J Invest Med* 1996;44:303.
105. de Jong JL, Farner NL, Widmer MB, Giri JG, Sondel PM. Interaction of IL-15 with the shared IL-2 receptor β and γ_c subunits. The IL-15/β/γ_c receptor-ligand complex is less stable than the IL-2/β/γ_c receptor-ligand complex. *J Immunol* 1996;156:1339.
106. Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 1991;254:707.
107. Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993;362:245.
108. Sadlack B, Kuhn R, Schorle H, Rajewsky K, Muller W, Horak I. Development and proliferation of lymphocytes in mice deficient for both interleukins-2 and -4. *Eur J Immunol* 1994;24:281.
109. DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor γ chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:377–381.
110. Cao X, Shores EW, Hu-Li J, et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor γ chain. *Immunity* 1995;2:223.
111. Ohbo K, Suda T, Hashiyama M, et al. Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor γ chain. *Blood* 1996;87:956.
112. Izuhara K, Heike T, Otsuka T, et al. Signal transduction pathway of interleukin-4 and interleukin-13 in human B cells derived from X-linked severe combined immunodeficiency patients. *J Biol Chem* 1996;271:619.
113. Takeshita T, Asao H, Suzuki J, Sugamura K. An associated molecule, p64, with high-affinity interleukin 2 receptor. *Int Immunol* 1990;2:477.
114. Nakamura Y, Russell SM, Mess SA, et al. Heterodimerization of the interleukin-2 receptor β and γ cytoplasmic domains is required for signaling. *Nature* 1994;369:330.
115. Nelson B, Lord JD, Greenberg PD. Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor β and γ chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature* 1994;369:333.
116. Balasubramanian S, Chernov-Rogan T, Davis AM, et al. Ligand binding kinetics of IL-2 and IL-15 to heteromers formed by extracellular domains of the three IL-2 receptor subunits. *Int Immunol* 1995;7:1839.
117. Myszka DG, Arulanantham PR, Sana T, Wu Z, Morton TA, Ciardelli TL. Kinetic analysis of ligand binding to interleukin-2 receptor complexes created on an optical biosensor surface. *Protein Sci* 1996;5:2468.
118. Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 1995;3:521.
119. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor β. *Science* 1995;268:1472.
120. Nakajima H, Shores EW, Noguchi M, Leonard WJ. The common cytokine receptor γ chain plays an essential role in regulating lymphoid homeostasis. *J Exp Med* 1997;185:189–196.
121. Ihle JN. Interleukin-3 and hematopoiesis. In: Kishimoto T, ed. *Interleukins: molecular biology and immunology*. Basel, Switzerland: Karger, 1992:65.
122. Metcalf D. *The hematopoietic colony stimulating factors*. Amsterdam: Elsevier, 1984.
123. Takatsu K, Tominaga A, Harada N, et al. T-cell replacing factor (TRF)/interleukin 5 (IL-5): molecular and functional properties. *Immunol Rev* 1988;102: 107.
124. Hara T, Miyajima A. Functional and signal transduction mediated by the interleukin 3 receptor system in hematopoiesis. *Stem Cells* 1996;14:605.
125. Kitamura T, Sato N, Arai K, Miyajima A. Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared β subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. *Cell* 1991;66:1165.
126. Hara T, Miyajima T. Two distinct functional high affinity receptors for mouse IL-3. *EMBO J* 1992;10:1875.
127. Takaki S, Tominaga A, HitoshY, Mita S, Sonoda E, Yamaguchi N, Takatsu K. Molecular cloning and expression of the murine interleukin-5 receptor. *EMBO J* 1990;9:4367.
128. Tavernier J, Devos R, Cornelis S, et al. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL-5R) is composed of an IL-5-specific α chain and a β chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell* 1991;66:1174.
129. Gearing DP, King JA, Gough NM, Nicola NA. Expression cloning of a receptoı for human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *EMBO J* 1989;8: 3667.
130. Park LS, Martin U, Sorensen R, et al. Cloning of the low-affinity murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor and reconstitution of a high-affinity receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4295.
131. Gorman DM, Itoh N, Kitamura T, et al. Cloning and expression of a gene encoding an interleukin 3 receptor-like protein: identification of another member of the cytokine receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 5459.
132. Hayashida K, Kitamura T, Gorman DM, Arai K-I, Yokota T, Miyajima A. Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high affinity GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9655..
133. Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1992;10:295.
134. Sakamaki K, Miyajima I, Kitamura T, Miyajima A. Critical cytoplasmic domains of the common β subunit of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors for growth signal transduction and tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 1992;11: 3541.
135. Cornelis S, Fache I, Van der Heyden J, et al. Characterization of critical residues in the cytoplasmic domain of the human interleukin-5 receptor α chain required for growth signal transduction. *Eur J Immunol* 1995;25:1857.
136. Kouro T, Kikuchi Y, Kanazawa H, et al. Critical proline residues of the cytoplasmic domain of the IL-5 receptor α chain and its function in IL-5–mediated activation of Jak kinase and Stat5. *Int Immunol* 1996;8:237.
137. Nishinakamura R, Miyajima A, Mee PJ, Tybulewicz VL, Murray R. Hematopoiesis in mice lacking the entire granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 functions. *Blood* 1996;88:2458.
138. Metcalf D. The granulocyte-macrophage regulators: reappraisal by gene inactivation. *Exp Hematol* 1995;23:569.
139. Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 1990;63:1149.
140. Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, et al. The IL-6 signal transducer, gp130; an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 1992; 255:1434.
141. Taga T, Narazaki M, Yasukawa K, et al. Functional inhibition of hematopoietic and neurotrophic cytokines by blocking the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10998.
142. Yin T, Taga T, Tsang ML, Yasukawa K, Kishimoto T, Yang YC. Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11–mediated signal transduction. *J Immunol* 1993;151:2555.
143. Pennica D, Shaw KJ, Swanson TA, et al. Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J Biol Chem* 1995;270:10915.
144. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986;324:73.
145. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995;86:1243.
146. Hibi M, Nakajima K, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med* 1996;74:1.
147. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 1997;15:797.
148. Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, et al. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFNβ2) receptor. *Science* 1988;241:825.
149. Taga T, Hibi M, Hirata Y, et al. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 1989;58:573.
150. Murakami M, Hibib M, Nakagawa N, et al. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 1993;260:1808.
151. Panonessa G, Graziani R, Serio AD, et al. Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp130 dimer formation and signalling. *EMBO J* 1995;14:1942.
152. Ward LD, Howlett GJ, Discolo G, et al. High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *J Biol Chem* 1994;269:23286.
153. Du XX, Williams DA. Interleukin-11: a multifunctional growth factor derived from the hematopoietic microenvironment. *Blood* 1994;83:2023
154. Goldman SJ. Preclinical biology of interleukin 11: a multifunctional hematopoietic cytokine with potent thrombopoietic activity. *Stem Cells* 1995;13:462.
155. Paul SR, Bennett F, Calvetti JA, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7512.
156. Kobayashi S, Teramura M, Oshi K, Mizoguchi H. Interleukin-11. *Leuk Lymph* 1994;15:45.
157. Kawashima I, Ohsumi J, Mita-Honjo K, et al. Molecular cloning of cDNA encoding adipogenesis inhibitory factor and identity with interleukin-11. *FEBS Lett* 1991;283:199.

158. Baumann H, Wang Y, Morella KK, et al. Complex of the soluble IL-11 receptor and IL-11 acts as IL-6-type cytokine in hepatic and nonhepatic cells. *J Immunol* 1996;157:284.
159. Neddermann P, Graziani R, Ciliberto G, Paonessa G. Functional expression of soluble human interleukin-11 (IL-11) receptor α and stoichiometry of in vitro IL-11 receptor complexes with gp130. *J Biol Chem* 1996;271:30986.
160. Gearing DP, Gough NM, King JA, et al. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J* 1987;6:3995.
161. Hilton DJ, Gough NM. Leukemia inhibitor factor: a biological perspective. *J Cell Biochem* 1991;46:21.
162. Yamamori T, Kukada K, Abersold R, Korsching S, Fann MJ, Patterson PH. The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science* 1989;246:1412.
163. Gearing DP, Thut CJ, VandenBos T, et al. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J* 1991;10:2839.
164. Lin L-FH, Mismer D, Lile JD, et al. Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* 1989;246:1023.
165. Stockli KA, Lottspeich F, Sendtner M, et al. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 1989;342:920.
166. Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, et al. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 1991;253:59.
167. Davis S, Aldrich TH, Stahl N, et al. LIFRβ and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 1993;260:1805.
168. De Serio A, Graziani R, Laufer R, Ciliberto G, Paonessa G. In vitro binding of ciliary neurotrophic factor to its receptors: evidence for the formation of an IL-6-type hexameric complex. *J Mol Biol* 1995;;254:795.
169. Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, Todaro GJ. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9739.
170. Malik N, Kalestad JC, Gunderson NL, et al. Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol Cell Biol* 1989;9:2847.
171. Nair BC, DeVico AL, Nakamura S, et al. Identification of a major growth factor for AIDS-Kaposi's sarcoma cells as oncostatin M. *Science* 1992;255:1430.
172. Miles SA, Martinez-Maza O, Rezai A, et al. Oncostatin M as a potent mitogen for AIDS–Kaposi's sarcoma derived cells. *Science* 1992;255:1432.
172a. Ichihara M, Hara T, Kim H, Morate T, Miyajima A. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor do not use the same functional receptor in mice. *Blood* 1997;90:165.
173. Pennica D, King KL, Shaw KL, et al. Expression cloning of cardiotrophin-1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1142.
174. Pennica D, Wood WI, Chien KR. Cardiotrophin-1: a multifunctional cytokine that signals via LIF receptor-gp130 dependent pathways. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;1:81.
175. Pennica D, Arce V, Swanson TA, et al. Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron* 1996;17:63.
176. Robledo O, Fourcin M, Chevalier S, et al. Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *J Biol Chem* 1997;272:4855.
177. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372: 425 [erratum *Nature* 1995;374:479].
178. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995;83:1263.
179. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996;84:491.
180. White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, Baumann H, Tartaglia LA. Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. *J Biol Chem* 1997;272:4065.
181. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:251.
182. Kobayash M, Fitz L, Ryan M, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effect on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:827.
183. Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, et al. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4143.
184. Chua AO, Wilkinson VL, Presky DH, Gubler U. Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-β component. *J Immunol* 1995;155:4286.
185. Presky DH, Yang H, Minetti LJ, et al. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two β-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14002.
186. Gubler U, Presky DH. Molecular biology of interleukin-12 receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1996;795:36.
187. Lin J-X, Migone T-S, Tsang M, et al. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* 1995;2:331.
188. Zurawski G, de Vries JE. Interleukin 13, an interleukin 4–like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* 1994;15:19.
189. Smerz-Bertling C, Duschl A. Both interleukin 4 and interleukin 13 induce tyrosine phosphorylation of the 140-kDa subunit of the interleukin 4 receptor. *J Biol Chem* 1994;270:966.
190. Zurawski SM, Chomarat P, Djossou O, et al. The primary binding subunit of the human interleukin-4 receptor is also a component of the interleukin-13 receptor. *J Biol Chem* 1995;270:13869.
191. Aman MF, Tayebi N, Obiri NI, Puri RK, Modi WS, Leonard WJ. cDNA cloning and characterization of the human interleukin-13 receptor α chain. *J Biol Chem* 1996;271:29265.
192. Caput D, Laurent P, Kaghad M, Lelias J-M, Lefort S, Vita N, Ferrara P. Cloning and characterization of α specific interleukin (IL)-13 binding protein structurally related to the IL-5 receptor α chain. *J Biol Chem* 1996;271:16921.
193. Kammer W, Lischke A, Moriggl R, et al. Homodimerization of interleukin-4 receptor alpha chain can induce intracellular signaling. *J Biol Chem* 1996;271:23634.
194. Lai SY, Molden J, Liu KD, Puck JM, White MD, Goldsmith MA. Interleukin-4–specific signal transduction events are driven by homotypic interactions of the interleukin-4 receptor α subunit. *EMBO J* 1996;15:4506.
195. Hoffman RC, Castner BJ, Gerhart M, et al. Direct evidence of a heterotrimeric complex of human interleukin-4 with its receptors. *Protein Sci* 1995;4:382.
196. Taniguchi T. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 1995;268:251.
197. Sharfe N, Dadi HK, Shahar M, Roifman CM. Human immune disorder arising from mutation of the α chain of the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3168.
198. Leonard WJ, Depper JM, Kanehisa M, et al. Structure of the human interleukin-2 receptor gene. *Science* 1985;230:633.
199. Leonard WJ, Donlon TA, Lebo RV, Greene WC. The gene encoding the human interleukin-2 receptor is located on chromosome 10. *Science* 1985;228:1547.
200. Gnarra JR, Otani H, Wang MG, McBride OW, Sharon M, Leonard WJ. Human interleukin 2 receptor β chain gene: chromosomal localization and identification of 5' regulatory sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3440.
201. Shibuya H, Yoneyama M, Nakamura Y, et al. The human interleukin-2 receptor β chain gene: genomic organization, promoter analysis and chromosomal assignment. *Nucleic Acids Res* 1990;18:3697.
202. Watowich SS, Yoshimura A, Longmore GD, Hilton DJ, Yoshimira Y, Lodish HF. Homodimerization and constitutive activation of the erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2140.
203. Lodish HF, Hilton DJ, Klingmuller U, Watowich SS, Wu H. The erythropoietin receptor: biogenesis, dimerization, and intracellular signal transduction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1995;60:93.
204. Watowich SS, Wu H, Socolovsky M, Klingmuller U, Constantinescu SN, Lodish HF. Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1996;12:91.
205. Wu H, Klingmuller U, Besmer P, Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 1995;377:242.
206. Lev S, Blechman JM, Givol D, Yarden Y. Steel factor and c-kit protooncogene: genetic lessons in signal transduction. *Crit Rev Oncol* 1994;5:141.
207. Paul WE. Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response. *Cell* 1989;57:521.
208. Itoh N, Yonehara S, Schreurs J, et al. Cloning of an interleukin-3 receptor gene: a member of a distinct receptor gene family. *Science* 1990;247:324.
209. Kurman CC, Rubin LA, Nelson DL. Soluble products of immune activation: soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R, Tac protein). In: Rose NR, deMacario EC, Fahey JL, Friedman H, Penn GM, eds. *Manual of clinical laboratory immunology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992:256.
210. Fernandez-Botran R, Chilton PM, Ma Y. Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy. *Adv Immunol* 1996;63:269.
211. Salvati AL, Lahm A, Paonessa G, Ciliberto G, Toniatti C. Interleukin-6 (IL-6) antagonism by soluble IL-6 receptor a mutated in the predicted gp130-binding interface. *J Biol Chem* 1995;270:12242.
212. Isaacs A, Lindermann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond [Biol]* 1957;147:258.
213. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-γ and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993;11:571.
214. Diaz MO, Testa D. Type I interferon genes and proteins. *Biotherapy* 1996;8:157.
215. van den Broek MF, Muller U, Huang S, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev* 1995;148:5.
216. Hayes MP, Zoon KC. Production and action of interferons: new insights into molecular mechanisms of gene regulation and expression. *Prog Drug Res* 1994; 43:239.
217. Lefevre F, Boulay V. A novel and atypical type I interferon gene expressed by trophoblast during early pregnancy. *J Biol Chem* 1993;268:19760.
218. International Society for Interferon and Cytokine Research Newsletter. Nomenclature for Interferon Receptors and interferon δ. 1997;4:1.
219. Langer J, Garotta G, Pestka S. Interferon receptors. *Biotherapy* 1996;8:163.
220. Bazan JF. Shared architecture of hormone binding domains in type I and type II interferon receptors. *Cell* 1990;61:753.
221. Walter MR, Windsor WT, Nagabhushan TL, et al. Crystal structure of a complex

between interferon-γ and its soluble high-affinity receptor. *Nature* 1995;376: 230–235.
222. Domanski P, Colamonici OS. The type-1 interferon receptor: the long and short of it. *Cytol Growth Fact Rev* 1996;7:143.
223. Uze G, Lutfalla G, Mogensen KE. α and β interferons and their receptor and their friends and relations. *J Interfer Cyt Res* 1995;15:3.
224. Uze G, Lutfalla G, Gresser I. Genetic transfer of a functional human interferon receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell* 1990;60: 225.
225. Novick D, Cohen B, Rubinstein M. The human interferon α/β receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 1994;77:391.
226. Domanski P, Witte M, Kellum M, et al. Cloning and expression of a long form of the β subunit of the interferon α receptor that is required for interferon signaling. *J Biol Chem* 1995;270:21606.
227. Lutfalla G, Holland SJ, Cinato E, et al. Mutant U5A cells are complemented by an interferon αβ receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster. *EMBO J* 1995;14:5100.
228. Symons JA, Alcami A, Smith GL. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species-specificity. *Cell* 1995;81: 551.
229. Spriggs MK. Poxvirus-encoded soluble cytokine receptors. *Virus Res* 1994;33:1.
230. Gray PW, Leung DW, Pennica D, et al. Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. *Nature* 1982;295:503.
231. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFNγ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1997;15:563.
232. Marsters SA, Pennica D, Bach E, Schreiber RD, Ashkenazi A. Interferon γ signals via a high-affinity multisubunit receptor complex that contains two types of polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5401.
233. Aguet M, Dembic Z, Merlin G. Molecular cloning and expression of the human interferon-γ receptor. *Cell* 1988;55:273.
234. Soh J, Donnelly RJ, Kotenko S, et al. Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon γ receptor. *Cell* 1994; 76:793.
235. Hemmi S, Bohni R, Stark G, Di Marco F, Aguet M. A novel member of the interferon receptor family complements functionality of the murine interferon γ receptor in human cells. *Cell* 1994;76:803.
236. Kaplan DH, Greenlund AC, Tanner JW, Shaw AS, Schreiber RD. Identification of an interferon-γ receptor α chain sequence required for JAK-1 binding. *J Biol Chem* 1996;271:9.
237. Sakatsume M, Igarashi K, Winestock KD, Garotta G, Larner AC, Finbloom DS. The Jak kinases differentially associate with the α and β (accessory factor) chains of the interferon γ receptor to form a functional receptor unit capable of activating STAT transcription factors. *J Biol Chem* 1995;270:17528.
238. Lutfalla G, Gardiner K, Uze G. A new member of the cytokine receptor gene family maps on chromosome 21 at less than 35 kb from IFNAR. *Genomics* 1993; 16:366.
239. Gibbs VC, Pennica D. CRF2-4: isolation of cDNA clones encoding the human and mouse proteins. *Gene* 1997;186:97.
239a. Kotenko SV, Krause CD, Izotova LS, et al. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J* 1997;16:5894–5903.
239b. Spencer SD, Di Marco F, Hooley J, et al. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin-10 receptor. *J Exp Med* 1998;187:571–581.
240. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165.
241. Taniyama T, Takai S, Miyazaki E, et al. The human interleukin-10 receptor gene maps to chromosome 11q23.3. *Hum Genet* 1995;95:99.
242. Ying L, de Waal Malefyt R, Briere F, et al. The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J Immunol* 1997;158: 604.
243. Ho AS, Liu Y, Khan TA, Hsu DH, Bazan JF, Moore KW. A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 11267.
244. Liu Y, Wei SH, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* 1994;152:1821.
245. Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF. Jak protein tyrosine kinases: their role in cytokine signaling. *Trends Cell Biol* 1994;4:207.
246. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415.
247. Schinder C, Darnell JE Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the Jak-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 1995;64:621.
248. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 1995;13:369.
249. Wilks AF, Oates AC. The JAK/STAT pathway. *Cancer Surv* 1996;27:139.
250. Darnell JE Jr. The JAK-STAT pathway: summary of initial studies and recent advances. *Recent Prog Horm Res* 1996;51:391.
251. Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 1996;84: 331.
252. Leonard WJ. Stats and cytokine specificity. *Nature Med* 1996;2:968.
253. Leonard WJ, OShea JJ. Jaks and STATS: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998;16:293–322.
254. Horvath CM, Darnell JE. The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:233.
255. Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR, Ralph SJ, Zurcher G, Ziemiecki A. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol* 1991;11:2057.
256. Harpur AG, Andres AC, Ziemiecki A, Aston RR, Wilks AF. JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* 1992;7:1347.
257. Johnston JA, Kawamura M, Kirken RA, et al. Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature* 1994;370:151.
258. Witthuhn BA, Silvennoinen O, Miura O, et al. Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature* 1994;370:153.
259. Krolewski JJ, Lee R, Eddy R, Shows TB, Dalla-Favera R. Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene* 1990;5: 277.
260. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993;74:227.
261. DaSilva L, Howard OMZ, Rui H, Kirken RA, Farrar WL. Growth signaling and Jak2 association mediated by membrane-proximal cytoplasmic regions of the prolactin receptor. *J Biol Chem* 1994;269:18267.
262. Gurney AL, Wong SC, Henzel WJ, de Sauvage FJ. Distinct regions of c-mpl cytoplasmic domain are coupled to the JAK-STAT signal transduction pathway and Shc phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5292.
263. Tanner JW, Chen W, Young RL, Longmore GD, Shaw AS. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with Jak kinases. *J Biol Chem* 1995;270:6523.
264. Zhao, Y, Wagner F, Frank SJ, Kraft AS. The amino-terminal portion of the Jak2 protein kinase is necessary for binding and phosphorylation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor β_c. *J Biol Chem* 1995;270: 13814.
265. Kohlhuber F, Rogers NC, Watling D, et al. A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and γ interferon responses. *Mol Cell Biol* 1997;17:695.
266. Chen M, Cheng A, Chen Y-Q, et al. The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common γ chain and confers the ability to transmit interleukin 2–mediated signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 6910–6915.
267. Guschin D, Rogers N, Briscoe J, et al. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J* 1995;14:1421.
268. Boussiotis VA, Barber DL, Nakarai T, et al. Prevention of T cell anergy by signaling through the γ_c chain of the IL-2 receptor. *Science* 1994;266:1039.
269. Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* 1994;266:1045.
270. Yin T, Tsang ML, Yang YC. JAK1 kinase forms complexes with interleukin-4 receptor and 4PS/insulin receptor substrate-1–like protein and is activated by interleukin-4 and interleukin-9 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1994;269:26614.
271. Demoulin J-P, Uyttenhove C, van Roost E, et al. A single tyrosine of the interleukin-9 (IL-9) receptor is required for STAT activation, antiapoptoic activity, and growth regulation by IL-9. *Mol Cell Biol* 1996;16:4710.
272. Zhuang H, Patil SV, He T-C, Sonsteby SK, Niu Z, Wojchowski DM. Inhibition of erythropoietin-induced mitogenesis by a kinase-deficient form of Jak2. *J Biol Chem* 1994;269:21411.
273. Frank SJ, Yi W, Zhao Y, et al. Regions of the JAK2 tyrosine kinase required for coupling to the growth hormone receptor. *J Biol Chem* 1995;270:14776.
274. Kawahara A, Minami Y, Ihle JN, Taniguchi T. Critical role of the interleukin 2 (IL-2) receptor γ-chain-associated Jak3 in the IL-2 induced c-fos and c-myc but not bcl-2 induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8724.
275. Macchi P, Villa A, Gillani S, et al. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature* 1995;377:65.
276. Russell SM, Tayebi N, Nakajima H, et al. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science* 1995;270:797.
277. Thomis DC, Gurniak CB, Tivol E, Sharpe AH, Berg LJ. Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3. *Science* 1995; 270:794–797.
278. Nosaka T, van Deursen JMA, Tripp RA, et al. Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science* 1995;270:800–802.
279. Park SY, Saijo K, Takahash T, et al. Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* 1995;3:771–82.
280. Luo H, Hanratty WP, Dearolf CR. An amino acid substitution in the Drosophila hop[Tum-l] Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *EMBO J* 1995; 14:1412.
281. Harrison DA, Binari R, Nahreini TS, Gilman M, Perrimon N. Activation of a Drosophila Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J* 1995;14:2857.
282. Conway G, Margoliath A, Wong-Madden S, Roberts RJ, Gilbert W. Jak1 kinase is required for cell migrations and anterior specification in zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3082.
283. Migone T-S, Lin J-X, Cereseto A, et al. Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science 1995;269:79.*

284. Danial NN, Pernis A, Rothman PB. Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene. *Science* 1995;269:1875.
285. Ohashi T, Masuda M, Ruscetti SK. Induction of sequence-specific DNA-binding factors by erythropoietin and the spleen focus-forming virus. *Blood* 1995;84: 1454–1462.
286. Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, et al. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 1995; 269:81.
287. Meydan N, Grunberger T, Dadi H, et al. Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 1996;379:645.
288. Nelson BH, McIntosh BC, Rosencrans LL, Greenberg PD. Requirement for an intial signal from the membrane-proximal region of the interleukin 2 receptor γ_c chain for Janus kinase activation leading to T cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1878.
289. Hanissian SH, Geha RS. Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *Immunity* 1997;6:379.
290. Briscoe J, Rogers NC, Witthuhn BA, et al. Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-γ inducible gene expression but not an antiviral state. *EMBO J* 1996;15:799.
291. Gauzzi MC, Velazaquez L, McKendry R, Mogensen KE, Fellous M, Pellegrini S. Interferon-α–dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J Biol Chem* 1996;271:20494.
292. Feng J, Witthuhn BA, Matsuda T, Kohlhuber F, Kerr IM, Ihle JN. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol* 1997;17:2497.
293. Kohlhuber F, Rogers NC, Watling D, et al. A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and γ interferon responses. *Mol Cell Biol* 1997;17:695.
294. Luo H, Rose P, Barber D, et al. Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol Cell Biol* 1997; 17:1562.
295. Fujitani Y, Hibi M, Fukada T, et al. An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* 1997;14:751 761.
296. Binari R, Perrimon N. Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in Drosophila. *Genes Dev* 1994;8:300.
297. Lai KS, Jin Y, Graham DK, Witthuhn BA, Ihle JN, Liu ET. A kinase-deficient splice variant of the human JAK3 is expressed in hematopoietic and epithelial cancer cells. *J Biol Chem* 1995;270:25028.
298. Cance WG, Craven RJ, Weiner TM, Liu ET. Novel protein kinases expressed in human breast cancer. *Int J Cancer* 1993;54:571.
299. Fu XY. A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an intereferon alpha-induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s). *Cell* 1992; 70:323.
300. Fu XY, Schindler C, Improta T, Aebersold R, Darnell JE. The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7840.
301. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 1994;264:95.
302. Akira S, Nishio Y, Inoue M, et al. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 1994;77:63.
303. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4806.
304. Yamamoto K, Quelle FW, Thierfelder WE, et al. Stat4, a novel γ interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* 1994;14:4342.
305. Wakao H, Gouilleux F, Groner B. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J* 1994;13:2182.
306. Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Wong SC, McKnight SL. Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2. *Immunity* 1995;2:321.
307. Mui AL, Wakao H, O'Farrell A, Harada N, Miyajima A. Interleukin-3, granulocytes-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 signal through two STAT5 homologs. *EMBO J* 1995;14:1166.
308. Azam M, Erdjument-Bromage H, Kreider BL, et al. Interleukin-3 signals through multiple isoforms of Stat5. *EMBO J* 1995;14:1402.
309. Liu X, Robinston GW, Gouilleux F, Groner B, Hennighausen L. Cloning and expression of Stat5 and an additional homolgue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 8831.
310. Lin J-X, Mietz J, Modi WS, John S, Leonard WJ. Cloning of human Stat5B: reconstitution of interleukin-2–induced Stat5A and Stat5B DNA binding activity in COS-7 cells. *J Biol Chem* 1996;271:10738.
311. Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL. An interleukin-4 induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 1994;265:1701.
312. Wang D, Stravopodis D, Teglund S, Kitazawa J, Ihle JN. Naturally occurring dominant negative variants of Stat5. *Mol Cell Biol* 1996;16:6141–6148.
313. Copeland NG, Gilbert DJ, Schindler C, et al. Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics* 1995;29:225.
314. Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL, Schreiber RD. Ligand induced IFNγ receptor phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J* 1994;13:1591.
315. Yan H, Krishnan K, Greenlund AC, et al. Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFNαR1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. *EMBO J* 1996;15:1064.
316. Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE Jr, Yancopoulos GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 1995;267:1349.
317. Friedmann MC, Migone T-S, Russell SM, Leonard WJ. Different interleukin 2 receptor β-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2–induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2077.
318. Schindler U, Wu P, Rother M, Brasseur M, McKnight SL. Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular selectivity. *Immunity* 1995;2:686.
319. Klingmuller U, Bergelson S, Hsiao JG, Lodish HF. Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5 *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8324.
320. Weber-Nordt RM, Riley JK, Greenlund AC, Moore KW, Darnell JE, Schreiber RD. Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *J Biol Chem* 1996;271:27954.
321. Xu X, Sun Y-L, Hoey T. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 1996;273: 794.
322. Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE Jr. DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J* 1996:15:5616.
323. Sperisen P, Wang SM, Soldaini E, et al. Mouse interleukin-2 receptor α gene expression. Interleukin-1 and interleukin-2 control transcription via distinct cis-acting elements. *J Biol Chem* 1995;270:10743.
324. John S, Robbins CM, Leonard WJ. An IL-2 response element in the human IL-2 receptor α chain promoter is a composite element that binds Stat5, Elf-1, HMG-I(Y), and a GATA family protein. *EMBO J* 1996;15:5627.
325. Lecine P, Algarte M, Rameil P, et al. Elf-1 and Stat5 bind to a critical element in a new enhancer of the human interleukin-2 receptor α gene. *Mol Cell Biol* 1996; 16:6829.
326. Zhang, X, Blenis, Li HC, Schindler C, Chen-Kiang S. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* 1995;267: 1990.
327. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 1995;82:241.
328. Horvath CM, Darnell JE Jr. The antiviral state induced by alpha interferon and γ interferon requires transcriptionally active Stat1 protein. *J Virol* 1996;70:647.
329. Morrigl R, Berchtold S, Friedrich K, et al. Comparison of the transactivation domains of Stat5 and Stat6 in lymphoid cells and mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* 1997;17:3663.
330. David M, Petricon E III, Benjamin C, Pine R, Weber MJ, Larner AC. Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha and interferon beta stimulated gene expression through Stat proteins. *Science* 1995;269:1721.
331. Look DC, Pelletier MR, Tidwell RM, Roswit WT, Holtzman MJ. Stat1 depends on transcriptional synergy with Sp1. *J Biol Chem* 1995;270:30264.
332. Schaefer TS, Sanders LK, Nathans D. Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9097.
333. Bhattacharya S, Eckner R, Grossman S, et al. Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-α. *Nature* 1996;383:344.
334. Zhang JJ, Vinkemeier U, Gu W, Chakravarti D, Horvath CM, Darnell JE Jr. Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon γ signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15092.
335. Horvai AE, Xu L, Korzus E, et al. Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1074.
336. Stocklin E, Wissler M, Gouilleux F, Groner B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 1996;383:726–728.
337. Meraz MA, White JM, Sheehan KC, et al. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 1996;84:431.
338. Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised immunity to viral disease. *Cell* 1996; 84:443.
339. Takeda K, Noguchi K, Shi W, et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3801.
340. Thierfelder WE, van Deursen J, Yamamoto K, et al. Requirement for Stat4 in interleukin-12–mediated responses of natural killer cells. *Nature* 1996;382:171.
341. Kaplan MH, Sun Y-L, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 1996;382:174.
342. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. *Immunity* 1996;4:313.
343. Takeda K, Tanaka T, Shi W, et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling.

Nature 1996;380:627.

344. Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, et al. Lack of IL-4–induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 1996;380:630.
345. Liu X, Robinson GW, Wagner K-U, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* 1997;11:179.
346. Udy GB, Towers RP, Snell RG, et al. Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7239–7244.

346a. Nakajima H, Liu X-W, Wynshaw-Boris A, et al. An indirect effect of STAT5A in IL-2-induced proliferation: A critical role for STAT5a in IL-2-mediated IL-2 receptor α chain induction. *Immunity* 1997;7:691–701.

347. Hou XS, Melnick MB, Perrimon N. Marelle acts downstream of the Drosophila HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs. *Cell* 1996;84:411.
348. Yan R, Small S, Desplan C, Dearolf R, Darnell JE Jr. Identification of a Stat gene that functions in Drosophila development. *Cell* 1996;84:421.
349. Kawata T, Shevchenko A, Fukuzawa M, et al. SH2 signaling in a lower eukaryote: a STAT protein that regulates stalk cell differentiation in Dictyostelium. *Cell* 1997;89:909.
350. Mui A, Wakao H, Kinosha T, Kitamura T, Miyajima A. Suppression of interleukin-3–induced gene expression by a C-terminal truncated Stat5: role of Stat5 in proliferation. *EMBO J* 1995;15:2425.
351. Goldsmith MA, Lai SY, Xu W, et al. Growth signal transduction by the human interleukin-2 receptor requires cytoplasmic tyrosines of the β chain and non-tyrosine residues of the γ_c chain. *J Biol Chem* 1995;270:21729.
352. Quelle FW, Wang D, Nosaka T, et al. Erythropoietin induces activation of Stat5 through association with specific tyrosines on the receptor that are not required for a mitogenic response. *Mol Cell Biol* 1996;16:1622.
353. Damen JE, Wakao H, Miyajima A, et al. Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and Stat5 activation. *EMBO J* 1995;14:5557–5568.
354. Ascherman DP, Migone T-S, Friedmann M, Leonard WJ. Interleukin-2 (IL-2)–mediated induction of the IL-2 receptor α chain gene: critical role of two functionally redundant tyrosine residues in the IL-2 receptor β chain cytoplasmic domain and suggestion that these residues mediate more than Stat5 activation. *J Biol Chem* 1997;272:8704.
355. Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 1996;272:719.
356. Su W-C S, Kitagawa M, Xue N, et al. Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatrophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature* 1997;386:288.
357. Pfeffer LM, Mullersman JE, Pfeffer SR, Murti A, Shi W, Yang CH. STAT3 as an adapter to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNAR1 chain of the type I interferon receptor. *Science* 1997;276:1418.
358. Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D, Staudt LM. Control of inflammation, cytokine expression and germinal center formation by BCL-6. *Science* 1997;276:589.
359. Baldwin AS Jr. The NF-κB and IκB proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649.
360. Lee FS, Hagler J, Chen ZJ, Maniatis T. Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* 1997;88:213.
361. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family. *Annu Rev Immunol* 1997;15:707.
362. Crabtree GR, Clipstone NA. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T-lymphocytes. *Annu Rev Biochem* 1994;63:1045.
363. Takeshita T, Arita T, Higuchi M, et al. STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction. *Immunity* 1997;6:449.
364. Horak ID, Gress RE, Lucas PJ, Horak EM, Waldmann TA, Bolen JB. T-lymphocyte interleukin 2-dependent tyrosine protein kinase signal transduction involves the activation of $p56^{lck}$. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1996.
365. Hatakeyama M, Kono T, Kobayash N, et al. Interaction of the IL-2 receptor with the src-family kinase $p56^{lck}$: identification of novel intermolecular association. *Science* 1991;252:1523.
366. Torigo T, Saragovi HU, Reed JC. Interleukin-2 regulates the activity of the lyn protein tyrosine kinase in a B-cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2674.
367. Kobayashi N, Kono T, Hatakeyama M, et al. Functional coupling of the src-family protein tyrosine kinases p59fyn and p53/56lyn with the interleukin 2 receptor: implications for redundancy and pleiotropism in cytokine signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4201.
368. Minami Y, Nakagawa Y, Kawahara A, et al. Protein tyrosine kinase Syk is associated with and activated by the IL-2 receptor: possible link with the c-myc induction pathway. *Immunity* 1995;2:89.
369. Otani H, Siegel JP, Erdos M, et al. Interleukin (IL)-2 and IL-3 induce distinct but overlapping responses in murine IL-3 dependent 32D cells transduced with human IL-2 receptor β chain: involvement of tyrosine kinases other than $p56^{lck}$. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2789.
370. Karnitz L, Sutor SL, Torigoe T, et al. Effects of p56lck deficiency on the growth and cytolytic effector function of an interleukin-2–dependent cytotoxic T-cell line. *Mol Cell Biol* 1992;12:4521.
371. Hatakeyama M, Mori H, Doi T, Taniguchi T. A restricted cytoplasmic region of IL-2 receptor β chain is essential for growth signal transduction but not for ligand binding and internalization. *Cell* 1989;59:837.
372. Ravichandran KS, Igras V, Shoelson SE, Fesik SW, Burakoff SJ. Evidence for a role for the phosphotyrosine-binding domain of Shc in interleukin 2 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5275.
373. Turner M, Mee PJ, Costello PS, et al. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 1995;378:298.
374. Corey SJ, Burkhardt AL, Bolen JB, Geahlem RL, Tkatch LS, Tweardy DJ. Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling involves the formation of a three-component complex with lyn and syk protein tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4683.
375. Rao P, Mufson RA. A membrane proximal domain of the human interleukin-3 receptor β_c subunit that signals DNA synthesis in NIH 3T3 cells specifically binds a complex of src and Janus family tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1995;270:6886.
376. Ernst M, Gearing DP, Dunn AR. Functional and biochemical association of Hck with the LIF/IL-6 receptor signal transducing subunit gp130 in embryonic stem cells. *EMBO J* 1994;13:1574.
377. Matsuda T, Fukada T, Takahashi-Tezuka M, et al. Activation of Fes tyrosine kinase by gp130, an interleukin-6 family cytokine signal transducer, and their association. *J Biol Chem* 1995;270:11037.
378. Matsuda T, Takahashi-Tezuka M, Fukada T, et al. Association and activation of Btk and Tec tyrosine kinases by gp130, a signal transducer of the interleukin-6 family of cytokines. *Blood* 1995;85:627.
379. Izuhara K, Feldman RA, Greer P, Harada N. Interaction of the c-fes proto-oncogene product with the interleukin-4 receptor. *J Biol Chem* 1994;269:18623.
380. Myers MG Jr, White MF. Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:615.
381. Wang L-M, Keegan AD, Li W, et al. Common elements in interleukin 4 and insulin signaling pathways in factor-dependent hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4032.
382. Wang L-M, Myers MG Jr, Sun S-J, Aaronson SA, White M, Pierce JH. IRS-1: essential for insulin-and IL-4–stimulated mitogenesis in hematopoietic cells. *Science* 1993;261:1591.
383. Keegan AD, Nelms K, White M, Wang L-M, Pierce JH, Paul WE. An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4 mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth. *Cell* 1994;76:811.
384. Ridderstrale M, Degerman E, Tornqvist H. Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation of the insultin receptor substrate-1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in primary adipocytes. *J Biol Chem* 1995;270:3471.
385. Argetsinger LS, Norstedt G, Billestrup N, White MF, Carter-Su C. Growth hormone, interferon-γ, and leukemia inhibitory factor utilize insulin receptor substrate-2 in intracellular signaling. *J Biol Chem* 1996;271:29415.
386. Johnston JA, Wang LM, Hanson EP, et al. Interleukins 2, 4, 7, and 15 stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates 1 and 2 in T cells. Potential role of JAK kinases. *J Biol Chem* 1995;270:28527.
387. Kapeller R, Cantley LC. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays* 1994;16:565.
388. Truitt KE, Mills GB, Turck CW, Imboden JB. SH2-dependent association of phosphatidylinositol 3′-kinase 85-kDa regulatory subunit with the interleukin-2 receptor β chain. *J Biol Chem* 1994;269:5937.
389. Damen JE, Cutler RL, Jiao H, Yi T, Krystal G. Phosphorylation of tyrosine 503 in the erythropoietin receptor (EpR) is essential for binding of the p85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for EpR-associated PI 3-kinase activity. *J Biol Chem* 1995;270:23402.
390. Jucker M, Feldman RA. Identification of a new adapter protein that may link the common β subunit of the receptor for granulocyte/macrophage colong stimulating factor, interleukin-3 (IL-3), and IL-5 to phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1995;270:27817.
391. Karnitz LM, Burns LA, Sutor SL, Blenis J, Abraham RT. Interleukin-2 triggers a novel phosphatidylinositol 3-kinase–dependent MEK activation pathway. *Mol Cell Biol* 1995;15:3049.
392. Neel BG, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:193.
393. Denu JE, Stuckey JA, Saper MA, Dixon JE. Form and function of protein dephosphorylation. *Cell* 1996;87:361.
394. Tsui HW, Siminovitch KA, de Souza L, Tsui FW. Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat Genet* 1993;4:124.
395. Shultz LD, Schweitzer PA, Rajan TV, et al. Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell* 1993;73:1445.
396. van Zant G, Schultz L. Hematologic abnormalities of the immunodeficient mouse mutant, viable motheaten (meV). *Exp Hematol* 1989;17:81.
397. Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 1995;80:729.
398. Yi T, Mui AL, Krystal G, Ihle JN. Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor β chain and down-regulates IL-3 induced

tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol Cell Biol* 1993;13:7577.
399. Yetter A, Uddin S, Krolewski JJ, Jiao H, Yi T, Platanias LC. Association of the interferon-dependent tyrosine kinase Tyk-2 with the hematopoietic cell phosphatase. *J Biol Chem* 1995;270:18179.
400. Jiao H, Berrada K, Yang W, Tabrizi M, Platanias LC, Yi T. Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain–containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol* 1996;16:6985.
401. Yin T, Shen R, Feng GS, Yang YC. Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1997;272:1032–1037.
402. Haspel RL, Salditt-Georgieff M, Darnell JE Jr. The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J* 1996;15:6262.
403. Damen JE, Liu L, Rosten P, Humphries RK, Jefferson AB, Majerus PW, Krystal G. The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetraphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1689.
404. Ware MD, Rosten P, Damen JE, Liu L, Humphries RK, Krystal G. Cloning and characterization of human SHIP, the 145-kD inositol 5-phosphatase that associates with SHC after cytokine stimulation. *Blood* 1996;88:2833.
405. Kim TK, Maniatis T. Regulation of interferon γ activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 1996;273:1717.
405a. Noguchi M, Sarin A, Aman MJ, et al. Functional cleavage of the common cytokine receptor γ chain (γ_c) by calpain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11534–11539.
406. Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, et al. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J* 1995;14:2816.
407. Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, et al. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 1997;89:3148.
408. Starr R, Willson TA, Viney EM, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997;387:917–921.
409. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997;387:921–924.
410. Naka T, Narazaki M, Hirata M, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997;387:924–929.
410a. Aman MJ, Leonard WJ. Cytokine signaling: Cytokine inducible signaling inhibitors. *Curr Biol* 1997;12:R.784.
410b. Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, et al. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box from five structural classes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:114-119.
411. Mossmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clones. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348.
412. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138.
413. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787.
414. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:532.
415. Maggi E, Mazzetti M, Ravina A, et al. Ability of HIV to promote a Th1 to Th0 shift and to replicate preferentially in Th2 and Th0 cells. *Science* 1994;265:244.
416. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-γ production by T cells. *Nature* 1995;378:88–91.
417. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, et al. Activation of interferon-γ inducing factor mediated by interleukin-1 β converting enzyme. *Science* 1997;;275:206–209.
418. Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, et al. Caspase-1 processes IFN-γ–inducing factor and regulates LPS-induced IFN-γ production. *Nature* 1997;386:619-23.
419. Ho IC, Hodge MR, Rooney JW, Glimcher LH. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 1996;85:973.
420. Hodge MR, Chun HJ, Rengarajan J, Alt A, Lieberson R, Glimcher LH. NF-AT-driven interleukin-4 transcription potentiated by NIP45. *Science* 1996;274:1903.
421. Gajewski TF, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-γ in immune regulation. I IFN-γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 1988;140:4245.
422. Pernis A, Gupta S, Gollob KJ, et al. Lack of interferon γ receptor β chain and the prevention of interferon γ signaling in TH1 cells. *Science* 1995;269:245.
423. Bach EA, Szabo SJ, Dighe AS, et al. Ligand-induced autoregulation of IFN-γ receptor β chain expression in T helper cell subsets. *Science* 1995;270:1215.
424. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12Rβ2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997;185:817.
425. Hu-Li J, Huang H, Ryan J, Paul WE. In differentiated CD4+ T cells, interleukin 4 production is cytokine-autonomous, whereas interferon γ production is cytokine-dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3189–3194.
426. d'Andrea AD. Cytokine receptors in congenital hematopoietic disease. *N Engl J Med* 1994;330:839.
427. Amselem S, Duquesnoy P, Attree O, et al. Laron dwarfism and mutations of the growth hormone receptor gene. *N Engl J Med* 1989;321:989.
428. Dong F, Hoefsloot LH, Schelen AM, et al. Identification of a nonsense mutation in the granulocyte-colony-stimulating factor receptor in severe congenital neutropenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4480.
429. de la Chapelle A, Traskelin AL, Juvonen E. Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4495.
430. Souyri M, Vigon I, Penciolelli J-F, Heard J-M, Tambourin P, Wendling F. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell* 1990;63:1137.
431. Kundig TM, Schorle H, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM, Horak I. Immune responses in interleukin-2–deficient mice. *Science* 1993;262: 1059–1061.
432. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993;75: 253–261.
433. Kopf M, Brombacher F, Hodgkin PD, et al. IL-5–deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity* 1996;4:15–24.
434. Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M, et al. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 1994;264:713–716.
435. Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor–deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 5592–5596.
436. Nishinakamura R, Nakayama N, Hirabayashi Y, et al. Mice deficient for the IL-3/GM-CSF/IL-5 β_c receptor exhibit lung pathology and impaired immune response while βIL-3 receptor-deficient mice are normal. *Immunity* 1995;2:211–222.
437. Kopf M, Baumann H, Freer G, et al. Impaired immune and actue-phase responses in interleukin-6–deficient mice. *Nature* 1994;368:339–342.
438. Yoshida K, Taga T, Saito M, et al. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:407–411.
439. Akira S, Yosha K, Tanaka T, Taga T, Kishimoto T. Targeted disruption of the IL-6 related genes: gp130 and NF-IL6. *Immunol Rev* 1995;148:221–253.
440. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992:359:76–79.
441. Escary JL, Perreau J, Dum'enil D, Eziune S, Brulet P. Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of hematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* 1993:363:361–364.
442. Rao MS, Sun Y, Escary JL, Perreau J, Tresser S. Leukaemia inhibitory factor mediates an injury response but not a target-directed developmental transmitter switch in sympathetic neurons. *Neuron* 1993;11:1175–1185.
443. Ware CB, Horowitz MC, Renshaw BR, Hunt JS, Liggitt D. Target disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development* 1995;121:1283–1299.
444. Li M, Sendtner M, Smith A. Essential function of LIF receptor in motor neurons. *Nature* 1995;378:724–727.
445. Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H. Disruption of the CNTG gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 1993;365:27–32.
446. DeChiara TM, Bejsada R, Poueymirou WT, et al. Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 1995;83:313–322.
447. Magram J, Connaughton SE, Warrier RR, et al. IL-12–deficient mice are defective in interferon-γ production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 1996; 4:471–481.
448. Wu C, Ferrante J, Gateley MK, Magram J. Characterization of IL-12 receptor β1 chain (IL-12Rβ1)-deficient mice. *J Immunol* 1997;159:1658–1665.
449. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995;83:59–67.
450. Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* 1996;10:154–164.
451. Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW. Thrombocytopenia in c-mpl deficient mice. *Science* 1994;265:1445–1447.
452. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 1994;84: 1737–1746.
453. Yoshida H, YayashS-I, Kunisada T, et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1990;345:442.
454. Muller U, Steinhoff U, Reis LF, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994;264:1918–1921.
455. van den Broek MF, Muller U, Huang S, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev* 1995;148:5–18.
456. van den Broek MF, Muller U, Huang S, Aguet M, Zinkernagel RM. Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and γ interferon receptors. *J Virol* 1995;69:4792–4796.

457. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-γ genes. *Science* 1993;259:1739–1742.
458. Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon γ-deficient mice infected with Leishmania major. *J Exp Med* 1994;179:1367–1371.
459. Huang S, Hendriks W, Althage A, et al. Immune response in mice that lack the interferon γ receptor. *Science* 1993;259:1742–1745.
460. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10–deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263–274.
461. Rodig SJ, Meraz MA, White JM, et al. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 1998;93:373–383.
462. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 1998;93:385–395.
463. Neubauer H, Cumano A, Muller M, et al. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 1998;93:397–409.

第22章　促炎细胞因子:肿瘤坏死因子和白细胞介素-1家族、趋化因子、转化生长因子β及其他

T. Krakauer, J. Vilcek, and J.J. Oppenheim[①]

本章集中讨论细胞间介质,其主要活性是促进先天和后来的免疫调节性炎症应答。因此这些促炎细胞因子在宿主防御中起着至关重要的作用,但当过多存在或在不适当的自身免疫应答过程中,它们则有自身破坏的作用。作为宿主防御的参与者,越来越多的细胞因子正在被鉴定。因此,本章不得不进行完全修正,以囊括肿瘤坏死因子和白细胞介素-1家族成员、趋化因子、转化生长因子β及最近被发现的白细胞介素-16和白细胞介素-17。本章重点主要是细胞因子-受体的相互作用、信号传导以及基因靶向作用,并且依靠综述和前一版来覆盖有关这些细胞间介质种种生物学效应的较早文献。 775

肿瘤坏死因子家族

肿瘤坏死因子(TNF)最初是在动物体内作为由脂多糖(LPS)诱导的肿瘤出血性坏死因子而被描述的[1],后来作为与动物在寄生虫感染期间消瘦有关的“恶液素”而被独立鉴定[2]。TNF cDNA的克隆和纯化的TNF蛋白[3,4]显示,TNF在结构上与淋巴毒素相关[5,6]。淋巴毒素为活化的T细胞的一种产物,现在被命名为LT-α(直到最近,淋巴毒素也被命名为TNF-β,TNF过去被称作TNF-α,现在有时仍被称为TNF-α。在本章的所有地

① T. Krakauer: Kepartmint of Immunology and Molecular Biology, USAMRⅡD, Fort Detrick, Frederick, Maryland 21702. J. Vilcek: Departmint of Microbiology, New York University Medical Center, New York, New York 10016. J.J. Oppenheim: Laboratory of Molecular Immunoregulation, National Cancer Institute, FDRDC, Frederick, Maryland 21702-1201.

方，我们将使用 TNF 和 LT-α)。尽管 TNF 和 LT-α 是由不同的细胞在对不同的刺激物的应答中产生的，但它们利用相同的受体，因此能产生相似的生物学活性(表22.1，图22.1)。但是，在即将要讨论的内容中，我们发

表 22.1　肿瘤坏死因子家族：受体及其配体的主要功能

受体	配体	功能
TNF-RI (p55)	TNF 和 LT-α	宿主防御，炎症，细胞死亡
TNF-RⅡ (p75)	TNF 和 LT-α	宿主防御，炎症
LT-βR	LT-α/β 复合物	淋巴结发育，细胞死亡
CD40	CD40L	Ig 类别转换和 T 细胞的共刺激
CD27	CD27L	T 细胞的共刺激
CD30	CD30L	T 和 B 细胞的共刺激
OX40	OX40L	T 细胞的共刺激
4-1BB	4-1BBL	T 细胞的共刺激
Fas/Apo-1	FasL/Apo-1L	细胞死亡，NF-κB 活化，自反应 T 细胞的排除
DR4	TRAIL/Apo-2L	细胞死亡
Apo3/DR3/Wsl-1/TRAMP	Apo3L	细胞死亡，NF-κB 活化
TRAMP	?	NF-κB 活化，细胞死亡
CAR1	?	鸟白细胞组织增生肉瘤病毒的受体
HVEM	LIGHT 和 LT-α	疱疹单纯病毒共受体
GITR	?	保护 T 细胞受体介导的细胞死亡
骨质疏松素(OPG)	破骨细胞 + 分化因子	骨量调节
p75 NGF-R	NGF，neurotrophinsa[a]	神经元分化，细胞死亡

[a]但 p75 NGF 受体(低亲和力 NGF 受体)在结构上与 TNF 受体家族的其他成员相关，NGF 和神经营养因子与 TNF 家族配体成员不相关。改编自参考文献[15]。

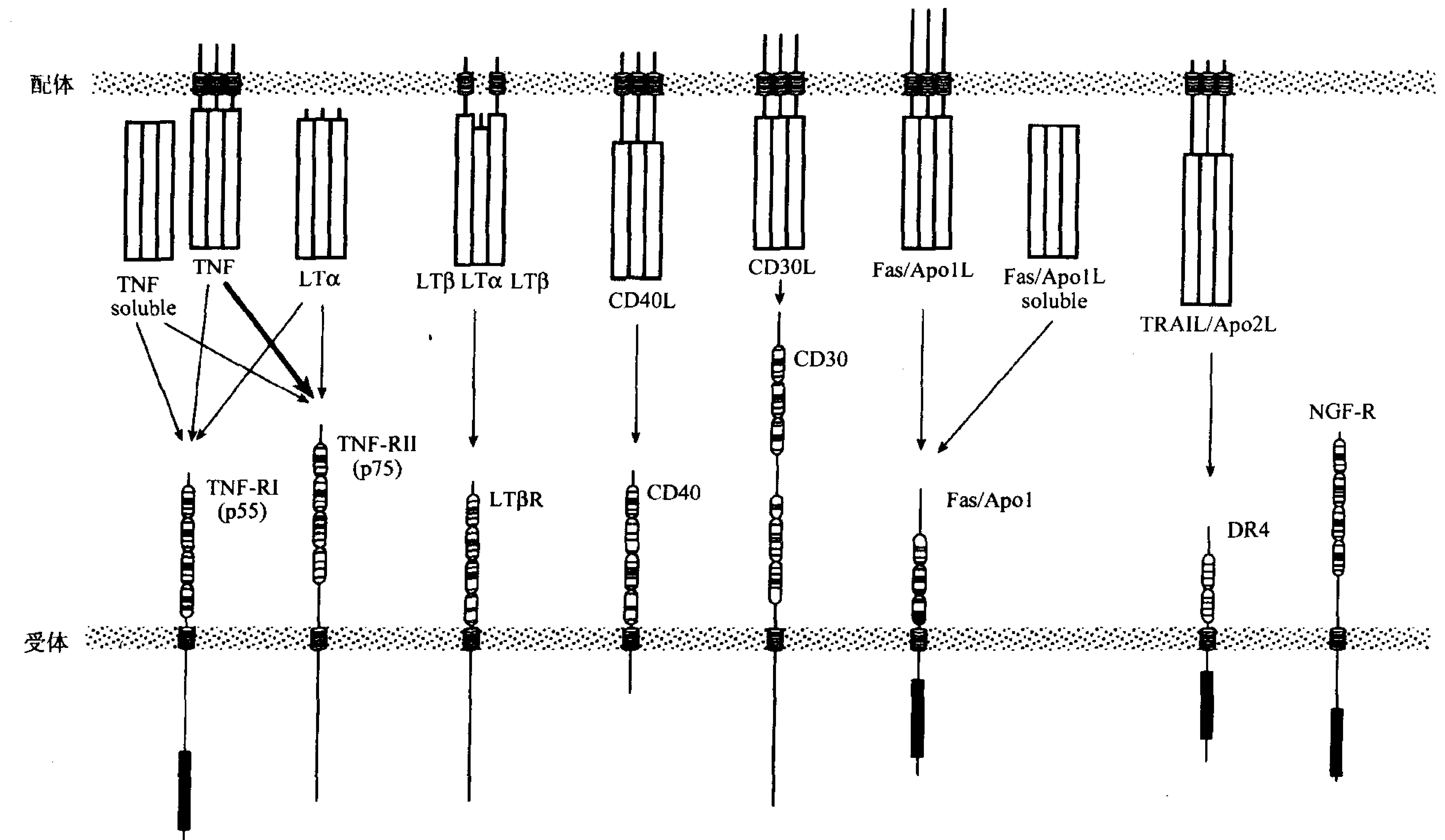


图 22.1　TNF 家族的配体和受体(改编自参考文献[141])。在配体中，只有淋巴毒素-α(LT-α)是分泌型蛋白。该家族中其他成员的配体都是作为Ⅱ型膜蛋白而被合成。被特异性金属酶裂解后，来自膜形式的 TNF 和 Fas/Apo1 也存在可溶性形式。相信大部分 TNF 家族配体的活性形式都是同源三聚体，而只有 LT-α 和 LT-β 形成异源三聚体。TNF 家族受体的标志是在其细胞外区存在的 3～6 个重复的富含半胱氨酸的结构域。另外，在一些 TNF 家族受体的胞质部分有一大约 80 个氨基酸长的死亡结构域区(实体矩形所示)。对 TNF 家族配体和受体更完全的介绍见表 22.1。

现 LT-α 也能与 LT-β 形成异源复合物，该复合物能利用不同的受体(LT-β 受体)，因而执行的生物学功能与单独的 LT-α 不同。TNF 和 LT-α 是现在正在日益增长的配体和受体家族[7]中最早被鉴定的成员，这一家族还包括 LT-β[8]、Fas/Apo1 受体及其配体[9]、TRAIL/Apo2L 及其受体[12,13]、CD40[14]和其他成员(表 22.1)。而主要影响 T 或 B 细胞功能的 CD40，CD40 配体及 TNF 受体和配体家族的其他一些成员将在本书的其他章节中进行更广泛地讨论。

除淋巴毒素-α 外，该家族的配体都是Ⅱ型膜蛋白，由 C 端胞外区、跨膜区和胞内区所组成。配体家族成员间的同源性在胞外区最明显。大部分配体都以完整跨膜蛋白存在，只有一些例外，特别是 LT-α、TNF 和 FasL，其可溶形式才有功能[15~17]。

肿瘤坏死因子家族的所有受体成员都是Ⅰ型膜蛋白。在胞外配体结合区，它们彼此显示出部分结构的同源性，该区包含各种不同数目特异性的、重复的富含半胱氨酸结构域(图 22.1)。除胞外区存在同源性外，该家族的一些受体在其胞内区也共有一段长为 80 个氨基酸的“死亡区”。死亡区对凋亡信号的产生非常重要，并且主要存在于 TNF-RⅠ、Fas/Apo1、DR3/WSL-1、DR4、CAR1、TRAMP 和 p75 NGF-R 的胞质区[17~21]。最近鉴定的肿瘤坏死因子家族受体成员[22-26]的配体还未被鉴定(表 22.1)。

基因

人肿瘤坏死因子基因位于 6 号染色体上主要组织相容性复合体 MLK 的第Ⅲ区域[8,27,28]。肿瘤坏死因子基因的两侧分别与编码淋巴毒素-α 和淋巴毒素-β 的基因相连(其中淋巴毒素-β 基因的定向相反)。尽管这 3 个基因的表达被分别调节，但它们基因组的构成彼此非常相似，每个基因都由约 3 kb 的 DNA 排列而成的 4 个外显子组成。定位于小鼠基因簇中 17 号染色体的小鼠肿瘤坏死因子/淋巴毒素基因也存在相同的排列[29,30]。这些结构特征强烈暗示 TNF、LT-α 和 LT-β 的基因由同一个祖基因复制而来。尽管有这些相似性，但它们基因表达的调节、表达的组织特异性、甚至 3 种蛋白的生物学功能方面都存在明显的不同。

对肿瘤坏死因子基因侧翼区内转录调节元件的分析促成了几个元件的鉴定，这些元件及其他元件在肿瘤坏死因子基因表达的调节中起着重要的作用[31,32]。除转录水平调节外，有证据表明肿瘤坏死因子的合成速度在 mRNA 延长水平、mRNA 加工和翻译水平也受控制[33]。另一个调节点在肿瘤坏死因子跨膜蛋白的蛋白水解切割水平，从而导致可溶性肿瘤坏死因子的释放(见后文)。肿瘤坏死因子基因在 MHC 基因簇内的定位增加了该部位内多态性，这种多态性可能作为与 MHC 有关的自身免疫和感染性疾病易感性的遗传决定因素而发挥着重要的作用。肿瘤坏死因子基因的特异性多态性已被显示与自身免疫和肿瘤坏死因子产生的增加有关[34]。

Fas 配体基因定位于人和鼠的 1 号染色体上，与编码 OX40 配体的基因相邻[35]。Fas 配体基因包括 5 个外显子，其基因结构与肿瘤坏死因子的有些相似。

蛋白质

人肿瘤坏死因子由 233 个氨基酸组成，为一分子质量为 26kDa 的跨膜蛋白(表 22.2)。有证据表明，肿瘤坏死因子的跨膜形式具有生物学活性，即它能与肿瘤坏死因子受体 TNF-RⅠ或 TNF-RⅡ交叉结合(图 22.1)。但是，TNF 的跨膜形式似乎优先活化 TNF-RⅡ而非 TNF-RⅠ，提示 TNF 的跨膜形式和可溶性形式执行着某些不同的功能[36]。TNF 的可溶性形式由 157 个氨基酸组成，来自其跨膜形式前体蛋白的水解切割。负责这一过程的特异性金属蛋白酶(TNF 转换酶或 TACE)是一个由 824 个氨基酸组成的跨膜蛋白，其起催化作用的部位是胞外区的一部分[37,38]。TACE 属于被称为“蛋白外功能区”(sheddase)的膜锚定金属蛋白酶家族[39]。TACE 在 Ala76 和 Val77 间切去 TNF 前体的胞外部分，留下完整的跨膜区和胞质区。产生的 157 个氨基酸长的可溶性 TNF 多肽可形成同源三聚体，这也是 TNF 受体交联中的一个重要特征[40]。由于 TNF 的跨膜形式能结合并活化 TNF 受体，因此它也可能作为三聚体存在，但还无正式的证据。人 TNF 的可溶性形式被结晶后，发现其晶体是一个具有“jelly-roll”布局拉长了的、反向平行的 β 折叠片层夹心结构[41,42]。单体围绕对称三维轴

778

密切联系形成紧凑的钟型三聚体。已有的证据表明，LT-α 和 TNF 配体家族的其他成员也可形成三聚体与受体结合，与受体相互作用的位点在三聚体的基底部[43]。

表 22.2　人和鼠 TNF 与 LT-α 的对比

特征	肿瘤坏死因子	淋巴毒素-α
细胞来源	单核-巨噬细胞，T 细胞，B 细胞，NK 细胞，血管内皮细胞，角化细胞，平滑肌细胞，肥大细胞，嗜中性粒细胞，星形胶质细胞，小胶质细胞	T 细胞(Th1 和 Th2)，B 细胞
染色体定位	6 号染色体(人)	6 号染色体(人)
	17 号染色体(鼠)	17 号染色体(鼠)
基因组织	3 个内含子	3 个内含子
前体蛋白大小(氨基酸)	233(人)	205(人)
	235(鼠)	202(鼠)
从细胞释放	通过特异性金属蛋白酶(TACE)切割膜蛋白	通过分泌途径
释放蛋白大小	157(人)	171(人)
	156(鼠)	169(鼠)
半胱氨酸残基[a]	2(人)	无(人)
	2(鼠)	1(鼠)
蛋氨酸残基[a]	无	3
N-糖基化	无(人)	有(人)
	有(鼠)	有(鼠)
四级结构	三聚体	三聚体
其他特征		与 LT-β 形成同源三聚体或异源三聚体

[a] 在释放蛋白中。

LT-α 是 TNF 家族配体中惟一作为传统分泌蛋白被合成的，有一可被切割的信号肽序列[44]。相反，LT-β 及 TNF 配体家族的其他成员是作为Ⅱ型膜蛋白被合成的。分泌型 LT-α 蛋白形成同源三聚体，其识别与 TNF 相同的细胞表面的 2 个受体(表 22.1，图 22.1)。但 LT-α 也与 LT-β 形成异源三聚体[8,15]。LT-β 是非分泌性的Ⅱ型膜蛋白。因此，LT-β 就在 LT-α/β 异源三聚体中起着锚定 LT-α 于细胞表面的作用。相信只有当 LT-α 被过度产生时，它才从细胞中被释放出来；即，只要细胞表面存在 LT-β，新合成的 LT-α 就优先形成 LT-α/β 异源三聚体。异源三聚体较常见的形式由 1 个 LT-α 分子和 2 个 LT-β 亚基组成[45]。值得注意的是，细胞表面结合的 LT-α/β 异源三聚体能与 LT-β 受体结合[46]、与 LT-α 识别的受体不同(表 22.1，图 22.1)。由于 LT-α 和 LT-α/β 识别不同的受体，因此它们执行不同的生物学功能也就不足为奇了(见后文)。

与 TNF 相似，Fas 配体作为Ⅱ型跨膜蛋白被合成，可被特异性金属蛋白酶切割而从细胞表面释放出来[47]。因此，与 TNF 非常相似，Fas 配体以两种形式存在，一种是 40 kDa 的跨膜形式，另一种是 26 kDa 的可溶性形式[35,47]。

制造者和诱导者

单核吞噬细胞是 TNF 的主要细胞来源，但许多其他有核细胞也能产生 TNF(表 22.2)。在适当刺激下能产生 TNF 的细胞有 T 细胞(Th1 和 Tc 细胞)、B 细胞、自然杀伤细胞(NK 细胞)、血管内皮细胞、角质细胞、平滑肌细胞、肥大细胞、中性粒细胞、星形胶质细胞和神经胶质细胞等[48]。刺激 TNF 产生的因子通常也诱导白细胞介素-1(IL-1)的产生[48]。用得最广泛的刺激物是各种各样的细菌产物，特别是 LPS，也包括酵母聚糖、佛波酯、紫外线、病毒感染、同种异体 B 细胞(在 T 细胞中)、原虫和其他微生物。TNF 的产生也能被各种细胞因子和其他内源介质上调，包括 TNF 本身、IL-1、IFN-γ、IFN-α、粒-巨集落刺激因子(GM-CSF)、IL-2、转化生长因子-β(TGF-β)、P 物质和血小板活化因子[48]。其他内源性物质被显示在转录或翻译水平抑制 TNF 合成，包括前列腺素、皮质激素、IL-4、IL-6 和 TGF-β[48]。如此多的外源性和内源性因子能影响 TNF 产生的事实显示了生物体中调节该细胞因子产生的物质的复杂性。尽管 TNF 的产生最初是由外源性因子(如感染)所引起，但该过程受细胞因子控制的复杂调节回路的精细调控。

LT-α 的表达局限于活化 B 细胞、T 细胞，可能还有 NK 细胞。[49,50]。LT-β 也在淋巴细胞中表达，但其表达不像 LT-α 那样受到高度调节。LT-α/β 异源三聚体在淋巴细胞表面的 表达水平似乎主要受 LT-α 合成水平调节。而 LT-α 的合成主要在转录水平被调节，但在 LT-α 基因表达的调节中起重要作用的转录因子和增强子元件还未被完全鉴定[49]。转录后的调节机制也影响着 LT-α 合成的水平。而且 CD4⁺ 的 Th1 细胞很容易产生 LT-α(及 TNF)，并被认为参与炎症应答过程中的巨噬细胞活化[52]。

779

Fas 配体主要由活化的 T 细胞产生，而未发现 B 细胞、巨噬细胞、内皮细胞和许多其他类型的细胞表达 Fas 配体的 mRNA 或蛋白[35]。但在睾丸和眼组织中发现了 Fas 配体表达，提示 Fas 配体在使眼和睾丸成为免疫特惠位点中的作用，Fas 配体的这种作用可能是通过诱导进入这些位点的、表达 Fas 的活化淋巴细胞的凋亡来实现的[17,53,54]。

受体

正如先前所指出的，2 个单独的受体 TNF-RⅠ和 TNF-RⅡ既能结合 TNF 又能结合 LT-α 同源三聚体(表 22.1，图 22.1)(但可溶性鼠 LT-α 活化 TNF-RⅠ或 TNF-RⅡ的能力还不确定[55])。尽管 TNF-RⅠ和 TNF-RⅡ胞外区中重复的富半胱氨酸区域的存在将其定性为同一受体家族的成员，但在其胞内区未发现同源性结构，提示它们通过不同的机制传导信号[56-59]。TNF-RⅠ在其胞浆区内含有 1 个特殊的死亡结构域区[18]。TNF 受体广泛分布于不同的组织中，许多细胞表达两种 TNF 受体，但 TNF-RⅠ的表达更普遍，特别是在非造血细胞中[15,58,59]。

研究显示，许多因子能调节 TNF 受体表达的水平。IFN-γ 上调 TNF 受体在各种类型的细胞上的表达，这部分解释了文献广泛报道的 TNF 与 IFN-γ 间的协同作用[60,61]。静止 T 细胞不表达 TNF 受体，但用 IL-2 处理后能诱导 TNF 受体的表达[62]。下调 TNF 受体的因子有佛波酯、IL-1、IL-6、TGF-β、视黄醛和 TNF 本身[63,64]。大部分下调 TNF 受体的因子也被显示能诱导 TNF-RⅠ和/或 TNF-RⅡ从细胞表面脱落。负责 TNF 受体外功能区切割而导致 TNF 受体脱落的酶还未被鉴定。脱落的可溶性 TNF 受体仍能结合 TNF，从而中和 TNF 的生物学活性。在健康人的尿和血浆中检测到可溶性 TNF 受体(TNF-RⅠ和 TNF-RⅡ)[65]，在有各种感染、免疫紊乱和癌症的患者中，可溶性 TNF 受体的水平增加[64]。提示血清中可溶性 TNF 的受体水平可作为自身免疫疾病、人免疫缺陷病毒(HIV)感染和癌症中疾病活动的标志[64]。通过结合 TNF，体液中的可溶性 TNF 受体能中和 TNF 活性。但是，由于这种结合是可逆的，而且 TNF 和可溶性受体形成的复合物比自由 TNF 更不易被清除，因此可溶性 TNF 受体也能延长 TNF 在体内的滞留[66]。

细胞表面 TNF 受体的信号传导由这些受体聚集而激发的。在 TNF 或 LT-α 的作用下，2 条或 3 条受体链(TNF-RⅠ或 TNF-RⅡ)发生交联，导致受体的聚集。TNF 受体胞外区的二价抗体模拟 TNF 作用的实验第一次证实了 TNF 受体的同源聚集足以启动信号传导[67,68]。应该注意的是，TNF 受体的这种做法明显不同于其他细胞因子受体，其他细胞因子受体大部分是异源二聚体或异源三聚体。和其他细胞因子受体一样，两种 TNF 受体都缺乏催化区。信号传导由配体诱导的受体聚集而启动，从而导致各种各样的细胞内信号蛋白被召集到受体复合物处。TNF-RⅠ是主要的信号传导受体。在无 TNF-RⅡ参与的情况下，TNF 的许多作用，包括细胞毒性、纤维母细胞增殖、NF-κB 的活化和许多基因的活化，都能被引发[69-71]。尽管 TNF-RⅡ能单独传送一些信号[68]，但它也被认为是先与 TNF 分子结合再将 TNF 分子传递给 TNF-RⅠ而执行着辅助功能(“配体传递”功能)[72,73]。与 TNF-RⅠ相比，TNF-RⅡ能以更快的开关速度来便利配体传递。另外，有证据表明，TNF-RⅠ和 TNF-RⅡ的胞内区之间存在着胞质接头蛋白介导的串话(见后文)。

可溶性 LT-α 同源三聚体结合 TNF-RⅠ和 TNF-RⅡ，而 LT-α1/β2 异源三聚体则结合被称为 LT-βR 的不同受体(表 22.1，图 22.1)[46]。Fas 配体识别的是 Fas 受体，Fas 是 TNF 受体家族的另一个重要(和最易被识别的一个)成员，其主要功能是激发凋亡[9~11]。尽管 Fas 配体的表达主要局限于淋巴样细胞，但 Fas 广泛表达于多种不同的组织中，包括肿瘤细胞[17,35]。用 IFN-γ 或 TNF 处理后，Fas 在某些细胞中的表达被提高[35]。Fas 含有一个死亡结构域区，这个区域同样也存在于 TNF-RⅠ、DR3/WSL-1、DR4、CAR1、TRAMP 和 p75 NGF-R 中(表

22.1)[17,74]。该区域在信号传导中的作用在后文讨论。

胞内信号传导

TNF家族的受体不含催化区,除存在于TNF-RⅠ、Fas、p75 NGF-R和该家族的一些其他成员中的死亡结构域区外(见上文),在这些受体的胞内区中无其他重要序列的同源性被报道。TNF家族受体的信号转导途径的活化主要靠各种胞内接头蛋白-信号传导子被募集到活化受体的胞内区来启动,大多数其他细胞因子受体也是这样。但是,参与TNF家族受体信号转导的胞内蛋白的数目比参与其他细胞因子受体(如干扰素受体)信号转导的胞内蛋白的数目要多得多,在其他细胞因子受体引起的信号转导中,Jak-STAT途径提供了信号转导的主要机制。TNF受体信号转导的种类繁多和复杂性,使得这些受体的生物学作用巨大差异。鉴于TNF家族受体正是由于(主要是TNF-RⅠ和Fas)活化、激发凋亡的信号传导途径在本书的其他地方被更详细地讲解,我们将主要回顾影响基因表达和分化的信号传导途径。

780

TNF受体相关因子

最早被分离的参与TNF作用的胞内信号蛋白是TNF受体相关因子1和TNF受体相关因子2(TRAF1和TRAF2)[75]。TRAF2是一种所有细胞都表达的、分子质量为56 kDa的蛋白,能组成性结合到TNF-RⅡ的C端区域。TRAF1是一分子质量约为45 kDa的蛋白,其表达主要局限于脾和肺,TRAF1由于与FRAF2结合而被间接募集到TNF-RⅡ处。在已被鉴定的其他4个截然不同的TRAF蛋白中[16,76],TRAF3与CD40和EB转化蛋白LMP1相互作用,TRAF5与CD40和LT-β受体相关,TRAF6在IL-1信号传导中起关键作用(见后文)。所有这些蛋白的特点是存在一个特征性的、约230个氨基酸长的TRAF结构域,该结构域在TRAF蛋白的同源和异源寡聚化、与受体胞内区中的特异序列结合及与下游靶分子相互作用中起着重要作用[77]。大部分FRAF蛋白也含有RING指基序和锌指序列[75]。TRAF2似乎在TNF诱导的、通过TNF-RⅠ和TNF-RⅡ对NF-κB转录因子的活化中起着作用(见后文)。

死亡结构域蛋白

信号传导子的另一个重要家族包括这样一些蛋白,它们包含同样存在于TNF-RⅠ、Fas的[16,76],以及TNF家族的其他受体的死亡结构域序列。TRADD,一种被所有细胞表达的、分子质量为34 kDa的蛋白质,作为与TNF-RⅠ的死亡结构域相互作用的蛋白质而被鉴定[78]。FADD/MORT[79,80]和RIP[81]最初是根据它们与Fas的胞内区的结合能力而分离的(图22.2)。该家族的第四个成员是RAIDD[82]。除了结合死亡结构域,这些蛋白还含有促进它们与ICE样蛋白酶MACH/FLICE(Caspase 8)和ICH-1(Caspase 2)结合的其他序列,从而激发细胞死亡途径[83]。值得注意的是,一些死亡结构域蛋白,特别是TRADD和RIP,也能与TRAF2的TRAF结构域结合,从而促进NF-κB活化(见后文)[84]。因此,死亡结构域蛋白不仅激发细胞死亡,也能导致NF-κB转录因子的活化,通过诱导保护性蛋白的合成来阻止凋亡引起的细胞死亡[85,86]。

NF-κB活化途径

尽管TNF或Fas受体激发的细胞死亡在无蛋白合成的情况下发生,但TNF家族成员所引起的其他重要作用都要归因于基因表达活化及其所致的编码蛋白的合成增加。已知大量细胞基因都可被TNF诱导,包括编码各种细胞因子、生长因子、受体、细胞黏附分子、急性期蛋白和转录因子的基因[87]。而且这些基因中许多基因的诱导可归因于细胞转录因子的活化,如AP-1,特别是NF-κB。TNF介导的导致TNF-κB活化的胞内信号传导的级联反应大部分已被阐明。我们知道TNF-RⅠ或TNF-RⅡ的激发能导致NF-κB的活化已有一段时间。也有证据表明TRAF2的过度表达,或死亡结构域蛋白TRADD、FADD/MORT或RIP的过度表达,也能导致NF-κB活化[83]。事实上,在Jurkat T细胞系中已发现,RIP对TNF诱导的NF-κB的活化是必需的[84]。似乎死亡结构域蛋白直接或间接结合TRAF2的能力及其所引起的TRAF2活化在这条信号传导途径中起着中

心作用(图 22.2)。TRAF2 进而又结合并活化被称为 NF-κB 活化激酶(NIK)的丝氨酸-苏氨酸激酶[88]。NIK 与有丝分裂原活化蛋白(MAP)激酶的上游激活子即所谓的 MAP 激酶激酶(MEKK)间显示出重要的序列同源性[88]。NIK 不直接活化 NF-κB,但以另一种丝氨酸-苏氨酸激酶(长期未为人所知的 IκB-α 激酶)上游激活子的身份发挥着作用[89,90]。在大多数脊椎动物细胞,NF-κB 蛋白以一种潜伏的形式存在,被抑制蛋白 IκB 家族

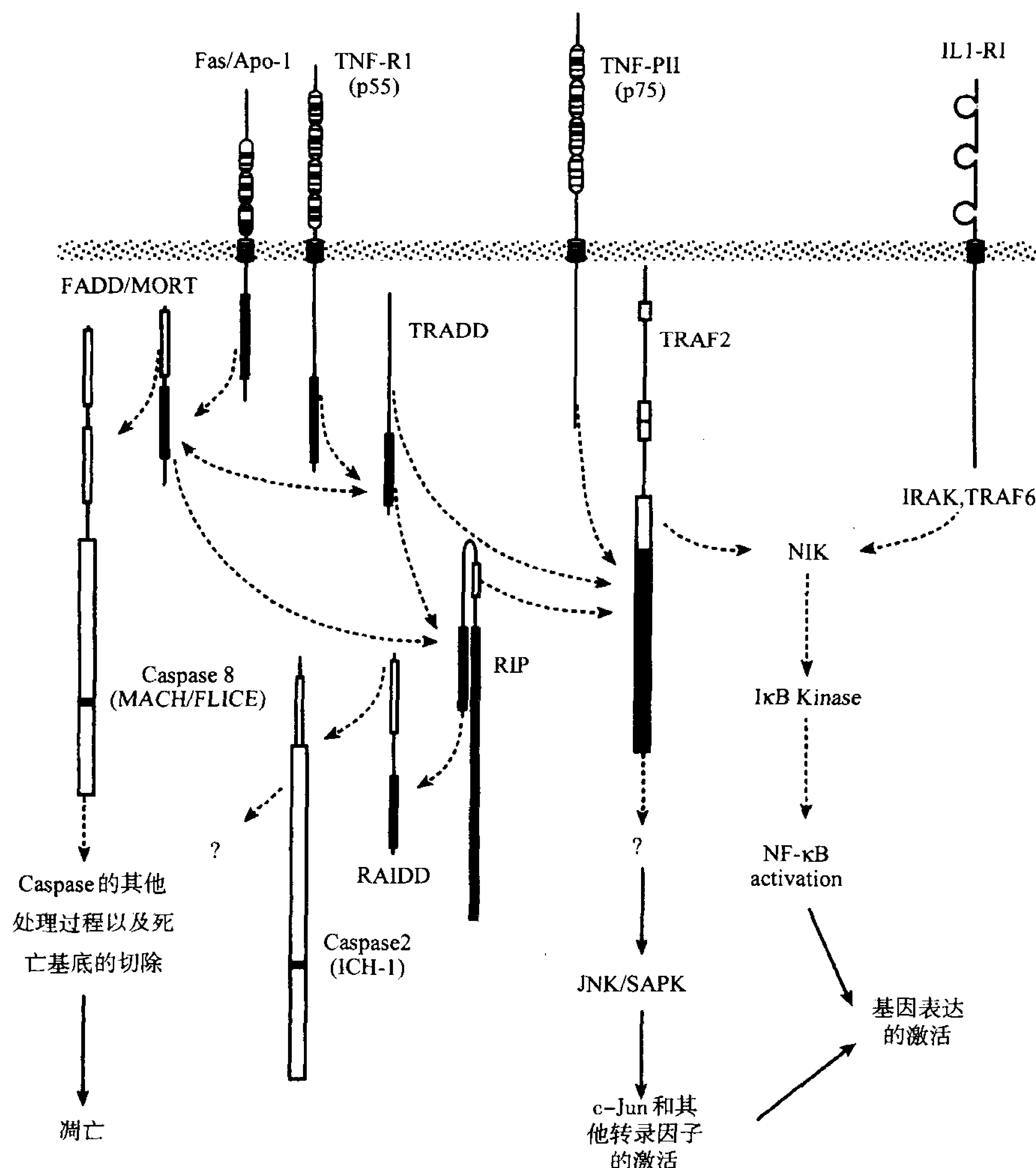


图 22.2 由 TNF 受体和 Fas/Apol 激活的几个重要的信号传导途径(由参考文献 83 改编)。尽管 TNF 受体Ⅰ(p55 受体)和受体Ⅱ(p75 受体)的胞内区域在序列上没有任何同源性,但是它们在胞内接头蛋白间的相互作用下可以协同传导信号。死亡区域包含与 TNF-R 死亡区域结合的蛋白(主要是 TRADD)。然而 TRADD 也可以与其他包含死亡结构域的蛋白如 TRAF2 相互作用(FADD/MORT1 及 RIP)TRAF2,从而直接与 JNF RⅡ结合,并且作为 MAP 激酶以 JNK/SAPK 亚家族激活途径的下游激活剂。TRAF2 能够直接与 NIK(一种激酶)结合从而导致其活外,死亡区域蛋白的募集能导致 caspase 的激活。一些细胞中的 caspase 可以通过凋亡触发细胞的死亡。Fas/Apol 的细胞内区域包含一个死亡区域,与 TNF-RⅠ中很相似。理所当然,Fas/Apol 激活的细胞内信号传导途径与 TNF-R1 非常相似,但是一般而言,Fas/Apol 在触发凋亡方面比激活基因表达方面更高效。在图中也显示了来自 IL-1 受体的信号传导过程,通过 IRAK 激酶和 TRAF6 导致 NIK 的激活,接着导致 NF-KB 的激活,同 TNF 受体产生的信号传导非常相似。IL-1 受体也通过其他未知途径的信号传导导致 INK/SAPK 的激活(图中未显示)。由 TNF 和 IL-1 受体激活的 p38 MAP 激酶活化途径也不清楚,在图中也就没有显示。

成员隔离于胞质中[91]。IκB-α 激酶负责使 IκB-α(NF-κB 的主要抑制亚单位)上的 32 丝氨酸和 36 丝氨酸磷酸化,从而使 IκB-α 发生靶向性泛素化并通过蛋白酶体途径发生降解[89,90]。该激酶也可使 NF-κB 的另一抑制亚单位 IκB-β 发生磷酸化。随着 IκB 的磷酸化及因此而发生的降解导致活化 NF-κB 蛋白的释放和核转位。

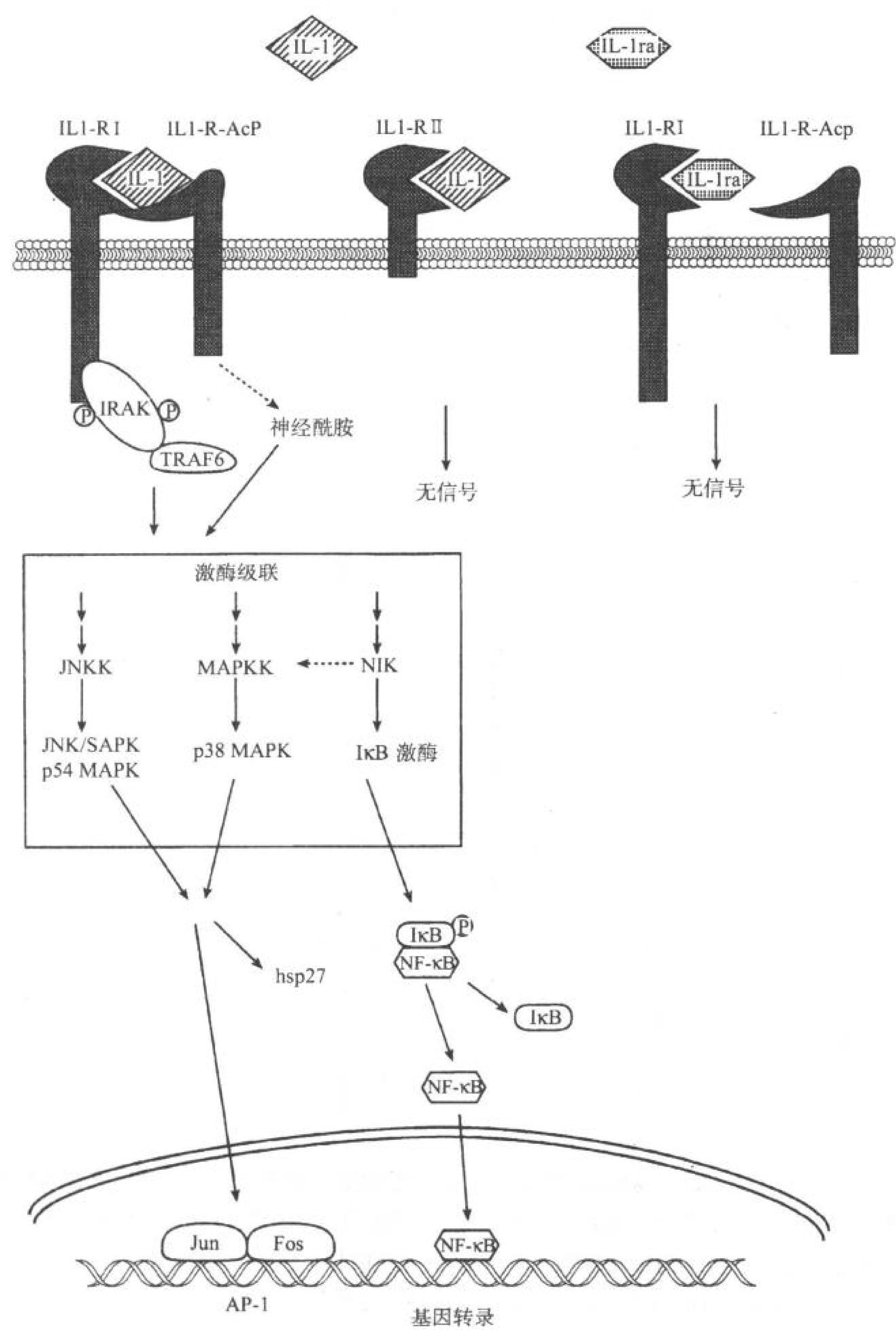


图 22.3 IL-1 诱导的信号传导途径。结合 IL-IR1 的 IL-1 导致 IL-1-AcP 相互作用,该复合物传导一信号 IL-1 与有一短的胞质尾巴的 IL-1RⅡ的结合不传导信号。缺乏第二结合位点的 IL-1ra 不能适当地与 IL-1RⅠ相互作用且不结合 IL-IR-ACP,当与 IL-1RⅠ结合时也不产生信号。当 IL-1 结合时,一个胞激酶,IL-1 受体相关激酶(IRAK)能迅速与 IL-1R1 和 IL-1-AcP 异源二聚复合物结合。TNF 受体相关蛋白(TRAF6)与自动磷酸化后 1RAK 的结合导致多个下游激酶的激活。早期的膜相关事件也可导致神经酰胺从膜鞘脂的释放,而导致激酶级联的激活。JNKK 和其他有丝分裂原活化蛋白(MAP)激酶的活化导致 p54MAPK、p38MAPK 和 hsp27 的磷酸化。参与信号传导的另一条途径是导致 NFKB 活化的 NFKB 诱导激酶(NIK)的活化。核转位和核因子与 DNA 的结合启动 IL-1 诱导的基因表达。

尽管 Fas 的主要功能是激活细胞死亡途径，但 Malinin 等[88]的工作提示，Fas 也能通过 TRAF2 和 NIK 激发 NF-κB 活化，推测可能由 FADD/MORT、TRADD 和(或)RIP 所介导(图 22.2)。NIK 的分离也有助于解释 IL-1 引起的 NF-κB 活化途径[88]。已有证据提示，NIK 位于 TNF 和 IL-1 信号传导途径的交叉点(图 22.2)。正如本章另一部分所阐述的(图 22.3)，IL-1 导致激酶 IRAK 和 TRAF 蛋白家族被称为 TRAF6 的活化。与 TNF 处理后细胞中的 TRAF2 相似，IL-1 处理后细胞中的 TRAF6 可能起着 NIK 的直接上游激活子的作用。因此，现在就可能从分子的观点来解释为什么结构不相关且结合完全不同的受体的细胞因子 TNF 和 IL-1，会活化如此多相同的靶基因及产生如此多相同的生物学作用。然而，是否 IκB 激酶是 NIK 的惟一的靶分子或是否可能有其他不依赖 NF-κB 活化而能介导 TNF(和 IL-1)作用的 NIK 底物存在呢？

其他胞内接头蛋白

除 TRAFs 和死亡结构域蛋白外，在 TNF 信号传导中也涉及到大量的其他胞内蛋白[76]。根据它们与 TNF 受体胞内结构域或 TNF 信号传导中涉及的其他胞内蛋白能发生相互作用，通过酵母双杂交筛选的方法分离出大多数蛋白(表 22.3)。使用这些蛋白中的一些完全蛋白或负面优势结构过度表达的蛋白可在细胞内产生可检测的影响，从而提示了其可能存在的细胞功能。但是，这些蛋白在 TNF 或 TNF 家族的其他成员所激活的信号传导级联反应中的生理学作用仍未被完全了解。有趣的是，表 22.3 所列蛋白中的两种蛋白(A20 和 I-TRAF/TANK)显示出影响 TNF 和 IL-1 所致的 NF-κB 活化，但它们在 IL-1 活化信号传导起级联作用的靶分子仍未被阐明。

781

表 22.3 在 TNF 信号传导中生理学作用还未被确定的细胞内蛋白质

蛋白质	相互作用伙伴	暂定功能	参考文献
FAN	TNF-RI (aa 309-319)	中性鞘磷脂酶的活化	[105]
Sentrin	TNF-RI(死亡结构域)	抑制凋亡	[142]
TRAP1	TNF-RI (N 端)	?	[143]
55.11	TNF-RI (N 端)	?	[144]
cIAP1 和 cIAP2	TRAF2 和 TRAF1	?(与昆虫内凋亡抑制子有关)	[145]
A20	TRAF2 和 TRAF1	抑制 TNF 和 IL-1 所致 NF-κB 活化	[146]、[147]
I-TRAF/TANK	TRAF	抑制(或加强?)TNF、IL-1 和 CD40 所致 NF-κB 活化	[148]、[149]
TRIP	TRAF	抑制 TNF 和 CD30 所致 NF-κB 活化	[150]
Casper/FLIP	Caspase, FADD/MORT1, TRAF1 和 TRAF2	抑制(或加强?)凋亡	[151]、[152]

有丝分裂原活化蛋白激酶

MAP 激酶在通过转录因子的磷酸化活化基因表达的跨胞质信号到细胞核的传导中起着突出作用[92]。双特异性 MAPK 激酶或 MKK 能使 MAP 激酶的苏氨酸-酪氨酸磷酸化，从而活化 MAP 激酶；双特异性 MAPK 激酶或 MKK 则由于丝氨酸被 MAPKK 激酶或 MEKK 磷酸化而被活化。在哺乳动物细胞，结构相关的 MAP 激酶的 3 个主要亚家族已被鉴定，它们是胞外信号调节激酶(ERK)、c-Jun N 端激酶-压力活化蛋白激酶(JNK/SAPK)和 p38 激酶。但 ERKs 特征性地与细胞增殖和防止细胞凋亡有关，而 JNK 和 p38 能促进凋亡。ERK-1 (p42)和 ERK-2(p44)是 MAP 激酶家族成员中首次被发现在某些类型细胞中能被 TNF(和 IL-1)活化的家族成员[93,94]。TNF 活化 ERK 的确切途径还不清楚。另外，目前尚不知道 ERK 在 TNF 作用中的功能意义。与生长因子如 EGF 相比，在许多细胞中由 TNF 引起的 ERK 的活化相对较弱且延续时间短，导致了 ERK 对 TNF 的作用不重要的看法[95]。但是，TNF(和 IL-1)扮演着 JNK/SAPK 和 p38 激酶的强激活子的角色[96,97]。TNF 诱导的 JNK 活化依赖 TRAF2：不仅 TRAF2(非 TRAF1 或 TRAF3)的过度表达导致 JNK 的活化，而且优势阴性 TRAF2 阻断了 TNF 诱导的(非 IL-1 诱导的)JNK 活化[86,98]。引起从 TRAF2 到 JNK 活化(如，TRAF2 如何产生 JNK 活

782

化所需的上游激酶的活化)的确切途径还不知道。是否 TNF 诱导的 p38 的活化也需要 TRAF2 的协助(一种有希望的可能性)还没有被报道。p38MAP 激酶活性的选择性抑制子被显示能抑制活化的巨噬细胞产生 TNF 和 IL-1,但这种抑制作用的机制还未被完全阐明[99]。JNK 和 p38 在 TNF 功能中的作用才刚开始进行研究。由于 MAP 激酶能引起 PLA2 活化,因此它们被认为在 TNF 诱导的、PLA2 所致的花生四烯酸的产生和由此所致的促炎代谢物的产生中是重要的。因为 JNK 使 c-Jun 磷酸化并由此活化 c-Jun ,JNK 和 p38 使 ATF-2101 磷酸化并活化 ATF-2101,所以 JNK 和 p38 对需要 AP-1 转录因子的基因活化可能是重要的。对 p38 激酶在 TNF 引起的、NF-κB 所介导的 IL-6 基因的活化中的作用也有初步证据[102]。

神经酰胺

许多研究已致力于分析脂质介质神经酰胺作为潜在的第二信使在 TNF(和 IL-1)作用中所扮演的角色[103]。用 TNF 对许多细胞进行处理导致两类使鞘磷脂裂解和神经酰胺产生的细胞鞘磷脂酶的迅速活化,一类是与细胞膜结合的中性鞘磷脂酶[104],另一类是酸性鞘磷脂酶[105]。尽管两类鞘磷脂酶都是通过 TNF-RⅠ被活化的,但途径却不同。中性鞘磷脂酶的活化涉及接头蛋白 FAN,FAN 结合到 TNF-RⅠ死亡结构域上方的胞内结构域中的近膜位点上[105],而酸性鞘磷脂酶则通过磷脂酰胆碱特异性磷脂酶 C(PLC)产生的 DAG 的作用而被活化[106]。已假设后一途径产生的神经酰胺参与 TNF 诱导的 IκB 的降解和由此造成的 NF-κB 的活化,而通过酸性鞘磷脂酶产生的神经酰胺则促进 TNF 或 Fas 应答中的凋亡及启动最终导致 JNK 活化的蛋白激酶级联反应[107]。一种使 Raf-1 磷酸化的神经酰胺蛋白激酶已被描述[108]。神经酰胺产生的另一种结果是蛋白激酶 Cz (PKCz)的活化[109]。几篇报道已对神经酰胺在 TNF 诱导的 NF-κB 活化中的作用提出质疑[110,111],尽管用可穿过细胞的 C2-神经酰胺对细胞的处理能导致 JNK 活化和(或)多种类型细胞中的凋亡这一点是很清楚的,但有关在 TNF 和 TNF 家族其他成员的作用中充当第二信使的神经酰胺的重要性仍看法各异。

生物学功能

在所有细胞因子中,TNF 和 IL-1 具有最广阔的多效性活性。描述 TNF 的种种活性的文献证明,在细胞培养、分离的组织、实验动物和人体中的 TNF 作用是如此的广泛以至任何试图对其进行清楚综述的努力都注定是要失败的。由于 TNF 受体被普遍表达且其激发启动一系列的平行信号传导途径,因此与 TNF 接触的细胞和组织能产生大量的生物学作用也就不足为奇了。要确定已报道的许多作用中哪些是生理学或病理生理学相关的或哪些是属于有趣的实验假象范畴是困难的。靶向敲除编码各种 TNF 家族配体和受体基因的小鼠的产生[112]对大部分 TNF 家族成员的"真实"生物学功能的鉴定是非常有用的并已导致一些以前未知的功能的发现(表 22.4)。例如,在基因敲除小鼠体内进行的研究已揭示了 TNF 在血细胞生成[113]、肥胖症诱导的胰岛素耐受[114]及对免疫应答的生发中心和 IgG 的形成[115~117]中发挥的作用。更令人惊讶的是 LT-α/β 的基本作用和 LT-α 在正常淋巴结发育中略微不同的作用得到了证实[118~121]。其他有价值的信息已从 TNF 或可溶性 TNF 受体单克隆抗体的临床研究中获得。

783

表 22.4　TNF 家族基因缺陷小鼠的表型

靶向基因	主要的表型异常
TNF	大大降低了的 *D*-氨基半乳糖处理后的脂多糖致命性,缺乏生发中心和异常 IgG 合成,对胞内微生物的抵抗力下降
TNF-RⅠ(p55)	大大降低了的 *D*-氨基半乳糖处理后的脂多糖致命性和 IL-6 的产生降低,缺乏生发中心和异常 IgG 合成,对胞内微生物的抵抗力下降
TNF-RⅡ(p75)	大大降低了的无 *D*-氨基半乳糖处理后的脂多糖致命性
LTα(TNF-β)	淋巴结不能发育,缺乏淋巴集结和脾发育不良,有缺陷的同型转换
LTβ	淋巴结不能发育(除肠系膜淋巴结和子宫颈淋巴结外),缺乏淋巴集结和脾发育不良
CD40 配体	无对 T 细胞依赖性抗原应答的免疫球蛋白,伴中性粒细胞和感染的高 IgM 综合征
Fas 配体	T 细胞和 CTL 靶细胞不凋亡, *gld* 基因小鼠缺陷导致自身免疫状态
Fas/Apo1	不能去除淋巴细胞产生过度增生, *lpr*/*lpn* 小鼠和人自身免疫淋巴细胞增生性综合征产生自身免疫病

宿主对感染的抵抗力

大量证据证实了TNF在宿主抗单核细胞增多性利斯特氏菌感染的早期阶段中的重要作用[112,122]。缺乏TNF-RⅠ或编码TNF结构基因的小鼠，接种非常小剂量的细菌就会死亡，而野生型小鼠却不会死于这种感染。细菌会在突变型小鼠体内繁殖，达到很高的滴度，突变型小鼠才会死亡，同时伴有内脏的广泛感染。在靶向性破坏了IFN-γ受体的小鼠体内也可见到类似的对单核细胞增多性利斯特氏菌抵抗力的缺陷。缺乏TNF-RⅠ或IFN-γ受体的小鼠也对分枝杆菌和鼠弓形虫的感染更敏感。这些资料表明，TNF和IFN-γ在抗胞内病原体抵抗力的形成中是必需的，而不是多余的。目前已经知道对胞内病原体的抵抗力包括对分泌TNF和IL-12的巨噬细胞和中性粒细胞的初始活化。这两种细胞因子刺激NK细胞产生IFN-γ，然后IFN-γ和TNF一起主要负责对杀菌所必需的巨噬细胞的活化（如通过NO的有效产生）。这一简要的提纲（毫无疑问是过于简单的）解释了宿主在对这些病原体的抵抗中对TNF和IFN-γ的需要。尽管已有证据表明，TNF在组织培养中能抑制某些病毒的复制[123]，但在完整生物体中，还没有TNF在病毒感染中起保护作用的直接证据。但是，一些痘病毒获得了编码可溶性TNF受体同系物基因及该基因在黏液瘤病毒中的存在有助于病毒毒性的事实[124]提示了TNF的这种作用的存在。

与这种保护效应相伴随，TNF在感染过程中的产生能引起毒性临床表现，加重疾病过程。TNF在感染性休克发病机制中的作用就是极好的例子（见后文）。另一个得到充分证实的例子是TNF作为小鼠脑型疟疾基本介质的作用，间接证据是TNF的产生与人恶性疟疾的严重程度有关[125]。

脂多糖毒性与感染性休克

TNF在抗感染中的有益效应被认为是其在感染局部适量而产生的结果。相反，当TNF大量产生而导致其在全身分布或在对其毒性高度敏感的器官（如脑）中的大量存在则会产生不利效应，甚至死亡。TNF在感染性休克发病机制中的关键作用得到多种证据的支持：①TNF抗体保护动物免受致死菌血症引起的感染性休克[126]；②给实验动物或人施以高剂量的TNF能出现类似于感染性休克的症状；③在动物和人的实验和临床感染性休克过程中，能产生TNF；④TNF在某些LPS诱导的毒性反应所起的作用已在基因敲除动物中得到确实的证据。

正常小鼠对LPS的毒性高度耐受，当给它们注射500mg或更高剂量的LPS时，它们能存活。然而，同时给以肝毒剂*D*-氨基半乳糖可显著提高LPS的毒性。在*D*-氨基半乳糖处理过的小鼠中，TNF在LPS的致死性作用中的作用已被几个小组的研究人员清楚证实。他们的研究显示，用高于野生型小鼠所能承受剂量100倍的LPS注射入TNF-RⅠ靶向敲除的小鼠中，小鼠能存活[122]。有趣的是，极高剂量的LPS在无*D*-氨基半乳糖时所产生的毒性受TNF-RⅠ敲除的影响不明显，而在TNF-RⅡ缺失小鼠中被适当降低[127]。因此，在无*D*-氨基半乳糖处理时，LPS的致死效应似乎主要不是由TNF介导。用TNF单克隆抗体或中和TNF的可溶性受体来治疗人感染性休克的尝试，至今仍不能提供有治疗价值的明显临床证据。造成这种失败的因素至少可能有两个。首先，与实验动物不同，对人的治疗只能在疾病症状出现后开始；其次，正如动物研究也清楚显示的，感染性休克综合征不是一种单因素疾病，TNF的相对作用可能各不相同。如果有能区分TNF介导的和非TNF介导的败血症的检验，那么用TNF抗体或可溶性TNF受体治疗可能会有更好的成功机会。

淋巴器官形成，生发中心发育和免疫球蛋白G类别转换

784

对LT-α基因靶向敲除小鼠的表型分析出人意料地显示，这些小鼠出生时无淋巴结或淋巴集结，且显示脾结构的总体异常[119]。这些发现说明，淋巴发育受LT-α/β异源三聚体的调节及受LT-α/β结合位点LT-β受体的介导的预测的正确性。另一出人意料的发现是，TNF-RⅠ或TNF结构基因缺乏的小鼠，虽不显示脾结构的缺陷，但免疫时却不能形成脾生发中心和小结树突状细胞网，并显示IgG抗体应答伴缺损性同型转换的降低[112,115,128-130]。LT-α、LT-β、TNF、TNF-RⅠ或TNF-RⅡ靶向敲除小鼠中所见的各种淋巴器官异常概要见

表 22.5。

表 22.5 TNF 家族基因靶向删除小鼠二级淋巴器官的发育和结构

被分析的特征	被检测的基因敲除小鼠				
	LT-α$^{-/-}$	LT-β$^{-/-}$	TNF$^{-/-}$	TNF-RⅠ$^{-/-}$	TNF-RⅡ$^{-/-}$
外周淋巴结发育	-	-	+	+	+
淋巴集结发育	-	-	+(?)	-(?)	+
颈和肠系膜淋巴结发育	-	+	+	+	+
脾初级 B 细胞滤泡	-	-	-	-	+
脾小结树突状细胞网	-	-	-	-	+
脾生发中心	-	-	-	-	+
脾边缘区中的 MAdCAM-1 表达	-	-	?	-	+
脾边缘区中的 MOMA-1 表达	-	-	?	+	+

+,存在;-,缺失。MAdCAM-1 是一种黏附分子,MOMA-1 染色为亲金属巨噬细胞特有。改编自参考文献[111]。

自身免疫性疾病

有关证据强烈提示,TNF 为自身免疫性疾病特别是类风湿性关节炎和节段性肠炎的一种致病因子。在一些滑膜组织中高水平表达人 TNF 的转基因小鼠品系中,大部分小鼠在出生后的 2 个月内都会患上关节炎[131]。在转基因动物中,给予抗人 TNF 单克隆抗体能缓解疾病活动。有趣的是,用抗 IL-1Ⅰ型受体的抗体治疗这些转基因小鼠也能抑制关节炎的发展,表明 TNF 和 IL-1 在发病机制中密切相关并相互依赖[132]。这些研究和其他有关类风湿性关节炎组织中细胞因子间相互作用的研究,对 TNF 单克隆抗体在严重类风湿性关节炎患者中的使用起推动作用。大部分用 TNF 抗体治疗的类风湿性关节炎患者可见临床状况和实验参数的显著改善[133]。也有证据表明 TNF 在小鼠实验性结肠炎中的致病作用[134],给予严重节段性肠炎患者以 TNF 抗体治疗可以使相当一部分患者的病情缓解[135]。在 NOD 小鼠,出生后的前 3 周内用 TNF 进行处理后,显示 TNF 可促进自身免疫性糖尿病的发生[136]。另一方面,给成年小鼠反复给予 TNF 延缓了糖尿病在 NOD 小鼠的发生,也抑制了 NZB/W 小鼠狼疮样疾病的发展[137]。TNF 对幼鼠与对成年小鼠的影响存在不同归结于 T 细胞发育过程中作为 TNF 作为生长因子对 T 细胞的可能发挥的作用,这与成年小鼠因长期缓慢接触 TNF 而导致 T 细胞功能的抑制相反[137]。

瘤形成

尽管 TNF 的原始描述是肿瘤坏死因子,但它在宿主抗癌中的作用的证据在很大程度上仍是间接的。TNF 对一些肿瘤细胞有直接毒性,在体外由单核细胞产生的 TNF 有助于对 TNF 敏感性肿瘤细胞系的杀伤。但是,在一些实验性恶性肿瘤中,TNF 似乎促进肿瘤发展[138]。对 TNF 在恶性肿瘤的发病机制中作用的更好的理解可能来自对 TNF 或其受体基因靶向缺失的小鼠的研究。由于严重的全身毒性,在患者中用 TNF 作为一种抗肿瘤因子的尝试大部分都已被放弃。但在四肢进展性软组织肉瘤的患者中已取得了一些治疗的成功。通过"独立肢体灌注",这些患者被给予高剂量的 TNF 治疗[139]。

总之,对遗传改变小鼠中的研究支持这样一个观点即:TNF 的主要功能是作为炎症的关键调节剂,其作用在宿主对感染性因子的应答和自身免疫中特别重要。最令人吃惊的消息是 TNF、LT-α 和 LT-α/β 在淋巴组织发育中的作用的证实,该消息来自最近在基因敲除小鼠中进行的研究。正如研究所指出的[112,140],因为 TNF 或 LT-α 在慢性炎症局部过度表达能导致淋巴再生,从而导致淋巴结样结构在局部炎症位点的出现,所以促炎作用和对淋巴组织的影响可能是有关联的。但是,在某些情况下,TNF 实际上可限制炎性应答及促进修复过程,而不是仅仅作为一种炎症递质[129]。

白细胞介素-1(IL-1)家族

IL-1 最初被 Gery 和 Waksman 描述为一种巨噬细胞起源的、对淋巴细胞和 T 细胞有协同促有丝分裂影响的淋巴细胞活化因子(LAF)[153]。现在知道,IL-1 有多种生物学作用,是宿主对感染和损伤应答的一种调节因子[154-156]。IL-1 家族由三种不同的但结构相关 的分子组成:引起生物学应答的 IL-1α 和 IL-1β 及被称为 IL-1 受体拮抗剂(IL-1ra)的一种特异性拮抗剂(表 22.6)。IL-1ra 最初是作为发热或慢性髓细胞性白血病患者的尿中所发现的 IL-1 抑制剂被检测到的[157]。IL-1ra 是惟一已知的、天然产生的细胞因子拮抗剂,它能结合 IL-1 受体但不传导信号,充当 IL-1α 和 IL-1β 的竞争性抑制剂。

表 22.6 IL-1 家族

	IL-1α	IL-1β	IL-1ra
前体蛋白(氨基酸)	271	269	177
成熟蛋白(氨基酸)	159	153	152
信号序列(氨基酸)	无	无	25
生物活性形式	细胞内的(祖 IL-1α)细胞外的膜 IL-1α	细胞外的	细胞内的(ic IL-1ra)
细胞来源: 有核细胞类型	大部分以细胞相关形式被释放	被释放的	特别是角化细胞、组织巨噬细胞 上皮细胞
受体	IL-1RⅠ > IL-1RⅡ	IL-1RⅡ > IL-1RⅠ	IL-1RⅠ > IL-1RⅡ
信号传导单位	IL-1RⅠ + IL-1R-AcP	IL-1RⅠ + IL-1R-AcP	结合,但无信号传导

基因

分子克隆及后续研究鉴定了 IL-1 家族的三个成员,它们是人 2 号染色体上彼此相邻的不同基因的产物。IL-1α 和 IL-1β 的基因组结构由 7 个外显子组成,长度分别为 11kb 和 7.5kb,而 IL-1ra 有 4 个外显子[158-161]。人 IL-1α 和 IL-1β 在核苷酸水平上的同源性为 45%,IL-1α 和 IL-1β 的种间同源性(人与小鼠相比)分别为 62%和 67%。IL-1α、IL-1β 和 IL-1ra 的基因序列和突变率分析提示,大约在 3.5 亿年前,这三种分子由一个共同的祖基因通过基因复制而来。

IL-1α、IL-1β 和 IL-1ra 基因中的调节序列不同,提示存在不同的调控机制。典型的转录启动子序列 TATA 框和 CAAT 框被发现直接位于 IL-1 β 基因转录起始位点的上游,而在 IL-1α 基因中却缺失。AP-1 位点、1 个 NF-IL-6 位点、1 个 CRE 和 1 个新的 LPS 诱导位点已在 IL-1β 启动子中被鉴定[162]。糖皮质激素调控元件也存在于 IL-1α 和 IL-1β 基因中。位于 IL-1β 基因 AP-1 位点下游的,起"基因沉默子"作用的脂磷酸多聚糖应答性启动子序列已被鉴定[163]。该序列负责下调 LPS 诱导的 IL-1β mRNA 的表达。两种形式 IL-1ra 的启动子区不同,细胞内 IL-1ra (icIL-1ra)缺乏 TATA 框,而分泌性 IL-1ra (sIL-1ra)有一含共有序列的 TATA 框,此共有序列可能是 NF-κB、NF-IL-1βA、AP-1 和 CRE 的结合位点[164]。细胞内变异体也通过 5′端外显子的剪接产生。

转录分别产生 IL-1α、IL-1β 和 IL-1ra 的 mRNA,大小分别为 2.1kb、1.6kb 和 1.8kb。IL-1ra mRNA 的 3′端非翻译区(UTR)缺乏与其他细胞因子 mRNA 的不稳定有关,但该序列在 IL-1α 和 IL-1β 的 mRNA 中都存在。此外,IL-1βmRNA 的 3′端非翻译区含有一个 LPS 应答元件,可刺激 IL-1β 的产生[165]。编码 IL-1α、IL-1β 和 IL-1ra 的基因在受到刺激时被迅速转录。根据特定细胞类型和用于诱导的刺激物的不同,IL-1 和 IL-1ra 的产生在转录和转录后水平的调节也不同。

蛋白质

IL-1α 和 IL-1β 都以 31kDa 的前体形式被合成(IL-1α 前体由 271 个氨基酸组成,IL-1β 前体由 269 个氨基

酸组成)，然后都被蛋白水解切割，生成17kDa的成熟分子(IL-1α由159个氨基酸组成，IL-1β由153个氨基酸组成)(表22.6)。两种分子都缺乏分泌型蛋白质的传统疏水信号序列，不通过经典的分泌途径被分泌。IL-1存在于胞质中被发现，但不存在于内质网或高尔基体中。大部分IL-1α以胞内前IL-1α的形式被储存，而其他的要么被磷酸化要么被十四酸化，通过IL-1α上的甘露糖残基参与的植物凝集素相互作用而成为膜结合形式[166,167]。前IL-1α和膜IL-1α都有生物学活性，但前IL-1β无生物学活性。产生17kDa的成熟IL-1β需要丝氨酸蛋白酶、弹性蛋白酶、血浆酶、糜蛋白酶、组织蛋白酶G，或在116天冬酰胺和117丙氨酸间特异性切割前IL-1β的被称为IL-1β转换酶(ICE)的半胱氨酸蛋白酶[168,169]。ICE是一种存在于大多数细胞内、分子量为45.2kDa的酶原，其本身需要两种蛋白水解切割以产生活性。前IL-1β可能是在通过质膜的转运过程中被蛋白酶水解加工的[170]。LPS和IFN-γ都上调ICE的表达。ICE不切割前IL-1α，但缺乏ICE基因的小鼠不能分泌IL-1β和IL-1α，可能是由于IL-1β诱导IL-1α的产生[171]。前IL-1α被钙激活蛋白酶和其他细胞外非特异性蛋白酶切割[172]。基于细胞类型和所用刺激物，IL-1的释放和加工可不发生，前IL-1可在细胞内聚集。由于细胞损伤和细胞死亡，IL-1的体外释放也可发生。

786 IL-1ra以177个氨基酸组成的非糖基化前体肽的形式被合成，带有1个25个氨基酸组成的信号序列[155,173]。IL-1ra以三种18~22kDa(152个氨基酸)的结构变异体形式存在，这三种变异体的糖基化程度不同，经聚集形式IgG刺激后的单核细胞的内质网和高尔基体被分泌到细胞外。这三种分泌性IL-1ra结合相同的受体，表明氨基端连接的单糖不是抑制活性所必需的。IL-1ra的细胞内变异体(icIL-1ra)没有信号序列，仅通过细胞破裂(死亡)过程被释放[174,175]。

结晶学研究显示，IL-1β为一种球状蛋白质，形似四面体结构，其三角形的平面由充分暴露于表面的高度亲水性环连接的12个反向平行的β链所形成[176]。其N端和C端是暴露的，受体结合位点是由在一级结构不连续的序列聚集在一起形成的一定的构像所构成。IL-1ra的亲水性区与IL-1β的亲水性区相似，提示它们三级结构的相似性。但IL-1ra与IL-1β只有26%的序列相似性，与IL-1α的相似性则更少。

缺失突变研究提示，保留IL-1α生物学活性的最小多肽是氨基酸序列128~267之间的140个氨基酸。保留IL-1β生物学活性的最小多肽是氨基酸序列120~266之间的147个氨基酸。大多数鉴定IL-1更小的活性片段的尝试都失败了，但据报道;将人IL-1β的一个9个氨基酸残基的片段(片段163~171)与一抗原融合后发现其具有重要的免疫佐剂活性[177]。该片段构成了IL-1β与IL-1受体结合的至关重要的结合位点，它在IL-1ra中不存在。另一个通过突变体的结合和功能分析鉴定的环状结构(氨基酸202~214)也是一个重要的IL-1受体结合位点[178]。以上说明IL-1β和IL-1ra在该区域的氨基酸序列有着本质不同。

制造者和诱导者

单核吞噬细胞是IL-1的主要细胞来源，但其他所有有核细胞都能产生IL-1。正常细胞必须受到刺激才能产生IL-1。感染、免疫和炎症过程、内源介质及细胞和组织损伤都能激发IL-1的产生[156,179]。而且，多种刺激物也能激发巨噬细胞产生IL-1，这些刺激物包括细菌细胞壁产物、LPS、微生物超抗原、酵母多糖、佛波酯、胞壁酰二肽、抗原、有丝分裂原、内源性细胞因子、白三烯、活性补体成分(C5a)、免疫复合物、紫外线照射、硅颗粒、病毒、寄生虫和其他微生物。活化淋巴细胞的刺激物可通过两种形式刺激巨噬细胞产生IL-1:一种是与MHCⅡ类基因控制的细胞直接接触，另一种则通过产生细胞因子如TNF-α、GM-CSF等或IL-1自身，来刺激巨噬细胞和其他细胞产生更多的IL-1。刺激物的性质决定IL-1是在细胞内聚集还是被分泌。乳胶颗粒、LPS和酵母多糖既刺激胞内IL-1增加也能刺激胞外IL-1增加，而硅颗粒和十四酸佛波酯乙酸盐则主要诱导胞外IL-1的产生。

很多类型的细胞也能产生IL-1ra，其中组织巨噬细胞和角化细胞是IL-1ra的良好制造者[180]。IL-1β和IL-1ra在人单核细胞中的产生被相互调节。体外研究显示，LPS能刺激人单核细胞产生同等数量的IL-1β和IL-1ra，而粘连IgG由于增强了mRNA的转录和延长了mRNA的稳定时间，因此能选择性诱导高水平IL-1ra的产生。IL-1和IL-1ra的不同调节的机制可能涉及引起不同信号传导途径的各种糖类基团在细胞表面的交

联。IL-1β 和 IL-1ra 的产生也受不同细胞因子的调节。如，IL-4、IL-10 和 TGF-β 增加 IL-1ra 的合成，但同时能降低 IL-1β 在单核细胞中的产生。皮质类固醇抑制 IL-1α 和 IL-1β 的产生，但对 IL-1ra 却无影响。对 IL-1 产生的动力学研究显示，IL-1β 的产生通常在 IL-1α 之前，IL-1ra 最后产生。此外，用 IL-1β 治疗的患者血浆中 IL-1ra 水平的提高，表明 IL-1 是 IL-1ra 产生的极好诱导剂[181]。

尽管许多类型的细胞都同时表达三种 IL-1 基因，但 IL-1α、IL-1β 和 I L-1ra 的表达水平却变化很大。角化细胞主要表达 IL-1α 和 icIL-1ra。人单核细胞主要产生 IL-1β，而小鼠巨噬细胞主要产生 IL-1α。在单核细胞分化为巨噬细胞过程中，IL-1ra 的产生增强，而 IL-1β 的产生降低。因此，IL-1ra 是组织巨噬细胞的一种主要产物，特别是在疾病过程中。某种病毒感染所引起的 IL-1/IL-1ra 的比率可能不同。例如，用 HIV 体外刺激单核细胞和用 EB 病毒体外刺激中性粒细胞，诱导产生较多的 IL-1ra 和较少的 IL-1[182,183]。在循环系统中检测到的大部分活性 IL-1 是 IL-1β，而 IL-1α 更常见于细胞膜。除排卵后女性及大强度运动后外，正常个体的血浆中通常检测不到 IL-1β(浓度 $<$ 40pg/ml)[184]。正常人体中 IL-1ra 循环水平为 200 ~ 300 pg/ml。在各种感染性疾病中，IL-1 血清水平的增加与疾病并无一致的相关性。但是，实验性内毒素血症的 3 ~ 4 小时，可见 IL-1β 的峰值水平达到 150 ~ 200 pg/ml[185]。IL-1ra 的峰水平通常更高，4 小时时约为 6000 ~ 8000 pg/ml，并在高水平保持 8 小时[186]。

受体

IL-1 存在两种不同的受体，Ⅰ型 IL-1 受体和Ⅱ型 IL-1 受体(IL-1RⅠ和 IL-1RⅡ)，均已被克隆和鉴定[187-190]。此外，公认的 IL-1 受体复合物信号传导亚单位受体辅助蛋白(IL-1R-AcP)也已被鉴定[191]。Ⅰ型和Ⅱ型受体都是免疫球蛋白超家族的成员。人Ⅰ型受体是一由 552 个氨基酸组成的、分子质量为 80kDa 的跨膜蛋白。它有 1 个 22 个氨基酸组成的单跨膜区和 1 个 212 个氨基酸组成的长胞质尾，该胞质尾参与信号传导。人Ⅰ型受体的胞外配体结合区由 3 个免疫球蛋白样结构域组成。Ⅱ型受体为一 60kDa 的蛋白质，其胞外区和跨膜区与Ⅰ型受体相似。然而，Ⅱ型受体有一个短的胞质尾，由 29 个氨基酸组成，不能传导信号。事实上，Ⅱ型受体通过充当 IL-1 的“诱饵”受体，竞争性抑制 IL-1 活性，下调胞外 IL-1 的水平。IL-1 受体辅助蛋白为 1 个 66kDa 的跨膜蛋白，由 570 个氨基酸组成。尽管 IL-1R-AcP 的胞外部分也由 3 个免疫球蛋白样结构域组成，且与 IL-1RⅠ有同源性，但它却不直接结合 IL-1 或 IL-1ra。

787

IL-1 以高亲和力(10^{-10}mol/L 的 K_D)与靶细胞上的 IL-1 受体结合。Ⅰ型受体见于大部分细胞上，包括 T 细胞、内皮细胞、肝细胞、纤维母细胞和角化细胞。Ⅱ型受体有较局限的分布，是 B 细胞、单核细胞和中性粒细胞上的主要受体。IL-1α、IL-1β 和 IL-1ra 各自都能与两种类型的 IL-1 受体结合，但亲和力不同。IL-1α 以很高的亲和力优先与Ⅰ型受体结合($K_D = 2 \times 10^{-10}$ mol/L)，IL-1β 优先与Ⅱ型受体结合($K_D = 10^{-10}$ mol/L)。IL-1ra 以此与Ⅱ型诱饵受体结合($K_D = 10^{-8}$mol/L)高得多的亲和力($K_D = 10^{-10}$ mol/L)与Ⅰ型受体结合，它能阻断 IL-1α 和 IL-1β 与Ⅰ型受体的结合及引起生物学应答。但是，在体外要达到对 IL-1 生物学作用产生 50%抑制，需要 10 ~ 500 倍过量的 IL-1ra。IL-1α 前体和其成熟形式以相同的亲和力与受体结合，且它们的生物学活性似乎是相似的。IL-1β 前体不与Ⅰ型受体结合或不通过Ⅰ型受体传递信号，而成熟的 IL-1β 切割产物却能。IL-1 受体辅助蛋白被 IL-1α 或 IL-1β 结合后，能与 IL-1RⅠ形成复合物，但被 IL-1ra 结合后却不能。尽管Ⅰ型受体的数量少(200/细胞)，但 IL-1 的所有生物学应答都是由与 IL-1R-AcP 形成复合物的Ⅰ型受体介导的。占每一细胞不到 5%的受体就足够细胞活化。这些资料提示，IL-1 信号传导的主要扩增一定发生在 IL-1 与 IL-1RⅠ/IL-1R-AcP 异源二聚体复合物结合之后。

Ⅰ型受体和Ⅱ型受体都受到严密的调节以控制炎症反应和免疫应答。通过转染而在表皮角化细胞中过度表达 IL-1RⅠ的转基因小鼠受到 IL-1 诱导剂的诱导时，表现出过度的炎症应答，提示 IL-1Ⅰ型受体介导对 IL-1 的应答[192]。活化的中性粒细胞和单核细胞释放Ⅰ型受体和Ⅱ型受体的胞外结构域，溶解的释放受体与 IL-1β 结合并抑制其功能[193 ~ 195]。研究显示牛痘和牛痘病毒表达基因编码的蛋白与可溶性 IL-1Ⅱ型受体有 30%序列同源性[196,197]。这个所谓的病毒因子蛋白能消除宿主对这些病毒的炎症应答，因为通过基因工程使

这些基因灭活的病毒致病性较弱。该研究及某些病毒获得ICE抑制物的报道再一次强调了IL-1在宿主防御中的重要性[198]。

IL-1引起的信号传导

IL-1功能信号传导受体由IL-1RⅠ和IL-1R-AcP组成,是一个由2个亚单位组成的受体复合物,能以较高的亲和力与IL-1α和IL-1β结合,但与IL-1ra的结合则较差[191,199]。与其他致炎细胞因子相似,IL-1活化两种转录因子NF-κB和AP-1,这两种转录因子转位到细胞核中,从而活化许多细胞因子诱导基因[200-202]。在大多数细胞中,NF-κB通常被抑制蛋白潴留在胞质中,称为IκB。在IL-1和各种其他胞外刺激物如TNF-α、有丝分裂原、氧化压力以及LPS的刺激下,IκB被降解,释放NF-κB进入细胞核,在细胞核中结合DNA并激活转录(图22.3)。

尽管IL-1RⅠ无内激酶活性,但与IL-1结合后导致许多蛋白质中的丝氨酸和苏氨酸残基迅速磷酸化[203]。一种能与人IL-1RⅠ发生免疫共沉淀的IL-1受体相关激酶(IRAK)已被鉴定和克隆[204,205]。IRAK为一种分子质量为100kDa的蛋白质,有一个高度保守的蛋白激酶结构域;IRAK与果蝇中的一种NF-κB同系物活化所必需的丝氨酸-苏氨酸激酶Pelle蛋白同源。当与IL-1结合时,IRAK迅速与IL-1RⅠ形成复合物,发生自身磷酸化(图22.3)。另一种IL-1信号传导分子TRAF6也被鉴定。TRAF6是TNF受体相关蛋白家族的一员[206]。当IL-1结合到IL-1RⅠ/IL-1R-AcP异源二聚体时,IRAK可能被磷酸化并与TRAF6结合。磷酸化了的IRAK/TRAF6复合物于是结合到IL-1RⅠ和IL-1R-AcP异源二聚体的胞浆尾,引起NF-κB活化和致炎基因的诱导。

许多第二信使和信号传导级联反应已被认为是由IL-1启动的[207,208]。一种潜在的激活途径包括中性鞘磷脂酶的活化,随后引起鞘磷脂水解产生神经酰胺[209,210];然后神经酰胺刺激神经酰胺活化蛋白激酶,使一系列特异性的胞内蛋白磷酸化,从而改变它们的功能。一个已被克隆的蛋白激酶NIK参与IL-1RⅠ和TNF/NGF家族共有的NF-κB诱导的信号传导级联[88]。NIK的分离有助于解释IL-1引起的NF-κB活化途径。已有的证据提示,NIK位于TNF和IL-1信号传导途径的交汇处(图22.3)。正如本章前面所提到的,IL-1引起IRAK激酶和TRAF蛋白家族的另一成员TRAF6的活化。TDAF6与TNF处理后细胞中的TRAF2相似,它在变IL-1刺激细胞中是NIK的直接上游激活剂。因此,现在可从分子水平解释为什么结构不相关且结合完全不同的受体的细胞因子TNF和IL-1,能活化如此多的相同靶基因、产生如此多的相同的生物学作用。此外,其他激酶,包括p38 MAPK、JNK/SAPK(c-Jun N端激酶/压力活化蛋白激酶或p54 MAPK)、IκB激酶和β-酪蛋白激酶,也被IL-1活化[211]。这些激酶都通过多个磷酸化步骤参与各种核结合蛋白的下游磷酸化,从而激活新基因表达。这些信号传导级联的精确顺序还未被确定。不同类型的应答细胞可利用IL-1的不同的信号传导途径,从而导致细胞应答的特异性。例如,在内皮细胞中,IL-1活化JNK,活化后的JNK使ATF-2和c-Jun磷酸化,从而增加这些因子的反式激活能力[212]。

IL-1受体相互作用后激活的各种信号传导途径导致转录因子的核转位,诱导多种基因的活化。AP-1和NF-κB结合位点在某些IL-1诱导基因的启动子区中被发现,包括IL-6、IL-8、IL-2受体和内皮细胞黏附分子。IL-1也激活其他两种转录因子Jun-1和Jun-2与c-Jun的启动子结合,引起基因转录增加[213]。c-Fos也被激活,Jun和Fos蛋白结合形成AP-1[214]。IL-1的许多生物学活性是通过这些因子与IL-1诱导基因的AP-1和NF-κB位点的结合而介导的。

炎症和免疫学效应

788

IL-1的生物学活性大部分是其他介质级联诱导的间接结果。其生物学活性在很大程度上与TNF-α和IL-6的生物学活性重叠[154,156]。IL-1是宿主对感染和有害损伤应答的一种多效性介质,它协调其他细胞和细胞因子的活性。IL-1的许多效应是通过增加其他细胞因子产生而介导的,如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、GM-CSF、TNF-α、IL-6、IL-8及化学因子家族的同源性成员、血小板衍生生长因子和IL-11。IL-1生物学效应的进一步扩大是通过上调自身受体、IL-2受体α链、IFN-γ受体、IL-3受体和GM-CSF受体表达及其中的一些细

胞因子与 IL-1 协同发挥作用来实现的。

IL-1 在高于 $10^{-9} \sim 10^{-15}$mol/L 的低浓度时是有活性的。当由被刺激细胞在局部产生时，IL-1 在早期先天性炎症应答和后期特异性免疫应答中起自分泌或旁分泌协同刺激分子作用。当 IL-1 被大量释放进入血液循环时，IL-1 在全身发挥作用，影响内分泌的协调，如发热中枢、下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴的激活，并在急性期蛋白的诱导中发挥作用。

IL-1 能刺激免疫和炎性应答的各种效应细胞。IL-1 是 T 细胞的一种共有丝分裂原，能上调 IL-2 的产生和 IL-2 受体在 T 细胞上的表达[215]。IL-1 优先充当 T 细胞抗原受体激活的 Th2 细胞的一种协同刺激分子，导致 Th2 细胞的增殖和 IL-9 产生的增加[216]。IL-1 之所以能增强抗原诱导的 T 细胞的增殖应答和功能应答，部分原因是由于 IL-1 协同诱导 MHCⅡ类分子在抗原呈递细胞上的表达[217]。IL-1 也诱导 IL-6 和 TNF-α 产生。有研究显示，在胸腺微环境内产生的 IL-1，诱导 IL-2 受体 α 链在早期未成熟胸腺细胞上的表达[218]。所以，IL-1 能促进胸腺细胞成熟和 $CD4^+$ $CD8^+$ 分化。尽管如此，但缺乏 IL-1Ⅰ型受体的基因敲除小鼠的胸腺发育是正常的，推测胸腺的发育可能依赖多种细胞因子活性和补偿途径。

正如前面所证实的，IL-1 能诱导 B 细胞前体 κ 轻链的合成，所以 IL-1 也能促进 B 细胞成熟和分化[219]。IL-1 增强 B 细胞增殖、表面 IgM 表达和抗体产生。但是，缺乏 IL-1Ⅰ型受体的基因敲除小鼠有正常的血清免疫球蛋白水平和正常的免疫应答。IL-1 作用于单核细胞和中性粒细胞，诱导多种细胞因子的分泌，包括 IL-8 和 IL-1 本身[154,220]。据报道，IL-1 能延长中性粒细胞的存活时间。IL-1 能提高树突细胞的抗原呈递能力[221]。

通过诱导黏附分子(ICAM、ELAM 和 VCAM)在血管内皮上的表达和许多能吸引中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞到损伤位点的趋因子的产生，IL-1 参与募集白细胞到炎症位点的过程[220,222-224]。其他介质，如 IL-1、IL-6、前列腺素 、血小板激活因子(PAF)和促凝血因子(组织因子)，在对 IL-1 的应答中也能由内皮细胞产生。

其他生物学功能

IL-1 是血细胞生成的一种重要调节分子[225]，尽管 IL-1β 缺陷小鼠的表型是明显正常的[226]。IL-1 诱导骨髓基质细胞产生 GM-CSF 和 G-CSF，并诱导 GM-CSF 受体的产生。因此，IL-1 与 GM-CSF 协同刺激早期造血骨髓祖细胞的生长，并能抵消放射治疗和化学治疗对骨髓的抑制作用[227,228]。后者部分是通过线粒体超氧化锰歧化酶来介导的，超氧化锰歧化酶能清除有潜在毒性的超氧化基。

IL-1 为一种内源性致热源[229]，已被显示可能通过诱导 leptin 的产生引起发热、慢波睡眠的持续，降低食欲[230]。脑和内分泌器官都有Ⅰ型受体。神经元和神经胶质细胞能合成 IL-1，提示 IL-1 可能调节神经元间的相互作用[231]。在发育期间和对损伤的应答中，IL-1 在中枢神经系统(CNS)中的合成增加。IL-1 独自或与 IFN-γ 或与 TNF-α 联合，刺激星型胶质细胞而不是小胶质细胞表达氧化氮合成酶的可诱导形式[232]。IL-1 也刺激下丘脑产生促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)，导致脑下垂体阿片黑素(POMC)基因的表达和内啡肽、α-黑色素细胞刺激激素(α-MSH)和促肾上腺皮质激素(ACTH)的产生。所有上述物质都有抗炎作用。HPA 轴的这种激活在肾上腺糖皮质激素产生的诱导中达到顶点。糖皮质激素也充当 IL-1 产生的内源性负反馈下调因子及Ⅰ型和Ⅱ型 IL-1 受体的上调因子[233]。肾上腺切除动物对 IL-1 的炎性和毒性效应敏感得多的事实显示了糖皮质激素在缓解 IL-1 效应中的关键作用，表明正常肾上腺活动能缓冲 IL-1 活性[234]。IL-1 也抑制促性腺激素释放激素的释放，从而抑制免疫激发的再生功能。IL-1 除抑制促甲状腺激素(TSH)的释放外还抑制促黄激素(LH)的释放，降低血浆甲状腺激素。

IL-1 被认为在破坏性关节病中起主要作用，如类风湿关节炎[235]。IL-1 通过诱导软骨细胞金属蛋白酶分泌，刺激骨吸收，导致软骨破裂和蛋白多糖释放。IL-1 诱导组织型巨噬细胞分泌白明胶酶并参与破坏细胞外基质[236]。IL-1 刺激纤维母细胞增殖和胶原酶、IL-6、IL-8、G-CSF 的释放。IL-1 也诱导环氧化酶合成，从而诱导纤维母细胞释放前列腺素，但它抑制基质蛋白 mRNA 的表达。在动物模型中，佐剂诱导的关节炎可受到 IL-1ra 或 IL-1 中和抗体的显著抑制[237,238]。

790

除有促进肿瘤生长的作用外，IL-1 也能抗肿瘤[239-241]。在体外，IL-1 对许多肿瘤细胞系既起细胞抑制因子作用又起杀伤细胞因子的作用。IL-1 的这种活性与 IL-1 对鸟氨酸脱羧酶活性的抑制有关。在体内，IL-1 既增加 T 细胞依赖性肿瘤免疫又增加 NK 细胞的先天抗瘤活性。被转染而过度表达 IL-1α 的纤维肉瘤肿瘤细胞系更易被排斥并可诱导对二次接种的免疫抵抗力的形成。但是已有报道表明，IL-1 的全身给药在某些动物模型中促进肿瘤转移的形成。所以，IL-1 在某些情况下可促进肿瘤发生。

IL-1 可能通过诱导氧化氮的产生向参与胰岛素分泌的诱导和刺激胰岛 β 细胞凋亡[242]。因此，在胰岛素依赖型糖尿病中，由未知的自身免疫过程活化的局部炎性细胞所产生的 IL-1 可能促成 β 细胞的破坏。

报道提示，细胞内 IL-1β 在 Fas 介导凋亡中起内源性抑制因子的作用，可通过抑制巨噬细胞的凋亡延长 IL-1β 的释放[243]。IL-1α 的反义寡聚脱氧核苷酸被显示可延长在体外培养的人内皮细胞的寿命[244]。所以，细胞内 IL-1 既可调节衰老，也可在正常细胞的生存中起作用。但进一步的研究表明，这些活性在基因敲除小鼠中也存在。

icIL-1ra 的胞内功能，即使有的话，也不清楚，甚至比 IL-1α 和 IL-1β 更不清楚。IL-1ra 主要集中于正常皮肤的颗粒层细胞内，这与体外研究观察发现的分化型角化细胞生成的增加相一致。icIL-1ra 削弱并使 IL-1 诱导的卵巢癌细胞内的 GRO mRNA 不稳定，并在细胞因子-受体相互作用的下游某处限制 IL-1 反应性[245]。

抑制剂和拮抗剂

由于 IL-1 强大的致炎作用，其产生、分泌和生物学活性受到严密的调节（表 22.7）。IL-1 的生物学效应既受到 IL-1ra 的调节也被脱落的 IL-1 受体可溶性形式（sIL-1R）调节[246-250]。在患各种炎性疾病患者体内的血浆和组织中发现高水平的 IL-1ra 表明，内源性产生的 IL-1ra 可能是一种正常的内环境稳定性反应，以限制 IL-1 的致炎、致病效应。肠黏膜 IL-1ra/IL-1 比率有显著意义的降低与炎性肠疾病有关[251]。在类风湿样滑膜细胞中也可观察到一种类似的 IL-1ra/IL-1β 产生失平衡[252]。

表 22.7　IL-1 抑制分子对 IL-1、IL-1ra 和 IL-1R 的影响

抑制分子	IL-1	IL-1ra[a]	IL-1RⅡ	sIL-1RⅡ[a]	IL-1RⅠ
糖皮质激素	↓	↑	↑	↑	↑
IL-4 和 IL-13	↓	↑	↑	↑	↑
IL-10	↓	↑	ND	ND	ND
TGF-β	↓	↑	ND	ND	↓
PGE_2	↓	ND	↑	ND	↑

[a]IL-1ra 和 sIL-1RⅡ也是 IL-1 抑制分子。这些抑制分子的上调或下调作用用箭头表示。

ND，未确定。

由于 IL-1 对受体的不同亲和力，sIL-1RⅠ优先抑制 IL-1α，而存在于正常血浆、血清和滑膜炎性渗出物中的 IL-1RⅡ则起 IL-1β 特异性抑制物的作用。sIL-1RⅡ保持着与 IL-1α 和 IL-1β 相同的亲和力，但与细胞表面 IL-1RⅡ相比，它对 IL-1ra 的亲和力则降低了 2000 倍[194]。此外，sIL-1RⅡ能以很高的亲和力与前蛋白结合从而阻断前-IL-1β 的加工。IL-1ra 与 sIL-1RⅡ联合，在抑制 IL-1β 结合 IL-1RⅠ方面有加合效应。相反，IL-1ra 与 sIL-1RⅠ可以相互抵消彼此的抑制效应（表 22.7）。

在血清中存在大量的其他自然产生的 IL-1 抑制分子。α-MSH 抑制 IL-1 的合成和活性。PGE_2 抑制 IL-1 的合成与释放，但却增强两种 IL-1 受体的表达。CRH 抑制 IL-1 诱导的厌食、睡眠和前列腺素合成。皮质类固醇抑制 IL-1 mRNA 的表达，但增加两种 IL-1 受体和 sIL-1RⅡ的表达。TGF-β 下调 IL-1 和 IL-1RⅠ的产生，但诱导 IL-1ra 合成。IL-4，IL-10 和 IL-13 抑制 IL-1 产生，却上调 IL-1ra 产生。另外，IL-4 和 IL-13 也增加两种受体的表达及 IL-1RⅡ的脱落。趋化因子，包括 IL-8、FMLP、C5a、白三烯 B_4 和 PAF，诱导 IL-1RⅡ从人多形核白细胞上的迅速脱落[253]。这些细胞因子和激素抑制 IL-1 产生及诱导诱饵受体的表达和脱落的能力可解释为这些因子的抗炎效应。

尽管 IL-1 功能缺陷的基因敲除小鼠仅表现很弱的表型缺陷，但 IL-1 却是惟一被天然竞争性同系物 IL-1ra 调节的细胞因子。用 IL-1ra 缺陷小鼠进行的研究提示 IL-1ra 参与正常发育，因为与野生型对照相比 IL-1ra 缺陷小鼠体重降低[254]。IL-1ra 能阻断 IL-1 诱导的 T 细胞增殖和 LPS 诱导的 IL-8 在单核细胞的产生。LI-1ra 也降低 IL-2 受体及 IL-1α、IL-1β、IL-2 和 TNF 在这些细胞的体外分泌。一些研究已显示，IL-1ra 被中和抗体抑制后会导致炎性疾病的严重恶化。例如在动物模型中，给予 IL-1ra 中和抗体，能明显加剧动物结肠炎的诱导[255]。因此，IL-1ra 在下调体内炎性反应中起一定作用。在动物模型中，IL-1 诱导的低血压在用大剂量的 IL-1ra 预处理动物中可以得到控制。但是，需要大量的 IL-1ra(10000 倍摩尔超过量，用于人估计要 2.5g/d)来抵消 IL-1 介导的效应限制了其临床使用。因此，IL-1ra 在治疗脓毒症的人体Ⅲ期临床试验中至今仍无有意义的治疗潜能。提供 IL-1ra 局部来源的改进传送系统可使 IL-1ra 更加有效[256,257]。

791

阻断 IL-1 介导应答的其他治疗方法包括使用抗 IL-1 抗体、抗 IL-1 受体抗体、可溶性 IL-1 受体和抑制 IL-1β 加工的 ICE 抑制剂。在另一研究中，通过对不同 IL-1ra 突变体的受体结合亲和力和拮抗活性进行比较，发现了一种比 IL-1ra 更好的拮抗剂，该拮抗剂与 IL-1RⅠ的结合增加而与 IL-1Ⅱ的结合降低[249]。

基因缺失

尽管 IL-1 活性过剩，IL-1α 或 IL-1β 产生缺陷或 IL-1Ⅰ型受体表达缺陷的基因敲除小鼠均可存活，并且只表现出相对的有限的表型缺陷[258~260](表 22.8)。IL-1β 缺陷小鼠可抵抗热诱导，能削弱了局部注射松节油引起的急性期应答，尽管 LPS 的全身投放在这些小鼠能产生正常的炎症应答。对 LPS 的这种正常应答是基于 IL-1α、IL-1β、TNF-α、LT-α 和 IL-6 活性的过量。

表 22.8 IL-1 家族基因敲除小鼠的表型

靶基因	主要表型异常
IL-1β	IL-6 产生减少和降低对松节油的急性期应答
IL-1RⅠ	无对松节油的热应答和厌食应答；缺乏 IL-1 介导的信号传导对单核细胞增多性利斯特氏菌的更高敏感性
IL-1RA	体重降低；更高的 LPS 致命性；对单核细胞增多性利斯特氏菌的敏感性降低
ICE	较低的 LPS 致命性；IL-1α 和 IL-1β 释放缺陷

与对照相比，IL-1ra 缺陷小鼠对致命内毒素血症更敏感，而对单核细胞增多性利斯特氏菌的敏感较小。相反，IL-1ra 过多产生的转基因小鼠能受到保护而免遭内毒素的致命效应，但对利斯特氏菌更敏感。内毒素激发后的 IL-1 血清水平在 IL-1ra 缺陷小鼠体内降低，而在 IL-1ra 过多产生的小鼠体内增高。所以，IL-1ra 对 IL-1 的水平起正调节的作用，以平衡 IL-1 的潜在有益效应，抑制 IL-1 在感染过程中的过度产生。

总之，IL-1 通过诱导其他介质和细胞因子从而在免疫应答的调节中起着中心作用。IL-1 是惟一一种存在天然内源性的特异性抑制分子(IL-1ra)以抵消其生物学效应的细胞因子。因此，多种机制，如 IL-1 受体的脱落、皮质类固醇和 IL-1ra，调节着 IL-1 的水平和活性。尽管 IL-1α、IL-1β 或 IL-1RⅠ同源缺失小鼠令人惊奇地表现出存在很少的表型缺陷，但 IL-1 在宿主防御中扮演着重要作用的最好证据是：许多病毒能产生毁灭宿主防御机制的 IL-1 受体同源物，而这些受体同源物一旦被删除，这些病毒的致病性就会降低。

趋化因子

正在发展中的化学趋化性细胞因子家族现在被称为趋化因子，该家族由迄今为止所鉴定出的性质最为不同的、最大的细胞因子亚群所组成。趋化因子以其能诱导白细胞及其他类型的体细胞的定向迁移和活化为特征，在急性和慢性炎症中起主要作用。趋化因子也促进体液和细胞介导免疫反应；调节细胞黏附、血管生成、白细胞移动和归巢；参与淋巴细胞生成和血细胞生成[261-265]。在机体对刺激物、多克隆刺激剂、抗原和内源性细胞因子的应答中，趋化因子由多种白细胞和其他类型的细胞产生。在许多病症的局部炎症位点也

可检测到多种趋化因子[265]。对中和性抗体的在体作用和趋化因子基因的同源缺失研究显示趋化因子在宿主抗感染性生物(包括 HIV)的防御中起着关键作用[266]。此外,趋化因子参与不同疾病的发病机制,如反复灌注损伤,包括中风、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、免疫复合物诱导的肾小球肾炎、动脉粥样硬化和自身免疫反应[265,267]。但是,与其他致炎细胞因子如 IL-1 和 TNF 相反,循环趋化因子一般不诱导其他细胞因子、急性期应答或发热产生,却诱导其他效应分子的产生,如组胺、酶和防御素。在很高的浓度下,循环趋化因子有脱敏作用,能抑制局部炎症。由于对人趋化因子的鉴定和研究比较超前,因此如无特别说明本章讲述的是人的趋化因子。

亚家族

根据它们的结构,4 个趋化因子亚家族已被鉴定。它们包括 CXC(α)、CC(β)、C(γ)和 CX_3C 亚家族[261]。每一趋化因子亚群的基因通常紧密聚集于同一染色体上,表明它们是通过反复的基因复制而产生的。CXC 趋化因子亚群的 9 个成员聚集于人 4 号染色体上(q12-21),而 SDF-1 基因则在 10 号染色体上。它们都有 1 个氨基酸(X)将它们 4 个保守的半胱氨酸残基的前两个分开。CC 趋化因子 β 亚群的 11 个成员位于人 17 号染色体上(q11-21),而 4 个新近鉴定的成员被发现在 2、9 和 16 号染色体上[268]。它们没有氨基酸将其 4 个半胱氨酸残基的前两个分开,或者在 I-309 没有氨基酸将其 6 个半胱氨酸残基的前两个分开。在这两个亚家族中,第一个半胱氨酸与第三个半胱氨酸形成二硫键,第二个与第四个形成二硫键,从而形成一个分子质量范围在 7~9 kDa 之间的稳定的三维结构。淋巴细胞毒素 (Lptn)是趋化因子 γ 群的惟一成员,位于人 11 号染色体上,分子质量为 16kDa,在其 N 端附近有惟一的一对半胱氨酸[269]。Lptn 由 NK 细胞产生,对 NK 细胞及 T 细胞发挥作用[270]。最新的 CX_3C 趋化因子被称为分形因子或神经毒素,在其 N 端半胱氨酸间有 3 个氨基酸。该趋化因子位于人 16 号染色体[271,272]。它比其他趋化因子大,分子质量约为 38kDa。分形因子在其 C 端附近有一个由 18 个氨基酸组成的疏水序列,该序列似乎起内皮细胞膜锚定基序的作用。分形因子可能是由大约 80 个氨基酸组成的趋化因子成分切去了其 24 个氨基酸长的黏蛋白样柄状结构而形成,分形因子主要以细胞结合方式发挥作用。

792

趋化因子以无活性的前体被产生,在细胞内被酶切,通过经典途径被分泌。碱性趋化因子分子的 C 端都显示低亲和力的($K_D = 10^{-5}$ mol/L)肝素结合特性,能与细胞表面的葡糖胺聚糖(GAG)分子和其他负电荷糖分子及组织基质糖蛋白结合[273]。这使得趋化因子能吸附到沿血管、结缔组织和胞外基质排列的内皮细胞(EC)上。因此,趋化因子也有诱导细胞沿 GAG 覆盖表面定向"配位趋化"迁移的能力。

受体和信号转导

趋化因子能与一类正在发展中的同源 7 跨膜 G 蛋白偶联受体(7TMR)亚家族以较高的亲和力($K_D = 10^{-8} \sim 10^{-9}$mol/L)发生相互作用[262,263]。其他促炎化学引诱剂,如 PAF、LTB4、C5a 和 fMLP,也能使用与趋化因子受体同源性较低的 7TMR。嗜水性分析显示,趋化因子受体由一个胞外 N 端、7 个疏水性跨膜结构域形成的 3 个胞外环和 3 个胞内环以及 1 个含大量丝氨酸和苏氨酸残基的胞内 C 端组成。这些残基能发生磷酸化,参与信号传导和脱敏反应。趋化因子通常既能与受体 N 端相互作用,也可以与受体 1 个胞外环上的第二位点相互作用。异源三聚体 G 蛋白通常与受体的 1 个胞内环结合[274]。一般位于第二个胞内环中的"DRY"基序(Asp-Arg-Tyr)也参与信号传导[275]。迄今为止,4 种受体已被克隆和鉴定,分别为结合 CXC 亚家族的 CXCR1-4,结合 CC 趋化因子的 8 种受体(CCR1-8)。趋化因子在受体的利用方面存在相当多的重复,而白细胞则能表达多种受体(图 22.4)。因此,与其他细胞因子相似,趋化因子在其活性方面是多效性的。

微生物与病毒也已适应对自己有利的趋化因子受体[262,275]。Duffy 抗原又称为 DARC,已被鉴定出是一种结合许多 CXC 和 CC 趋化因子的受体,并存在于红细胞上,为间日疟原虫的侵入提供结合位点——7TMR[276]。尽管在毛细血管后微静脉、普尔基涅细胞和活化 T 细胞上也能检测到 DARC,但趋化因子与该受体的结合不传导信号,因此该受体被认为在转运和促进循环趋化因子的清除中发挥着作用(表22.9)。此

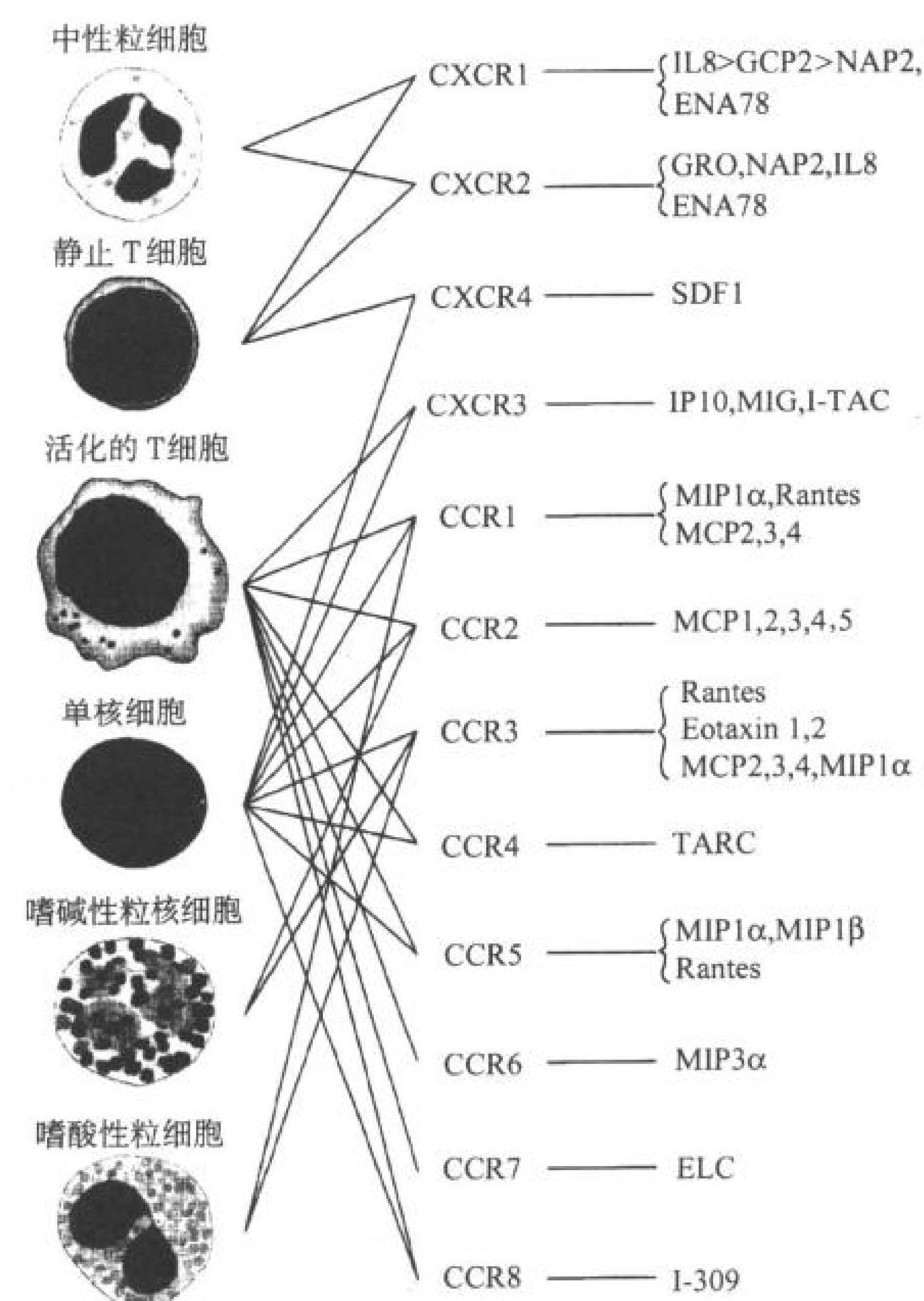


图 22.4　结合趋化因子的人白细胞受体。人白细胞能表达多种与一种或许多趋化因子相互作用的7-跨膜受体。(改编自 Charles Mackay、Barrett Rollins 和 Andrew Luster 等博士提供的图画和资料)。

外,几种疱疹病毒也存在编码趋化因子结合分子的基因。巨细胞病毒(CMV)使感染的淋巴细胞表达结合 MCP-1、MIP-1α、MIP-1β 和 RANTES 的一个功能性结合位点。这种 CMV 编码的趋化因子受体:US28,已被发现能允许 HIV-1 感染 $CD4^+$ T 细胞,这或许解释了受 CMV 双重感染的获得性免疫缺陷综合征(AIDS)患者的恶化疾病状态[277]。松鼠猴疱疹病毒(HVS)感染的淋巴细胞表达 CXCR2 样结合位点(表 22.9)。从 AIDS 患者卡波西肉瘤取得的人疱疹病毒 8 的一个基因,该基因编码 IL-8 样受体[278]。该受体组成型传导信号,与 IL-8 相似,因此促进肿瘤血管形成,是这种肿瘤类型过多血管形成的原因。

表 22.9　微生物病原体与趋化因子的相互作用

病原体起源信号	受体	趋化因子配体
单变 HIV-1 gp120	CCR5 ＞ CCR3 和 CCR2, STRL33	MIP-1β,α、RANTES、嗜酸性粒细胞活化趋化因子、MCP-2
Lymphotrophic HIV-1 gp120	CXCR4 和 STRL33	SDF-1α
间日疟原虫	DARC	IL-8、GROα、嗜酸性粒细胞活化趋化因子、MCP-1,2,3,4、MIP-1α、RANTES
疱疹 CMV US28 基因	US28 (CCR 样受体)	MCP-1、MIP-1α、RANTES
松鼠猴疱疹病毒 - ECRF3 基因	ECRF3 (CXCR 样受体)	GROα、NAP-2、IL-8
疱疹病毒 8:编码 MIP1α 和 IL-1 同源物	IL-8 样组成性活化受体 CCR1、3 和 5	IL-8(?)
黏液瘤(pox)病毒	有 GAG 结合位点的病毒来源抑制物	许多 CC 和 CXC 趋化因子的 C 端尾部

趋化因子受体的表达受外源性和内源性刺激物的严密调节,但也有一些例外。与未受刺激的静止白细胞相比,活化白细胞表达更多的受体。例如,体外 37℃孵育时,CXCR2 在人 T 淋巴细胞中 CXCR2 的转录和表达降低,而在有单核细胞或 IFN-γ 存在条件下孵育,CXCR2 的表达则会恢复[279]。活化 T 淋巴细胞表达更多

的 CCR1 至 CCR7,而静止 T 细胞表达更多的 CXCR1、CXCR2 和 CXCR4[280]。研究也显示,与 IL-2 而不是 IL-8 一起培养 4 天或 4 天以上的记忆 T 细胞(CD45RO⁺),表达更多的 CCR1、CCR2 和 CCR5,且更易被 CC 趋化因子趋化[281]。在体外,中性粒细胞与 G-CSF 一起孵育增强 CXCR2 mRNA 的表达、与 IL-8 结合及中性粒细胞对 IL-8 的趋化应答,而与 LPS 一起孵育则抑制 CXCR2 mRNA 的表达、与 IL-8 结合及中性粒细胞对 IL-8 的趋化应答[282]。LPS 和其他微生物因子也能迅速降低 CCR2 在单核吞噬细胞中的表达,同时使 CCR1 和 CCR5 的表达降低到很低的程度,降低其 mRNA 的表达,并伴随它们与 MCP-1 的结合能力降低及对 MCP-1 的趋化应答的降低[283]。相反,IL-2 能增加 CCR2 表达。

趋化因子受体介导的信号传导需与 G 蛋白进行初始偶联,从而启动细胞间信号传导的级联反应和最终的生物学应答(图 22.5)。G 蛋白由一个编码至少 16 个 α 亚单位、4 个 β 亚单位和多个 γ 亚单位的大基因家族组成。趋化因子受体信号常被百日咳毒素(PT)抑制,PT 能使某些 G 蛋白(Gαi 2 和 3)与趋化因子受体分开的 284)。受体偶联一般导致 G 蛋白 α 亚单位从 GDP 结合状态到 GTP 结合状态的转换,从而使 α 亚单位与 β 和 γ 亚单位分离。这些亚单位然后活化 PLCβ1 和 PLCβ2,接着是 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)的水解,产生肌醇三磷酸(IP3)和二脂酰甘油(DAG),最后 IP3 从细胞内钙库动员 Ca^{2+}。这个过程证明了趋化因子具有诱导多种类型细胞的内钙流出的能力[261-263]。DAG 刺激 PKC,PKC 使 MAP 激酶等许多效应分子发生磷酸化并使之活化。MCP-1 是一个例外,它不能诱导 CCR2 发出使 PIP2 更新的信号以及 IP3 产生信号[285]。MCP-1 和 MCP-3 依赖外部 Ca^{2+} 来使钙库 Ca^{2+} 流出,而 MCP-2 和 MIP-1β 是单核细胞内 Ca2⁺ 流出的弱诱导剂。趋化因

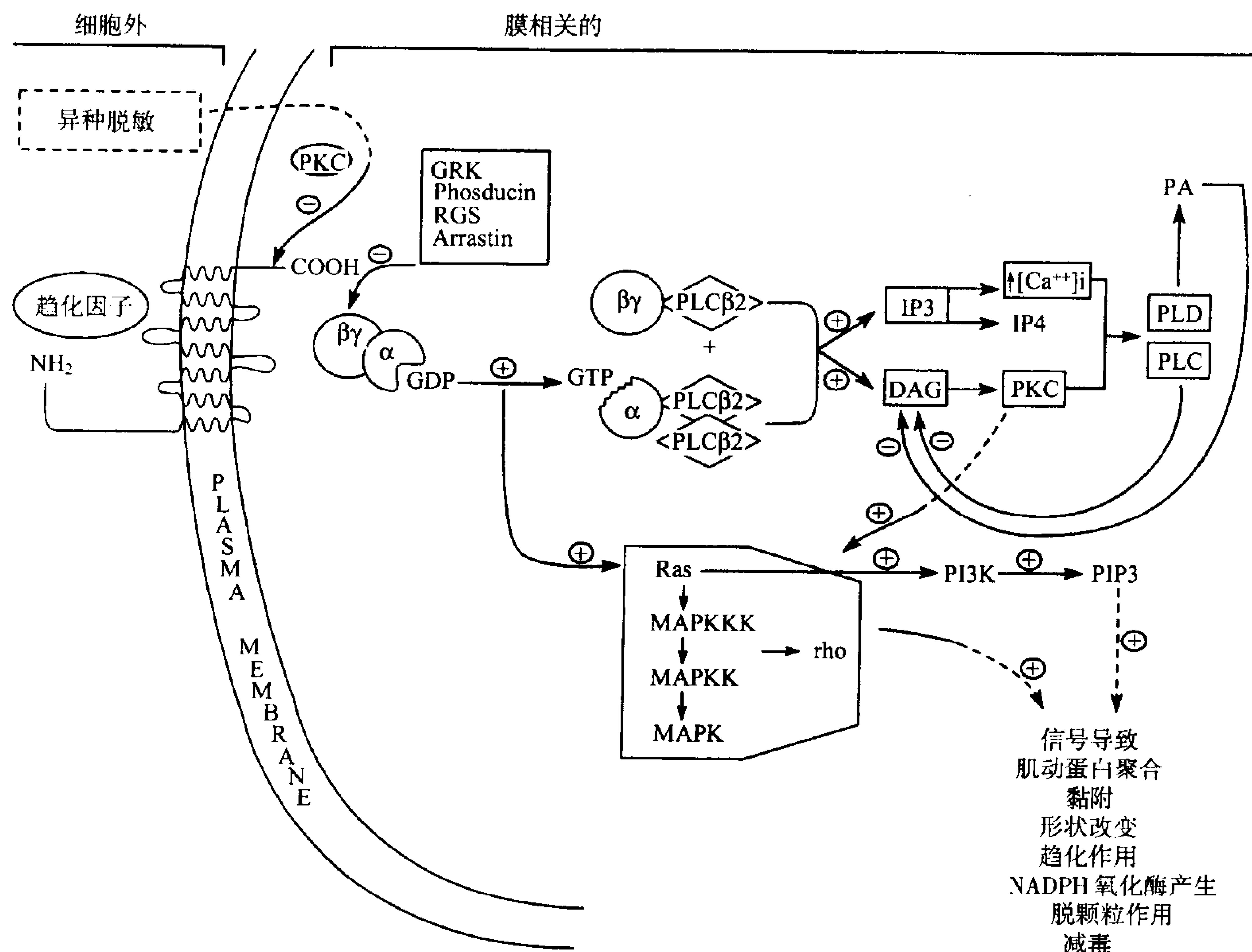


图 22.5 趋化因子介导的信号传导。受体偶联导致 G 蛋白从与 GDP 结合状态到 GTP 结合状态的转变。这种转变可被异种脱敏、PKC 或大量其他的下调分子的信号传导引起的 G 蛋白解偶联而终止。换句话说,G 蛋白的 α 亚单位和 β、γ 亚单位活化 PCLβ1 和 PCLβ2,产生 IP3 和 DAG,IP3 动员钙离子,而 DAG 则刺激 PKC,使 MAP 激酶等下游效应分子磷酸化,引起细胞动员、黏附、脱颗粒、酶活动和其他细胞功能。PCL,磷脂酶 C;RGS,G 蛋白信号调节分子;PIP2,4,5-二脂磷酸磷脂酰肌醇;IP3,1,4,5-三磷酸肌醇;DAG,二脂酰甘油;PLD,磷脂酶 D;PA,磷脂酸;PKC,蛋白激酶 C;MAPK,有丝分裂原活化蛋白激酶;MAPKK,MAPK 激酶;MAPKKK,MAPKK 激酶。

794

子也时常使酪氨酸磷酸化,参与下游 MAP 激酶的级联反应。G 蛋白依赖信号传导引起肌动蛋白聚合、粘连蛋白结构变换和其他有助于细胞迁移的细胞应答。此途径可与 Ca^{2+}外流和 PKC 依赖性应答分离,而酪氨酸磷酸化和 DAG/PLD 相互作用促进过氧化物产生。

CXC 趋化因子亚类

794

那些在 N 端附近的 4、5 和 6 位置有一 ELR 序列(glu-leu-arg)的 CXC 趋化因子都以同样的高亲和力与 CXCR2 相互作用(图 22.4)。该受体高度表达于中性粒细胞上,是引起 IL-8、GRO、NAP-2、ENA78 和 GCP-2 发挥急性炎性效应的主要原因[286]。ELR$^+$ CXC 趋化因子能趋化中性粒细胞,促进它们黏附 EC、随后通过血管壁的迁移、组织入侵、沿基质蛋白和细胞表面上的趋化因子梯度迁移到局部炎症部位(表 22.10)。在更高浓度时,趋化因子活化中性粒细胞产生氧基和脱颗粒,随后释放一些颗粒成分,进一步扩大正在进行的炎性和免疫反应[264]。通过对 ELR 序列进行修饰去除 ELR$^+$ CXC 趋化因子与 CXCR2 相互作用的能力,从而使这些趋化因子失去活性[261]。CXC 趋化因子的血管生成效应依赖于其具有诱导 EC 增殖和迁移的能力,从而导致新脉管系统的形成[287]。尽管有报道表明,一些 EC 能表达 CXCR1[288] 及在伤口愈合处表达 CXCR2[289];但其他研究却认为趋化因子对 EC 的影响是间接的[290]。已发现许多肿瘤组成性分泌 IL-8、GRO 或 ENA78,通过干扰肿瘤血管生成来中和这些趋化因子既减少肿瘤生长又降低转移性扩散[291]。相反,没有 N 端 ELR 序列的 CXC 趋化因子(如 IP-10 和 MIG)对中性粒细胞没有影响,但对单核细胞和 T 淋巴细胞有趋化作用,也是有效的抗血管生成因子[292](表 22.11)。PF4 是一个例外,它对纤维母细胞有趋化作用,也是抗血管生成因子。PF4 实际上已在临床上评估其抗血管生成和抗肿瘤活性,但在单独使用时却无效[293]。

表 22.10 人 CXC-ELR$^+$ 趋化因子 α 亚家族的特性

趋化因子	细胞来源	刺激物	被化学引诱的靶细胞	体外主要效应	体内主要效应
IL-8	M	LPS	N	活化中性粒细胞黏附、	动员 BM 中性粒细胞
	N	有丝分裂原	新鲜 T 细胞	形状改变、	抗菌
	F	微粒	MC	脱颗粒、	急性和慢性炎症
	EC	病毒	EC	酶释放和	
	K	细菌	NK	呼吸爆发	血管生成
	NK	IL-1	BS	EC 增殖、抑制 IL-4	
	T	TNF		介导的 IgE 产生	
	SMC	IL-3			
GRO(α, β, γ) MGSA	M	LPS	N	中性粒细胞活化	急性炎症
	F	IL-1	MC	黑色素瘤细胞增殖	纤维素增生
	EC	TNF	EC	EC 增殖	血管生成
	MC		F	纤维母细胞增殖	
			新鲜 T 细胞	活化 T 细胞	
NAP-2	Plt	血小板活化	N	中性粒细胞活化	急性炎症
	M		EC		凝血块再吸收
ENA-78	K	LPS	N	EC 增殖	急性炎症
	F	IL-1	EC	中性粒细胞活化	血管生成
	M	TNF-α			动员 BM 中性粒细胞
	EC				
	SMC				
GCP-2	骨肉瘤细胞	N	中性粒细胞明胶	急性炎症	
		EC	酶-β 释放		

M,单核巨噬细胞;N,中性粒细胞;F,纤维母细胞;EC,内皮细胞;K,角化细胞;NK,自然杀伤细胞;T,T 细胞;SMC,平滑肌细胞;P,血小板;BS,嗜碱性粒细胞;MC,黑色素瘤细胞;BM,骨髓。

表 22.11　人 CXC (ELR-) C + CX3C 趋化因子亚家族的特性

趋化因子	细胞来源	刺激物	体外主要效应	体内主要效应
PF-4 (CXC)	Plt	Plt 聚集物	抑制 EC 增殖趋化纤维母细胞	抗血管生成
IP-10 (CXC)	M	IFN-α,β,γ	抑制 EC	免疫刺激物
	T	TNF-α	趋化静止 T 细胞 > 激活	抗血管生成
	F	LPS	T 细胞, NK 细胞, 单核细胞	抗肿瘤免疫
	EC			
	K			
MIG (CXC)	M	IFN-γ	抑制 EC	抗血管生成
	肝细胞		趋化 T 细胞(静止 > 激活)	宿主的抗菌能力
I-TAC (CXC)	星型胶质细胞	IFN-β	趋化 T 细胞	
	M			
	T			
SDF-1 (CXC)	BM 间质	组成成分	趋化初始 T 细胞 > 记忆性 T 细胞	抗嗜 T 细胞 HIV-1, B 细胞的发育, 淋巴细胞的迁移
淋巴细胞毒素 (LPTN) (C)	CD8 > CD4 T 细胞		趋化胸腺细胞, DC、T、NK 细胞	淋巴细胞的迁移
	NK 1.1 CD4⁺ T 和 NK 细胞			
	T 细胞			
分形因子(神经毒素)(CX3C)	EC	TNF-α	通过单核细胞介导 EC 的迁移	脑的炎症反应
	微神经胶质细胞	IL-1		
	单核细胞		趋化 T, M, 及 N	

基因调控

CXC 趋化因子的基因包括 4 个外显子和 3 个间隔的内含子。其基因的读框编码前体蛋白,前体蛋白通过切除信号序列和进一步的胞内水解其氨基端的序列而缩短。IL-8 主要以两种天然蛋白的组成形式存在:一个是 77 个氨基酸组成的蛋白,主要由 EC、纤维母细胞等组织细胞产生;一个较活跃的由 72 个氨基酸组成的蛋白,由白细胞[295]产生。在众多的炎症因子中, CXC 趋化因子的 mRNA 如 IL-8 都有一个 3′端 AU 丰富区,从而使其 mRNA 高度不稳定而且易于降解,其半衰期一般小于 1 小时。

795

大多数外源性抗原和内源性的炎症刺激物,例如内毒素,植物凝集素,缺氧,病毒,细菌以及细胞因子等,通过稳定 CXC 趋化因子的 mRNA 同时激活其基因转录来刺激各种不同细胞来源的 CXC 趋化因子的产生。显然,促炎因子 IL-1 和 TNF 是 ELR^+ CXC 趋化因子主要的内源性刺激物,然而 IFN 虽然不是促炎因子但也具有抗血管生成的作用,而且是非 ELR^+ CXC 趋化因子的主要诱导物。此外,IFN 还积极的抑制具有抗血管生成特性的细胞因子如 IL-8 的产生[296]。IFN 通过 NF-κB 和 NF-IL-6 的结合位点在转录水平下调 TNF-α 诱导的 ELR^+ CXC 趋化因子的表达。在 IL-8 中,其基因序列中 5′端位于第一个外显子前的区域中存在着一些公认的的转录调控元件的结合位点的。这些结合位点包括 NF-κB, NF-IL-6-C/EBP, AP-1, 糖皮质激素受体,肝细胞核因子, IFN 调控因子-1 等的结合位点以及八聚体结合的基序[298,299]。糖皮质激素,如地塞米松,是很强的抗炎症激素,它能在基因转录水平对许多炎症细胞因子包括 IL-8 和其他一些趋化因子产生显著的抑制效果。通过地塞米松实验发现,存在于许多遗传型中的、能与糖皮质激素反应的启动子元件,对抑制趋化因子的表达起了一定的作用。然而,地塞米松也可以通过抑制 NF-κB 的活性来抑制由 IL-1 诱导的 IL-8 的产生 。

IL-8

尽管在趋化因子中 IL-8 看起来似乎是多余的,但是 IL-8 却是在各种急性和慢性炎症中起着主要作用的

因子。通过免疫组化和原位杂交技术[300]，在每一个急性炎症反应中都能检测到 IL-8 的存在。相反，用抗 IL-8 的抗体中和 IL-8 能够阻断由 IL-8 引起的炎症反应[267]，甚至能降低兔子对分枝杆菌的纯蛋白衍生物(PPD)[301]的迟发型超敏反应。这些结果清楚的表明，IL-8 在许多急性炎症反应中发挥着重要的作用。这些急性炎症反应包括由缺氧引起的损伤，急性呼吸性窘迫综合征(ARDS)，由内毒素引起的局部炎症反应，免疫复合物引起的血管球性肾炎和其他的一些反应[267]。与互相依赖、协同作用的炎症因子相比，趋化因子并不能相互诱发，而且对炎症因子的诱导也很微弱。这表明 IL-8 和其他的趋化因子在激发炎症反应中起着直接的作用。

尽管 IL-8 与 CXCR1 和 CXCR2 的结合具有相同的亲和力，而且 IL-8 不同的部位能选择性地和 CXCR1 或 CXCR[302]结合，但是却有相反的报道表明，IL-8 能优先利用 CXCR1 或 CXCR2。研究表明，高剂量的 IL-8 对表达 CXCR1 的细胞的作用更显著，而低剂量的 IL-8 对表达 CXCR2 的细胞的作用更显著。因此研究者认为，在同一炎症部位，CXCR2 作用的范围比 CXCR1 要广得多。小鼠虽然缺乏 IL-8 同源的基因，但是有对研究人 GRO α、CRO β、CRO γ (KC 和 MIP-2α 和 β)，ENA78、mu LIX、GCP-2 以及 NAP-2 的有用小鼠。小鼠仅表达一个 ELR^+ CXC 趋化因子受体，此受体与人 CXCR1 和 CXCR2 都具有同源性。这种小鼠的受体通过异形同源物的再结合(表 22.12)而被敲除，从而使 ELR^+ 鼠的趋化因子不再对"IL-8 受体的同源物"中性粒细胞缺陷小鼠产生趋化作用[304]。这种被基因敲除过的小鼠表现出脾、骨髓髓样增生、淋巴结 B 细胞增生以及血中的浆细胞再生性增生，以对一些正常的微生物的入侵产生应答。而在无菌环境下生长的基因敲除小鼠就不会出现这些显性的不正常状况[305]。因此仅当这些受体缺陷的小鼠受到周围病原体入侵时，这些髓样细胞才表现出过度的兴奋。而由正常的微生物菌群诱导的髓样前体细胞大量增生表明，IL-8 受体的同源物通常具有下调髓样细胞和 B 细胞的增殖的功能[306]。

796

表 22.12　鼠趋化因子、配体、受体显性基因的敲除

目标基因	显性的不正常状况
IL-8R 同源物	缺乏对 MIP2 的趋化性，仅在有菌的环境中通过脾肿大、淋巴结病以及浆细胞增生症导致骨髓髓样细胞的增生
CCR1	缺乏对利什曼虫属 S 肉芽肿性反应以及中性粒细胞的抗真菌反应
CCR5	小鼠降低对利斯特氏菌抵抗力，但人缺乏时看上去却很正常
SDF-1 α	由于缺乏 T，B 淋巴细胞而引起的免疫缺陷病以及室间隔缺失，小鼠在出生后不久就死亡
MIP-1α	肺部抵抗流感病毒的单核细胞浸润的减少，从而导致体内出现高滴度的流感病毒。较少有柯萨奇病毒感染引起的严重自身免疫性心肌炎
嗜酸性粒细胞活化趋化因子	循环的嗜酸性粒细胞数量减少以及组织中嗜酸性粒细胞减少 60%以对抗变应原刺激引起的应答

给小鼠或兔子皮下注射人 IL-8，3～4 小时内，在注射部位会有局部中性粒细胞的浸润以及轻微的水肿或红斑。48 或 72 小时后会有相当数量的 T 细胞浸润。尽管这些现象产生只有部分来自于 IL-8 对 T 细胞的趋化作用，但是中性粒细胞的脱颗粒却是由于 IL-8 诱导导致防御素、CAP37/嗜苯胺蓝毒素以及组织蛋白酶 G 的释放而引起的，同时这些物质还能吸引 T 细胞，单核细胞以及剩余的中性粒细胞到注射部位[307,308]。此外，防御素和组织蛋白酶 G 是 T 细胞的协同和促有丝分裂因子，能够分别提高 IFN-γ 和 IL-4 的分泌量，而且能够促进抗原刺激的应答中体内抗体生成量的增加。因此，趋化因子如 IL-8 促进中性粒细胞的脱颗粒，能引起免疫刺激的级联式反应，从而有助于使天然免疫转变为宿主特异性的免疫应答。

其他 CXC 趋化因子

GRO 有三种不同的形式：GROα、CROβ、CROγ。它们在氨基酸序列上有 95%的同源性而且与 CXCR 的相互作用能力也相同。小鼠中与 GROα、CROβ、CROγ 等同的是 KC、MIP-2α、MIP-2β，它们趋化人的中性粒细胞如同趋化小鼠的一样。此外，MIP-2 同 CSF-1 和 GM-CSF 一起协同刺激造血系统的形成。GROα，或是黑色素瘤生长刺激素，首次发现是作为癌基因转染的细胞系的分泌物以及黑色素瘤细胞系自分泌的生长因子[309,310]。

GROα 还通过其血管生成素的活动直接促进黑色素瘤的生长。GRO 还可以诱导纤维母细胞的增殖,但是纤维母细胞的 GRO 受体还不清楚。GROα 和 IL-8 可以从牛皮癣组织中分离得到[265]。

中性粒细胞激活肽-2(NAP-2)来源于血小板基本蛋白(PBP)的血小板 α 颗粒的分裂产物,它出胞后,继续分裂,后生成 CTAPⅢ[263]去掉 9 个氨基酸[263],在 β 凝血酶球蛋白(βTG)的作用下,在氨基端切除 4 个氨基酸,最后再失去 11 个氨基酸后形成由 70 个氨基酸组成的中性粒细胞趋化物 NAP-2 。尽管 NAP-2 和 IL-8 的亲和力只有 IL-8 和 CXCR1 亲和力的 1/20,但是它与 CXCR2 的亲和力和 IL-8 一样。NAP-2 在血小板聚集的时候释放出来,而且对趋化中性粒细胞到受伤、出血部位以及血栓包括动脉粥样硬化斑块等部位都有一定的作用[265]。

尽管上皮细胞来源的中性粒细胞激活肽 78(ENA-78)与 IL-8 只有 22%的同源性,但是在中性粒细胞和 EC 细胞的激活效应中,它具有与 GRO 和 NAP-2 相同的能力[313]。ENA78 是 IL-8 对 LPS, IL-1 以及 TNF-α 刺激引起的应答中由单核细胞产生的,而且在许多炎症状态下都检测得到。基于它具有强烈的血管生成素活性,它也是许多肿瘤自分泌的生长因子。粒细胞趋化蛋白-2 (GCP-2)与 ENA78 有 71%的同源性。GCP-2 不仅表现出对 CXCR2 高度的亲和力,而且与 CXCR1 相互作用的能力是 CXCR1 与 IL-8 亲和力的 1/10[314]。然而,GCP-2 和 ENA78 蛋白生成的浓度比 IL-8 要低得多。小鼠中 LPS 诱导的 CXC 趋化因子(LIX)大多数是最近报道的 ELR$^+$ CXC 趋化因子[315]。它与 ENA78 和 GCP-2 的结构非常相似,但它有很长的 C 端。但是迄今为止没有明确的人 L1X 同源物。

IP-10 通常被认为是大小为 10kDa,由 IFN-γ 诱导的,来源于人 U937 单核细胞白血病细胞系的蛋白。IP-10 具有抗肿瘤活性基于它的抗血管生成效应,此外,经过转染后表达 IP-10 的肿瘤细胞能够导致 T 细胞依赖性的抗肿瘤免疫反应的发生[317]。IFN-γ 通过存在于转录起始点的干扰素刺激反应元件来诱导 IP-10 的表达,而且通过 NF-κB 活化 TNF-α 来增加 IP-10 的表达[318]。IL-4 能够 抑制 IFN- γ,但随后通过激活竞争结合 ISER 位点的负调控子诱导 IP-10 表达。LPS 也可以通过 ISER,通过介导内源性 IFN-αβ 的表达,通过 2 个 NF-κB 结合位点来刺激 IP-10 的表达。至于 IL-8 基因 ,通过 IFN-γ 或 LPS 途径诱导的 IP-10 表达需要其上游至少 2 个结合位点的协同作用。

797

由 IFN-γ 诱导产生的单核因子(MIG)是 CXC 趋化因子,MIG 是通过淋巴细胞激活的巨噬细胞的 cDNA 文库进行差异筛选而发现的[319]。MIG 对激活的 T 细胞和 NK 细胞具有趋化作用,但是对静止的 T 细胞、B 细胞、单核细胞或中性粒细胞却没有趋化作用。.MIG 在肝细胞中的表达最高,它不同于 IP-10,它仅依赖于 IFN-γ 的诱导[320]。单核细胞也可以被诱导产生 IP-10 ,但并不是 MIG 对 IFN-α/β 和 LPS 刺激的应答。MIG 和 IP-10 在氨基酸序列上存在着 37%的同源性,而且它们有相同的受体 CXCR3[321]。除此之外,这些 CXC 趋化因子在体内并非以多余的形式发挥作用,如 MIG 在全身分布很广泛,而 IP-10 通常和 IFN-γ 一起表达,而且在某些组织的局部更活跃。I-TAC 是最近被确认的非 ELR CXC 趋化因子,是通过由 IL-2 激活的星型胶质细胞的 CDNA 文库的差异显示确定出来的[322]。IP-10, MIG 和 I-TAC 交叉反应不敏感,表明它们都有 CXCR3 。

基质细胞来源的因子 1(SDF-1)通常来源于骨髓基质细胞,但是现在发现它在许多组织中都表达[323]。SDF-1 与 CXC 和 CC 趋化因子具有同等的同源性,而且在进化上相当保守,这些表明它可能是一个原始的趋化因子。SDF-1 在血浆中组成型表达,而且以可检测的水平存在于血浆中。SDF-1 是一种强烈的淋巴细胞和单核细胞趋化因子,而且在单核细胞的归巢和进化中所起的作用比在炎症中反应中更为重要。SDF-1 也是 CD34$^+$ 造血干细胞趋化因子,能趋化它们从骨髓向外周血中迁移[324]。敲除 SDF-1 基因的小鼠一周后就死去了,伴随着 B 细胞前体数量的严重减少,T 细胞缺陷,骨髓髓样细胞的减少以及室间隔缺陷(表 22.12)[325]。SDF-1 能利用融合的单个受体(CXC4),同时也以 T 淋巴细胞的复合受体发挥作用,而且通过嗜淋巴细胞 HIV-1 入侵神经细胞[326]。CXCR4 在胚胎期就表达,而且在许多器官和成年老鼠的 T 细胞中均表达。

CC 趋化因子蛋白与基因

目前已经鉴定和克隆出的人和小鼠的 CC 趋化因子达 25 种之多。CC 趋化因子的基因包括 3 个外显子

和2个间隔的内含子。在刺激下,基因开始迅速转录并且在3~4h达到高峰。此基因编码含有92~99个氨基酸的前体蛋白,包括开始的20~25个氨基酸的起始序列。这些序列在蛋白成熟时已被切除,成熟蛋白序列的同源性达28%~73%[261]。

核磁共振研究表明,CC趋化因子单体的三级结构与CXC趋化因子非常相似[327]。但是,其同型二聚体的拐角结构却相差很大。另一方面,将MCP-1的第28位和第30位的氨基酸与IL-8同等位置的氨基酸进行交换则会导致突变,这种突变使IL-8选择性的趋化中性粒细胞,而不是单核细胞,推测可能是由于增强了中性粒细胞与IL-8受体的结合能力[328]。同时也表明MCP-1和IL-8的受体结合区域非常相似。

对一些CC趋化因子的基因调控研究显示,在小鼠MCP-1基因的5′端存在NF-κB,NF-IL-6, AP-1以及AP-2的潜在结合位点[329]。NF-IL-6 (C/EPB), NF-κB和c-Ets的结合位点已被证实位于MIP-1α的启动子区域[330]。从上也可表明LPS和IFN-γ能迅速下调MIP-1α mRNA在巨噬细胞中的表达。但是调控CC趋化因子表达的活化元件仍需进一步的研究。

CC趋化因子显示了细胞因子应答的常规模式:活化细胞中CC趋化因子mRNA的表达增加,而在转染的细胞系中通常可以看到CC趋化因子组成性的表达。尽管各种不同类型的细胞都可以产生CC趋化因子,但是很显然很多CC趋化因子来自T细胞(表22.13).。被多克隆刺激物或抗原激活的T细胞能够诱导RANTES、MIP-1α、MIP-1β以及I-309的产生,表明它们像天然的宿主免疫应答一样对免疫调节做出贡献。

表22.13 人CC趋化因子的特点、细胞来源及作用

C-C亚家族	染色体	细胞来源	特点	主要作用
MCP-1	17(q11-21)	大多数非淋巴细胞		慢性炎症反应,激活巨噬细胞,提高Th2细胞的免疫性,刺激嗜碱性粒细胞释放组胺
MCP-2	17(q11-21)	单核细胞	与MCP-1有62%的同源性	与MCP-1相似,但还能通过CCR5减少对HIV-1的摄取量
MCP-3	17(q11-21)	单核细胞	与MCP-1有73%的同源性	与MCP-1相似,但还能趋化嗜酸性粒细胞
MCP-4	17(q11-21)	单核细胞和上皮细胞	与MCP1-3有56%~61%的同源性与嗜酸性粒细胞活化趋化因子有70%的同源性	活化单核细胞,嗜碱性粒细胞以及嗜酸性粒细胞
MCP-5	17(q11-21)	单核细胞和SMC	与嗜酸性粒细胞活化趋化因子有60%的同源性	与MCP-1相似
MIP-1α	17(q11-21)	T细胞、单核细胞、肥大细胞和成纤维细胞		宿主的抗病毒防御促进Th1CMI
MIP-1β	17(q11-21)	T细胞、单核细胞和纤维母细胞	与MIP-1α有72%的同源性	减少HIV-1的摄取量
LARC/MIP-3α/exodus	2	肝、肺、单核细胞和DC		慢性炎症反应
MIP-3β/ELC	9	单核细胞、胸腺细胞、LN、脾		
RANTES	17(q11-21)	T细胞、EC和血小板		早期T细胞产物能增强单核细胞的浸润
嗜酸细胞活化趋化因子	17(q11-21)	EC、M、上皮细胞,肺LN	与MCPI-4有70%的同源性	在肺部变态反应中存在于气管支气管组织中
I-309	17(q11-21)	T细胞、肥大细胞	含有6个半胱氨酸	趋化T细胞,诱导肿瘤免疫,抗T细胞的凋亡
PARC	17(q11-21)	肺、胸腺细胞、LN、单核细胞、	同MIP-1α有61%的同源性	单核细胞的炎症反应
SLC	9	脾、LN、肠		单核细胞的炎症反应
TARC (TECK)	16	DC、EC、肺、结肠和胸腺DC	与MIP-1γ同源	单核细胞的炎症反应

受体

CC 趋化因子存在 8 种受体 CCR1-8,能与一种或多种 CC 趋化因子发生反应,它们都已被克隆和表达(表 22.4)。另外,CMV 转染的 T 淋巴细胞能表达 US28 的基因产物,此产物与 MIP-1α、MIP-1β、RANTES 以及 MCP-1 关系密切[262]。感染的 T 细胞表达这种受体对病毒的入侵非常有利。US28 也可以作为 HIV 入侵的协同受体,从而使 CMV 的感染成为 AIDS 潜在的致命帮凶[331]。

功能

除少数外,大多数 CC 趋化因子能趋化 T 细胞和单核细胞,但是不能趋化中性粒细胞(表 22.4)。CC 趋化因子可以根据它们在白细胞参与的变态反应中所起的趋化作用的不同进行分类。嗜酸性粒细胞活化趋化因子 1、2,MCP-4 以及更广泛一点 RANTES, MCP-2、MCP-3 和 MIP-1α 等主要对嗜酸性粒细胞起趋化作用。嗜酸性粒细胞活化趋化因子 1、2 ,RANTES 以及 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4 都能趋化嗜碱性粒细胞,并且通过脱颗粒,诱导组胺的迅速释放[332]。MCP-1、MCP-2、MCP-3, RANTES 以及 MIP-1α 也对鼠的肥大细胞也起趋化作用,但是没有报道表明它们能诱导组胺的释放[265]。

趋化因子对造血功能也能发挥作用。这种作用基于其能抑制体内 GM-CSF。通过干细胞因子(SCF)诱导的克隆组成分析表明:MIP-1α、IP-10、PF4、IL-8、MCP-1、嗜酸性粒细胞活化趋化因子 2 (Mu MPIF-2)、LARC (也被称为 MIP-3α 或 Exodus)、MRP-1、2,以及 Mu MPIF-1,都能够下调造血功能[333-335];显然,嗜酸性粒细胞活化趋化因子 1、Mu MIP-2、以及 IL-8 能够促进早期造血前体细胞的生长[336]。然而,敲除了 MIP-1α、MCP-1、CCR1 CCR5 同源基因的小鼠通常在造血功能上无任何缺陷,因此趋化因子看起似乎以多余的形式存在。但是,当 $CCR1^{-/-}$ 小鼠受到内毒素的作用时,就会在脾和循环系统中出现大量的髓样前体细胞,这也许与骨髓前体细胞的活动减弱有关[337]。

炎症反应和免疫活动

也许从它们对单核细胞的趋化作用可以推测,在持续感染、自身免疫疾病以及移植排斥反应等引起的慢性炎症部位[264,265,300],都可以通过免疫组化和原位杂交技术检测到 CC 趋化因子的存在。注射 CC 趋化因子如 MCP-1、2、3、RANTES 以及 MIP-1α 等 4h 后,在注射部位能发现单核细胞的浸润[338]。然而,经转染而在皮肤中过度表达 MCP-1 的小鼠,却很难发生任何皮肤的炎症反应,除非让它接触感光剂或刺激剂[339]。因此,看起来要诱导炎症反应,趋化因子似乎是必需的,但不是过量的。有人提出,在激活 EC 中,由促炎因子如 IL-1、TNF 产生的第二信号是必需的,从而使 EC 能有效的与趋化因子相互作用以激活淋巴细胞。

798

一些 CC 趋化因子如 RANTES、MIP-1α、MIP-1β、MCP-1 以及 MCP-3 虽然以微摩尔的浓度存在,但在 T 细胞的激活中却起着协同刺激信号的作用。它们能促进 T 细胞的增殖,IL-2 的产生以及抗 TCR 和抗原激活的 T 淋巴细胞中 IL-2Rα 的表达[340]。这种协同刺激作用仅在低浓度抗原或有丝分裂原刺激时才能够检测得到。其他 CC 趋化因子在适宜抗原刺激的 T 细胞克隆中则起抑制作用。另一方面,中和抗 RANTES 抗体的剩余物能局部抑制 T 细胞的多克隆应答,表明正常产生的 RANTES 对此应答有一定的作用。CC 趋化因子的这种协同刺激作用可能一部分基于其促进了 APC 对抗原的呈递能力。有数据表明,CC 趋化因子能放大 B7 共刺激因子在 APC 上的表达[340]。目前,已经克隆出被 DC 细胞大量表达的人 CC 趋化因子并命名为 DC-CK1[341]。这种趋化因子存在于 DC 细胞的原始中心和次级淋巴器官的 T 细胞区域。DC-CK1 优先趋化初始的 $CD45RA^+$ T 细胞,而且对免疫应答的诱发起一定的作用。

趋化因子能促进中性粒细胞和单核细胞释放脱颗粒蛋白,这些蛋白可以促进肿瘤细胞的溶解。尽管趋化因子并不能促进 LAK 细胞的活性或是抗体依赖的细胞溶解反应,但是许多 CC 趋化因子 例如 MCP-1、3、RANTES、MIP-1α 和 MIP-1β 能促进 CTL 和 NK 细胞介导的转染了目的基因细胞的杀伤效应(C82)。趋化因子介导的对 CTL 和 NK 细胞杀伤效应的放大依赖于整合素 β2 的表达, 据推测,整合素 β 能促进被杀伤靶细胞

的相互作用。趋化因子也可以诱导淋巴细胞的脱颗粒以及随之一系列酯酶的释放[340]。这个过程可以被 PT 阻断,而且在 MIP-1α 基因敲除小鼠中被破坏[343]。因此,杀伤细胞脱颗粒可能将致命的分子传递给靶细胞。

大量的研究已经瞄准了趋化因子与 Th1 依赖的细胞免疫,或 Th2 依赖的体液免疫的联系上。研究表明 MCP-1 能促进 Th2 淋巴细胞诱导的 IL-4 的产生,而减少 IL-12 的产生以及由 Th1 诱导的 IFN-γ 的产生[344]。MCP-1 参与基于 Th2,由血吸虫属和利什曼蚊属虫卵引起的慢性继发性炎症反应,然而 MIP-1α 在 Th1 依赖的,由 M 肺结核引起的脱颗粒反应中发挥着很大的作用[345]。实际上,抗原刺激的 Th0 细胞克隆与 MIP-1α 共刺激培养将导致它们向由 IFN-γ 诱导的 Th1 表型分化,而将它们与 MCP-1 接触时,则可以导致它们向由 IL-4 诱导的 Th2 分化[346]。MIP-1α 在 Th1 依赖的细胞免疫中的关键作用,在敲除 MIP-1α 受体同源基因的小鼠中得到进一步的证实,该小鼠表现 Th1 型的脱颗粒反应显著降低,同时淋巴结细胞中产生的 IFN-γ 减少,而 IL-4 增加。

特性

RANTES 是一个具有多种亲和能力的 CC 趋化因子,由免疫和非免疫细胞产生,在急性变态反应和慢性炎症部位都可检测到。未受刺激的 T 细胞中组成型表达 RANTES ,而且当 T 细胞激活后,RANTES 的 mRNA 和蛋白的表达也随之增加。因此, RANTES 表达的调控是独一无二的,从而也显示出其独特的生理学功能[347]。RANTES 能在其他 CC 趋化因子未产生之前迅速产生,并且能活化表达多种受体 (CCR1、3 和 5)的细胞。在高浓度时, RANTES 俨然像 T 细胞的有丝分裂原,它能诱导淋巴细胞的产生和 IL-2R 的表达[348]。这种 T 细胞应答对除锈霉素 A 敏感,而对 PT 不敏感,表明此应答是由酪氨酸激酶介导的。MIP-1α 也通过相同的受体发挥作用,但是其发挥的作用却与 RANTES 相差很大,表明它们可能利用其他的至今尚未发现的受体发挥作用。尽管 MIP-1α 和 MIP-1β 在氨基酸序列上存在 78%的同源性,但是 MIP-1β 对单核细胞的趋化作用要弱一些,并且大多数情况下是与 CCR5 相互作用而发挥效应。MIP-1α 同源基因缺陷的小鼠当受到流感病毒的侵犯时,肺部单核细胞的炎症反应会降低,而且产生更高滴度的流感病毒[343]。当柯萨奇病毒感染时,它们也会产生不太严重的自身免疫性心肌炎(表 22.12)。因此,尽管 MIP-1α 的功能和对受体的利用看起来似乎多余,但是它在扩大宿主的抗病毒防御上发挥着关键的作用。

I-309 和其同源物鼠的 TCA3 有三对半胱氨酸。它们是由激活的 T 细胞产生,但是在单核细胞中也表达此基因[349]。转染了 TCA3 的肿瘤细胞产生免疫原性表明这种 T 细胞趋化因子具有免疫刺激的能力[350] I-309 可抗凋亡以及保护 T 细胞不受地塞米松诱导而溶解死亡[351]。而其他没有任何趋化因子具有影响在体细胞存亡的能力。

MCP 和嗜酸性粒细胞活化趋化因子构成一个 CC 趋化因子的功能性亚家族。MCP-1 最初被发现是作为 IL-1 诱导的黏附单核细胞的产物[332]。而嗜酸性粒细胞活化趋化因子是从小型猪经历变态反应后的支气管液体中纯化得到的[352]。MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4 以及嗜酸性粒细胞活化趋化因子 1 在氨基酸序列上大约有 65%的同源性 ,但是与嗜酸性粒细胞活化趋化因子 2 只有 35%的同源性。鼠 MCP-5 与人 MCP-1 的同源性很高。MCP-1 和 MCP-5 的内含子和外显子的结构和嗜酸性粒细胞活化趋化因子的基因非常的相似,它们都位于人的 17 号染色体上,而 MCP-5 则位于鼠的 11 号染色体上。所有的 MCP 都能利用 T 细胞和巨噬细胞表面的 CCR2, 然而 MCP-2、MCP-3、MCP-4 还能利用 CCR1 和分享 CCR3,CCR3 通常由嗜酸性粒细胞活化趋化因子诱导的嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞表达(表 22.4)。对嗜酸性粒细胞活化趋化因子在体效应的研究表明它能和 IL-5 协同作用以促进组织的嗜酸性粒细胞的增多[332,352]。IL-5 能诱导骨髓细胞的释放和激活嗜酸性粒细胞,这些细胞能够更迅速的被嗜酸性粒细胞活化趋化因子趋化到原发部位。靶向阻断了嗜酸性粒细胞活化趋化因子基因的小鼠其外周血中的嗜酸性粒细胞会减少,而且当变应原的刺激时,嗜酸性粒细胞对组织的浸润会减少 60%[353]。这表明嗜酸性粒细胞活化趋化因子发挥了很重要的作用,当然包括它趋化嗜酸性粒细胞的作用。尽管 MCP-4 也是一种强烈的嗜酸性粒细胞趋化因子,但是与嗜酸性粒细胞活化趋化因子相比,MCP 趋化嗜碱性粒细胞的效应更强一些。

一个新的 CC 趋化因子——鼠 MIP-1γ，是小鼠 I-A^{+} 朗格汉斯细胞和脾、骨髓来源的 DC 细胞的一种产物[354]。MIP-1γ 与鼠 C10 具有很高的同源性，但是与 MIP-1α、MIP-1β 的同源性不高，MIP-1γ 与 MIP-1α 一样使用由鼠中性粒细胞表达的 CCR1 受体。.相当数量的 MIP-1γ 是由树突细胞组成性产生，而且它的产生并不会由于 IL-1β 、TNFα 或 IL-6 的刺激而增多。因此鼠的血清中通常含有检测量的 MIP-1γ。值得注意的是树突细胞也产生 TARC、Mu C10、MCP-1，但是仅对炎症刺激物产生应答。MIP-1γ 趋化激活和未激活的 CD4^{+} 和 CD8^{+} T 细胞[354]。

人们发现两种新的鼠的 CC 趋化因子，它们是两种不同类型的造血干细胞的抑制剂[335]。MPIF-1（CKβ8）主要由肺、肝、骨髓和胎盘的巨噬细胞和 EC 细胞表达。它和 MIP-1α 在序列上非常的相似，而且它们有公共的受体。MPIF-1 趋化静止的 T 细胞、单核细胞和中性粒细胞。MPIF-1 抑制（降低增生潜能）人和鼠的 LPP-CFC 和 CFU-GM 。与 MIP-1α 相比，MPIF-1 对造血干细胞的抑制作用要强得多，而且对不同激活时期的 T 细胞发挥作用。MPIF-1 与人 MRP-2 的同源性也很高，而且它们在功能上有很多相似之处。现在 Mu MPIF-2 也被认为是嗜酸性粒细胞活化趋化因子 2 ，而且与嗜酸性粒细胞活化趋化因子 1 的功能相似，因为它们都使用 CCR3。Mu MPIF-2 也显示出与 MCP-3、MIP-1α 的同源性。MPIF-2 趋化静止的 T 细胞和嗜酸性粒细胞。嗜酸性粒细胞活化趋化因子 2，与嗜酸性粒细胞活化趋化因子 1 相反，抑制鼠 HPP-CFC 多潜能造血干细胞的分化。在体内，CC 趋化因子与造血功能的联系需要进一步的证实。另外还有 5 种趋化因子已被鉴定、克隆和表达。它们分别为 TARC（TECK）、LARC/MIP-3α、ELC/MIP-3β、SLC 以及 PARC[268]。它们都由淋巴组织组成型表达，但是 TARC 在胸腺中的表达特别高，LARC 主要由肝和淋巴组织表达 ，PARC 可以由肺组织表达。MIP-3α 和 MIP-3β 的表达能被 IL-10 迅速下调[355]。除了 TARC 是 T 细胞所特有的趋化因子外，其余这些趋化因子都选择性地仅对 T 和 B 细胞有趋化性。这些趋化因子看起来似乎是通过单一的受体发挥作用，这些受体确定为：CCR4 是 TARC 的受体；CCR6 是 LARC 的受体；CCR7 是 ELC 的受体（表 22.4）。除 PARC 以外，其余这些趋化因子都位于 17 号染色体上，接近其他的趋化因子。这些 CC 趋化因子的特殊性质表明，它们很可能与自我调节和各种淋巴细胞亚群的归巢有关[268]。这些性质当然也在 CC 趋化因子受体 BLR1 的配体 BCA-1 的发育中起着一定的作用[356]。为了证实这种配体的作用，在靶向性缺乏 BRL1 基因的小鼠中发现，其 B 细胞和记忆性 T 细胞表面不再表达这种受体。这种小鼠缺乏腹股沟淋巴结而且仅有一些表型异常的派尔集合淋巴结。它们的初级淋巴滤泡中缺乏 B 淋巴细胞，而且脾中缺乏生发中心，所有的这些表明这种受体对 B 细胞的回巢和定位是必不可少的。相反，SLC 似乎是 T 细胞归巢的关键调控子。

800

趋化因子在获得性免疫缺陷综合征中的作用

从这一章中大量的文献可以发现在对感染的应答中，各种趋化因子在炎症细胞活动中发挥着重要的作用。趋化因子在宿主对 HIV-1 的抵抗力以及 SDF-1α 对嗜淋巴细胞 HIV-1 毒株对 T 淋巴细胞入侵的抑制作用等方面也发挥着作用。而 RANTES、MIP-1α 以及 MIP-1β 能阻止 HIV-1 对单核细胞系的感染[357]。CXCR4、CCR5，范围更狭窄一点，CCR3 以及 CCR2b 是嗜淋巴细胞、嗜单核细胞以及嗜淋巴单核 HIV-1 毒株入侵 CD4^{+} 淋巴细胞、单核细胞以及嗜酸性粒细胞的协同受体[358]。一个新的趋化因子受体 STRL33 被确定为嗜单核细胞和嗜淋巴细胞 HIV-1 毒株的融合辅助因子[359]。趋化因子抗 HIV-1 感染作用的强有力的证据就是，尽管 1%CCR5 缺陷的高加索人从表型上看起来很正常，但是有一些人在反复接触感染 HIV-1 仍然具有全面的抵抗力。[360]。缺乏 CCR5 的小鼠会对单核细胞起源的利斯特氏菌的抵抗力下降[361]。因此，这些趋化因子受体特别是 CCR5 成为抗 HIV-1 的治疗性试剂的目标。

趋化因子应答的抑制

基因删除或失活的各种趋化因子的异型同源体的表现（表 22.12）证实了各种趋化因子的独特性和重要性。正如细胞因子，趋化因子的作用也如同双刃剑一样：它们在宿主防御中起着必不可少的作用，但是在自身免疫应答、外伤、组织缺氧等状况下，对自身有破坏性的炎症反应中也发挥着作用。正如上面所提到的，通

过 IL-8 的中和性抗体来抑制急性炎症反应可以减轻反应带来的损伤和 ARDS[267]，而抗 MIP-1α 抗体能够缓解 EAE 的严重性[362]。另一方面，抗 MIP-2 抗体(GRO)能加重小鼠克雷白菌性肺炎[362]。许多内源性抗炎剂包括皮质甾类、IL-10 以及 TGF-β 能下调趋化因子的产生[261]。趋化因子受体的相互作用也可以被各种不同的趋化因子配体所阻断[363]。最后，在对黏液瘤病毒的研究中确定了一条阻断趋化因子效应的有效途径，即通过表达约束和抵消各种趋化因子活性的基因产物来阻断其效应[364,365]。黏液瘤基因删除后能恢复兔子对黏液瘤病毒的防御反应。这些痘病毒来源的抑制剂似乎结合在各种 CXC、CC 趋化因子低亲和力的 GAG 结合区域(表 22.9)。

同时也存在一些下调途径，通过阻断由不匹配 G 蛋白诱导的信号传导导致脱敏反应或减毒反应的发生。趋化因子的脱敏反应的发生。配体与相应的受体相互作用以导致。这个过程的发生在配体的浓度很高时，涉及到受体是否主动磷酸化，而且这个过程可以通过受体的去磷酸化和细胞表面受体的循环而发生逆转[366]。一些报道很好地解释了这些现象，经过转染能过度表达 mu JE(MCP-1)，而且血浆中 mu JE(MCP-1)的水平达到 5 ~ 20 ng / ml 的转基因小鼠能够使巨噬细胞失活，使宿主的抗感染应答缺失[367]。来源于此种小鼠的巨噬细胞会长期对 MCP-1 的应答不敏感，而且由于外周血中 MCP-1 梯度的形成，使得循环系统腔内趋化因子的水平升高。相反，生理剂量的其他趋化因子配体与不同 G 蛋白相匹配受体的相互作用以导致异种脱敏反应的发生，从而，导致交叉磷酸化作用和无关受体的失活。例如，鸦片制剂作用约 1 小时左右时，δ 以及 μ 阿片样物质受体能够抑制趋化因子受体介导的趋化作用，以对 IL-8 或 RANTES 发生应答[368]。这种现象与趋化因子受体的内在化无关，但是却与趋化因子受体磷酸化以对鸦片制剂发生应答有关。而且，将单核细胞与 gp120 预孵育后，也可以抑制它们对许多趋化因子和 fMLP 的趋化作用[369]。因此，长时间接触异种配体将抑制细胞对宿主趋化剂应答的活动能力。这些数据表明，有潜在的抗趋化因子效应的物质能够竞争性地与趋化因子受体相互作用，或者是受体依赖的信号传导的脱敏剂。这种抑制趋化因子活性的抑制剂可能会导致没有大量边缘效应的抗炎症药的诞生。

转化生长因子 β

TGF-β 是一种多功能细胞因子，具有调节生长和各种类型细胞分化的作用，而且还具有促炎和抑制免疫力的作用(表 22.14 和表 22.15)。TGF-β 最早是作为小鼠肉瘤病毒感染的细胞系产生的一种活性物质，这种物质能够刺激正常大鼠肾纤维母细胞呈一种抛锚的自主性生长，经尽管该物质并未转化到该细胞内[370]。许多正常的细胞和组织组成型表达 TGF-β，并且在受到刺激时产生量增加。这些细胞包括血小板、巨噬细胞、B 和 T 淋巴细胞、纤维母细胞、EC、造骨细胞、破骨细胞、星形胶质细胞以及微神经胶质细胞。

表 22.14　TGF-β

蛋白质	
Pro-TGF-β	2 条多肽链组成，由 390 ~ 412 个氨基酸组成并且有信号肽序列
TGF-β1，-β2 或-β3	110 ~ 140 个氨基酸，25kDa 的同二聚体，有生物学活性
TGF-β1，-β2	25kDa 异型二聚体
潜在 TGF-β	LAP + TGF-β 二聚体的非共价化合物
来源	
T、B 细胞、巨噬细胞、胸腺、骨髓、纤维母细胞、血小板、胎盘和骨	
受体	
Ⅰ型 (53 kDa)，“信号链”	
Ⅱ型 (70 ~ 80 kDa)，“结合链”	
Ⅲ型 (200 ~ 300kDa)，β 多聚糖“呈递位点”	
200 ~ 300 Ⅰ型 和Ⅱ型受体/细胞 K_d = 3 ~ 30 pmol/L，β1 = β3 > β2	
< 20 000 Ⅲ型位点/细胞，K_d = 50 ~ 500 pmol/L，β1 = β2 = β3	
信号传导单元 = Ⅰ型 + Ⅱ型异二聚体	

表 22.15　TGF-β 的活性

纤维母细胞的促有丝分裂素
抑制大多数其他类型细胞的增殖
抑制造血功能和淋巴细胞增殖
抑制多克隆抗体的产生
抑制 CTL、NK、LAK 细胞的活性
使巨噬细胞失活
提高口腔的免疫耐受
诱导 IL-1ra 的产生和下调 IL-1RI 的产生
抑制体内的炎症反应
促进伤口的愈合和血管的生成
刺激纤维母细胞，PMN，单核细胞以及杆状细胞、T 细胞的趋化现象。
诱导局部的炎症反应和纤维化症状
刺激细胞外基质的沉积
促进抗体向 IgA 型转换

801 目前,已确定出 TGF-β 的 5 个亚类,但是在哺乳动物中仅表达前 3 个 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3,这三种 TGF-β 亚型在序列上有 70%~76%的同源性。不同种属之间,每一个亚型的序列具有高度的保守性(95%~99%),如人 TGF-β1 和小鼠的仅有 1 个氨基酸的变化。在体外,这些亚型的生物学活性几乎相同[371-372]。然而,免疫组化和原位杂交技术表明:在鼠的胚胎时期,TGF-β 各种亚型的表达方式不同[373,374],从而也说明不同的亚型有着不同的功能,这一点可以用敲除 TGF-β 基因小鼠所表现出的不同的表型来证实[375,377]。因此 TGF-β2 和 TGF-β3 是细胞分化的重要调控子,同时也影响发育和胚胎的形成,而 TGF-β1 主要在免疫学方面发挥效应。

基因

哺乳动物各亚型的基因位于不同的染色体上,但是它们有着相同的基因组成,即在相应的位置上有 7 个外显子。根据动物种系分析表明,TGF-β 亚型产生于基因的复制过程以及序列歧变造成。通过对 3 种 TGF-β 亚型启动子区分析表明它们的同源性很小,从而表明它们基因表达的调控也不同[378]。TGF-β2 和 TGF-β3 的启动子有经典的 TATA 框以及 GRE/ATF 元件,然而 TGF-β1 的启动子区含有 AP-1、NF-1、Sp1 的结合位点以及 GC 富含区,但是缺乏 TATA 序列[379~380]。调节 TGF-β1 自发释放的 AP-1 结合位点[381],在病理条件下,能加快 TGF-β1 的复制。而 TGF-β2 启动子激活的不同在于不同类型的细胞的相互作用从而通过靠近 TATA 框的 CRE 位点活化复制因子。三种亚型共同的特征就是存在很长的 5′端 UTR,从而允许进一步的复制和翻译的调控。通过计算机分析 TGF-β1 的 5′端 UTR 表明,稳定的柄环状结构可能是细胞类型特异性的细胞质因子的结合位点并且影响翻译的进行。总之,TGF-β 表达的调控在复制水平和复制前水平均有所不同,而这又与细胞组织以及外源性刺激引起的特异性的 TGF-β 亚型在发育中的表达有关。

蛋白质

TGF-β 具有生物学活性的形式是由二硫键连接的二聚体形式,此二聚体分子质量为 25kDa 并且含有由 110~140 个氨基酸组成的高度保守的亚单位[372~382]。此亚单位由 C 端的部分前体蛋白(390~412 个氨基酸组成)和氨基端 20~30 个氨基酸的信号肽序列以及 1 个结构域前体组成。这个结构域前体被很好地保存,并且参与 TGF-β 的折叠、二聚体的形成以及分泌。前体蛋白在二聚体或 RXXR 的形式的分泌途径中被肽酶剪切,并释放出 C 端含有 110~140 个氨基酸的成熟蛋白。形成二聚体的结构域前体也称为潜在联合蛋白(LAP),以非共价键与 C 端的片段相连产生一个潜在的高分子质量复合物,这个复合物包括另一个分子质量为 125kDa 的糖蛋白,称为潜在 TGF-β 结合蛋白(LTBP)。潜在 TGF-β 位于细胞的表面,而且通过结合甘露糖-6-磷酸酯-胰岛素样生长因子Ⅱ型受体或其他糖基化结合蛋白位于细胞外基质中[383]。潜在 TGF-β 通过这些转变以便在某些未知的位点激活 TGF-β,但是这里面一定存在高效的调节机制。因为分泌形式的 TGF-β 是缺乏生物活性的,而潜在 TGF-β 的激活则是调节 TGF-β 活性的关键步骤。潜在 TGF-β 被转变后能在体内通过纤维蛋白溶酶,组织蛋白酶 D、血小板凝血酶敏感蛋白,或是通过加热、酸以及 chaotropic 试剂破坏非共价键来激活 TGF-β。在某些细胞中,潜在 TGF-β 的活化需要某些其他分子的级联反应,这些分子包括组织的Ⅱ型谷氨酰胺转移酶、LTBP、纤维蛋白溶酶以及尿激酶型血浆素原激活剂[384]。而且,潜在 TGF-β 也能被细胞之间的相互作用激活。例如将牛的内皮细胞与平滑肌细胞共培养能够通过纤维蛋白溶酶依赖机制激活 TGF-β。仅成熟 TGF-β 的二聚体 形式能与细胞表面的 TGF-β 受体相互作用并产生信号传导。

TGF-β 细胞因子有着相同的三级结构,而且在成熟区域中,7 个半胱氨酸的间隔在 TGF-β 家族成员间几乎都相同。

受体和信号转导

TGF-β 受体在大多数细胞表面广泛分布和表达,这些细胞包括淋巴样细胞和造血细胞。基于它们对射

线标记的 TGF-β 亲和力的高低,将 TGF-β 受体分为三种类型。同时,根据它们分子质量大小分别为 53、70～80,200～300kDa,分别命名为Ⅰ型、Ⅱ型和Ⅲ型受体[372,385,386]。Ⅰ型和Ⅱ型受体是跨膜蛋白,有 1 个相对较短,但富含半胱氨酸的胞外区,1 个疏水的跨膜螺旋以及 1 个具有丝氨酸和苏氨酸激酶活性的胞质区。Ⅰ型或Ⅱ型受体的抗体在存在的配体发生交联后,能使两种受体发生免疫共沉淀。经诱导发生突变的细胞系的研究表明,Ⅱ 型受体与配体的结合效率高,但是Ⅰ型受体与配体仅在Ⅱ型受体存在时下才结合[387]。对这些不具实际意义的受体的使用表明,不管是Ⅰ型还是Ⅱ型受体的同型二聚体都无法 产生生物效应[388]。因此,与Ⅱ 型受体结合的配体能诱导构像的改变,从而促使 I 型受体复原以形成一个异二聚体受体复合物[389～391]。Ⅱ型受体是一种组成型的活性激酶,能发生磷酸化并且激活Ⅰ型受体,然后将信号传递到细胞内。

802

除了信号受体外,许多细胞表达Ⅲ 型受体,Ⅲ 型受体也被称为 β 多聚糖以及一系列的亚型特异性的 TGF-β 结合蛋白。β 多聚糖是一种蛋白多糖,含有大量的细胞外结构域,1 个穿膜结构域以及 1 个较短的胞质内的未知信号基序。它能够通过其细胞外的氨基葡糖多聚糖链与细胞外基质相互作用。β 多聚糖能以相同的亲和力(K_d = 50 ～ 500 pmol/L)与 TGF-β 的 3 个亚型结合。细胞表面有许多的Ⅲ型受体(最少 20 000 个/细胞),它们的功能就是将 TGF-β 呈递给信号受体。因此,信号受体与 β 多聚糖联合后,其与 TGF-β 的亲和力会增加 20 倍。相反,尽管有些细胞表达少量的Ⅰ型和Ⅱ 型受体(200～2000 个/细胞),但是受体与 TGF-β1 和 TGF-β2 的亲和力却很高(K_d = 3 ～ 30 pmol/L)。

其他 TGF-β 结合蛋白包括 endoglin、核心蛋白多糖、α2 巨球蛋白以及血小板凝血酶敏感蛋白等。这些蛋白能调整进入信号受体复合物的配体。endoglin 是一种膜锚定蛋白多糖,其结构与 β 多聚糖非常相似,在内皮细胞和肾小球系膜细胞中高度表达,仅与 TGF-β1 和 TGF-β3 结合,不与 TGF-β2 结合。血小板凝血酶敏感蛋白能激活潜在 TGF-β,而且人肿瘤 p53 突变导致血小板凝血酶敏感蛋白的减少,将对肿瘤的发生起一定的作用[392]。TGF-β 受体与二聚体配体结合后将很快被抑制。信号转导途径并未完全弄清楚,但是 2 个信号传递者 Smad2 和 DPC4 已经被确定[393]。Smad 是一群在进化上比较保守的蛋白,被认为是骨形态生成蛋白(BMP)受体的关键调解者和 TGF-β 亚家族成员的激活素。1 个相关蛋白、DPC4、1 个肿瘤抑制剂的基因产物,也可以协调 TGF-β 的活动,并从人乳腺癌细胞系(MDA-MB468)的共转染实验中可以得到证实。在加入 TGF-β10 分钟内,Smad2 磷酸化,然后与 DPC4 形成复合物。Smad2 和 DPC4 这种异二聚体复合物的核易位,将导致特异性的 TGF-β 反应。删除某些癌症细胞的 DPC4 将会使 TGF-β 的这条信号转导途径失活。在静止的 B 淋巴细胞瘤中,TGF-β1 能诱导产生 IkBα,从而抑制 NF-κB/Rel 的活性。这种对 NF-κB/Rel 的下调将降低 c-myc 的表达,从而导致这些 B 细胞凋亡从而对 TGF-β 产生应答[394]。

免疫学活性

TGF-β 能产生多种抗细胞效应,效应的产生依赖于细胞的类型、应答细胞的成熟和分化情况以及局部生理、细胞环境。因此,从整体水平来看,它抑制免疫系统;但是从局部水平来看,它刺激免疫应答和炎症反应[395,396]。

TGF-β 的免疫抑制效应在靶向性破坏 TGF-β1 基因的缺陷型小鼠中可以得到证实[375,376]。这些小鼠许多器官中出现大量白细胞浸润的多种炎症反应,同时伴有 TNF-α、IFN-γ、MIP-1α 以及 MHCI 、Ⅱ类抗原的减少,最后导致小鼠在 3～5 周后死亡。TGF-β 缺陷的小鼠也表现出循环系统出现高水平的自身抗体,同样的现象也出现在具有自身免疫性缺陷的 MRP/lpr 小鼠中,而且伴有 IgG 沉积在小鼠的肾小球血管中。因此 TGF-β1 在正常情况下是作为一种活性炎症抑制剂发挥作用。

TGF-β 能抑制 T、B 细胞以及单核细胞、巨噬细胞的增殖和分化[372,397]。它能抑制成熟 B 细胞分泌免疫球蛋白,但是却可以促进免疫球蛋白向 IgA 型转化的发生[398]。TGF-β 也能抑制细胞毒性 T 细胞的产生以及 NK 细胞和 LAK 细胞的活性[399]。TGF-β 能抑制丝裂原诱导的 IFN-γ、IL-2、IL-3、GM-CSF 以及 TNF-α 的合成。TGF-β 通过抑制骨髓干细胞的增殖来抑制造血功能,并且能下调造血细胞表面 SCF400、IL-3 以及 GM-CSF 的表达。TGF-β 能通过降低巨噬细胞释放过氧化物和氮氧化物的能力而使其失活,并且抑制它们的细胞毒性,下调其 MHCⅡ类分子的表达,抑制 TNF-α、IL-1 的产生,并对抗这些细胞因子产生的效应[401]。一些调节性 T 细

胞能通过非特异性抗原的形式抑制正在进行的炎症反应。TGF-β也可以通过下调内皮细胞表面的内皮细胞选择素和IL-8来抑制炎症反应,从而抑制通过细胞因子激活的内皮细胞介导的中性粒细胞和淋巴细胞的黏附和迁徙[402]。

TGF-β也可以提高口腔的免疫耐受[403]。通过口服抗原(髓磷脂碱性蛋白)给药的多发性硬化症患者体内会产生抗原特异性的、并且分泌TGF-β1的Th3细胞[404]。口腔耐受最基本的机制之一就是通过诱导肠相关淋巴组织来源的调节性T细胞来激活免疫抑制。Th3细胞分泌TGF-β、IL-4以及IL-10,这些都能下调Th1以及其他的免疫细胞。

在炎症部位以及组织伤口处,TGF-β能诱导中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞、肥大细胞以及纤维母细胞的趋化现象的发生[405,406];激活这些细胞产生促炎因子(IL-1,TNF,IL-6)并且促进白细胞黏附在血管壁和细胞外基质[407]。

其他活性

TGF-β是一种联系组织细胞的刺激剂,同时也是组织修复的潜在调节子和伤口愈合的促进子,这种作用主要在于它具有刺激细胞外基质中出现沉淀,而沉淀的产生又基于基质蛋白的合成增加和基底膜降解的减少,而这些现象的产生主要是由于蛋白水解酶的合成减少以及蛋白酶抑制物合成的增加造成。TGF-β也能促进整合素受体的合成增加,从而增强细胞和细胞外基质的相互作用。由于TGF-β有调节细胞外基质和免疫系统的作用,因此TGF-β被认为是一种在许多慢性炎症中发挥作用的因子,这些慢性炎症包括风湿性关节炎、血管球性肾炎、肺纤维素性炎、全身性硬化症以及慢性肝炎[408]。在自身免疫性缺陷的MPR/lpr小鼠中,TGF-β1与IgG形成复合物在血浆中循环,而且某些SLE患者,在体外抑制中性粒细胞的功能以及体内抑制宿主对金黄色葡萄球菌抵抗力的方面,结合了IgG的活性的TGF-β比没有结合的作用效果要高500倍[409]。

TGF-β在胚胎期和发育中的重要调节作用,已被TGF-β3缺陷小鼠出现的肺的不正常发育和腭裂等现象所证实[377,410]。因此,TGF-β3能控制间质细胞和上皮细胞的相互作用以及调节细胞的分化和增殖。它能促进间质细胞的生长,但却是大多数其他类型细胞生长的抑制物,这些细胞包括上皮细胞、内皮细胞、淋巴细胞、造血干细胞。许多研究表明TGF-β1能通过防止前体细胞的凋亡在体外促进来源于造血干细胞的树突细胞的发育[411],而且外源性TGF-β1对正常小鼠的朗格汉斯细胞的发育和内皮细胞的定位也是必不可少的[412]。

803

由于TGF-β具有强烈的抑制增殖效应,因此它通常作为人恶性肿瘤抑制剂而发挥作用[413]。然而,癌细胞通过多种机制对TGF-β的抵抗在肿瘤的进程中较晚发生,这些机制包括TGF-β受体的突变、细胞信号的缺陷以及改变细胞与基质外细胞的相互作用等。TGF-β正常情况下是以0.1~6.3 ng/ ml存在于血清中,但是在肾细胞癌患者的血清中含量会升高,在前进性脂肪沉滞性动脉硬化症中会低于正常水平[415]。

TGF-β在生长、发育以及同源异型免疫原性的维持中的重要性可以通过对TGF-β1和TGF-β3缺陷小鼠的研究中得到证实。它是炎症反应的关键抑制剂,缺乏它将导致自身免疫性疾病,而且它能下调免疫优势部位的免疫活性,如眼。TGF-β还能抑制肿瘤的生长,然而TGF-βⅡ型受体的突变失活将对肿瘤的生长和进展起一定的作用。

白细胞介素-16(IL-16)

IL-16是在1982年作为一种外周血单核细胞来源的$CD4^+$ T淋巴细胞趋化因子(LCF)而检测到的[416]。它的结构与趋化因子的结构截然不同,其活性结构是由4条分子质量为16.3kDa的多肽链形成的同型四聚体形式。其mRNA在$CD4^+$和$CD8^+$的T细胞中组成型表达。IL-16也可以由$CD4^+$的T细胞、肥大细胞以及嗜酸性粒细胞产生。IL-16的分泌主要是对血清素,组胺以及丝裂原激活的淋巴细胞产生应答。在细胞内可以检测到的IL-16分子质量为90kDa的前体形式,前体形式切除C端得到单体形式。IL-16并没有引导序列,

其基因主要位于人的 15q26.1 染色体上，而且在灵长目动物和啮齿动物中其基因具有高度的保守性。人工合成与 IL-16 C 端疏水性区域相似的多肽以及抗 C 端疏水区域的抗血清都会抑制 IL-16 的功能，这表明 C 端的这个区域在 IL-16 与受体的相互作用中发挥着作用。

有许多线索表明 CD4 可能是 IL-16 的一个受体。抗 CD4 的单价 Fab 能抑制 IL-16 的功能。小鼠和大鼠 IL-16 对人 $CD4^+$ T 细胞的趋化活性能被可溶性 CD4 所阻断；相反，用人 CD4 转染的小鼠 T 细胞杂交瘤能使细胞发生迁移以对 IL-16 产生应答。对 IL-16 诱导的信号传导的研究表明 p56 lck417 发挥着重要的作用[417]。渥曼青霉素，一个磷脂酰肌醇 3-激酶(I3P)选择性抑制剂，能阻断 IL-16 诱导的趋化现象，正如 PKC 的选择性抑制剂一样。然而 CD4 可能并不是 IL-16 的惟一受体，因为 IL-16 的激活也具有 PT 敏感性，从而表明有 Gi 蛋白信号的参与。

IL-16 对静止和激活的 T 细胞、嗜酸性粒细胞以及单核细胞都具有趋化性。IL-16 能促进 $CD4^+$ T 细胞的黏附，IL-2Rα(CD25)、HLA-DR 的表达以及细胞因子(IL-3、GM-CSF 以及 IFN-γ)的生成。IL-16 能抑制抗原和异型抗原诱导的淋巴细胞的增殖[418]，而且能抑制 HIV 和猿免疫缺陷病毒的复制[419]。然而，与趋化因子不同，IL-16B 并不是通过竞争性地与 HIVgp120 的结合位点结合而发挥抑制作用，它是作为一种有效的生存因子以及对抗诱导生长的细胞因子如 IL-2 的凋亡效应而发挥作用[416]。在气管、支气管的上皮细胞以及哮喘患者的痰液中可以检测到 IL-16，而其产生主要由组胺所诱导，而且 IL-16 能使变态反应加重。通过免疫组化技术，在良性淋巴肉芽肿病和分枝杆菌引起的肺结核患者的肉芽肿中，可以检测到高水平的 IL-16。这些研究表明 IL-16 可能是一种促炎因子和免疫调节因子。

白细胞介素-17 (IL-17)

小鼠的 IL-17 最早通过杂交分离技术从激活的 T 细胞杂交瘤中分离出来，并命名为鼠 CTL 相关抗原-8 (mCTL-8)[420]。由 150 个氨基酸组成的 CTLA-8 又被重新命名为 IL-17，因为它表现出许多与细胞因子相似的性质，如在疏水性的 N 端有 1 个信号肽，在 3′端 UTR 区有与 mRNA 稳定性相关的 AU 丰富区反复出现。人和啮齿目动物中 CLTA-8 的表达仅局限在记忆性 $CD4^+$ 的 T 细胞中，而且 CLTA-8 可以诱导上皮细胞、内皮细胞以及纤维母细胞激活 NF-κB，并产生 IL-6、IL-8、G-CSF 以及 PGE_2，但不会产生 IL-1 或 TNF[421,422]。有一种“病毒因子”，它与 IL-17 在氨基酸序列上具有 57%的同源性，并且功能也非常相似，这种“病毒因子”被确定为松鼠猴属疱疹病毒的 ORF13。IL-17 位于小鼠 1A 染色体上和人的 2q31 染色体。小鼠中，IL-17 的受体已被克隆出来，并且在各种基质细胞中以比配体更广泛的形式表达[423]。IL-17 能够诱导纤维母细胞更好地支持 $CD34^+$ 前体细胞的生长和分化。因此 IL-17 被认识是一种基质细胞促炎作用的诱导者和血细胞生成的诱导因子。

迁移抑制因子

我们以回顾迁移抑制因子(MIF)的状况来结束这一章是非常合适的。MIF 是一种淋巴细胞来源的活性细胞因子，30 年前作为一种巨噬细胞移动的抑制剂而被发现[424,425]。以前将这些现象归因于 IFN-γ 和 IL-4 的作用，直到 1989 年，John David 及其同事克隆并通过测序分析发现了一种新的分子 MIF，它在凝集素存在的情况下，仍能抑制巨噬细胞的移动[426]。然而，我们发现这种新克隆出来的活性 MIF 具有自己的一些奇怪而又独特的属性[427]。研究者同时也发现 MIF 是一种 LPS 诱导的、由小鼠垂体细胞系(AtT-20)分泌的分子质量为 12.5kDa 的产物。MIF 以一定的数量储存在垂体前细胞中，如同 ACTH 一样，被促皮质素释放因子(CRF)释放。给啮齿动物以 LPS7 会启动一种紧张反应从而导致垂体的颗粒内含物释放，并且使血浆中 MIF 水平从正常的 10～15ng/ml 提高到 50ng/ml。这种释放可以因垂体摘除而被阻断，但却能将 MIL 储存到外周血中的单核细胞和 T 细胞以及其他的 MIF 来源的细胞中。

体外和体内实验表明 MIF 是一种促炎细胞因子。MIF 通过刺激巨噬细胞诱导 TNF-α 的产生，而 TNF-α

反过来又能诱导 MIF 的释放。进一步的研究表明，MIF 能使 IFN-γ 诱导的鼠巨噬细胞产生 NO 成为可能。研究表明，将 MIF 和 LPS 同时注射入小鼠中将加重致死性内毒素血症，然而具有中和能力的抗 MIF 抗体能使老鼠具有对抗注入致死剂量的 LPS 能力。抗 MIF 抗体能使 LPS 诱导的 TNF-α 循环降低 35%。MIF 的 mRNA 和蛋白在迟发型超敏反应(DTH)的发生部位显著表达，而且抗 MIF 抗体能降低小鼠 DTH 的发展。然而出人意料之外的是糖皮质激素(GC)能直接诱导单核细胞 MIF 的释放。因此，MIF 是一种独特的促炎因子，能被 GC 诱导而释放而不是被 GC 抑制，MIF 可能是作为 GC 的负调控子而发挥作用。事实上，从剂量依赖方面来看，MIF 能消除 GC 诱导的对单核细胞和 LPS 共培养产生的 TNF-α、IL-1β、IL-6 以及 IL-8 的抑制效应。相反，抗 MIF 抗体能使 GC 对 LPS 诱导产生的 TNF-α 的抑制效应成为可能。MIF 也能消除 GCs 对抗原和多克隆抗体刺激的 T 细胞的抗增殖效应。MIF 还能阻断 GCs 对 LPS 致命性损伤小鼠的保护效应。

MIF 这些基本活性的机制并未完全弄清楚。MIF 含有增强子、启动子基序的基因能够与转录因子如 NFKB、Ck-1、nGRE 以及 CREB 结合。而且 MIF 似乎具有酶的活性，并能催化异构效应。人 MIF 晶体的三维结构表明 MIF 有独特的、由 3 个相同亚单位组成的三聚体结构。目前还没有有关 MIF 受体的报道。尽管，以上的研究并没有对 MIF 各种活性给予清晰鉴定，但是这些研究将会使一种令人着迷的、宿主防御反应的调控子得到鉴别。

结论

总之，概括说明这些不同的促炎因子是一件具有挑战性的工作。然而，我们必须强调，尽管我们分别总结了不同因子的特性，但是它们实际上是与体内存在的许多其他介质和激素协同发挥作用。因此，有时候很难通过这些细胞因子的体外活动来区分它们在体内发挥的作用。这些细胞因子很容易相互发挥作用，从而使它们的网络效应发生显著改变。IL-1、TNF 以及 IL-6 的相互作用是一个经典的例子，这些细胞因子并不仅仅是一个诱导另一个的产生，而且也互相配合，从而导致它们对病理生理反应的影响得到放大。进一步的研究表明，敲除细胞因子表型基因的小鼠表现出来的缺陷通常比预测的要少得多，这主要是因为大量细胞因子的校正效应，另一方面，这些现象也表明一些意想不到的细胞因子也在发挥作用如 LTα。体内实验的一些事实也许很陈旧但却是事实，而且在体实验为一些基本细胞因子的功能提供了数据，同时也为治疗性细胞因子的抑制剂和拮抗剂提供了重要的模型。

致谢

我们对 Adit Ben-Baruch, Michael Grimm, O.M. Zach Howard, Dennis Taub, Sergei Nedospasov, Scott Durum 以及 Ji Ming Wang 博士提出的建设性意见以及 Cheryl Fogle 和 Ilene Totillo 细致的秘书性协助工作表示深深的谢意。

（邹丽云　贾正才 译）

参 考 文 献

Selected TNF Family

1. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3666–3670.
2. Beutler B, Mahoney J, LeTrang N, Pekala P, Cerami A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* 1985;161:984–995.
3. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984;312:724–729.
4. Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, et al. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1985;260:2345–2354.
5. Ruddle NH, Waksman BH. Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity. 3. Analysis of mechanism. *J Exp Med* 1968;128:1267–1279.
6. Granger GA, Williams TW. Lymphocyte cytotoxicity in vitro: activation and release of a cytotoxic factor. *Nature* 1968;218:1253–1254.
7. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996;334:1717–1725.

8. Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, et al. Lymphotoxin β, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* 1993;72:847–856.
9. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1989;169:1747–1756.
10. Trauth BC, Klas C, Peters AM, et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989;245:301-305.
11. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991;66:233–243.
12. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3: 673–682.
13. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997;276:111–113.
14. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 1994;12:881–922.
15. Ware CF, VanArsdale S, VanArsdale TL. Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families. *J Cell Biochem* 1996;60:47–55.
16. Baker SJ, Reddy EP. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 1996;12:1–9.
17. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355–365.
18. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993;74:845–853.
19. Casaccia-Bonnefil P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 1996;383:716–719.
20. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, et al. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 1996;274: 990–992.
21. Kitson J, Raven T, Jiang Y-P, et al. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 1996;384:372–375.
22. Brojatsch J, Naughton J, Rolls MM, Zingler K, Young JAT. CAR1, a TNFR-related protein, is a cellular receptor for cytopathic avian leukosis-sarcoma viruses and mediates apoptosis. *Cell* 1996;87:845–855.
23. Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 1996;87:427–436.
24. Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, et al. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6216–6221.
25. Bodmer J-L, Burns K, Schneider P, et al. TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity* 1997;6:79–88.
26. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309–319.
27. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985;13:6361–6373.
28. Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D, Strominger JL. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8699–8702.
29. Nedospasov SA, Hirt B, Shakhov AN, et al. The genes for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) are tandemly arranged on chromosome 17 of the mouse. *Nucleic Acids Res* 1986;14:7713–7725.
30. Muller U, Jongeneel CV, Nedospasov SA, Lindahl KF, Steinmetz M. Tumour necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. *Nature* 1987;325:265–267.
31. Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV. kB-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor α gene in primary macrophages. *J Exp Med* 1990;171:35–47.
32. Kuprash DV, Udalova IA, Turetskaya RL, Rice NR, Nedospasov SA. Conserved kB element located downstream of the tumor necrosis factor α gene: distinct NF-kB binding pattern and enhancer activity in LPS activated murine macrophages. *Oncogene* 1995;11:97–106.
33. Han J, Thompson P, Beutler B. Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J Exp Med* 1990;172:391–394.
34. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195 3199.
35. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449–1456.
36. Grell M, Douni E, Wajant H, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995;83:793–802.
37. Moss ML, Jin S-L, Milla ME, et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-α. *Nature* 1997;385:733–736.
38. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-α from cells. *Nature* 1997;385:729–733.
39. Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNFα and notch. *Cell* 1997;90:589–592.
40. Smith RA, Baglioni C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 1987;262:6951–6954.
41. Jones EY, Stuart DI, Walker NP. Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 1989;338:225–228.
42. Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-α at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 1989;264:17595–17605.
43. Banner DW, D Arcy A, Janes W, et al. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF β complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 1993;73:431–445.
44. Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, et al. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* 1984; 312:721–724.
45. Androlewicz MJ, Browning JL, Ware CF. Lymphotoxin is expressed as a heteromeric complex with a distinct 33-kDa glycoprotein on the surface of an activated human T cell hybridoma. *J Biol Chem* 1992;267:2542–2547.
46. Crowe PD, VanArsdale TL, Walter BN, et al. A lymphotoxin-β-specific receptor. *Science* 1994;264:707–710.
47. Tanaka M, Suda T, Haze K, et al. Fas ligand in human serum. *Nat Med* 1996;2: 317–322.
48. Neta R, Sayers TJ, Oppenheim JJ. Relationship of TNF to interleukins. In: Aggarwal BB, Vilcek J, eds. *Tumor necrosis factors: structure, function, and mechanism of action*. New York: Marcel Dekker Inc, 1992:499–566.
49. Turetskaya RL, Fashena SJ, Paul NL, Ruddle NH. Genomic structure, induction, and production of TNF-β. In: Aggarwal BB, Vilcek J, eds. *Tumor necrosis factors: structure, function, and mechanism of action*, vol 56.New York: Marcel Dekker Inc, 1992:35–60.
50. Ware CF, Crowe PD, Grayson MH, Androlewicz MJ, Browning JL. Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. *J Immunol* 1992;149:3881–3888.
51. Millet I, Ruddle NH. Differential regulation of lymphotoxin (LT), lymphotoxin-β (LT-β), and TNF-α in murine T cell clones activated through the TCR. *J Immunol* 1994;152:4336–4346.
52. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348–2357.
53. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;270: 1189–1192.
54. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995;377:630–632.
55. MacKay F, Bourdon PR, Griffiths DA, et al. Cytotoxic activities of recombinant soluble murine lymphotoxin-α and lymphotoxin-α/β complexes. *J Immunol* 1997;159:3299–3310.
56. Loetscher H, Pan Y-CE, Lahm H-W, et al. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1990;61:351–359.
57. Schall TJ, Lewis M, Koller KJ, et al. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 1990;61:361–370.
58. Smith CA, Davis T, Anderson D, et al. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 1990;248: 1019–1023.
59. Dembic Z, Loetscher H, Gubler U, et al. Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine* 1990;2: 231–237.
60. Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by γ-interferon. *Nature* 1985;318: 665–667.
61. Tsujimoto M, Yip YK, Vilcek J. Interferon-γ enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986;136:2441–2444.
62. Owen-Schaub LB, Crump Wd, Morin GI, Grimm EA. Regulation of lymphocyte tumor necrosis factor receptors by IL-2. *J Immunol* 1989;143:2236–2241.
63. Tsujimoto M, Oku N. Regulation of TNF receptors. In: Aggarwal BB, Vilcek J, eds. *Tumor necrosis factors: structure, function, and mechanism of action*, vol. 56. New York: Marcel Dekker Inc, 1992:149–160.
64. Aderka D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:231–240.
65. Engelmann H, Aderka D, Rubinstein M, Rotman D, Wallach D. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J Biol Chem* 1989;264:11974–11980.
66. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 1992; 175:323–329.
67. Engelmann H, Holtmann H, Brakebusch C, et al. Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity. *J Biol Chem* 1990;265:14497–14504.
68. Tartaglia LA, Goeddel DV, Reynolds C, et al. Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol* 1993;151:4637–4641.
69. Smith DM, Tran HM, Soo VW, et al. Enhanced synthesis of tumor necrosis factor-inducible proteins, plasminogen activator inhibitor-2, manganese superoxide dismutase, and protein 28/5.6, is selectively triggered by the 55-kDa tumor

necrosis factor receptor in human melanoma cells. *J Biol Chem* 1994;269: 9898–9905.

70. Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel DV. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 1993;73:213–216.
71. van der Poll T, Jansen PM, Van Zee KJ, et al. Tumor necrosis factor-α induces activation of coagulation and fibrinolysis in baboons through an exclusive effect on the p55 receptor. *Blood* 1996;88:922–927.
72. Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992;13: 151–153.
73. Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem* 1993;268:18542–18548.
74. Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 1993;268:10932–10937.
75. Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1994;78:681–692.
76. Darnay BG, Aggarwal BB. Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *J Leukoc Biol* 1997;61:559–566.
77. Takeuchi M, Rothe M, Goeddel DV. Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J Biol Chem* 1996;271:19935–19942.
78. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kB activation. *Cell* 1995;81:495–504.
79. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81:505–512.
80. Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 1995;270:7795–7798.
81. Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 1995;81:513–523.
82. Duan H, Dixit VM. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 1997;385: 86–89.
83. Wallach D. Cell death induction by TNF: a matter of self control. *TIBS* 1997;22: 107–109.
84. Ting AT, Pimentel-Muinos FX, Seed B. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-κB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J* 1996;15:;6189-6196.
85. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NK-kB in preventing TNF-α-induced cell death. *Science* 1996;274:782–784.
86. Liu Z-G, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kB activation prevents cell death. *Cell* 1996;87:565–576.
87. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 1991;266:7313–7316.
88. Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D. MAP3K-related kinase involved in NF-kB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 1997;385: 540–544.
89. Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M. Identification and characterization of an IkB kinase. *Cell* 1997;90:373–383.
90. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive IkB kinase that activates the transcription factor NF-kB. *Nature* 1997;388:548–554.
91. Baldwin AS Jr. The NF-kB and I kB proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649–683.
92. Cano E, Mahadevan LC. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci* 1995;20:117–122.
93. Vietor I, Schwenger P, Li W, Schlessinger J, Vilcek J. Tumor necrosis factor-induced activation and increased tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1993;268: 18994–18999.
94. Van Lint J, Agostinis P, Vandevoorde V, et al. Tumor necrosis factor stimulates multiple serine/threonine protein kinases in Swiss 3T3 and L929 cells. Implication of casein kinase-2 and extracellular signal-regulated kinases in the tumor necrosis factor signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1992;267: 25916–25921.
95. Minden A, Lin A, Smeal T, et al. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 1994;14:6683–6688.
96. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, et al. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 1994;369:156–160.
97. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995;270:7420–7426.
98. Natoli G, Costanzo A, Ianni A, et al. Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Science* 1997;275: 200–203.
99. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994;372:739–746.
100. Lin L-L, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. cPLA$_2$ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 1993;72:269–278.
101. Read MA, Whitley MZ, Gupta S, et al. Tumor necrosis factor α-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 1997;272: 2753–2761.
102. Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, et al. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis in response to tumour necrosis factor. *EMBO J* 1996;15:1914–1923.
103. Kolesnick R, Golde DW. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* 1994;77:325–328.
104. Kim MY, Linardic C, Obeid L, Hannun Y. Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *J Biol Chem* 1991; 266:484–489.
105. Adam-Klages S, Adam D, Wiegmann K, et al. FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* 1996;86: 937–947.
106. Heller RA, Krönke M. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J Cell Biol* 1994;126:5–9.
107. Verheij M, Bose R, Lin XH, et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996;380:75–79.
108. Yao B, Zhang Y, Delikat S, Mathias S, Basu S, Kolesnick R. Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature* 1995;378:307–310.
109. Muller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K. PKC ζ is a molecular switch in signal transduction of TNF-α, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J* 1995;14:1961–1969.
110. Gamard CJ, Dbaibo GS, Liu B, Obeid LM, Hannun YA. Selective involvement of ceramide in cytokine-induced apoptosis. Ceramide inhibits phorbol ester activation of nuclear factor kB. *J Biol Chem* 1997;272:16474–16481.
111. Zumbansen M, Stoffel W. Tumor necrosis factor α activates NF-kB in acid sphingo-myelinase-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 1997; 272:10904–10909.
112. Pasparakis M, Alexopoulou L, Douni E, Kollias G. Tumour necrosis factors in immune regulation: everything that's interesting is...new. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:223–229.
113. Zhang Y, Harada A, Bluethmann H, et al. Tumor necrosis factor (TNF) is a physiologic regulator of hematopoietic progenitor cells: increase of early hematopoietic progenitor cells in TNF receptor p55-deficient mice in vivo and potent inhibition of progenitor cell proliferation by TNF alpha in vitro. *Blood* 1995;86: 2930–2937.
114. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-α function. *Nature* 1997; 389:610–614.
115. Le Hir M, Bluethmann H, Kosco-Vilbois MH, et al. Differentiation of follicular dendritic cells and full antibody responses require tumor necrosis factor receptor-1 signaling. *J Exp Med* 1996;183:2367–2372.
116. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF α in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996;184:1397–1411.
117. Matsumoto M, Mariathasan S, Nahm MH, Baranyay F, Peschon JJ, Chaplin DD. Role of lymphotoxin and the type I TNF receptor in the formation of germinal centers. *Science* 1996;271:1289–1291.
118. Banks TA, Rouse BT, Kerley MK, et al. Lymphotoxin-α-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J Immunol* 1995;155:1685–1693.
119. De Togni P, Goellner J, Ruddle NH, et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 1994;264:703–707.
120. Koni PA, Sacca R, Lawton P, Browning JL, Ruddle NH, Flavell RA. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins α and β revealed in lymphotoxin β-deficient mice. *Immunity* 1997;6:491–500.
121. Alimzhanov MB, Kuprash DV, Kosco-Vilbois MH, et al. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin β-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9302–9307.
122. Bluethmann H. Physiological, immunological and pathological functions of TNF revealed by TNF deficient mice. In: Durum SK, Muegge K, eds. Contemporary immunology: cytokine knockouts. Totowa, NJ: Humana Press, 1998:69–88.
123. Rubin BY. TNF and viruses: multiple interrelationships. In: Aggarwal BB, Vilcek J, eds. *Tumor necrosis factors: structure, function, and mechanism of action.* New York: Marcel Dekker Inc, 1992:331–340.
124. Upton C, Macen JL, Schreiber M, McFadden G. Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology* 1991;184:370–382.
125. Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, et al. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med* 1989;320:1586–1591.
126. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987;330:662–664.
127. Erickson SL, de Sauvage FJ, Kikly K, *et al. Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice.*

Nature 1994;372:560–563.
128. Matsumoto M, Fu YX, Molina H, Chaplin DD. Lymphotoxin-α-deficient and TNF receptor-I-deficient mice define developmental and functional characteristics of germinal centers. *Immunol Rev* 1997;156:137–144.
129. Marino MW, Dunn A, Grail D, et al. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8093–8098.
130. Pasparakis M, Alexopoulou L, Grell M, Pfizenmaier K, Bluethmann H, Kollias G. Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6319–6323.
131. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991;10: 4025–4031.
132. Probert L, Plows D, Kontogeorgos G, Kollias G. The type I interleukin-1 receptor acts in series with tumor necrosis factor (TNF) to induce arthritis in TNF-transgenic mice. *Eur J Immunol* 1995;25:1794–1797.
133. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996;14:397–440.
134. Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M, et al. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol* 1997;27: 1743–1750.
135. van Deventer SJ, Camoglio L. Monoclonal antibody therapy of inflammatory bowel disease. *Pharm World Sci* 1997;19:55–59.
136. Yang XD, Tisch R, Singer SM, et al. Effect of tumor necrosis factor alpha on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process. *J Exp Med* 1994;180:995–1004.
137. Cope AP, Liblau RS, Yang XD, et al. Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T cell receptor signaling. *J Exp Med* 1997;185: 1573–1584.
138. Naylor MS, Stamp GW, Foulkes WD, Eccles D, Balkwill FR. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J Clin Invest* 1993;91:2194–2206.
139. Eggermont AM, Schraffordt Koops H, Klausner JM, et al. Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas. The cumulative multicenter European experience. *Ann Surg* 1996;224:756–764.
140. Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, Ruddle NH. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J Exp Med* 1996;183: 1461–1472.
141. Wallach D. Suicide by order: some open questions about the cell-killing activities of the TNF ligand and receptor families. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7:211–221.
142. Okura T, Gong L, Kamitani T, et al. Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol* 1996; 157:4277–4281.
143. Song HY, Dunbar JD, Zhang YX, Guo D, Donner DB. Identification of a protein with homology to hsp90 that binds the type 1 tumor necrosis factor receptor. *J Biol Chem* 1995;270:3574–3581.
144. Boldin MP, Mett IL, Wallach D. A protein related to a proteasomal subunit binds to the intracellular domain of the p55 TNF receptor upstream to its 'death domain'. *FEBS Lett* 1995;367:39–44.
145. Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 1995;269:1424–1427.
146. Opipari AW Jr, Boguski MS, Dixit VM. The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J Biol Chem* 1990; 265:14705–14708.
147. Song HY, Rothe M, Goeddel DV. The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kB activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6721–6725.
148. Rothe M, Xiong J, Shu HB, Williamson K, Goddard A, Goeddel DV. I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8241–8246.
149. Cheng G, Baltimore D. TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kB activation. *Genes Dev* 1996;10:963–973.
150. Lee SY, Lee SY, Choi Y. TRAF-interacting protein (TRIP): a novel component of the tumor necrosis factor receptor (TNFR)- and CD30-TRAF signaling complexes that inhibits TRAF2-mediated NF-kB activation. *J Exp Med* 1997;185: 1275–1285.
151. Irmler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190–195.
152. Shu H-B, Halpin DR, Goeddel DV. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 1997;6:751–763.

Selected IL-1 Family

153. Gery I, Gershon RK, Waksman BH. Potentiation of the T lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J Exp Med* 1972;136:128–138.
154. Dinarello CA. Biologic basis for Interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87: 2095–2147.
155. Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 1993;54:167–227.
156. Durum SK, Schmidt JA, Oppenheim JJ. Interleukin 1: an immunological perspective. *Annu Rev Immunol* 1986;3:263–287.
157. Seckinger P, Lowenthal JW, Williamson K, Dayer JM, MacDonald JR. A urine inhibitor of interleukin 1 activity that blocks ligand binding. *J Immunol* 1987; 139:1546–1552.
158. Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, et al. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:7907–7911.
159. LoMedico PT, Gubler U, Hellmann CP, et al. Cloning and expression of murine interleukin 1 cDNA in Escherichia coli. *Nature* 1984;312:458–462.
160. Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, et al. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 1990;343:341–343.
161. Carter DB, Deibel MR, Dunn CJ, et al. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 1990;344:633.
162. Tsukada J, Saito K, Waterman WR, Webb AR, Auron PE. Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 β gene. *Mol Cell Biol* 1994;14:7285–7291.
163. Hatzigeorgiou DE, Geng J, Zhu B et al. Lipophosphoglycan from leishmania suppresses agonist-induced IL-1β gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14708–14713.
164. Smith MF, Eidlen D, Brewer MT, Eisenberg SP, Arend WP, Gutierrez-Hartmann, A. Human IL-1 receptor antagonist promoter: cell type-specfic activity and identification of regulatory regions. *J Immunol* 1992;149:2000–2006.
165. Kern JA, Warnock LJ, McCafferty JD. The 3′ untranslated region of IL-1β regulates protein production. *J Immunol* 1997;58:1187–1193.
166. Koyabashi Y, Appella E, Yamada M, Copeland TD, Oppenheim JJ, Matsushima K. Phosphorylation of intracellular precursors of human IL-1. *J Immunol* 1988; 140:2279–2284.
167. Brody DT, Durum SK. Membrane IL1: IL1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. *J Immunol* 1989;143:1183–1188.
168. Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, et al. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5227–5231.
169. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, et al. A novel heterodimeric cystein protease is required for interleukin-1beta processing in monocytes. *Nature* 1992, 356:768–774.
170. Singer II, Scott S, Chin J et al. The IL-1β-converting enzyme (ICE) is localized on the exernal cell surface membranes and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immuno-electron microscopy. *J Exp Med* 1995;182: 1447–1459.
171. Kuida K, Lipke JA, Ku G, et al. Altered cytokine export and apotosis in mice deficient in interleukin-1β converting enzyme. *Science* 1995;267:2000–2002.
172. Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad SCi USA* 1990;97:5548–5552.
173. Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, et al. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 1990;343:336–339.
174. Haskill S, Martin M, Van Le L, et al. cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3681–3685.
175. Muzio M, Polentarutti N, Sironi M, et al. Cloning and characterization of a new isoform of the IL-1 receptor antagonist. *J Exp Med* 1995;182:623–628.
176. Priestley JP, Schar HP, Grutter MG. Crystallographic refinement of interleukin-1 at 2.0 A resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9667–9671.
177. Hakim I, Levy S, Levy R. A nine-amino acid peptide from IL-1β augments antitumor immune responses induced by protein and DNA vaccines. *J Immunol* 1996;157:5503–5511.
178. Boraschi D, Bossu P, Ruggiero P, et al. Mapping of receptor binding sites on IL-1β by reconstruction of IL-1ra-like domains. *J Immunol* 1995;155:4719–4725.
179. Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 1994;8: 1314–1325.
180. Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest* 1991;88:1445–1451.
181. Kopp WC, Urba WJ, Rager HC, et al. Induction of interleukin-1 receptor antagonist after interleukin 1 therapy in patients with cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2: 501–506.
182. Roberge CJ, Poubelle PE, Beaulieu AD, Heitz D, Gosselin J. The IL-1 and IL-1 receptor anyagonist (IL-1Ra) response of human neutrophils to EBV stimulation. *J Immunol* 1996;156:4884–4891.
183. Zavala F, Rimaniol AC, Boussin F, Dormont D, Bach JF, Deschamps-Latscha B. HIV predominantly induces IL-1 receptor antagonist over IL-1 synthesis in human primary monocytes. *J Immunol* 1995;155:2784–2790.
184. Cannon JG, Dinarello CA. Increased plasma interleukin-1 activity in women after ovulation. *Science* 1985:227:1247–1250.
185. Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, et al. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock experimental endotoxin fever. *J Infect Dis* 1990;161:79–84.
186. Granowitz EV, Santos A, Poutsiaka DD, et al. Circulating interleukin-1 receptor antagonist levels during experimental endotoxemia in humans. *Lancet* 1991; 338:1423–1424.

187. Sims JE, March CJ, Cosman D, et al. Expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 1988;241:585–588.
188. McMahan CJ, Slack JL, Moslwy B, et al. A novel IL1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J* 1991;10:2821–2826.
189. Sims JE, Giri JG, Dower SK. The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72:9–14.
190. Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. The type II "decoy" receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today* 1994;15;562–566.
191. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin-1 receptor complex. *J Biol Chem* 1995;270:13757–13765.
192. Groves RW, Rauschmayr T, Nakamura K, Sarkar S, Williams IR, Kupper TS. Inflammatory and hyperproliferative skin disease in mice that express elevated levels of the IL-1 receptor (type I) on epidermal keratinocytes. *J Clin Invest* 1996;98:336–344.
193. Symons JA, Eastgate JA, Duff GW. Purification and characterization of a novel soluble receptor for interleukin 1. *J Exp Med* 1991;174:1251–1258.
194. Symons JA, Young PR, Duff GW. Soluble type II IL-1 receptor binds and blocks processing of IL-1β precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1714–1718.
195. Giri JG, Wells J, Dower SK, et al. Elevated levels of shed type II IL-1 receptor in sepsis. *J Immunol* 1994;153:5802–5807.
196. Spriggs MK, Hruby DE, Maliszewski CR, et al. Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1 binding protein. *Cell* 1992;71:145–152.
197. Alcami A, Smith GL. A soluble receptor for interleukin-1β encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 992;71:153–160.
198. Ray CA, Black RA, Kronheim SR, et al. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1β converting enzyme. *Cell* 1992;69:597–604.
199. Sims JE, Gayle MA, Slack JL, et al. Interleukin-1 signalling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6155–6160.
200. Lenardo MJ, Baltimore D. NF*K*B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 1988;58:227–229.
201. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-*K*B-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066–1071.
202. Chiu R, Boyle WJ, MeekJ, Smeal T, Hunter T, Karin M. The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 1988;54:541–549.
203. Guy GR, Chua SP, Wong NS, et al. Interleukin 1 and tumor necrosis factor activate common multiple protein kinases in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1991; 266:14343–14352.
204. Cao Z, Henzel WJ, Gao X. IRAK: a kinase associated with the interleukin 1 receptor. *Science* 1996;271:1128–1131.
205. Croston GE, Cao Z, Goeddel DV. NF-*k*B activation by IL-1 requires an IL-1 receptor-associated protein kinase activity. *J Biol Chem* 1995;270: 16514–16517.
206. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin 1. *Nature* 1996;383:443–446.
207. Saklatvala J, Davis W, Guesdon F. Interleukin 1 and tumor necrosis factor signal transduction. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci* 1996;351:151–157.
208. Kuno K, Matsushima K. The IL-1receptor signaling pathway. *J Leukoc Biol* 1994;56:542–547.
209. Kolesnick R, Golde DW. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signalling. *Cell* 1994;77:325–331.
210. Mathias S, Younes A, Kan CC, Orlow I, Joseph C, Kolesnick RN. Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1β. *Science* 1993;259:519–522.
211. Ridley SH, Sarfield SJ, Lee JC, et al. Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 1997;158:3165–3173.
212. Karmann K, Min W, Fanslow WC, Pober JS. Activation and hologous desensitization of human endothelial cells by CD40 ligand, tumor necrosis factor and interleukin 1. *J Exp Med* 1996;184:173–182.
213. Muegge K, Vila M, Gusella GL, et al. IL-1 induction of the c-jun promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7054–7057.
214. Muegge K, Williams TM, Kant J, et al. Interleukin 1 costimulatory activity on the interleukin 2 promoter via AP-1. *Science* 1989;246:249–252.
215. Rothenberg EV, Diamond RA, Pepper KA, Yang JA. IL-2 gene inducibility in T cells before T cell receptor expression. Changes in signaling pathways and gene expression requirements during intrathymic maturation. *J Immunol* 1990;144: 1614–1619.
216. Schmitt E, Beuscher HU, Huels C, et al. IL1 serves as a secondary signal for IL9 expression. *J Immunol* 1991;147:3848–3853.
217. Krakauer T, Oppenheim JJ. IL-1 and TNFα each up-regulate both the expression of IFNγ receptors and enhance IFNγ induced HLA-DR expression on human monocytes and a human monocytic cell line (THP-1). *J Immunol* 1993;150: 1205–1211.
218. Zuniga-Pflucker JC, Jiang D, Lenardo MJ. Requirement for TNF-α and IL-1α in fetal thymocyte commitment and differentiation. *Science* 1995;268:1906–1909.
219. Giri JG, Kincade PW, Mizel SB. Interleukin 1-mediated induction of kappa-light chain synthesis and surface immuno-globulin expression on pre-B cells. *J Immunol* 1984;132:223–227.
220. Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991;9:617–648.
221. Koide SL, Inaba K, Steinman RM. Interleukin 1 enhances T-dependent immune responses by amplifying the function of dendritic cells. *J Exp Med* 1987;165: 515–519.
222. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993;11:767–804.
223. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986;137:245.
224. Sanz MJ, Weg VB, Bolanowski MA, Nourshargh S. IL-1 is a potent inducer of eosinophil accumulation in rat skin. *J Immunol* 1995;154:1364–1373.
225. Bagby GC. Interleukin 1 and hematopoiesis. *Blood Rev* 1989;3:152–159.
226. Fantuzi G, Dinarello CA. The inflammatory response in interleukin-1β-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. *J Leukoc Biol* 1996;59:489–493.
227. Laver J, Abboude M, Gasparetto C, et al. Effects of IL-1 on hematopoietic progenitors after myelosuppressive chemoradiotherapy. *Biotherapy* 1989;1:293–300.
228. Neta R, Douches S, Oppenheim JJ. Interleukin-1 is a radioprotector. *J Immunol* 1986;136:2483–2488.
229. Duff GW, Durum SK. The pyrogenic and mitogenic actions of interleukin-1 are related. *Nature* 1983;304:449–452.
230. Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, et al. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. A role for leptin in the anorexia of infection. *J Clin Invest* 1996;97:1–6.
231. Besedovsky HO, Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;17:64–76.
232. Liu J, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC. Expression of type II nitric oxide synthase in primary human astrocytes and microglia. *J Immunol* 1996;157:3569–3576.
233. Fantuzzi G, Ghezzi P. Glucocorticoids as cytokine inhibitors: role in neuroendocrine therapy of inflammatory diseases. *Mediator Inflamm* 1993;2:263–268.
234. Bertini R, Bianchi M, Ghezzi P. Adrenalectomy sensitizes mice to the lethal effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1988;167: 1708–1714.
235. Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993;328:106–113.
236. Saren P, Welgus HG, Kovanen PT. TNFα and IL-1β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol* 1996;157: 4159–4165.
237. Wooley PH, Whalen JD, Chapman DL, et al. The effect of an IL-1 receptor antagonist protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 1993;36:1305–1310.
238. van den Berg WB, Joosten LA, Helsen M, van de Loo FA. Amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti-IL-1 treatment. *Clin Exp Immunol* 1994;95:237–242.
239. Onozaki K, Matsushima K, Aggarwal BB, Oppenheim JJ. Human interleukin-1 is a cytocidal factor for several tumor cell lines. *J Immunol* 1985;135: 3962–3968.
240. North RJ, Neubauer RH, Huang JJH, Newton RC, Loveless SE. Interleukin 1-induced, T cell-mediated regression immunogenic murine tumor. *J Exp Med* 1988;168:2031–2043.
241. Mori N, Shirakawa F, Murakami S, Oda S, Eto S. IL-1α as an autocrine growth factor for acute lymphoblastic leukaemia cells. *Br J Haematol* 1994;86:386–391.
242. Mandrup-Poulsen T, Zumsteg U, Reimers J, et al. Involvement of IL-1 and IL-1 antagonist in pancreatic β-cell destruction in insulin-dependent diaetes mellitus. *Cytokine* 1993;5:185–191.
243. Tatsuta T, Cheng J, Mountz JD. Intracellular IL-1β is an inhibitor of FAS-mediated apoptosis. *J Immunol* 1996;157:3949–3957.
244. Maier JA, Voulalas P, Roeder D, Maciag T. Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 alpha antisense oligomer. *Science* 1990;249: 570–574.
245. Watson JM, Lofquist AK, Rinehart CA, et al. The intracellular IL-1 receptor antagonist alters IL-1-inducible gene expression without blocking exogenous signaling by IL- 1β. *J Immunol* 1995;155:4467–4475.
246. Arend WP, Malyak M, Smith MF, et al. Binding of IL-1α, IL-1β, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids. *J Immunol* 1994;153:4766–4774.
247. Dinarello CA, Thompson RC. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today* 1994:12:404–410.
248. Van Zee KJ, Coyle SM, Calvano SE, et al. Influence of IL-1 receptor blockade on the human response to endotoxemia. *J Immunol* 1995:154:1499–1507.
249. Ruggiero P, Bossu P, Macchia G, et al. Inhibitory activity of IL-1 receptor antagonist depends on the balance between binding capacity for IL-1 receptor type I and IL-1 receptor type II. *J Immmunol* 1997;158:3881–3887.
250. Burger D, Chicheportiche R, Giri JG, Dayer JM. The inhibitory activity of human IL-1 receptor antagonist is enhanced by type II IL-1 soluble receptor and hindered by type I IL-1 soluble receptor. *J Clin Invest* 1995;96:38–41.
251. Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJT, Fiocchi C, Pizarro TT, Cominelli F. Mucosal

imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 1995;154:2434–2440.
252. Chomarat P, Vannier E, Dechanet J, et al. Balance of IL-1 receptor antagonist/IL-1β in rheumatoid synovium and its regulation by IL-4 and IL-10. *J Immunol* 1995;154:1432–1439.
253. Colotta F, Orlando S, Fadlon EJ, Sozzani S, Matteucci C, Mantovani A. Chemoattractants induce rapid release of the IL-1 type II decoy receptor in human polymorphonuclear cells. *J Exp Med* 1995;181:2181–2188.
254. Hirsch E, Irikura VM, Paul SM, Hirsh D. Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11008–11013.
255. Ferretti M, Casini-Raggi V, Pizarro TT, Eisenberg SP, Nast CC, Cominelli F. Neutralization of endogenous IL-1 receptor antagonist exacerbates and prolongs inflammation in rabbit immune colitis. *J Clin Invest* 1994;94:449–453.
256. Muller-Ladner U, Roberts CR, Franklin BN, et al. Human IL-1ra gene transfer into human synovial fibroblasts is chondroprotective. *J Immunol* 1997;158: 3492–3498.
257. Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, et al. Chondroprotective effect of intraarticular injections of IL-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum* 1996;39: 1535–1541.
258. Zheng H, Fletcher D, Kozak W, et al. Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-β-deficient mice. *Immunity* 1995;3:9–19.
259. Li P, Allen H, Banerjee S, et al. Mice deficient in IL-1β-converting enzyme are defective in production of mature IL-1β and resistant to endotoxic shock. *Cell* 1995;80:401–411.
260. Fantuzzi G, Ku G, Harding MW, et al. Response to local inflammation of IL-1β-converting enzyme-deficient mice. *J Immunol* 1997;158:1818–1828. Selected Chemokine Reviews and References
261. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997;15:675–705.
262. Murphy PM. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:47–64.
263. Ben-Baruch A, Michiel DF, Oppenheim JJ. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem* 1995;270:11703–11706.
264. Taub DD. Chemokine-leukocyte interactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:355–376.
265. Oppenheim JJ, Wang JM, Chertov O, Taub DD, Ben-Baruch, A. The role of chemokines in transplantation biology. In: Tilney NL, Strom TB, Paul LC, eds. *Cellular and molecular aspects.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996:187–200.
266. Moore JP, Trkola A, Dragic T. Co-receptors for HIV entry. *Curr Opin Immunol* 1997;9:557–562.
267. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 1994;56:559–564.
268. Yoshie O, Imai T, Nomiyama H, et al. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *J Leukoc Biol* 1997;62:634–644.
269. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994:266:1395–1399.
270. Hedrick JA, Saylor V, Figueroa D, et al. Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vitro. *J Immunol* 1997;158:1533–1540.
271. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385:640–644.
272. Pan Y, Lloyd C, Zhou H, et al. Neurotactin, a novel membrane-anchored chemokine that is upregulated in brain inflammation. *Nature* 1997;387:611–617.
273. Witt DP, Lander AD. Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr Biol* 1994;4:392–400.
274. Damaj BB, McColl SR, Neote K, et al. Identification of G-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops. *FASEB J* 1996;10:1426–1434.
275. Horuk R. The interleukin-8 receptor family: from chemokines to malaria. *Immunol Today* 1994;15:169–174.
276. Chitnis CE, Chaudhuri A, Horuk R, Pogo AO, Miller LH. The domain on the Duffy blood group antigen for binding Plasmodium vivax and P. Knowlesi malarial parasites to erythrocytes. *J Exp Med* 1996;184:1531–1536.
277. Pleskoff O, Treboue C, Brelot A, Heveker N, Seman M, Alizon M. Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science* 1997;276:1874–1878.
278. Guo HG, Browning P, Nicholas J, et al. Characterization of a chemokine receptor-related gene in human herpesvirus 8 and its expression in Kaposi's sarcoma. *Virology* 1997;228:371–378.
279. Tani K, Utsunomiya I, Xu L, Oppenheim JJ, Wang JM. Interferon-gamma maintains the binding and functional capacity of receptors for IL-8 on cultured human T cells. *Eur J Immunol* 1998;28:502–507.
280. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay C. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1925–1930.
281. Loetscher P, Seitz M, Baggiolini M, Moser B. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184:569–577.
282. Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ, Taub DD. Chemokines regulate T cell adhesion to endothelium and extracellular matrix proteins. *J Immunol* 1996; 156:932–938.
283. Sica A, Saccani A, Borsatti A, et al. Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *J Exp Med* 1997;185:969–974.
284. Al-Aoukaty A, Schall T, Maghazaci A. Differential coupling of CC chemokine receptors to multiple heterotrimeric G proteins in human interleukin-2 activated natural killer cells. *Blood* 1996;87:4255–4260.
285. Charo IF, Myers SJ, Hemman A, Franci G, Connoly AJ, Coughlin SK. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2752–2756.
286. Ahuja SK, Murphy PM. The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO)α, GROβ, GROγ, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *J Biol Chem* 1996;271: 20545–20550.
287. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995;270:27348–27357.
288. Schonbeck, Brandt E, Petersen F, Flad HD, Loppnow H. IL-8 specifically binds to endothelial but not smooth muscle cells. *J Immunol* 1995;154:2375–2383.
289. Nanney LB, Mueller SG, Bueno R, Peiper SC, Richmond A. Distributions of melanoma growth stimulatory activity of growth-regulated gene and the interleukin-8 receptor B in human wound repair. *Am J Pathol* 1995;147:1248–1260.
290. Petzelbauer P, Watson CA, Pfan SE, Pober JS. IL-8 and angiogenesis: evidence that human endothelial cells lack receptors and do not respond to IL-8 in vitro. *Cytokine* 1995;7;267–272.
291. Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, Glass MC, Burdick M, Strieter RM. Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. *J Clin Invest* 1996;97:2792–2802.
292. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, et al. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 1995;182:155–162.
293. Kolber DL, Knisely TL, Maione TE. Inhibition of development of murine melanoma lung metastases by systemic administration of recombinant platelet factor 4. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:304–309.
294. Nourshargh S, Perkins JA, Showell HJ, Matsushima K, Williams TJ, Collins PD. A comparative study of the neutrophil stimulatory activity in vitro and proinflammatory properties in vivo of 72 amino acid and 77 amino acid IL-8. *J Immunol* 1992;148:106–111.
295. Abruzzo LV, Thornton AJ, Liebert M, et al. Cytokine-induced gene expression of interleukin-8 in human transitional cell carcinomas and renal cell carcinomas. *Am J Pathol* 1992;140:365–373.
296. Gusella GL, Musso T, Bosco MC, Espinoza-Delgado I, Matsushima K, Varesio L. IL-2 upregulates, but IFN-γ suppresses IL-8 expression in human monocytes. *J Immunol* 1993;151:2725–2732.
297. Olivera IC, Mukaida N, Matsushima K, Vilcek J. Transcriptional inhibition of the IL-8 gene by interferon is mediated by the NF-kB site. *Mol Cell Biol* 1994;14: 5300–5308.
298. Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, et al. Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression: nuclear factor kB is a target for glucocorticoid-mediated IL-8 gene repression. *J Biol Chem* 1994;269:13289–13295.
299. Stein B, Baldwin AS Jr. Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involves synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 1993;13:7191–7198.
300. Taub DD, Oppenheim JJ. Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther Immunol* 1994;1:29–246.
301. Larsen CG, Thomsen MK, Gesser B, et al. The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8. *J Immunol* 1995;155:2151–2157.
302. Schraufstatter IU, Barritt DS, Ma M, Oades ZG, Cochrane CG. Multiple sites on IL-8 responsible for binding to α and β IL-8 receptors. *J Immunol* 1993;151: 6418–6428.
303. Chuntharapai A, Kim KJ. Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible function of each receptor. *J Immunol* 1993;155:2587–2594.
304. Cacalano G, Lee J, Kikly K, et al. Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science* 1994;265:682–684.
305. Shuster DE, Kehrli ME Jr, Ackerman MR. Neutrophilia in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science* 1995;269:1590–1591.
306. Broxmeyer HE, Cooper S, Cacalano G, Hague NL, Bailish E, Moore MW. Involvement of IL-8 receptor in negative regulation of myeloid progenitor cells in vivo: evidence from mice lacking the murine IL-8 receptor homologue. *J Exp Med* 1996;184:1825–1832.
307. Chertov O, Michiel DF, Xu L, et al. Identification of defensin-1, defensin-2 and CAP37/Azurocidin as selective T-cell chemoattractant proteins released from IL-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 1996;271:2935–2940.
308. Chertov O, Ueda H, Xu LL, et al. Identification of human neutrophil derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med* 1997;186:739–748.
309. Richmond A, Balentein E, Thomas HG, et al. Molecular characterization and chromosomal mapping of melanoma growth stimulatory activity, a growth factor structurally related to β-thromboglobulin. *EMBO J* 1988;7:2025–2033.

310. Haskill S, Peace A, Morris J, et al. Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 7732–7736.
311. Unemori EN, Amento EP, Bauer EA, Horuk R. Melanoma growth-stimulatory activity/GRO decreases collagen expression by human fibroblasts. Regulation by C-X-C but not C-C cytokines. *J Biol Chem* 1993;268:1338–1342.
312. Ben-Baruch A, Bengali K, Tani K, Xu L, Oppenheim JJ, Wang J. IL-8 and NAP2 differ in their capacities to bind and chemoattract 293 cells transfected with either IL-8 receptor A or B. *Cytokine* 19977;9:37–45.
313. Walz A, Schmutz P, Mueller C, Schnyder-Candrian L. Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease. *J Leukoc Biol* 1997;62:604–611.
314. Van Damme J, Wuyts A, Froyen G, et al. Granulocyte chemotactic protein-2 and related CXC chemokines: from gene regulation to receptor usage. *J Leukoc Biol* 1997;62:563–569.
315. Smith JB, Rovai RE, Herschman HR. Sequence similarities of a subgroup of CXC chemokines related to murine LIX: implications for the interpretations of evolutionary relationships among chemokines. *J Leukoc Biol* 1997;62:598–603.
316. Luster AD, Ravetch JV. Genomic characterization of a gamma-interferon-inducible gene (IP-10) and identification of an interferon-inducible hypersensitive site. *Mol Cell Biol* 1987;7:3723–3731.
317. Luster AD, Leder P. IP-10, a C-X-C chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vitro. *J Exp Med* 1993;178:1057–1065.
318. Ohmori Y, Hamilton T. The interferon-stimulated response element and a kB site mediate synergistic induction of murine IP-10 gene transcription by IFN-gamma and TNF-α. *J Immunol* 1995;154:5235 5244.
319. Farber JM. A macrophage mRNA selectively induced by interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5238–5242.
320. Liao F, Rabin RL, Yannclli JR, Koniares LG, Vanguri P, Farber JM. Human MIG chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 1995;182:1301–1314.
321. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, et al. Chemokine receptor specific for IP10 and MIG: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184:963–969.
322. Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, et al. Interferon inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): A novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through high affinity binding to CXC-R3. *J Exp Med* 1998;187:1–13.
323. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, SDF-1. *J Exp Med* 1996;194:1101–1109.
324. Aiuti A, Webb I J, Bleul C, Springer T, Gutierree-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new in mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 1997;185:111–120.
325. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B cell lymphopoiesis and bone marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996;382:635–638.
326. Nagasawa T, Nakajuma T, Tachibana K, et al. Molecular cloning and characterization of murine pre-B cell growth stimulating factory stromal cell-derived factor 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14726–14729.
327. Gronenborn AM, Clore CM. Modeling the three-dimensional structure of the monocyte chemo-attractant and activating protein MCAF/MCP-1 on the basis of the solution structure of interleukin-8. *Protein Eng* 1991;4:263–269.
328. Beall CJ, Mahajan S, Kolattukudy PE. Conversion of monocyte chemo-attractant protein-1 into a neutrophil attractant by substitution of two amino acids. *J Biol Chem* 1992;267:3455–3459.
329. Ueda A, Okuda K, Ohno S, et al. NF-kB and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol* 1994;153: 2052–2063.
330. Grove M, Plumb M. C/EBP, NF-kB and C-Est family members and transcriptional regulation of the cell specific and inducible macrophage inflammatory protein 1α immediate early gene. *Mol Cell Biol* 1993;13:5276–5289.
331. Pleskoff O, Treboute C, Brelot A, Hereker N, Seman M, Alizon M. Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science* 1997;276:1874–1878.
332. Luster A, Rothenberg M. Role of chemokines in allergy. *J Leukoc Biol* 1997;62:620–633.
333. Broxmeyer HE, Sherry B, Cooper S, et al. Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines (chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor. *J Immunol* 1993;150:3448–3458.
334. Youn B-S, Jang I-K, Broxmeyer HE, et al. A novel chemokine MRP-2 inhibits colony formation of bone marrow myeloid progenitors. *J Immunol* 1995;155: 2661–2667.
335. Patel VP, Kreider BL, Li Y, et al. Molecular and functional characterization of two distinct classes of myeloid progenitors. *J Exp Med* 1997;185:1163–1172.
336. Keller JR, Bartelmer SH, Situicha E, et al. Distinct and overlapping direct effects of MIP-1α and TGFβ on hematopoietic progenitor cell growth. *Blood* 194;84: 21275–21281.
337. Gao JL, Wynn TA Chang Y, et al. Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1–type 2 cytokine balance in mice lacking CCR1. *J Exp Med* 1997;185:1959–1968.
338. Taub DD, Oppenheim JJ, Anver M, Kelvin DJ, Longo DL, Murphy W. T lymphocyte recruitment by interleukin 8 (IL-8): IL-8 induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1996;97:1931–1941.
339. Nakamura K, Williams IR, Kupper TS. Keratinocyte-derived monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): analysis in a transgenic model demonstrates MCP-1 can recruit dendritic and Langerhans cells to skin. *J Invest Dermatol* 1995;105:635–643.
340. Taub DD, Ortaldo JR, Turcovki-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ. Beta chemokines costimulate lymphocyte cytolysis, proliferation and lymphokine production. *J Leukoc Biol* 1996;59:81–89.
341. Gosse JA, Hartgers F, Verstraten R, et al. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 1997;387:713–717.
342. Taub DD, Sayers T, Carber C, Ortaldo J. Alpha and β chemokines induce NK cell migration and enhance NK cell cytolytic activity via cellular degranulation. *J Immunol* 1995;155:3877–3888.
343. Cook DN, Beck MA, Coffman TM. Requirement of MIP-1α for an inflammatory response to viral infection. *Science* 1995;269:1583–1585.
344. Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, Sanghi PS, Lincoln P, Kunkel SL. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in TH1 (mycobacterial) and TH2 (Schistosomal) antigen-induced granuloma formation. *J Immunol* 1996;157:4602–4608.
345. Lukacs NW, Kunkel SL, Strieter RM, Warmington K, Chensue SW. The role of MIP-1α in Schistosoma mansoni egg induced granulomatous inflammation. *J Exp Med* 1993;177:1551–1559.
346. Karpus WJ, Kennedy KJ. MIP-1α and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as TH1/TH2 lymphocyte differentiation. *J Leukoc Biol* 1997;62:681–687.
347. Schall TJ. Biology of the RANTES/sis cytokine family. *Cytokine* 1991;3: 165–183.
348. Bacon KB, Premack BA, Gardner B, Schall TJ. Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science* 1995;269:1727–1730.
349. Selvan RS, Zhou LJ, Krangel MS. Regulation of I-309 gene expression in human monocytes by endogenous interleukin-1. *Eur J Immunol* 1997;27:687–694.
350. Laning J, Kawasaki H, Tanaka E, Luo Y, Dorf ME. Inhibition of in vivo tumor growth by the beta chemokine, TCA3. *J Immunol* 1994;153:4625–4635.
351. Van Snick J, Houssiau F, Proost P, Van Damme J, Renauld JC. I-309/T cell activation gene-3 chemokine protects murine T cell lymphomas against dexamethasone-induced apoptosis. *J Immunol* 1996;157:2570–2576.
352. Jose PJ, Griffith-Johnson DA, Collins PD, et al. Eotaxin, a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med* 1994;179:881–887.
353. Rothenberg ME, MacLean JA, Pearlman E, Luster AD, Leder P. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. *J Exp Med* 1997;185:785–790.
354. Mohamadzadek M, Poltorak AN, Bergstresser PR, Beutler B, Takashima A. Dendritic cells produce MIP-1γ, a new member of the CC chemokine family. *J Immunol* 1996;156:3102–3106.
355. Rossi DL, Vicari AP, Franz-Bacon K, McClanahan TK, Zlotnik A. Identification through bio informatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3α and MIP-3β. *J Immunol* 1997;158:1033–1036.
356. Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BRL1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 1996;87:1037–1047.
357. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1α, and MIP-1β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. *Science* 1995;270:1811 1815.
358. Moore J, Trkola A. HIV type-1 coreceptors, neutralization, serotypes and vaccine development. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997;13:733–736.
359. Liao F, Alkhatib G, Peden KWC, Sharma G, Berger EA, Farber JM. STRL33, a novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line tropic HIV-1. *J Exp Med* 1997;
360. Samson M, Libert F, Doranz BJ, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996;382:722–725.
361. Zhou Y, Kurihara T, Ryseck R-P, et al. Impaired macrophage function and enhanced T-cell dependent immune response in mice lacking CCRS, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol* 1998;160:4018–4025.
362. Greenberger MJ, Strieter RM, Kunkel SL, et al. Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in murine Klebsiella pneumonia. *J Infect Dis* 1996;173:159–165.
363. Howard OMZ, Ben-Baruch A, Oppenheim, JJ. Chemokines progress in identifying molecular targets for therapeutic agents. *Trends Biotechnol* 1996;46–51.
364. McFadden G, Kelvin D. New strategies for chemokine inhibition and modulation. *Biochem Pharmacol* 1997;53:1271–1280.
365. Lalani AS, McFadden G. Secreted poxvirus chemokine binding proteins. *J Leukoc Biol* 1997;62:570–576.
366. Ben-Baruch A, Bengali K, Xu L, Oppenheim JJ, Wang JM. IL8 and NAP 2 differ in their capacities to bind *and chemo-attract 293 cells transfected with either* IL8 receptor type A or type B. *Cytokine* 1997;9:37–45.

367. Rutledge BJ, Rayburn H, Rosenberg R, et al. High level MCP-1 expression in transgenic mice increases their susceptibility to intracellular pathogens. *J Immunol* 1995;155:4838–4843.
368. Grimm MC, Ben-Baruch A, Taub DD, et al. Opiate inhibition of chemokine induced chemotaxis is based on δ and μ opiate receptor mediated heterologous desensitization. *J Exp Med* 1998 *(in press)*.
369. Wang JM, Ueda H, Chertov O, et al. The inhibitory effect of HIV-1 envelope gp120 on monocyte chemoattractant receptors involves activation of CD4. *J Immunol* 1998 *(in press)*.

Selected TGF and Other Cytokines

370. DeLarco J, Todaro G. Growth factors from sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:4001–4005.
371. Roberts AB, Sporn MB. The transforming growth factor-βs. *Handbook Exp Pharm* 1990;95:419–475.
372. Massague J. The transforming growth factor-β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6:597–674.
373. Heine U, Munoz EF, Flanders KC, et al. Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo. *J Cell Biol* 1987;105:2861–2876.
374. Millan FA, Denhez F, Kondaiah P, Akhurst RJ. Embryonic gene expression patterns of TGF-β1, β2, and β3 suggest different development functions in vivo. *Development* 1991;111:131–143.
375. Shull MM, Ormbbsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of mouse TGF-β1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1990;359:693–696.
376. Letterio JJ, Roberts AB. Transforming growth factor-β1-deficient mice: identification of isoform-specific activities in vivo. *J Leukoc Biol* 1996;59:769–774.
377. Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, et al. Transforming growth factor-β3 is required for secondary palate fusion. *Nature* 1995;11:409–414.
378. Roberts AB, Sporn MB. Differential expression of the TGF-β isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues. *Mol Reprod Dev* 1992;32:92–97.
379. O'Reilly MA, Geiser AG, Kim SJ, et al. Identification of an activating transcription factor (ATF) binding site in the transforming growth factor-β2 promotor. *J Biol Chem* 1992;267:19938–19943.
380. Kim SJ, Park K, Koeller D, et al. Post-transcriptional regulation of the human transforming growth factor-β1 gene. *J Biol Chem* 1992;267:13702–13707.
381. Kim SJ, Jeang KT, Glick A Sporn MB, Roberts AB. Promoter sequences of the human transforming growth factor-β1 gene responsive to transforming growth factor-β1 autoinduction. *J Biol Chem* 1989;264:7041–7045.
382. Kingsley DM. The TGF-β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994;8:133–146.
383. Dennis PA, Rifkin DB. Cellular activation of latent transforming growth factor-β requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:580–584.
384. Nunes I, Shapiro RL, Rifkin DB. Characterization of latent TGF-β activation by murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 1995;155:1450–1459.
385. Lin HY, Lodish HF. Receptors for the TGF-β superfamily. *Trends Cell Biol* 1993; 3:14–19.
386. Attisano L, Wrana JL, Lopez-casillas F, Massague J. TGF-β receptors and actions. *Biochim Biophys Acta* 1994;1222:71–80.
387. Laiho M, Weis FMB, Boyd FT, Ignotz RA, Massague J. Responsiveness of TGF-β restored by complementation between cells defective in TGF-β receptors I and II. *J Biol Chem* 1991;266:9108–9112.
388. Vivien D, Attisano L, Ventura F, Wrana JL, Massague J. Signalling activity of homologous and heterogous TGF-β receptor kinase complexes. *J Biol Chem* 1995;270:7134–7141.
389. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-β receptor. *Nature* 1994;370:341–347.
390. Chen RH, Moses HL, Maruoka EM, Derynck R, Kawabata M. Phosphorylation-dependent interaction of the cytoplasmic domains of the type I and type II TGF-β receptors. *J Biol Chem* 1995;270:12235–12241.
391. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by members of the transforming growth factor-β superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:327–339.
392. Markowitz SD, Roberts AB. Tumor suppressor activity of the TGF-β pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:93–102.
393. Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-β signalling pathways. *Nature* 1996;383:832–836.
394. Arsura M, Wu M, Sonenshein GE. TGF-β1 inhibits NF-kB/Rel activity inducing apotosis of B cells: transcriptional activation of IkBα. *Immunity* 1996;5:31–40.
395. McCartney-Francis NL, Wahl SM. Transforming growth factor: a matter of life and death. *J Leukoc Biol* 1994;55:401–409.
396. Sporn MB, Roberts AB. TGF-β: problems and prospects. *Cell Reg* 1990;1: 875–882.
397. Kerl JH, Taylor A, Kim SJ, Fauci AS. Transforming growth factor β is a potent negative regulator of human lymphocytes. *Ann NY Acad Sci* 1991;628:345–353.
398. Kerl JH, Thenvenin C, Rieckmann P, Fauci AS. Transforming growth factor β suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA. *J Immunol* 1991;146:4016–4023.
399. Ruscetti F, Varesio L, Ochoa A, Ortaldo J. Pleiotropic effects of transforming growth factor-β on cells of the immune system. *Ann NY Acad Sci* 1993;685: 488–500.
400. Dubois C, Ruscetti F, Stankova J, Keller J. Transforming growth factor β regulates c-kit message stability and cell-surface expression in hematopoietic progenitors. *Blood* 1994;83:3138–3145.
401. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-β. *Nature* 1988;334:260–262.
402. Smith WB, Noack L, Khew-Goodall Y, Isenmann S, Vadas MA, Gamble JR. Transforming growth factor-β1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. *J Immunol* 1996;157:360–368.
403. Weiner HL. Oral tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10762–10765.
404. Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific TGF-β1-secreting Th_3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1996;98:70–77.
405. Wahl SM, Hines KL, Christ M, et al. Adhesion, recruitment, and activation of mononuclear phagocytes in inflammation. *J Leukoc Biol* 1993;54:74–81.
406. Reibman J, Meixler S, Lee TC, Gold, et al. Transforming growth factor β_1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6805–6809.
407. Wahl SM. Transforming growth factor β in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol* 1992;12:61–74.
408. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286–1292.
409. Caver TE, O'Sullivan FX, Gold LI, Gresham HD. Intracellular demonstration of active TGF-β1 in B cells and plasma cells of autoimmune mice. *J Clin Invest* 1996;98:2496–2506.
410. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton DB, Heisterkamp N, Groffen J. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-β3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 1995;11:415–421.
411. Strobl H, Reidl E, Scheinecker C. TGF-β1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *J Immunol* 1996;157: 1499–1507.
412. Borkowski TA, Letterio JJ, Farr AG, Udey MC. A role for endogenous TGF-β1 in Langerhans cell biology: the skin of TGF-β1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1996;184:2417–2422.
413. Alexandrow MG, Moses HL. Transforming growth factor and cell cycle regulation. *Cancer Res* 1995;55:1452–1457.
414. Ivanovic V, Melman A, Davis-Joseph B, Valcic M, Geliebter J. Elevated plasma levels of TGF-β1 in patients with invasive prostrate cancer. *Nat Med* 1995; 1:282–283.
415. Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, et al. The serum concentration of active TGF-β is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med* 1995;1: 74–79.
416. Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW. Interleukin-16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today* 1996;17:476–481.
417. T Ryan, WW Cruikshank, DM Center. Activation of CD4 associated p56 lck by the lymphocyte chemoattractant factor. Dissociation of kinase enzymatic activity with chemotactic response. *J Biol Chem* 1995;270:17081–17086.
418. Theodore AC, Center DM, Nicoll J, Fine G, Kornfeld H, Cruikshank WW. The CD4 ligand, IL-16, inhibits the MLR. *J Immunol* 1996;157:1958–1964.
419. Maciaszek JW, Parada NA, Cruikshank WW, Center DM, Kornfeld H, Viglianti GA. Interleukin-16 represses HIV-1 promoter activity. *J Immunol* 1997;158:5–8.
420. Rouvier E, Luciani M-F, Mattei MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8 cloned from an activated T cell, bearing AU-rich mRNA instability sequences and homologs to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* 1993;150:5445–5456.
421. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 1995;155:5483–5486.
422. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996;183:2593–2603.
423. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, et al. Herpesvirus saimiri encodes a new cytokine IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 1995;3: 811–821.
424. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 1966;153:8–82.
425. David J. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966;56: 72–77.
426. Weiser WY, Temple PA, Witeek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7522–7526.
427. Bucala R. MIF re-discovered: pituitary hormone and glucocorticoid-induced regulator of cytokine production. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:19–24.

第23章　凋　　亡

Craig B. Thompson[①]

813　大多数情况下，免疫反应被启动以应答细胞损伤。最严重的细胞损伤是细胞死亡(cell death)，而许多胞内物质对于先天免疫系统(innate immune system)是促炎症性的(proinflammatory)。因此，从死亡细胞释放胞内物质便是免疫系统获知机体处于危险境地的一个早期警报。但是，并不是所有类型的细胞死亡都可产生前炎症信号。在大多数组织中，细胞不断自我更新。Kerr 及其同事[1]首先报道，在正常组织动态平衡过程中所发生的细胞死亡具有独特的组织学特征。这些研究者注意到，即使在正常组织中，每天都有一小部分细胞死亡，并且这种死亡可以通过它所具有的独特形态学特征以及不能启动炎症应答的特性来加以识别。这种生理性的细胞死亡被称为凋亡(apoptosis)。随后的研究工作证实，凋亡是细胞的一种自杀方式，临终细胞(dying cell)通过激活一个内在编码的、进化上非常保守的死亡程序来启动自身的死亡[2~4]。

凋亡的形态学和生物化学特征

各种各样的外在或内在信号均可启动凋亡性细胞死亡(apoptotic cell death)[5]。对凋亡的生理性调控提

① C.B. Thompson: Howard Hughes Medical Instiute, Departmint of Medicime, The University of Chicago, Chicago, Illinois 60637-5420.

供了消除多余产生的，发育不正常的以及存在遗传损伤的细胞的一种机制。凋亡的特点是临终细胞受到控制的自我消化(图 23.1)。细胞的死亡是通过内源性蛋白酶的激活来实现的[6~9]。结果便是细胞骨架的完整性被破坏，细胞变圆并且体积开始缩小。由于胞质体积缩小，细胞膜开始起泡，并失去正常细胞膜脂的不对称性。正常细胞的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine)主要分布在细胞膜的内侧面，而发生凋亡时，磷脂酰丝氨酸开始暴露于细胞膜的外侧面[10]。凋亡过程中，细胞核也发生特征性改变。核酸内切酶被激活，开始降解细胞核 DNA。在一些类型的细胞核中，DNA 被降解成核小体大小的片段；而在其他类型的细胞核中，则产生较大的 DNA 片段。另外，核层纤蛋白(nuclear lamin)也被降解。这些事件的结果便是，细胞核变得皱缩和致密。其他细胞器的功能也受到影响。

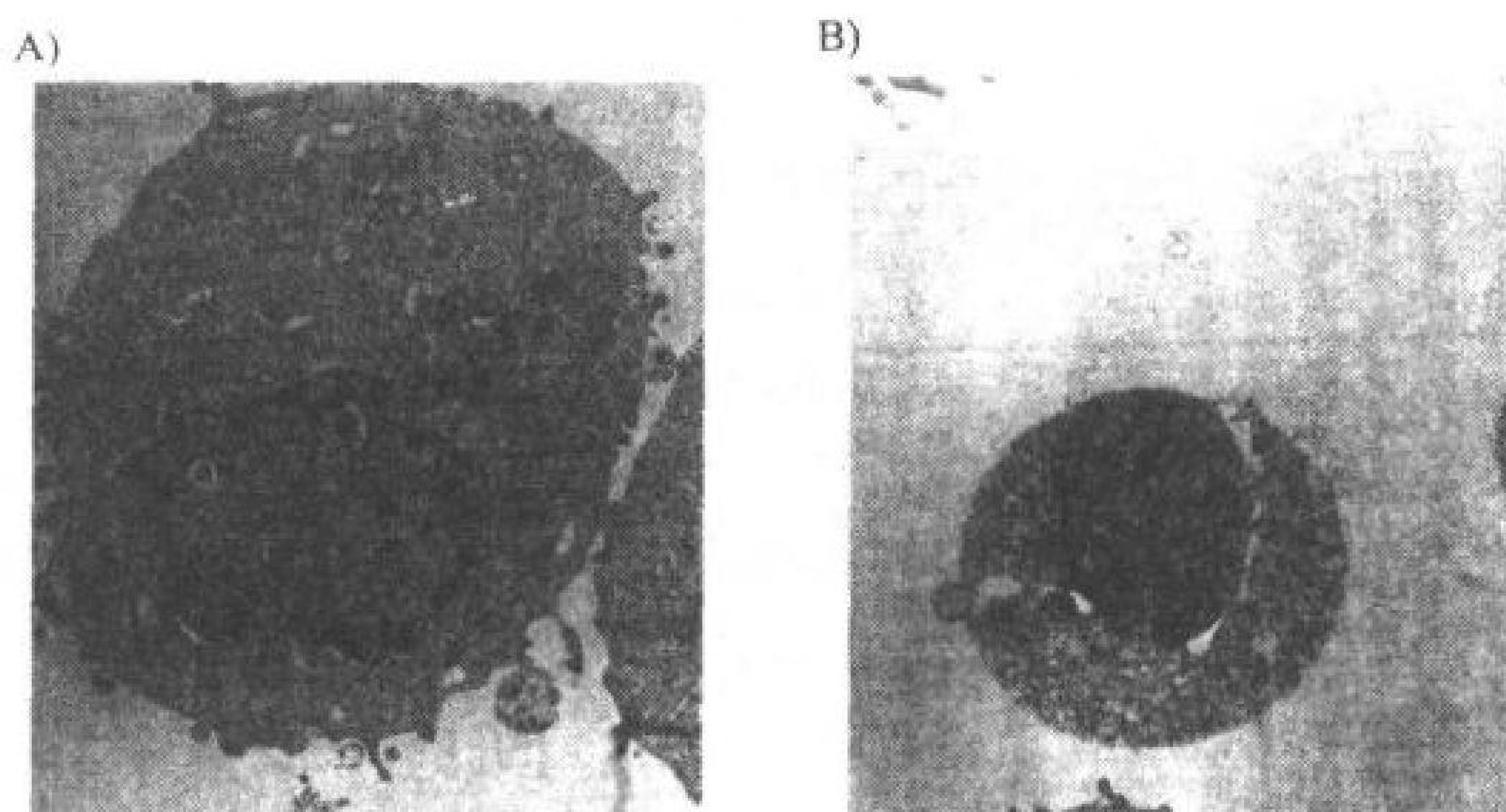


图 23.1 凋亡细胞具有独特的形态。A)组织培养液中 WEHI231 B 淋巴细胞的电镜照片；B)WEHI 231 细胞表面免疫球蛋白受体交联 12h 后的形态。此细胞显示出凋亡细胞典型的形态特征(详见正文，照片由 Alex Gottschalk 和 Jose Quintans 提供。)

目前的证据提示：胞质成分决定了凋亡是否发生。去核的胞质就能对凋亡刺激信号发生应答，表现为体积皱缩，丧失胞膜的不对称性以及启动胞内细胞器的降解[11]。线粒体功能的丧失一直被认为是凋亡细胞发生死亡的一个早期不可逆事件[12]。在细胞凋亡的启动阶段，可以观察到线粒体内膜中细胞色素 c 重新分布，线粒体跨膜电位消失[13~15]。将细胞色素 c 加入到胞质提取物中，可以诱导某些酶的激活，进而导致外源性加入的胞核发生凋亡性损伤[16,17]。

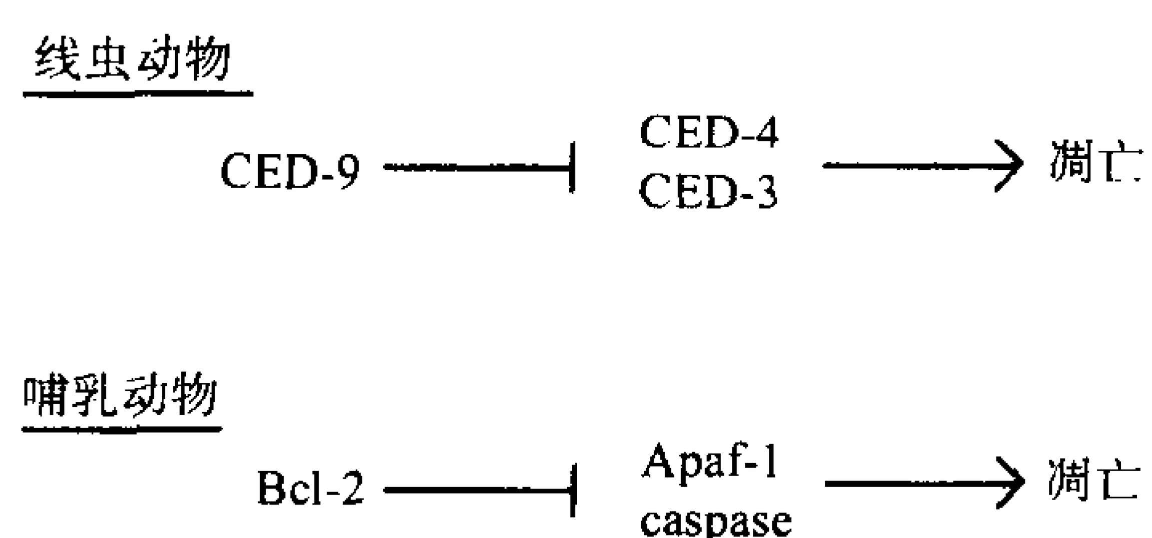
814

凋亡的一个典型特征是细胞膜依旧保持完整。胞膜的改变，包括磷脂酰丝氨酸的暴露，是向邻近吞噬细胞发出信号，以吞噬凋亡细胞并完成降解过程[18]。有趣的是，吞噬细胞吞噬凋亡细胞并不伴随着吞噬细胞活化标记物或细胞因子的上调。没有被立即吞噬的凋亡细胞依然保持完整，它将自身降解成有膜包绕的更小的部分，被称为凋亡小体(apoptotic body)。这样通过维持胞膜的完整性，凋亡形式的死亡可以在不引起炎症应答的情况下，促进临终细胞的清除。

与凋亡性细胞死亡相反，坏死性细胞死亡(necrotic cell death)和外伤性细胞死亡(traumatic cell death)是由急性细胞损伤引起的病理性细胞死亡[19]。两者的特点是：细胞迅速肿胀和溶解，胞浆内容物释放并诱发炎症反应。在坏死性细胞死亡和创伤性细胞死亡中，临终细胞似乎并不发挥积极的作用。因此，一个细胞对损伤的反应能力可能是细胞死亡是否伴随炎症反应的决定性因素。如果细胞损伤太严重，以至细胞无法作出相应的反应，细胞将通过坏死的方式死亡，导致免疫应答。相反，如果临终细胞能够对细胞损伤作出生理性反应，有能力执行有计划的自身死亡，细胞则以凋亡方式来结束有机体对于最初侵犯的应答。从这个角度来看，执行程序性死亡的能力提供了一种重要的由组织损伤所诱发的免疫应答的调控机制。

凋亡细胞死亡受到遗传调控

最近关于细胞死亡的许多研究进展均来源于凋亡调控基因的发现和鉴定[2]。这些发现证实，贯穿于胚胎发育各个阶段的细胞死亡[程序性细胞死亡(programmed cell death)]受到共同的遗传调控(图 23.2)。无论在无脊椎动物中，还是在脊椎动物中，参与共同死亡通路调控的许多基因都是保守的。在对美丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)的早期研究中，发现 3 个基因参与线虫发育过程中的细胞死亡调控。这一研究成果直接导



815

图 23.2 调控凋亡的中枢基因在进化上保守。

致了另外 3 个哺乳动物基因的发现,它们对于胚胎发育过程中的程序性细胞死亡具有十分重要的作用。其中 1 个基因 CED-9 的功能放大性突变(gain-of-function mutation)可以使胚胎发育避免程序性细胞死亡[20]。相反,其他 2 个基因 CED-3 和 CED-4,则是细胞在发育中具有自身死亡能力所必需的[21,22]。这三种基因在哺乳动物的同源物(homolog)已被确定(图 23.2)。CED-9 被克隆后,发现它与哺乳动物原癌基因 Bcl-2 相关[23]。最初发现 Bcl-2 基因是因为它参与人 14 号和 18 号染色体易位[24]。70%以上的淋巴细胞都存在这种易位。14:18 的易位致使 18 号染色体上面的 Bcl-2 基因与 14 号染色体上面的免疫球蛋白重链增强子并排(juxtaposition),导致 Bcl-2 的表达增加。随后研究发现,Bcl-2 过度表达可以增强细胞对各种凋亡刺激因子诱导程序性死亡的耐受性。Bcl-2 转基因可以部分缓解 CED-9 缺陷型线虫的细胞死亡,从而证实 Bcl-2 和 CED-9 在功能上是保守的[25]。

线虫 CED-3 蛋白与白细胞介素-1 转化酶(一种半胱氨酸蛋白酶,现也被称为 caspase 1)的序列具有相似性[26]。这种现象引发人们进一步证实,它们其中任可一种蛋白活化形式的过度表达都能够诱导细胞发生具有凋亡典型形态特征的细胞死亡。这两种酶都执行相似的蛋白水解反应:从天冬氨酸残基上裂解它们的底物。现在,又从哺乳动物中鉴定了许多其他的 caspases[27]。

最近又从哺乳动物鉴定了 CED-4 的同源性蛋白,命名为凋亡蛋白酶活化因子 1(apoptotic protease activating factor 1 ,Apaf-1)[28]。Apaf-1 是作为胞浆提取物中细胞色素 C 诱导凋亡活性所必需的一种胞浆蛋白被分离出来的。与此相似,发现 CED-4 也能活化 CED-3[29]。这些结果提示,CED-4 及其相关蛋白的作用在于调节天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶类(caspases)从非活化到活化状态的转变,进而促进蛋白酶的活化和随后的凋亡。鉴于 Bcl-2 和 caspases 1 都是脊椎动物多基因家族的成员,因此很可能还会有其他 CED-4 哺乳动物同源性蛋白被陆续鉴定出来。这些蛋白质分子联系着刺激因子和 caspase 活化,以及线粒体中细胞色素 c 的释放。

一个细胞要维持生存,凋亡必须被有效地抑制

迄今为止,在所有研究过的多细胞有机体中,如果缺乏外在存活因子,或者经丝氨酸激酶抑制剂(staurosporine)处理后,细胞都会发生凋亡[30]。两种情况下,细胞死亡都没有伴随新的蛋白质合成。提示在所有细胞中,引发凋亡所必需的蛋白质分子都是组成性表达的。在体内,细胞存活似乎依赖于邻近细胞、细胞外基质和生长因子等不断提供的存活信号。这提示,如果没有从周围环境中不断地或间断地获得存活信号,多细胞机体的所有细胞都会执行程序性自杀。这样的细胞存活控制系统对于调节特定细胞系的生理位置和细胞数目是非常重要的。例如,依赖于环境的存活信号可以避免肝细胞在肺中存活。此外,由于细胞存活依赖于外界信号,因此可以避免产生过多的细胞,如肝细胞,以至于与之接触的基质细胞和体液中存活因子所不能承受。

细胞能接受指令来启动凋亡

凋亡也可以通过指令性的机制(instructive mechanism)被启动。已经被鉴定出一些特殊的细胞表面受体,它们与配体结合后向胞内转导信号,导致凋亡发生[31]。最典型的细胞死亡受体便是肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的成员,如 Fas。与存活信号不足所导致的细胞死亡不同,指令性细胞死亡信号通路并非在所有细胞上都是组成性表达的。在有些例子中,指令性细胞死亡还需要新的蛋白质合成等机制来诱导凋亡。最初认为细胞死亡受体的表达只局限于某些细胞,它们在执行正常生理功能时经历周期性的扩增和缩减,如淋巴细胞和生殖器官的细胞。但近年来已逐渐明确,在各种应激反应通路激活的情况下,大多数的细胞都能够诱导

表达细胞死亡受体或它们的配体。

凋亡的启动

细胞存活除了受生长因子和细胞死亡受体的外在调节外,胞内事件也能启动凋亡(图 23.3)。DNA 的损伤能够诱导凋亡,其中的大部分信号传导途径都由 p53 介导[32]。对程序性细胞死亡的耐受有助于肿瘤的发生,由此可以解释为什么如此众多的人类癌症中都存在 p53 的突变。事实上,任何持续存在的细胞新陈代谢或细胞周期的混乱(perturbation)都能诱导凋亡[5]。这些现象提示,凋亡的调控可能不仅仅是通过单一信号途径来实现的,而是由各种信号通路的相互协调来调节程序性细胞死亡的易感性。虽然这些细胞新陈代谢或周期干扰调控程序性细胞死亡的特定结合点尚未确定,但已发现一些涉及细胞存活调控的胞内干扰控现象。在众多不同的细胞系统中,胞内钙的升高、胞内 pH 值的下降以及细胞氧化还原电位的改变都可以增加细胞对程序性细胞死亡的敏感性[33~41]。但目前还不清楚这些扰动现象如何激活影响程序性细胞死亡的蛋白质。

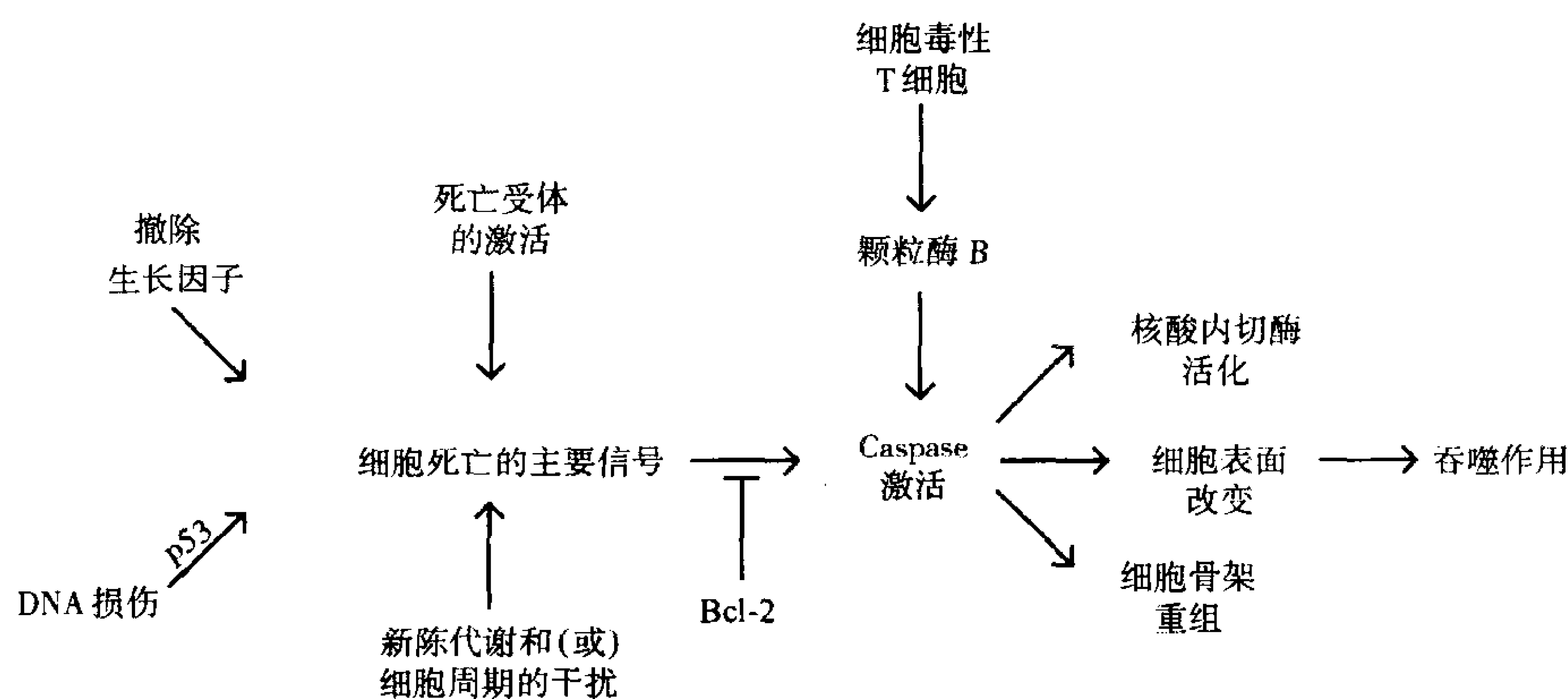


图 23.3 凋亡细胞死亡的主要特征概略图。

虽然所有的哺乳动物细胞似乎都依赖于持续性的存活信号,但还没有确定信号丧失后是如何启动凋亡的。这类凋亡实验一般使用生长因子依赖的细胞系,一旦撤除生长因子,便迅速地启动程序性细胞死亡。令人惊讶是,尽管这些细胞系依赖的生长因子使用不同的信号转导通路,当撤除生长因子时,这些细胞系却似乎表现出相似的特征。生长因子的撤除通常会导致细胞新陈代谢急性扰动,并妨碍细胞周期的进行。正如上面提到的,这些变化可导致凋亡应答的激活。然而,这些变化导致细胞死亡的机制,目前尚不清楚。或许存在另一种可能:生长因子的撤除诱导一个应激反应,进而导致由细胞死亡受体介导的信号转导过程敏感性增加。

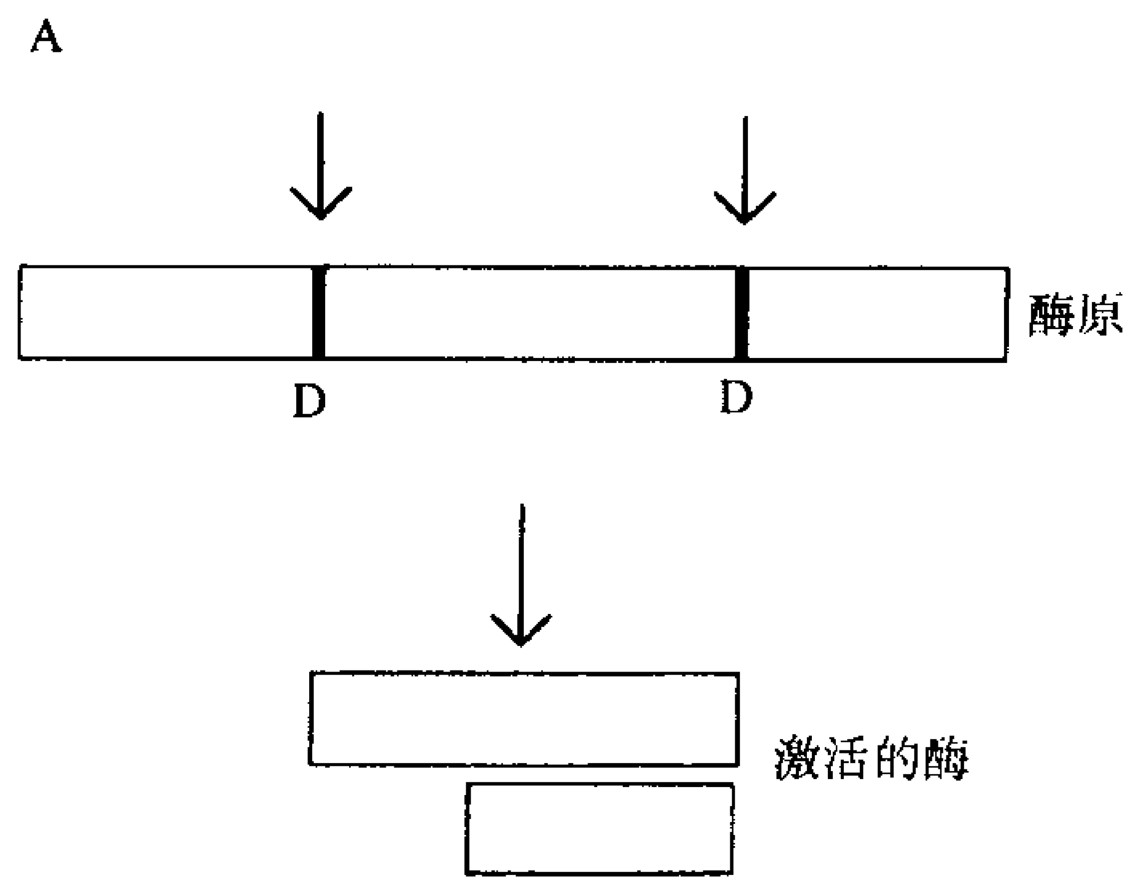
816

与其他凋亡通路不同,通过细胞表面受体启动凋亡的信号通路已逐渐被确定。例如,TNF 相关受体启动的信号通路都涉及蛋白酶的激活[42]。在细胞死亡受体介导的凋亡信号通路中,最典型的蛋白酶即是 caspase 家族的成员。

天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶(caspase)

caspase 属胞内丝氨酸(cysteine)蛋白酶,另外具有从天冬氨酸(aspartic acid)残基位置裂解蛋白质的新功能,因此称作 caspase[27]。至今已经确定了 10 种哺乳类动物的 caspase(图 23.4)。所有经详细研究的细胞系都组成型表达一种或多种 caspase。在活细胞中,caspase 以蛋白酶原的形成存在,仅在蛋白水解后才被活化[3,7]。蛋白水解的作用在于切除氨基端前结构域(prodomain)的部分,并将剩余的多肽处理为活性蛋白酶的

2个亚基。活化的蛋白酶是由2个活化亚基的2个拷贝组成的异型四聚体。已报道的研究结果显示，蛋白水解作用是通过裂解天冬氨酸残基来完成的，提示 caspase 活化的主要机制不是自身催化(autocatalysis)就是由家族中其他成员来完成的。一旦活化，绝大部分的 caspase 可以催化其他 caspase 家族成员的活化，导致蛋白水解作用的级联放大效应。如果细胞没有处于抑制状态，caspase 的激活就足以启动凋亡相关的所有形态学变化[26]。



B 人的 caspase

现名	曾用名
caspase 1	ICE
caspase 2	ICH-1
caspase 3	CCPP32,Yama,apopain
caspase 4	ICH-2,TX,ICE$_{rel}$-Ⅱ
caspase 5	ICE$_{rel}$-Ⅲ,TY
caspase 6	Mch2
caspase 7	Mch3,ICE-LAP3,CMH-1
caspase 8	FLICE,MACH.Mch5
caspase 9	ICE-LAP6,Mch6
caspase 10	Mch4

图 23.4 caspase 基因家族。A:典型的 caspase 作为酶原表达。氨基末端区域代表1个涉及介导蛋白/蛋白相互作用和 caspase 活化结构域的前面部分。D 代表1个天冬氨酸残基，是裂解位点。蛋白酶转变为活性酶涉及原结构域的裂解以及余下的蛋白部分变为2个亚基，形成具有催化活性的酶。B:目前人 caspase 的专门术语。

已经鉴定了凋亡过程中被蛋白水解的多种 caspase 底物。这些底物包括参与细胞修复的蛋白质，如多聚 ADP 核糖聚合酶(PARP)、DNA 依赖性蛋白激酶和 MDM2；参与细胞周期调控的蛋白质，如视网膜母细胞瘤蛋白、周期素依赖性蛋白激酶和酪氨酸激酶 c-Abl；参与信号转导的蛋白质，如 PAK2；以及参与维持细胞结构完整的蛋白质，如核层纤蛋白、fodrin、凝溶胶蛋白和肌动蛋白[42~46]。大多数情况下，caspase 的裂解作用导致底物的失活。但在有些情况下，caspase 的裂解作用导致底物的组成型活化。例如，PAK2 被 caspase 裂解后，成为组成型活化的激酶[47]。任何一种还是所有的 caspase 底物蛋白质导致了不可逆的细胞死亡还需要作进一步的证实。caspase 也能蛋白水解 IL-1β 和 IL-18 两种细胞因子[48]。这些细胞因子的激活是否在调节吞噬细胞对凋亡细胞的应答方面发挥作用，目前尚未确定。

817

caspase 抑制剂可以完全抑制由死亡受体如 Fas 激活而启动的细胞死亡[49]。因此，受体介导的凋亡所涉及的生理性蛋白酶是 caspases。但是，在另一些类型的凋亡中，caspase 作为死亡效应分子的中心地位还没有得到肯定[50]。例如，生长因子撤除后，虽然 caspase 抑制剂可以防止细胞发生与凋亡相关的形态学变化，但是重新施加生长因子后，绝大多数的被 caspase 保护的细胞都不能复原[51]。虽然 caspase 的活性是凋亡独特形态所必需的，但不可逆性细胞损伤后也发生 caspase 的活化。

caspase 不是启动凋亡反应的惟一蛋白酶。多种多样的蛋白酶通过显微注射进入细胞后，也可以诱导细胞凋亡[6]。提示 caspase 可能是细胞程序性死亡的主要生理效应分子，其他蛋白酶则可以作为凋亡启动分子或者通过 caspase 的蛋白水解激活来诱导凋亡。

Bcl-2 蛋白

凋亡信号启动以及 caspase 活化放大的水平受 Bcl-2 蛋白家族的调控[24]。目前的研究资料表明 Bcl-2 并不是抑制细胞程序性死亡的某个特定环节，而是改变细胞的凋亡阈值(apoptotic threshold)[5]。Bcl-2 过度表达的细胞在多种凋亡诱导剂的处理下也会发生程序性死亡。但是，足以诱导程序性死亡的诱导剂剂量必须远大于没有 Bcl-2 的情况。

已经鉴定了多种 Bcl-2 相关蛋白(图 23.5)[24,52,53]。有些矛盾的是，某些家族成员可以促进细胞存活，而另一些成员则增加细胞对程序性死亡的敏感性。Bcl-2 的 5 个同源蛋白(homolog)具有抗凋亡的活性，包括 Bcl-x_L、Bcl-w、Mcl-1、NR-13 和 A-1。而 Bcl-2 家族的 2 个促凋亡成员(proapoptotic member) Bax 和 Bak 也已被发现[54~56]。它们能对抗 Bcl-2 或 Bcl-x_L 促进细胞存活的活性。Bcl-2 相关蛋白的共同特性是，它们都与家族中其他成员形成同型二聚体或异型二聚体。例如，Bcl-2 和 Bcl-x_L 能与 Bax 形成异二聚体。在转染细胞中，Bcl-2 和 Bax 的比例影响着凋亡阈值[57]。过量的 Bcl-2 促进细胞存活，过量的 Bax 则促进细胞死亡。传统上，也是根据 Bcl-2 家族成员是具有促进凋亡还是抑制凋亡的活性，将它们分为不同的亚群。但最近的资料提示，对于单个家族成员而言，是具有促凋亡活性还是具有抑制凋亡的活性取决于细胞周围的环境[58]。由于这些蛋白的氨基酸序列具有高度的相似性，因此 Bcl-2 相关蛋白的功能可能具有生化连续性(biochemical continuum)。Bcl-2 相关蛋白的一个共同特点是，这些蛋白的 C 端都含有一个疏水性区域。该区域是蛋白质插入内质网膜、线粒体外膜和核外膜的必要充分条件[53,58]。作为信号转导蛋白，这种胞内分布模式是十分罕见的，提示 Bcl-2 相关蛋白可能具有新的生物化学功能。

图 23.5 Bcl-2 相关蛋白。根据序列的相似性，Bcl-2 相关蛋白可分为 3 个子家族。虽然抗凋亡和促凋亡蛋白在其全长序列上都显示出相当大的序列相似性，但第三类 Bcl-2 相关蛋白与其他家族成员相比，仅有有限的序列相似性。这些蛋白的序列相似性都集中在一个单 α 螺旋结构域，即 BH3 同源区域中。

抗凋亡蛋白	促凋亡蛋白	仅有 BH3 同源性的蛋白分子
Bcl-2	Bax	Bad
Bcl-x_L	Bak	Bid
Bcl-w	Bcl-x_s	Bik
Mcl-1		Hrk
NR-13		

Bcl-2 相关蛋白 Bcl-x_L 的三维结构已经解析，并由此确定了另外 2 个功能结构域。第一个功能结构域由一个巨大的柔软的环组成，它对于 Bcl-x_L 的抗凋亡活性可有可无。这个环结构域几乎占据了蛋白质分子的 1/4，是参与蛋白质功能翻译后调控的一个重要区域[59]。蛋白质剩下的部分是由 7 个 α 螺旋组成，其中 2 个疏水性螺旋位于中央，四周由 5 个两性螺旋围绕[60]。α 螺旋束(α-helical bundle)的顶部是一个疏水性沟槽，与细胞表面受体蛋白的配体结合位点相似[61]。实验已经证实，它是 Bcl-x_L 结合促凋亡蛋白 Bak 和 Bax 上一个由 16 个氨基酸组成的 α 螺旋所必需的结构。Bak 和 Bax 的这个 α 螺旋区域被称为 Bcl-2 同源结构域 3(homology domain 3, BH3)。BH3 结构域也出现在能与 Bcl-x_L 组成异二聚体的蛋白分子中，例如 Bad，Bik，Hrk 和 Bid[57,62~64]。该亚群的蛋白质分子通过使 Bcl-x_L 的抗凋亡功能失活而具有促进凋亡的作用。有趣地是，将疏水性沟槽突变可抑制 Bcl-x_L 与含有 BH3 的蛋白质形成异二聚体[65]。但这些 Bcl-x_L 的突变体仍保留抗凋亡活性。

最近，数家实验室认为，Bcl-2 和 Bcl-x_L 通过与 caspase 激活所需的蛋白质组成无活性的异二聚体来促进细胞存活。其中一种蛋白质就是线虫的促凋亡蛋白 CED-4。Bcl-2、Bcl-x_L 和线虫的 Bcl-2 同源蛋白 CED-9 均可与哺乳动物转染细胞中的 CED-4 结合[66~68]。而且，Bax 的结合可以阻止 Bcl-x_L 与 CED-4 结合[66]。提示存在着这样一个模型：Bcl-2 和 Bcl-x_L 通过隔离哺乳动物的 CED-4 同源蛋白，阻止这些蛋白质激活 caspase 来实现抑制凋亡的活性。在这个模型中，Bax 与 Bcl-2 结合，使 CED-4 游离出来激活 caspase，因此可能具有促凋亡活性。但是，同样可能发生的是，CED-4 结合 Bcl-2 相关蛋白来抑制 Bcl-2 同源蛋白的抗凋亡功能。

818

$Bcl-x_L$ 抗凋亡结构域的三维结构与大肠杆菌素(colicin)的穿孔结构域具有显著的同源性[60]。大肠杆菌素的穿孔结构域能够插入生物活性膜并形成穿膜孔。Bcl-2 相关蛋白的胞内膜定位包括内质网、线粒体外膜和核外膜,提示 $Bcl-x_L$ 在真核细胞中也具有类似的功能。与这种可能性相一致的是,$Bcl-x_L$ 能在合成的脂质双分子层中形成一个离子导电孔(ion-conducting pore)[69]。Bcl-2 和 Bax 也能够在合成膜上形成离子导电孔[70~72]。也许存在这样的机制:Bcl-2 蛋白通过调节所在细丙膜的通透性来维持动态平衡。根据其特性的不同,这种孔可能通过消除细胞内必需的电化学梯度来促进细胞死亡,或者通过维持细胞内各区域之间的离子或蛋白质的动态平衡来促进细胞存活。

与 Bcl-2 蛋白可以调节细胞膜通透性这一假说相一致,Bcl-2 的表达可以增强线粒体的完整性[51]。将细胞色素 c 注射到活细胞的胞液中可诱导凋亡[73]。细胞色素 c 通常分布于线粒体的内膜空间中。在凋亡应答的早期,细胞色素 c 重新分布,进入胞液中[13,14,51]。在三磷酸腺苷和哺乳动物类 CED-4 的同源蛋白 Apaf-1 存在的情况下,胞液中的细胞色素 c 可有效激活 caspase[16,28]。不论是内源性 Bcl-2 还是加入的外源性 Bcl-2,高水平的 Bcl-2 都能避免细胞色素 c 在各种凋亡刺激所引起的应答中从线粒体释放出来。综合含有 Bcl-2 的线粒体或 Bcl-2 缺陷的线粒体实验结果,证实只有当线粒体表面存在 Bcl-2 时,才能阻止细胞色素 c 的释放[14]。这些实验似乎有利于以下假说:Bcl-2 是通过直接或间接地保持胞膜完整性来维持细胞存活。但是,最近有个研究小组认为,Bcl-2 阻止细胞色素 c 从线粒体释放是因为细胞色素 c 是 $Bcl-x_L$ 的配体[74]。因此,在调节程序性细胞死亡的过程中,这些 Bcl-2 相关蛋白的配体结合活性与穿孔活性,哪一个发挥更大的作用仍是一个悬而未决的问题(图 23.6)。

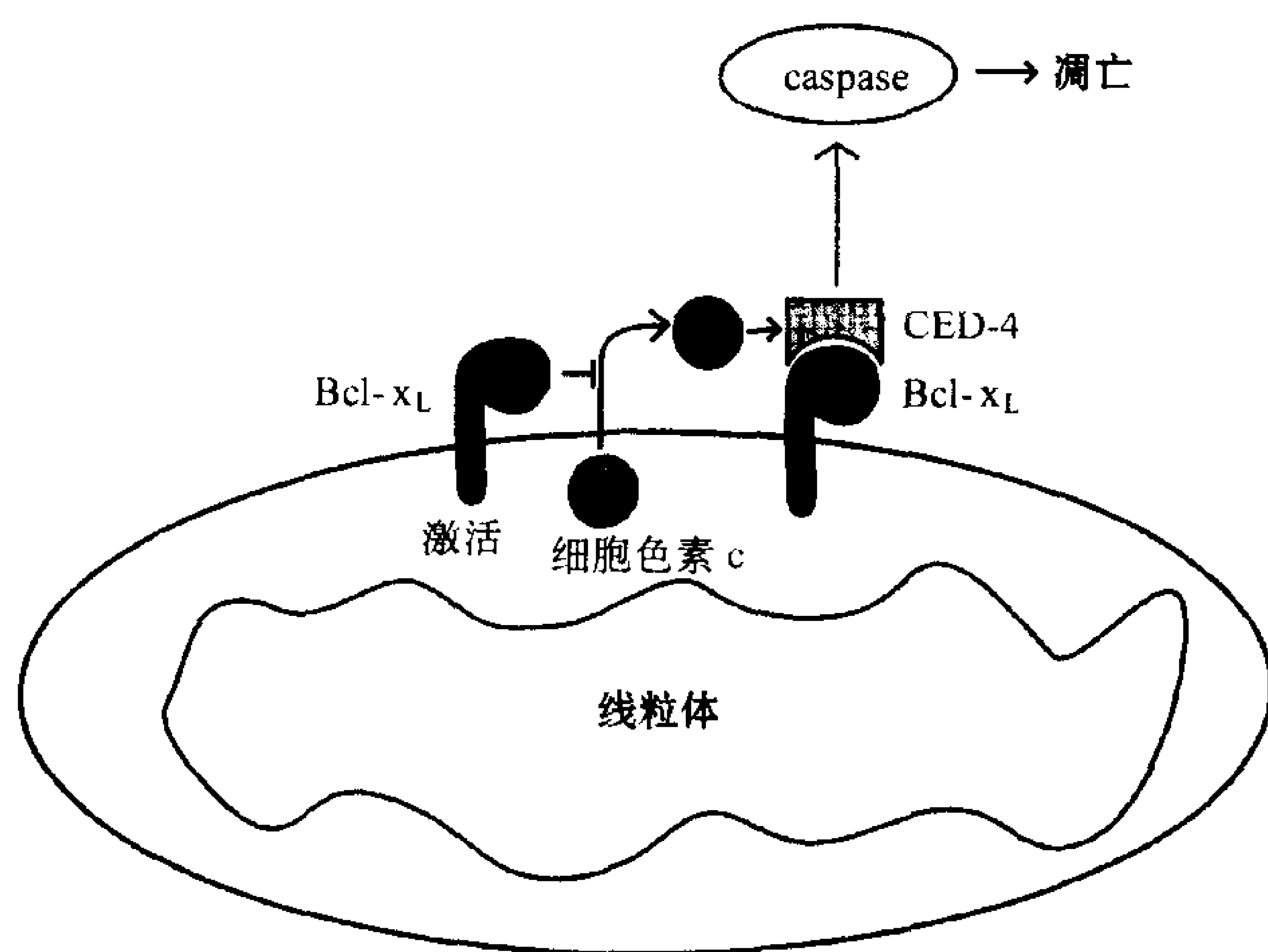


图 23.6 $Bcl-x_L$ 调控胞质 caspase 激活的可能理论机制模型。据报道,$Bcl-x_L$ 通过维持线粒体外膜完整性阻断线粒体的细胞色素 c 重新分布。此外,$Bcl-x_L$ 与促凋亡蛋白 CED-4 结合。CED-4 的人同源蛋白 Apaf-1 在细胞色素 c 存在的情况下是 caspase 直接激活因子。因此,$Bcl-x_L$ 可通过与 CED-4 结合并阻断它与细胞色素 c 相互作用来阻止 caspase 的激活以阻止凋亡发生。或者,CED-4 结合 $Bcl-x_L$ 并使其失活,促进细胞色素 c 重新分布并诱导凋亡发生。

致病病毒编码蛋白质抑制宿主细胞的凋亡

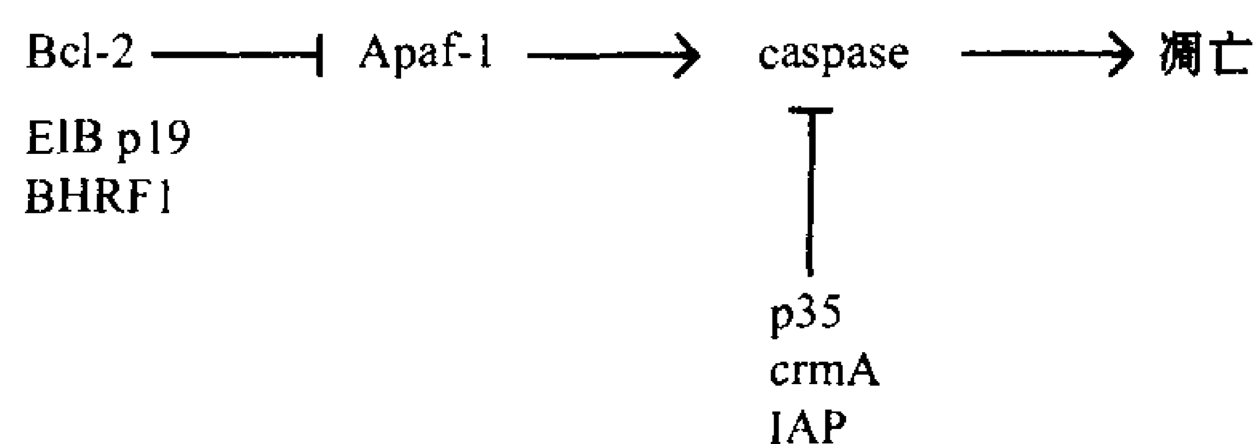


图 23.7 调控细胞死亡主要信号途径的病毒基因。病毒 Bcl-2 同源物存在于疱疹病毒(BHRF1)和腺病毒(E1B p19)家族中。caspase 抑制因子存在于杆状病毒(p35, IAP)和 Pox 病毒(crm A)中。

为了生存,病毒必须使宿主细胞存活直到病毒完成它自身的生命周期。感染细胞针对内部新陈代谢的扰动而发生细胞凋亡的能力,是多细胞生物体防御并限制病毒扩散的第一道防线。由于细胞凋亡涉及到细胞内容物的顺序性破坏,无疑会破坏病毒的基因组和初期产生的病毒颗粒。病毒于是整合了多种多样的基因进入自身基因组中,而这些基因的产物可抑制宿主细胞的凋亡(图 23.7)。某些基因产物通过信号传导途径的调变来发挥作用。另一些病毒蛋白可以作为感染细胞自分泌的存活因子来发挥作用。还有一些病毒

蛋白可以抑制死亡受体的功能。例如,几种痘病毒可以编码分泌型的 TNF 受体[74]。病毒感染细胞分泌这种蛋白质竞争性结合 TNF,来阻止 TNF 诱导的感染细胞凋亡。疱疹病毒也编码一些调节凋亡信号的蛋白质。如多种疱疹病毒可以编码抑制 Fas 和 TNF 信号转导的蛋白质[75,76]。此外,疱疹病毒和腺病毒还可以编码 Bcl-2 同源蛋白[77,78]。这些转染的 Bcl-2 相关蛋白过度表达后,具有抗凋亡的活性。

caspase 是病毒影响细胞凋亡最常见的胞内靶分子。痘病毒编码的 crmA 就是一种有效的 caspase 1 抑制剂[79]。通过抑制 caspase 1,crmA 不仅能部分阻断凋亡,还能阻止宿主细胞 IL-1 前体转化为活化的 IL-1,进而限制免疫应答。昆虫杆状病毒编码 2 个不同的 caspase 抑制剂。p35 是广泛的活性 caspase 抑制剂,它可以作为 caspase 的底物,但是一旦裂解后仍能与活性蛋白酶结合[80]。相反,杆状病毒凋亡蛋白抑制剂(inhibitors of apoptosis proteins, IAP)为 caspase 3 和 caspase 7 的非底物抑制剂(nonsubstrate ingibitors)。在多种类型的程序性细胞死亡中,caspase 3 和 caspase 7 都是主要的效应因子[81,82]。最近又鉴定了几个抑制凋亡的哺乳动物 IAP 同源蛋白[83~85]。一旦过度表达,这些蛋白质也能通过抑制 caspase 来阻止程序性细胞死亡。此外,IAP 蛋白与 TNF 相关受体的信号转导途径有关,但还不清楚 IAP 蛋白在这些信号途径中所扮演的角色[86]。

上述观察支持这样一个假说:病毒"任命"(co-opted)宿主细胞的蛋白质来调节程序性细胞死亡,以促进宿主细胞的存活和病毒的复制。目前,正在从其他病毒基因组中筛选编码干扰细胞凋亡的蛋白质的基因。这些基因的鉴定和分析将确定凋亡应答中的另一些关键性调控步骤。

细胞凋亡是免疫系统的效应成分

执行凋亡的蛋白质都是组成型表达,并且存在着启动细胞凋亡的信号传导途径,这些均暗示了凋亡对于免疫系统的重要性。细胞毒性 T 细胞启动靶细胞死亡的一个机制就是通过诱导能够启动靶细胞凋亡应答的蛋白质分子来实现的[87]。例如,细胞毒性 T 细胞通过穿孔素和颗粒酶 B 的联合作用诱导靶细胞凋亡。细胞毒性 T 细胞识别靶细胞后,贮存在细胞毒性颗粒中的穿孔素和颗粒酶 B 释放出来。穿孔素促进颗粒酶 B 进入靶细胞,颗粒酶 B 激活 caspase[88~92]。除 caspase 以外,颗粒酶 B 是目前惟一已知的在天冬氨酸残基处发挥裂解作用的蛋白酶。脊椎动物的所有细胞都内源性表达执行凋亡的蛋白酶,提示存在着这样一个机制:细胞毒性 T 细胞能启动所有靶细胞的死亡。细胞毒性 T 细胞也能作用于细胞死亡受体,特异性诱导信号转导通路以激活这些蛋白酶[87]。由于细胞应激(cell stress)可诱导基质细胞表达细胞死亡受体,因此,细胞毒性 T 细胞采用基于受体的细胞死亡通路,对于在炎症应答的复杂环境中选择性杀伤受损细胞有重要作用。细胞毒性 T 细胞只启动受损的或感染的靶细胞发生凋亡,可能是细胞毒性细胞在根除感染的同时限制组织损伤的一个重要机制。

不幸地是,免疫细胞任命一个组成型表达的内在编码系统来根除感染的或可能受损的细胞,对于宿主细胞也有负面影响。在许多细胞谱系中,一个谱系功能的维持通过细胞增殖和细胞死亡的平衡来调节。但在有些细胞类型中,例如神经细胞,自我更新的能力很有限。绝大多数的神经细胞寿命与有机体一样长。那么为什么在这些组织中,免疫细胞介导细胞死亡受到限制? 相关机制研究才刚刚开始。虽然这样的保护机制可以避免消除不能替换的细胞,但是对免疫诱导的凋亡耐受也可能导致免疫系统不能根除感染细胞或不正常的细胞。

淋巴细胞存活的调节

如其他类型细胞一样,淋巴细胞的数量也同时受到细胞增殖和凋亡的调节。对于免疫系统调控细胞存活的机制,人们才刚刚开始有所了解。凋亡是淋巴细胞发育和自稳调节所必需的。由于 V(D)J 重排的不精确性,大量的细胞没有正确发育分化为 B 细胞或 T 细胞。为了避免无功能细胞的堆积,必须剔除这类细胞。不能产生有效的 T 细胞受体(TCR)或者膜表面免疫球蛋白受体复合物的淋巴细胞都将发生凋亡。此外,通

过阴性选择，发育过程中出现的潜在性自身反应性 B 细胞或 T 细胞也被清除。其中的细胞死亡也是通过凋亡来实现的[93,94]。因此，影响发育中淋巴细胞存活的因素，对于免疫应答的塑造起着关键性作用。

一旦脊椎动物进入成年期，机体的淋巴细胞数目在一生中都保持相对恒定。但是参与宿主防御的淋巴细胞经历着周期性的扩增和缩减。为了提供有效的免疫应答，抗原特异性的淋巴细胞必须进行大量的克隆扩增来使宿主清除病原体。但是，成功清除病原体后，必须相应地缩减淋巴细胞以维持细胞谱系数量的稳定。下一节将讨论凋亡在淋巴细胞发育和存活方面的调节作用。

凋亡在淋巴细胞发育中的调节作用

由于 V(D)J 重排的不精确性，大部分发育的淋巴细胞都不能产生可表达的抗原受体。即使抗原受体基因重排正确，能在细胞表面表达 TCR 或免疫球蛋白受体也不能保证该淋巴细胞可以完成发育。据估计，胸腺中可以产生 TCR 的胸腺细胞中，95%以上既不能进行阳性选择也不能进行阴性选择[93]。胸腺中的 TCR 阳性胸腺细胞，若不能进行选择，半寿期(half-life)大约为 4 天。这些被忽略的淋巴细胞(neglected thymocyte)的存活受 Bcl-2 蛋白的调控。基因去除实验中，无 Bcl-x_L 的胸腺细胞因忽略而死亡时，半寿期大约为 1 天[95]，提示 Bcl-x_L 对维持这类细胞的半寿期起关键性作用。增加 Bcl-2 或者 Bcl-x_L 的组成性表达可促进双阳性胸腺细胞的堆积。对 B 细胞的发育的观察也得到类似的结果[96]。去除 Bcl-x_L 可减少前 B 细胞的存活，而增加 Bcl-x_L 的表达可导致非成熟细胞的堆积。

820 Bcl-2 家族成员的过度表达似乎对胸腺的选择结果没有明显的影响[96a]。因此，阴性选择中的细胞死亡可能与细胞凋亡无关，甚至包括 Bcl-2 非依赖的凋亡；也可能是因为 Bcl-2 的功能失活。第一种不太可能，因为阴性选择中，胸腺细胞死亡的形态学变化具有程序性细胞死亡的所有典型特征[93,94]。最近证实，Bcl-2 蛋白可以在翻译后失活，提示阴性选择中 Bcl-2 蛋白的失活是一种可能。当然，这还需要进一步研究[59]。另一种可能是，阴性选择提供了一种持久的或者强烈的信号，以至于无论 Bcl-2 的表达水平有多高，它都能克服因 Bcl-2 蛋白而提高的细胞凋亡阈值。这与阴性选择是源于 TCR 高亲合力信号的假说相一致。非成熟胸腺细胞上强烈的或持久的 TCR 信号可能引起细胞周期或细胞新陈代谢中的冲突(conflict)，进而克服 Bcl-2 蛋白所设置的凋亡阈值。这与如下假说相一致：细胞的存活是来自不同促凋亡或抗凋亡信号通路的信号，在强度和持续时间方面整合的结果。TCR 结合(engagement)导致的胸腺细胞死亡涉及新的蛋白质合成，提示 TCR 信号转导诱导了促进细胞死亡所涉及的基因产物。几种转录诱导的基因(transcriptionally induced gene)，包括 Nur 77 和相关的类固醇受体，都可能与胸腺细胞凋亡有关[97,98]。

外周淋巴细胞自稳的调节

在初级淋巴器官和外周血中循环的绝大多数外周 B 细胞和 T 细胞都是处于静息或静止状态。虽然初始细胞(naive cell)的寿命比记忆细胞短，但也有几周或几个月。这些静息细胞的存活对于维持免疫系统的预见性是很关键的。特别是青春期后，这一点尤为重要，因为此时胸腺退化，产生新 T 细胞的速度明显减少。与其他细胞一样，静息淋巴细胞的存活依赖于细胞从周围环境中所获得的存活信号。静息的淋巴细胞从淋巴结或者脾移除后，会快速发生凋亡，而这种凋亡能被 caspase 抑制剂所阻断[99]。

已鉴定出两种类型的胞外信号支持静息淋巴细胞的存活。一种是细胞从它的基质环境中所获得的存活信号。如果细胞不能移动到淋巴结和脾的适当环境中，其存活能力会大大降低[100]。静息淋巴细胞接受存活信息部分是通过抗原受体。在外周淋巴器官中，缺乏抗原受体的 B 细胞迅速发生凋亡[101]。将 T 细胞转入到 MHC 缺陷型动物体内，其寿命变短[102]。此外，募集到炎症部位的静息淋巴细胞可由炎症细胞因子促进其存活。即使没有抗原受体的激活，炎症损害所产生的细胞因子也可促进淋巴细胞的存活[103,104]。这样便能避免细胞在炎症损伤这个促凋亡环境中被清除掉，也防止具有保护作用的免疫细胞库被不适当地清除。

除胞外存活信号外，静息的 T 和 B 细胞也依赖于 Bcl-2 的内源性表达[105,106]。Bcl-2 在静息的淋巴细胞中组成性表达。Bcl-2 基因缺损的动物因静息淋巴细胞的进行性丧失而很快表现为免疫缺陷。因此，Bcl-2 对于静息淋巴细胞的长期存活非常关键。

静息淋巴细胞的抗原受体与抗原的结合会诱导细胞进入细胞周期(图 23.8)。但是，单独的这一信号并不足以维持细胞存活。在缺乏其他生长因子或共刺激受体的情况下，抗原激活的细胞更易于发生凋亡。抗原受体的激活导致程序性细胞死亡的敏感性增加，它的具体机制仍存在争议。抗原依赖性激活中，通过共刺激受体，如 T 细胞上的 CD28 受体或 B 细胞上的 CD40 受体介导的信号转导，不仅促进了细胞增殖而且促进了细胞存活[107~112]。活化细胞的克隆增殖受一系列生长因子的调节，包括 IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-9 和 IL-15。这些细胞因子促进了细胞的存活，也促进了整个细胞周期的进行[103,113~116]。活化细胞的克隆扩增受限于这些因子，如果在免疫应答的扩增期撤除这些生长因子，细胞将死于凋亡。

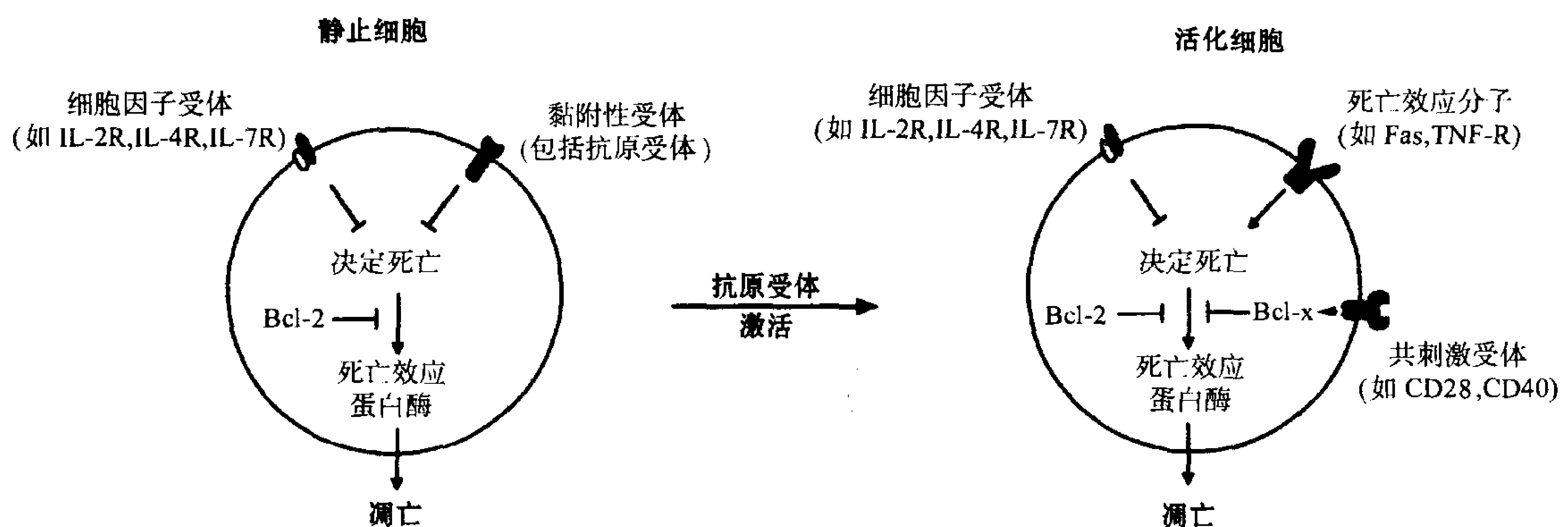


图 23.8　调控静止淋巴细胞和活化淋巴细胞凋亡敏感度的各种因素。

一旦免疫应答临近结束，抗原或共刺激配体变得越来越有限，扩增的克隆细胞就会对由细胞死亡受体介导的清除变得敏感。这些死亡受体包括 Fas，1 型和 2 型 TNF 受体(TNF-R1 和 TNF-R2)[43,117~125]。Fas 缺陷的动物在发生免疫应答后不能适当地清除细胞，导致静息的淋巴细胞进行性堆积。动物因此发生自身免疫性疾病的趋向增强[124,125]。Fas 表型缺陷并伴随 TNF-R1 缺陷的动物则更加严重[123]。提示在免疫应答末期消除多余免疫细胞的过程中，这 2 个受体的作用有部分冗余。但目前还不清楚是什么因素决定了炎症应答产生的细胞中，什么细胞将存活下来，什么细胞将继续转变为记忆细胞。细胞存活与否可能存在着随机性。例如，仅有极少数细胞能够到达淋巴滤泡，并在淋巴滤泡的支持下长期存活，而避免被带有 Fas 配体(Fas ligand, FasL)的细胞清除。

以上资料表明存在这样一个模式，活化的淋巴细胞是否存活取决于 3 个不同信号途径的整合作用[126]。抗原受体激活后，细胞的存活和克隆扩增受细胞因子受体控制，而细胞的清除则受细胞死亡受体，包括 Fas 和 TNF-R1 控制。共刺激受体对于避免细胞在生长因子不足或死亡受体介导信号转导的情况下发生死亡具有重要作用。但是，没有一个信号途径是以全或无的方式(all-or-none sense)发挥决定性作用。一个细胞在体内的应答方式似乎取决于这些不同信号途径形成的信号网络的综合作用。

共刺激受体增强 Bcl-x_L 的表达

CD28 和 CD40 促进细胞存活的共同机制，就是通过 Bcl-2 相关蛋白 Bcl-x_L 特异性的短暂上调来实现的[107,108,111,112]。Bcl-x_L 的表达可避免细胞在生长因子不足或者 Fas 介导信号转导时发生死亡[107,127]。CD28 或 CD40 介导的信号仅能诱导抗原活化的细胞表达 Bcl-x_L。在抗原受体没有结合抗原的情况下，CD40 的结合可

822

促进细胞死亡[128,129]。无论是 CD28 还是 CD40 都只是短暂诱导 Bcl-x_L 的表达,仅能维持 3~4 天[107,111]。也仅限于 Bcl-x_L 表达期间可以保护细胞不发生死亡。

细胞因子诱导的细胞存活

相对来讲,生长因子促进活化淋巴细胞存活的机制还了解得不多。最近阐明了生长因子如何促进细胞存活的一个例子(图 23.9)。IL-3 受体介导的信号激活激酶,导致 Bcl-x_L 抑制物 Bad 的磷酸化[130]。Akt 就是一个可以磷酸化 Bad 的生长因子依赖性激酶[131,132]。由于 Akt 的活化依赖于磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol -3 kinase),因此这些激酶有利于细胞存活的一个机制便是通过 Bad 的磷酸化[133~137]。磷酸化的 Bad 不能与 Bcl-x_L 结合。于是释放 Bcl-x_L,再通过 Bcl-x_L 与其他细胞死亡效应分子的结合,或者通过 Bcl-x_L 作为一个离子型通道调节膜通透性来促进细胞存活。撤除 IL-3 介导的信号,Bad 迅速去磷酸化。去磷酸化的 Bad 就能与 Bcl-x_L 结合,相当于替换了与 Bcl-x_L 结合的死亡效应分子,或者通过改变 Bcl-x_L 插入细胞膜所必需的构象来抑制 Bcl-x_L。因此,Bad 表现出以生长因子依赖的方式来调节 Bcl-x_L 的功能。尚不清楚其他的 Bcl-x_L 抑制因子,如 Bik 和 Bid,是否也是采用类似的调控方式。

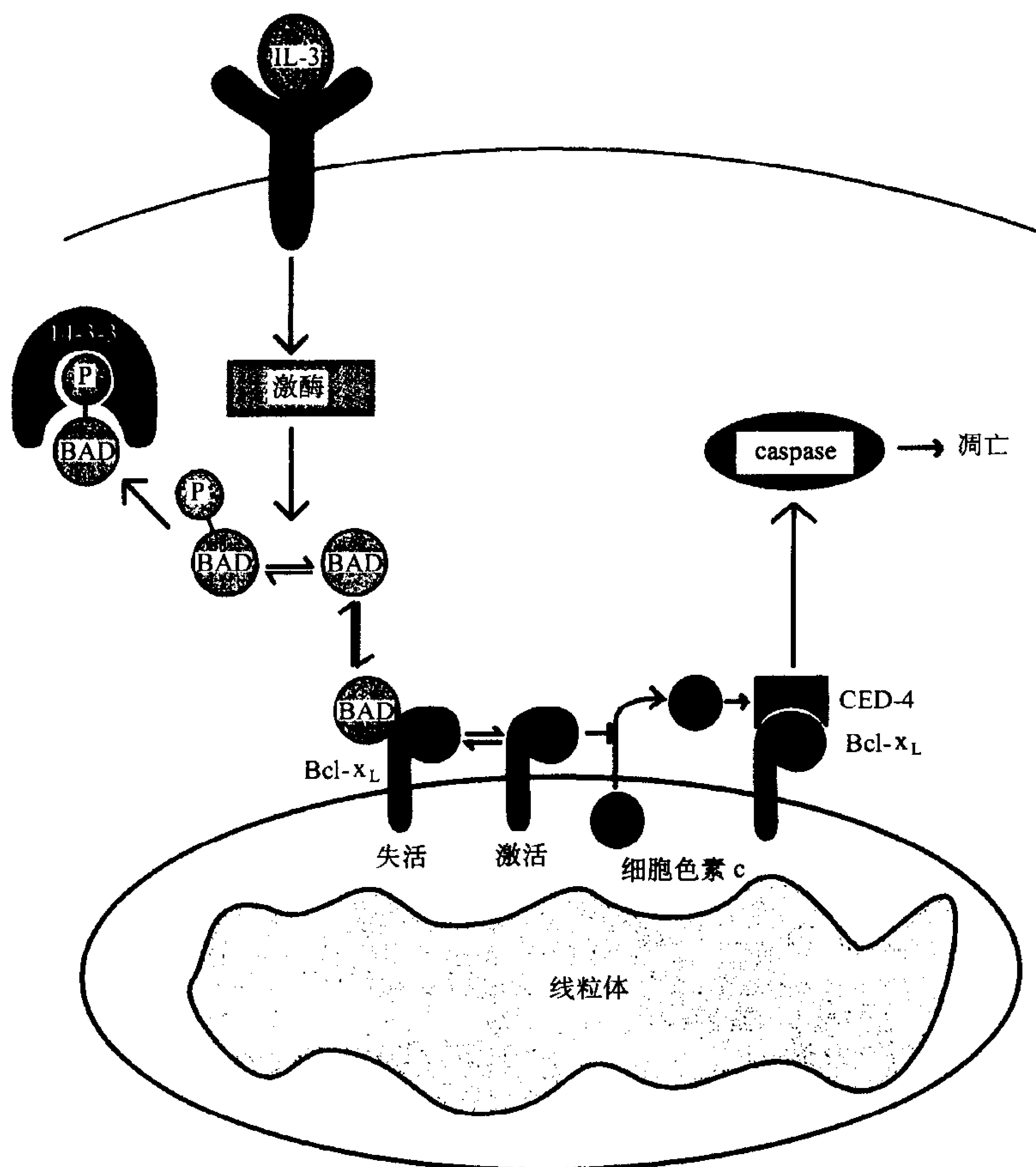


图 23.9 IL-3 生长因子通过使 Bcl-2 抑制子 Bad 失活来促进细胞存活的分子机制概图。目前有证据提示能够导致 Bad 磷酸化的激酶是 Akt。磷酸化的 Bad 在胞质中与 14-3-3 蛋白相互作用后被扣留。磷酸化作用和扣留作用都阻止 Bad 与 Bcl-x_L 相互作用,使得 Bcl-x_L 保持活化形式,调控程序性细胞死亡。

TNF 受体介导的信号转导

关于细胞死亡调控的争论,其中一个涉及到 Bcl-2 蛋白阻止 TNF 受体相关蛋白 Fas 诱导细胞死亡的能力[138~142]。同 TNF 受体家族中其他成员一样,Fas 也会发生配体诱导的三聚体化(ligang-induced trimerization)(图 23.10)。这样的三聚体化导致 FADD 接头(adaptor)的募集。FADD 全称为与 Fas 结合的包含死亡结构域的蛋白质(Fas-associated death domain-containing protein, FADD),也叫 MORT1[143,144]。FADD 中包含一个介导蛋白质间相互作用的结构域,称为死亡效应结构域(death effector domain),可促进 FADD 与含有死亡效应结构域的其他蛋白质形成二聚体。最近鉴定了这样的一个蛋白质,称为 FLICE/MACH1/Mch5(caspase 8)[145,146]。caspase 8 是 caspase 家族的一个成员,其氨基末端含有 2 个独立的死亡效应结构域。caspase 8 通过 FADD 募集到 Fas 信号转导复合物(Fas signal transduction complex)上,导致 caspase 8 的自身催化裂解,释放活性蛋白酶亚基。一旦活化,caspase 8 活化细胞内其他的 caspase,并降解胞内底物。

823

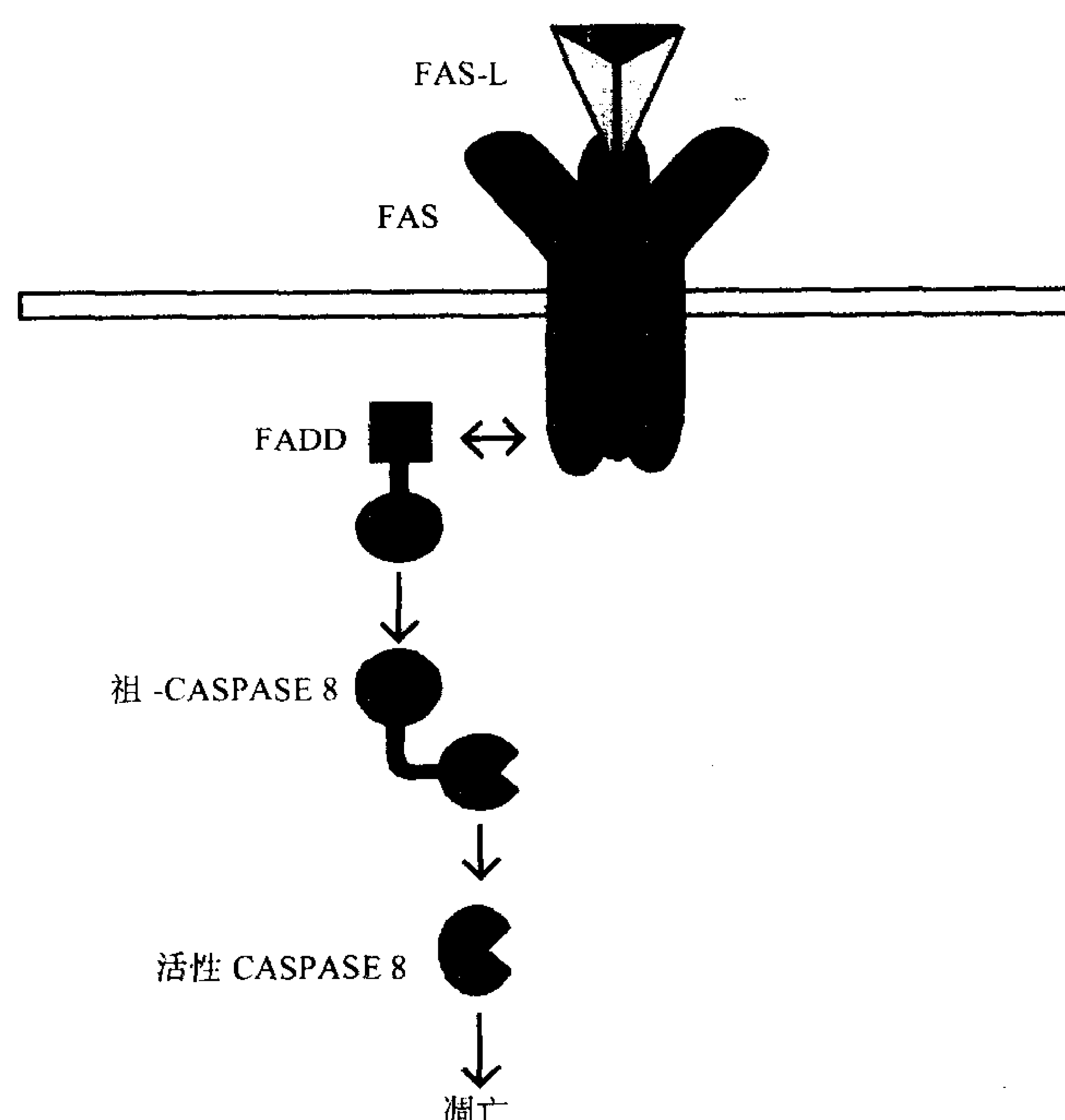


图 23.10 通过 Fas 受体激活的细胞死亡途径概图。

因此,Fas 信号转导途径涉及募集和活化 caspase 的信号接头分子。这让人很难理解 Bcl-2 家族的蛋白质分子如何抑制 Fas 诱导的细胞死亡。但在几种细胞系统中,Bcl-2 或 Bcl-x_L 的过度表达确实可以防止 Fas 介导的细胞死亡[140,142,147,148]。已提出 2 种不同的假说来解释上述现象。生化方面的近期资料提示,Bcl-x_L 蛋白可直接或间接结合 caspase 8,使之与其他成分隔离[66]。通过将 caspase 8 隔离到胞内细胞器,Bcl-x_L 可以阻止 caspase 8 募集到 Fas 受体复合物上。然而另外一些研究人员发现,表达 Bcl-2 的细胞中,caspase 8 的激活是 Fas 依赖性的,并保持在相对正常的水平[148,149]。换句话说,他们的资料提示:Bcl-x_L 在 caspase 8 激活的下游阻断 Fas 诱导的信号转导,其机制可能是通过限制 caspase 放大,或者保护胞内细胞器如线粒体等免受 caspase 介导的蛋白水解作用。上述 2 种分子机制相互并不排斥,并且两个都一致报道 Bcl-2 蛋白能够与促凋亡蛋白结合,并能调节膜的通透性。

TNF 受体家族有一个令人好奇的地方:虽然某些成员,如 Fas、TNF-R1、DR3、DR4 和 DR5 都含有可募集、

激活 caspase 的死亡结构域[150~156]，其他 TNF 相关性受体则可能有效诱导细胞存活[157]。TNF 相关蛋白 CD40 是主要的 B 细胞共刺激受体(图 23.11)。CD40 转导的信号可有效刺激 B 细胞的存活、增殖和分化[158]。配体诱导形成三聚体后，CD40 募集了一组接头分子，称为 TNF 受体结合因子(TNF receptor-associated factors, TRAF)。目前有 6 个 TRAF 蛋白，均含有一个共同的 C 末端 TRAF 结构域。TRAF 结构域可以募集受体，也是受体募集所必需的[159~163]。与 TRAF 结构域的相互作用也会导致凋亡抑制蛋白(inhibitors of apoptosis proteins, IAP)募集到受体结合复合物上。3 个已知的 IAP——IAP1、cIAP2 和 ILP(x-IAP)都是凋亡的抑制剂[83~85]。此外，在受体-配体相互作用后，TRAF 蛋白的 N 端对于 NF-κB 和 Jun C 端激酶的活化具有重要的作用[164,165]。除 CD40 外，3 个 TNF 受体相关的 T 细胞共刺激分子 CD30、OX-40 和 4-1BB 也是通过接头蛋白的 TRAF 家族与 NF-κB 的活化相联系[166,167]。有趣的是，CD40 和 CD30 转导信号会产生两方面的结果，一方面，这些细胞内受体的主要作用是刺激淋巴细胞存活，另一方面，它们的次要作用是诱导并增加细胞对 TNF 受体家族中死亡诱导成员，如 Fas 和 TNF-R1 的敏感性[128,129,168,169]。提示在免疫应答的早期，CD40 和 CD30 转导的信号促进细胞的存活，而在晚期，则是建立有利于细胞清除的机制。

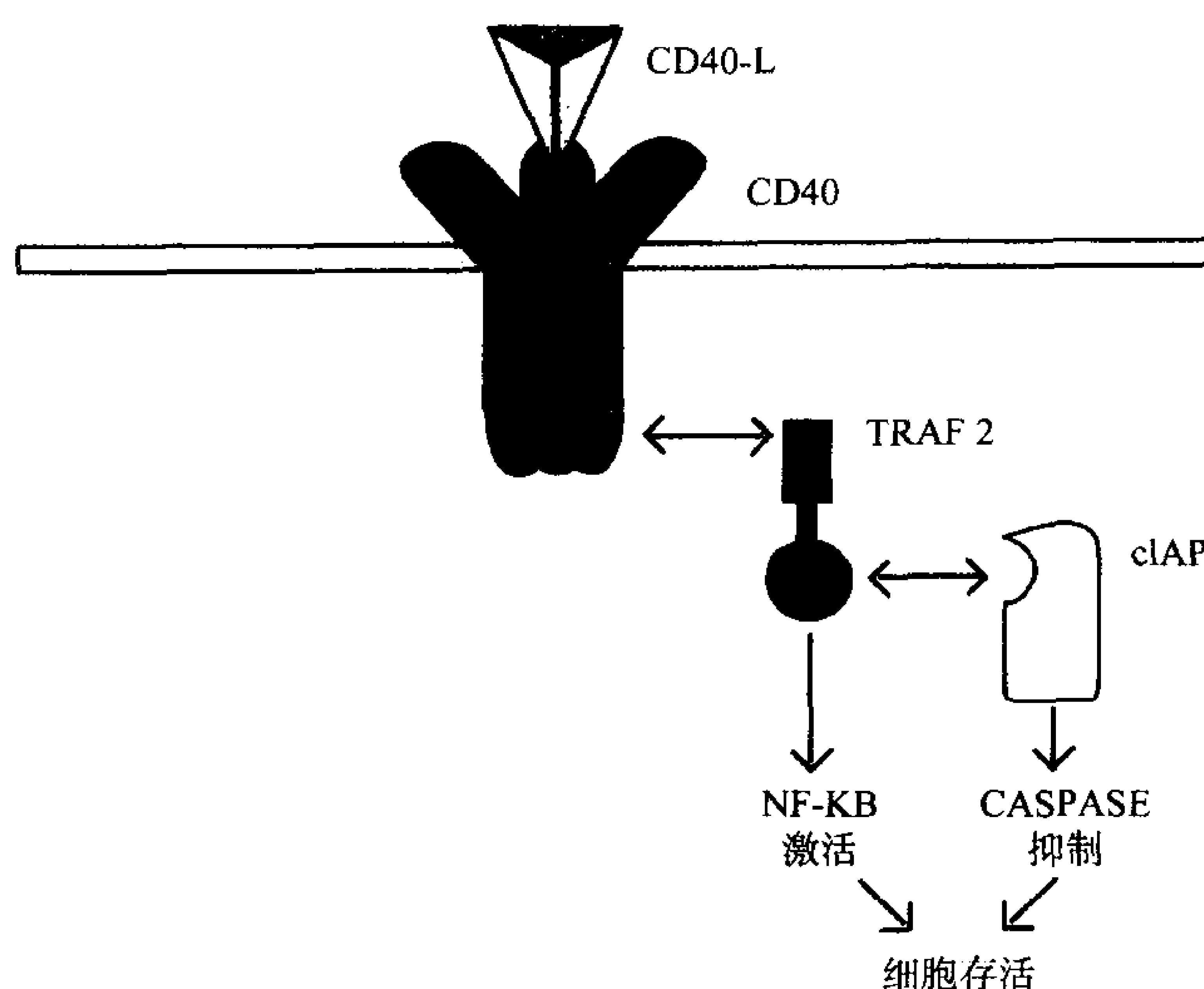


图 23.11 CD40 信号转导途径诱导细胞存活的概图。

受体介导 NF-κB 的活化，进而诱导促进细胞存活基因转录[170~172]。NF-κB 在维持淋巴细胞存活方面的重要性得到以下现象的支持：其他主要共刺激受体 CD28，能够有效地较长时间地抑制 IκB 的活性，导致 NF-κB 的激活[173]。相反，促进外周淋巴细胞死亡的糖皮质激素可通过 2 个不同的机制抑制 NF-κB 的激活：上调 IκB 的转录以及抑制 NF-κB 的 DNA 结合活性[174,175]。NF-κB 亚基 p65 缺陷的细胞存活性降低[176]。

TNF-R1 受体介导的信号转导远比 Fas 和 CD40 复杂[177](图 23.12)。募集到 TNF-R1 死亡结构域的接头分子是 TRADD。TRADD 可以通过 TRAF 2 传导信号，进而激活 NF-κB；或者通过 FADD 的募集，激活 FLICE。选择哪一种分子机制取决于一组目前尚不清楚的复杂变量。因此，TNF 受体家族的某些成员是促进淋巴细胞存活还是死亡，取决于细胞活化的状态和胞内可用的接头水平。最近，关于细胞 TNF 受体和 FADD 的诱捕均有报道。这些分子与配体或受体竞争结合，抑制凋亡信号的转导[155,156,178,179]。

产生免疫应答，细胞存活通路必须比细胞死亡通路占优势

根据信号转导的时间和水平的不同，共刺激因子、细胞因子受体或者细胞死亡受体产生的 3 种效应中，某一种会处于支配地位。例如，活化的 CD4 细胞对 Fas 诱导的细胞死亡敏感。但在体外实验中，CD4 细胞在

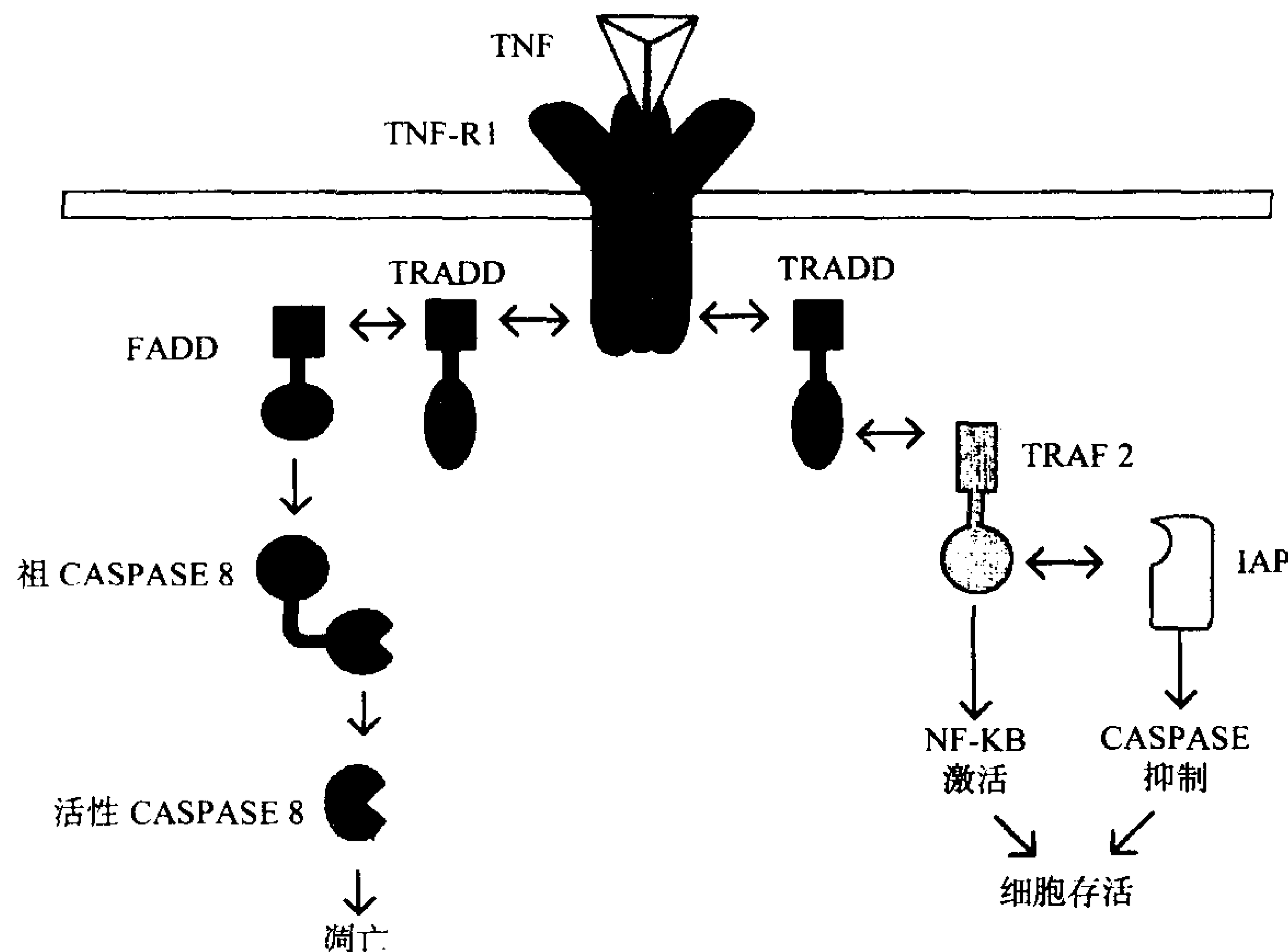


图 23.12　由 TNF-R1 受体启动信号转导的几种可能形式。

持续的 CD28 共刺激作用下，仍能通过反复的抗原受体结合而呈指数扩增[180]。这些细胞组成型表达 Fas，并可通过 TCR 的结合，诱导 FasL 的表达。然而将细胞在 CD28 共刺激作用下培养，细胞不能发生凋亡。T 细胞活化后 FasL 的短暂性表达可解释 FasL 为什么不能诱导那些接受共刺激因子和细胞因子受体存活信号的细胞死亡。相反，体内 FasL 的组成型表达可清除活化的 T 细胞。例如，组织移植物中细胞组成型表达 FasL，能够诱导移植物反应中活化的淋巴细胞发生死亡，以此避免免疫排斥反应[181]。

上述实验确定了通过共刺激因子或者细胞死亡受体最适刺激所产生的效应范围，但是最近的资料提示：在模拟免疫应答扩增期的情况下，诱导细胞死亡的信号转导从属于细胞存活的信号。但在增殖应答的任何时间，一旦失去抗原或共刺激因子受体的作用，活化细胞就对 Fas 或 TNF-R1 诱导的细胞死亡敏感。如果有什么不同的话，先用共刺激信号或淋巴因子处理，可以增强 T 细胞在增殖应答后被清除的敏感性。其他受体也能促进活化的淋巴细胞被清除。例如，转化生长因子 β 和 CTLA-4 的抗增殖作用可使 T 细胞对于随后地的清除过程更敏感[182,183]。这提示免疫应答中，细胞增殖的结束可以促进淋巴细胞的清除。抗增殖受体和细胞死亡受体相互协同，下调免疫应答。

免疫赦免

对免疫赦免现象一种可能的解释是，表达 FasL 的细胞能够清除活化的淋巴细胞[184,185]。已经发现眼部是一个植入外来组织而不发生免疫应答的部位。这一部位耐受外来组织的分子机制还在争论中。最近发现，眼的上皮细胞组成型表达 FasL，进而促进眼中活化的 T 细胞被清除[186]。FasL 或者 Fas 受体缺陷的动物不能表现出重要的免疫赦免现象。眼的上皮细胞也不是组成型表达 FasL 的惟一细胞。睾丸的支持细胞(sertoli cell)也表达 FasL[187]。睾丸的基质细胞和角膜表达 FasL，可以解释为什么这些组织容易接受同种异体移植物。类似的机制也被用于解释妊娠时的胎儿耐受和一些类型肿瘤的免疫逃避[189]。

一个研究小组发现：如果将抗原和凋亡的 T 细胞引入眼前房，便可以在 FasL 缺陷的动物中建立眼中的免疫赦免[190]。提示免疫赦免不仅是缺乏炎症应答的结果，而且是组织中凋亡免疫细胞积聚的免疫结果。因此，免疫细胞凋亡是终止炎症应答的一个信号。免疫应答中凋亡细胞的聚集可触发一些细胞的发育，它们具有下调或抑制进一步免疫激活的功能。

凋亡与自身免疫

826

凋亡性细胞死亡与 caspase 的激活有关，后者与细胞内其他蛋白酶相比，具有一个独特的蛋白水解裂解方式。因此，caspase 激活产生的多肽片段可能不同于一般蛋白酶体依赖性蛋白质更新所产生的多肽片段。当产生的新片段达到一定水平时就可能启动免疫应答。然而，由于凋亡性细胞死亡是动物体从发育开始便在许多组织中不断进行着的，因此能对凋亡细胞所产生的独特多肽片段有反应的 T 细胞可能已经被清除或者成为无反应性的。令人惊讶的是，许多人类自身免疫性疾病中所鉴定到的自身抗原都是凋亡性细胞死亡中 caspase 裂解的底物。这些抗原包括多聚 ADP 核糖聚合酶(poly-ADP ribose polymerase, PARP)、Rho、U1-70、核有丝分裂激活蛋白(nuclear mitotic activator protein, NuMA)、DNA 依赖性蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase)和 fodrin[191]。由此引出一个假说：某些类型的自身免疫性疾病是因为对凋亡性细胞死亡不正常的应答所引起的。虽然尚未确定不正常的应答是如何发生的，但这些现象支持这样一个假说：凋亡在调节免疫应答方面发挥积极的作用。正如本章开始所述，人们最初认为凋亡性细胞死亡是免疫沉默(immunologically silent)的表现。但是，随着越来越多的证据表明凋亡在免疫赦免的建立和自身免疫性疾病的发病机制中发挥作用，人们已经认识到，凋亡性细胞死亡在调节免疫应答方面发挥着积极的作用。

(李　华 译)

参 考 文 献

1. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue culture. *J Cancer* 1972;26:239–257
2. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991;7:663–698.
3. Chinnaiyan AM, Dixit VM. The cell-death machine. *Curr Biol* 1996;6:555–562.
4. Golstein P. Controlling cell death. *Science* 1997;275:1081–1082.
5. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456–1462.
6. Williams MS, Henkart PA. Apoptotic cell death induced by intracellular proteolysis. *J Immunol* 1994;153:4247–4255.
7. Kumar S. ICE-like proteases in apoptosis. *TIBS* 1995;20:198–202.
8. Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O, Kimchi A. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-γ, Fas/APO-1 and TNF-α. *EMBO J* 1996;15:3861–3870.
9. Vaux DL, Wilhelm S, Häcker G. Requirements for proteolysis during apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997;17:6502–6507.
10. Castedo M, Hirsch T, Susin SA, et al. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 1996;157:512–521.
11. Jacobson MD, Burne JF, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J* 1994;13:1899–1910.
12. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996;183:1533–1544.
13. Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129–1132.
14. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132–1136.
15. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, et al. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95– and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med* 1997;186:25–37.
16. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C. *Cell* 1996;86:147–157.
17. Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR, Newmeyer DD. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J* 1997;16:4639–4649.
18. Ren Y, Silverstein RL, Allen J, Savill J. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* 1995;181:1857–1862.
19. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251–306.
20. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992;356:494–499.
21. Yuan J, Horvitz HR. The *Caenorhabditis elegans* genes ced-3 and ced-4 act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev Biol* 1990;138:33–41.
22. Yuan J, Horvitz HR. The *Caenorhabditis elegans* cell death gene ced-4 encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 1992;116:309–320.
23. Hengartner MO, Horvitz HR. C. Elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 1994;76:665–676.
24. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386–401.
25. Vaux DL, Weissman IL, Kim SK. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 1992;258:1955–1957.
26. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1β–converting enzyme. *Cell* 1993;75:641–652.
27. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171.
28. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c–dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90:405–413.
29. Seshagiri S, Miller LK. *Caenorhabditis elegans* CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3–induced apoptosis. *Curr Biol* 1997;7:455–460.
30. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356:397–400.
31. Nagata S. Apoptosis: telling cells their time is up. *Curr Biol* 1996;6:1241–1243.
32. Oren M. Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death. *Semin Cancer Biol* 1994;5:221–227.
33. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994;15:7–10.
34. Meisenholder GW, Martin SJ, Green DR, Nordberg J, Babior BM, Gottlieb RA. Events in apoptosis. *J Biol Chem* 1996;271:16260–16262.
35. Lemasters JJ, DiGuiseppi J, Nieminen A-L., Herman B. Blebbing, free Ca^{2+} and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 1987;325:78–81.
36. Briehl MM, Cotgreave IA, Powis G. Downregulation of the antioxidant defence during glucocorticoid-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 1995;2:41–46.
37. Déas O, Dumont C, Mollereau B, et al. Thiol-mediated inhibition of FAS and CD2 apoptotic signaling in activated human peripheral T cells. *Int Immunol* 1997;9:117–125.
38. Wright SC, Wei QS, Kinder DH, Larrick JW. Biochemical pathways of apoptosis: nicotinamide adenine dinucleotide–deficient cells are resistant to tumor necrosis factor or ultraviolet light activation of the 24-kD apoptotic protease and DNA fragmentation. *J Exp Med* 1996;183:463–471.
39. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241–251.

40. Hyde H, Borthwick NJ, Janossy G, Salmon M, Akbar AN. Upregulation of intracellular glutathione by fibroblast-derived factor(s): enhanced survival of activated T cells in the presence of low Bcl-2. *Blood* 1997;89:2453–2460.
41. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997;389:300–304.
42. Fraser A, Evan G. A license to kill. *Cell* 1996;85:781–784.
43. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355–365.
44. Casciola-Rosen L, Nicholson DW, Chong T, et al. Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 1996;183:1957–1964.
45. Jänicke RU, Walker PA, Lin XY, Porter AG. Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J* 1996;15:6969–6978.
46. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, et al. Caspase-3–generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997;278: 294–305.
47. Rudel T, Bokoch GM. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 1997;276: 1571–1574.
48. Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, et al. Caspase-1 processes IFN-γ–inducing factor and regulates LPS-induced IFN-γ production. *Nature* 1997;386:619–623.
49. Longthorne VL, Williams GT. Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *EMBO J* 1997;16:3805–3812.
50. McCarthy N, Whyte M, Gilbert C, Evan G. Inhibition of Ced-3/ICE–related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* 1997;136:215–227.
51. Vander Heiden MG, Chandel NS, WIlliamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-x_L regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997;91:627–637.
52. White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996;10:1–15.
52a. Cory S. Regulation of lymphocyte survival by the BCL-2 gene family. *Annu Rev Immunol* 1995;13:513–543.
53. Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997;387: 773–776.
54. Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, et al. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J* 1995;14:5589–5596.
55. Brady HJM, Gil-Gómez G, Kirberg J, Berns AJM. Baxa perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *EMBO J* 1996;15:6991–7001.
56. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1β-cinvertin enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93: 14559–14563.
57. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995;80:285–291.
58. Gajewski TF, Thompson CB. Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence. *Cell* 1996;87:589–592.
59. Chang BS, Minn AJ, Muchmore SW, Fesik SW, Thompson CB. Identification of a novel regulatory domain in Bcl-x_L and Bcl-2. *EMBO J* 1997;16:968–977.
60. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-x_L, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996;381:335–341.
61. Sattler M, Liang H, Nettesheim D, et al. Structure of Bcl-x_L–Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 1997;275:983–986.
62. Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, et al. Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* 1995;11:1921–1928.
63. Wang K, Yin X-M, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 1996;10:2859–2869.
64. Inohara N, Ding L, Chen S, Núñez. Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-x_L. *EMBO J* 1997;16:1686–1694.
65. Kelekar A, Chang BS, Harlan JE, Fesik SW, Thompson CB. Bad is a BH3 domain–containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-x_L. *Mol Cell Biol* 1997;17:7040–7046.
66. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 1997; 275:1122–1126.
67. Wu D, Wallen HD, Nuñez G. Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED-9. *Science* 1997;275:1126–1129.
68. James C, Gschmeissner S, Fraser A, Evan GI. CED-4 induces chromatin condensation in *Schizosaccharomyces pombe* and is inhibited by direct physical association with CED-9. *Curr Biol* 1997;7:246–252.
69. Minn AJ, Vélez P, Schendel SL, et al. Bcl-x_L forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997;385:353–357.
70. Antonsson B, Conti F, Ciavatta AM, et al. Inhibition of Bax channel–forming activity by Bcl-2. *Science* 1997;277:370–372.
71. Schendel SL, et al. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5113–5118.
72. Schlesinger PH, Gross A, Yin X-M, et al. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:11357–11362.
73. Duckett CS, Wang J, Li F, Tomaselli KJ, Thompson CB, Armstrong RC. Human IAP-like protein is a downstream regulator of programmed cell death. *Mol Cell Biol* 1998;18:608–615.
73a. Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, et al. Role for Bcl-x_L as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6939–6942.
74. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994;76:959–962.
75. Thome M, Schneider P, Hofmann K, et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 1997;386: 517–520.
76. Bertin J, Armstrong RC, Ottilie S, et al. Death effector domain–containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1172–1176.
77. Lee M-A, Yates JL. BHRF1 of Epstein-Barr virus, which is homologous to human proto-oncogene bcl2, is not essential for transformation of B cells or for virus replication in vitro. *J Virol* 1992;66:1899–1906.
77a. Cheng EH-Y, Nicholas J, Bellows DS, et al. A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma–associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:690–694.
78. Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, White E. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev* 1995;10:461–477.
79. Ray CA, Black RA, Kronheim SR, et al. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1β converting enzyme. *Cell* 1992;69:597–604.
80. Clem RJ, Fechheimer M, Miller LK. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 1991;254:1388–1390.
81. Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 1993;67:2168–2174.
82. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388:300–304.
83. Duckett CS, Nave VE, Gedrich RW, et al. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 1996;15:2685–2694.
84. Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor–associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:4974–4978.
85. Liston P, Roy N, Tamai K, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996;379:349–353.
86. Rothe M, Pan M-G, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2–TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995;83:1243–1252.
87. Henkart PA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* 1994;1:343–346.
88. Kägi D, Ledermann B, Bürki K, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994;369: 31–37.
89. Sarin A, Williams MS, Alexander-Miller MA, Berzofsky JA, Zacharchuk CM, Henkart PA. Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity* 1997;6:209–215.
90. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T cell–derived granzyme B. *Nature* 1995;377:446–448.
91. Quan LT, Tewari M, O'Rourke K, et al. Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzyme B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93: 1972–1976.
92. Shresta S, MacIvor DM, Heusel DM, Russell JH, Ley TJ. Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92: 5679–5683.
93. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994;372:100–103.
94. Clayton LK, Ghendler Y, Mizogchi E, et al. T-cell receptor ligation by peptide/MHC induces activation of a caspase in immature thymocytes: the molecular basis of negative selection. *EMBO J* 1997;16:2282–2293.
95. Ma A, Pena JC, Chang B, et al. Bcl-x regulates the survival of double positive thymocytes. *P oc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4763–4767.
96. Motoyama N, Wang F, Roth KA, et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x–deficient mice. *Science* 1995;267: 1506–1510.
96a. Chao D, Linette GP, Boise LH, White LS, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bcl-x_L and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. *J Exp Med* 1995;182: 821–828.
97. Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* 1994;367:277–281.
97a. Cheng LE-C, Chan FK-M, Cado D, Winoto A. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J* 1997;16: 1865–1875.
98. Liu Z-G, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA. Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* 1994;367:281–284.

99. Noel PJ, Boise LH, Green JM, Thompson CB. CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol* 1996;157:636–642.
100. Cyster JG, Hartley SB, Goodnow CC. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature* 1994;371: 389–395.
101. Lam K-P, Kühn R, Rajewsky K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 1997; 90:1073–1083.
102. Tanchot C, Lemonnier FA, Pérarnau B, Freitas AA, Rocha B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science* 1997;276:2057–2062.
103. Boise LH, Minn AJ, June CH, Lindsten T, Thompson CB. Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5491–5495.
104. Vella AT, McCormack JE, Linsley PS, Kappler JW, Marrack P. Lipopolysaccharide interferes with the induction of peripheral T cell death. *Immunity* 1995;2:261–270.
105. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2–deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993;75:229–240.
106. Nakayama K-i, Nakayama K, Negishi I, et al. Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science* 1993;261: 1584–1588.
107. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-x_L. *Immunity* 1995;3:87–98.
108. Radvanyi LG, Shi Y, Vaziri H, et al. CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during primary T cell response. *J Immunol* 1996;156:1788–1798.
109. Vella AT, Mitchell T, Groth B, et al. CD28 engagement and proinflammatory cytokines contribute to T cell expansion and long-term survival in vivo. *J Immunol* 1997;158:4714–4720.
110. Tsubata T, Wu J, Honjo T. B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40. *Nature* 1993;364: 645–648.
111. Choi MSK, Boise LH, Gottschalk AR, Quintans J, Thompson CB, Klaus GGB. The role of bcl-x_L in CD40-mediated rescue from anti-μ–induced apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *Eur J Immunol* 1995;25:1352–1357.
112. Ishida T, Kobayashi N, Tojo T, Ishida S, Yamamoto T, Inoue J-I. CD40 signaling-mediated induction of Bcl-x_L, Cdk4, and Cdk6. *J Immunol* 1995;155:5527–5535.
113. Illera VA, Perandones CE, Stunz LL, Mower DA Jr, Ashman RF. Apoptosis in splenic B lymphocytes. *J Immunol* 1993;151:2965–2973.
114. Renauld J-C, Vink A, Louahed J, Van Snick J. Interleukin-9 is a major anti-apoptotic factor for thymic lymphomas. *Blood* 1995;85:1300–1305.
115. Chauhan D, Kharbanda S, Ogata A, et al. Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells. *Blood* 1997;89:227–234.
116. Kuroda K, Yagi J, Imanishi K, et al. Implantation of IL-2–containing osmotic pump prolongs the survival of superantigen-reactive T cells expanded in mice injected with bacterial superantigen. *J Immunol* 1996;157:1422–1431.
117. Lenardo MJ. Fas and the art of lymphocyte maintenance. *J Exp Med* 1996;183: 721–724.
117a. Crispe IN. Fatal interactions: Fas-induced apoptosis of mature T cells. *Immunity* 1994;1:347–349.
118. Dhein J, Walczak H, Bäumler C, Debatin K-M, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995;373:438–440.
119. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 1995;373:441–443.
120. Ju S-T, Panka DJ, Cui H, et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995;373:444–448.
121. Singer GG, Abbas AK. The Fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1994;1: 365–371.
122. Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature* 1995;377:348–351.
123. Zhou T, Edwards CK III, Yang P, Wang Z, Bluethmann H, Mountz JD. Greatly accelerated lymphadenopathy and autoimmune disease in lpr mice lacking tumor necrosis factor receptor. *J Immunol* 1996;156:2661–2665.
124. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992;356:314–317.
125. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995;268: 1347–1349.
126. Boise LH, Thompson CB. Hierarchical control of lymphocyte survival. *Science* 1996;274:67–68.
127. Lagresle C, Mondière P, Bella C, Krammer PH, Defrance T. Concurrent engagement of CD40 and the antigen receptor protects naive and memory human B cells from APO-1/Fas–mediated apoptosis. *J Exp Med* 1996;183:1377–1388.
128. Garrone P, Neidhardt E-M, Garcia E, Galibert L, van Kooten C, Banchereau J. Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 1995;182:1265–1273.
128a. Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA, Goodnow CC. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligand modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 1996;87:319–329.
129. Schattner EJ, Elkon KB, Yoo D-H, et al. CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas Pathway. *J Exp Med* 1995;182:1557–1565.
130. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996;87:589–592.
131. del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Nuñez G. Interleukin-3–induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997;278:687–689.
132. Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231–241.
133. Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E, et al. Suppression of c-Myc–induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 1997;385:544–548.
134. Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* 1997;17:1595–1606.
135. Dudek H, Datta SR, Franke TF, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997;275:661–664.
136. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997;88:435–437.
137. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, et al. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev* 1997;11:701–713.
138. Strasser A, Harris AW, Huang DCS, Krammer PH, Cory S. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulated distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J* 1995;14: 6136–6147.
139. Memon SA, Moreno MB, Petrak D, Zacharchuk CM. Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma. *J Immunol* 1995;155:4644–4652.
140. Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, et al. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995;182:1223–1230.
141. Van Parijs L, Ibraghimov A, Abbas AK. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity* 1996;4:321–328.
142. Rodriguez I, Matsuura K, Khatib K, Reed JC, Nagata S, Vassalli P. A bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction by not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection. *J Exp Med* 1996;183:1031–1036.
143. Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO-1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 1995;270:7795–7798.
144. Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, et al. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor–induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996;271:4961–4965.
145. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD–interacting protease, in Fas/APO-1–and TNF receptor–induced cell death. *Cell* 1996;85:803–815.
146. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3–like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996;85:817–827.
147. Zhang X, Li L, Choe J, et al. Up-regulation of Bcl-x_L expression protects CD40-activated human B cells from Fas-mediated apoptosis. *Cell Immunol* 1996;173: 149–154.
148. Boise LH, Thompson CB. Bcl-x_L can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94: 3759–3764.
149. Peter ME, Medema JP, Krammer PH. Does the *Caenorhabditis elegans* protein CED-4 contain a region of homology to the mammalian death effector domain? *Cell Death Differ* 1997;4:523–525.
150. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993;74:845–853.
151. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 1997;16:5386–5397.
152. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997;276:111–113.
153. Marsters SA, Sheridan JP, Donahue CJ, et al. Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-κB. *Curr Biol* 1996;6:1669–1676.
154. Kitson J, Raven T, Jiang Y-P, et al. A death-domain–containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 1996;384:372–375.
155. Pan G, Ni J, Wei Y-F, Yu G-L, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997;277:815–818.
156. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997;277:818–821.
157. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *Semin Med Beth Israel Hosp* 1996;334:1717–1725.
158. Kehry MR. CD40-mediated signaling in B cells balancing cell survival, growth, and death. *J Immunol* 1996;156:2345–2348.
159. Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV. A novel family of putative signal

transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1994,78:681–692.
160. Cheng G, Cleary AM, Ye Z-S, Hong DI, Lederman S, Baltimore D. Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science* 1995;267:1494–1498.
161. Régnier CH, Tomasetto C, Moog-Lutz C, et al. Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor–associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J Biol Chem* 1995;270:25715–25721.
162. Nakano H, Oshima H, Chung W, et al. TRAF5, an activator of NF-κB and putative signal transducer for the lymphotoxin-β receptor. *J Biol Chem* 1996;271: 14661-14664.
163. Ishida T, Mizushima S-i, Azuma S, et al. Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor–associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol Chem* 1996; 271:28745–28748.
164. Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF-κB by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 1995;269:1424–1427.
165. Song HY, Régnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M. Tumor necrosis factor (TNF)–mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-κB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor–associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:9792–9796.
166. Duckett CS, Gedrich RW, Gilfillan MC, Thompson CB. Induction of nuclear factor kB by the CD30 receptor is mediated by TRAF1 and TRAF2. *Mol Cell Biol* 1997;17:1535–1542.
167. Arch RH, Thompson CB. 4-1BB and Ox40 are members of a TNF/NGF receptor subfamily that bind TRAF proteins and activate nuclear factor κB. *Mol Cell Biol* 1998;18:558–565.
168. Lee SY, Park CG, Choi Y. T cell receptor–dependent cell death of T cell hybridomas mediated by the CD30 cytoplasmic domain in association with tumor necrosis factor receptor–associated factors. *J Exp Med* 1996;183:669–674.
169. Duckett CS, Thompson CB. CD30-dependent degradation of TRAF2: implications for negative regulation of TRAF signaling and the control of cell survival. *Genes Dev* 1997;11:2810–2821.
170. Wang C-Y, Mayo MW, Baldwin Jr AS. TNF- and cancer therapy–induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-κB. *Science* 1996;274:784–787.
171. Liu Z-g, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-κB activation prevents cell death. *Cell* 1996;87:555–576.
172. Wu M, Lee H, Bellas RE, et al. Inhibition of NF-κB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J* 1996;15:4682–4690.
173. Lai J-H, Tan T-H. CD28 signaling causes a sustained down-regulation of IkBa which can be prevented by the immunosuppressant rapamycin. *J Biol Chem* 1994;269:3077–30080.
174. Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS Jr. Role of transcriptional activation of IκBα in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995;270:283–286.
175. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-κB activity through induction of IkB synthesis. *Science* 1995;270:286–290.
176. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha induced cell death. *Science* 1996;274:782–784.
177. Hsu H, Shu H-B, Pan M-G, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996;84:299–308.
178. Irmler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190–195.
178a. Inohara N, Koseki T, Hu Y, Chen S, Núñez G. CLARP, a death effector domain–containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10717–10722.
179. Shu H-B, Halpin DR, Goeddel DV. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 1997;6:751–763.
180. Levine BL, Bernstein WB, Connors M, et al. Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of $CD4^{+}$ T cells in the absence of exogenous feeder cells. *J Immunol* 1997;159:5921–5930.
181. Lau HT, Yu M, Fontana A, Stoeckert CJ Jr. Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice. *Science* 1996;273:109–112.
182. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* 1995;270:985–988.
183. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693–699.
184. Green DR, Ware CF. Fas-ligand: privilege and peril. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5986–5990.
185. Streilein JW, Ksander BR, Taylor AW. Immune deviation in relation to ocular immune privilege. *J Immunol* 1997;158:3557–3560.
186. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;270:1189–1192.
187. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995;377:630–632.
188. Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA, Miller L. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J Immunol* 1997;158:4122–4128.
189. Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, et al. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996;274: 1363–1366.
190. Griffith TS, Yu X, Herndon JM, Green DR, Ferguson TA. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* 1996;5:7–16.
191. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 1994;179:1317–1330.

第 24 章　免疫球蛋白类别转换

Clifford M. Snapper and Fred D. Finkelman[①]

831

抗体与抗原特异性结合并通过多种效应机制清除抗原。虽然免疫球蛋白的重链恒定区可在少数情况下影响抗体亲和力(affinity)[1],但抗体的特异性和亲和力主要取决于重链及轻链可变区的氨基酸序列。提高抗体的亲和力以及增加每个抗体分子与抗原的结合位点数均可增强抗体与多价抗原的亲合力(avidity)。另一方面,抗体能够产生何种特异性效应主要取决于抗体分子重链的类别(class)或又称同种型(isotype)。本章主要介绍免疫球蛋白的同种型,并讨论不同类别免疫球蛋白功能上的差异,影响免疫球蛋白同种型表达的细胞因子和其他刺激因素,以及这些因素发挥作用的分子机制。

免疫球蛋白同种型的功能

小鼠、大鼠及人免疫球蛋白的分类

哺乳类动物中,小鼠、大鼠及人免疫球蛋白同种型研究得最为深入。根据免疫球蛋白重链的不同,可分为 5 类:IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。此外,3 种动物中,IgG 均包含 4 个亚类(小鼠为 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3;大鼠为 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG2c;人为 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4)。人的 IgA 可分为 IgA1 和 IgA2。除影响免疫球蛋白的大小和抗原结合价,同种型重链结构的不同还影响免疫球蛋白的体内半寿期(half-life),与膜上受体的结合活性,活化补体的能力,对蛋白水解酶消化的敏感性以及形成聚合物的倾向性。

IgM

初次抗体应答(antibody response)早期产生的免疫球蛋白主要为 IgM 同种型[2,3]。由于 IgM 的可变区主要由胚系基因决定,尚未经过体细胞突变(somatic mutation),它们与抗原的亲和力通常较低[4,5]。但 IgM 含 10

---

① C.M. Snapper: Depardmint of Pathology, Uniformed Services University of the Healty Sciences, Bethesda, Maryland 20814. F.D. Finkelman: Division of Immunology, University of Cincinnati Medical Center, Cincinnati, Ohio 45267-0563.

个抗原结合位点，即使 IgM 抗体亲和力较低，也可高亲合力结合带有多个相同表位的抗原[6,7]，从而在一定程度上弥补了亲和力较低的不足。此外，IgM 具有很强的补体固定(fixation of complement)能力，可直接破坏或调理吞噬靶抗原[8]。然而，这些特性也使 IgM 成为一个潜在危险因素。只要某种自身抗原表达多个相同的表位，如红细胞，那么即使是针对该抗原的低亲和力 IgM 也可造成相当程度损害。此外，10 价结构还影响 IgM 从产生部位向远处扩散的能力[9]。由于这个原因，以及 IgM 体内半寿期短于 IgG[10,11]，IgM 抗体在抵御病原体再次感染方面不如 IgG 有效。

IgM 与非 IgM 类抗体

832

在初次免疫应答中，IgG、IgA 和 IgE 的产生晚于 IgM，但它们是记忆应答中产生的主要抗体。虽然同种型转换(isotype-switching)与亲和力成熟(affinity maturation)是两个独立的过程，但通常同时发生[12]，以保证 2 价类抗体有足够亲和力与抗原高亲合力结合。IgG 是血浆以及血管外淋巴组织中主要的同种型[13]，IgA 则是呼吸道、消化道以及泌尿生殖道分泌液中的主要抗体[14]。

IgG 亚类

IgG 亚类的功能特点

不同 IgG 亚类均有较长的半寿期，使血清 IgG 维持在较高水平。在小鼠、大鼠和人类，不同的 IgG 亚类主要表现在效应功能的不同。补体固定能力最强的免疫球蛋白亚类在小鼠是 IgG2a 和 IgG2b[15,16]，大鼠为 IgG2b[17]，人类则是 IgG1 和 IgG3[18,19]。小鼠 IgG3 和 IgG1，大鼠 IgG1、IgG2a 和 IgG2c，以及人类 IgG2 也有部分补体固定能力[17]。啮齿类和人类 IgG 亚类的不同也体现在与 Fcγ 受体的结合能力上。啮齿类动物的 FcγRⅠ分布于单核细胞和巨噬细胞，与小鼠 IgG2a 和大鼠 IgG2b 高亲和力结合[20~22]。小鼠 FcγRⅡ(分布于巨噬细胞、单核细胞、B 淋巴细胞、肥大细胞和部分 T 淋巴细胞)和 FcγRⅢ(分布于巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞和 NK 细胞)与小鼠 IgG 亚类的结合能力依次为 IgG2b > IgG2a > IgG1，均为低亲和力结合[21,23]。所有这些受体均不能与小鼠 IgG3 有效结合。人的 FcγRⅠ(分布于单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞)与 IgG1 和 IgG3 的亲合力最高，IgG2 次之[21,23~25]。人的 FcγRⅡ(分布于巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞和 B 淋巴细胞)和 FcγRⅢ(分布于单核细胞、巨噬细胞、NK 细胞、中性粒细胞和部分 T 淋巴细胞)可选择性低亲和力与 IgG1 和 IgG3 结合[21,23]。此外，部分 IgG 亚类(小鼠的 IgG1 和大鼠的 IgG2a)可与肥大细胞受体结合，并介导肥大细胞脱颗粒[26,27]。胎盘上的 Fc 受体还可与 IgG 结合，促进母亲 IgG(而非其他同种型)转运至胎儿血循环[28]。IgG 也可与 FcRn (一种 MHCⅠ类分子相关受体)结合，促进幼年动物从肠道吸收母亲 IgG，并通过将胞饮的 IgG 回送到细胞外延长 IgG 的体内寿命[29,30]。

不同抗原刺激诱导产生不同的 IgG 亚类

可溶性蛋白质抗原主要刺激小鼠产生 IgG1[31,32]，多糖类抗原主要诱导小鼠产生 IgG3[31,33]，诱导大鼠产生 IgG2c[34]，在人则为 IgG2[35~37]。病毒主要诱导小鼠产生 IgG2a[38]，在人则为 IgG1 和 IgG3[39]。革兰氏阴性细菌可诱导小鼠产生 IgG2a 和部分 IgG3[40~42]。线虫类寄生虫可诱导大多数的小鼠品系产生 IgG1[43]，在人则为 IgG4[44,45]。重复免疫，特别是使用可诱导 IgE 的变应原，可诱导人产生 IgG4[46]。

IgG 亚类的生理作用

在一定范围内，特定 IgG 亚类的功能特点总是使其更适合于结合或破坏特定类型的抗原或寄生虫。小鼠 IgG2a 能够高效固定补体，与巨噬细胞上的高亲和力 IgG 受体结合，并与 NK 细胞 Fcγ 受体相互作用，因而似乎特别适合于控制病毒和革兰氏阴性菌的感染。小鼠 IgG3 与带有重复多糖表位的抗原结合；可发生自身凝集[47]。该特性使 IgG3 同 IgM 相类似，即使多糖抗原只能诱导低亲和力抗体产生，IgG3 也能与细菌壁多糖

抗原高亲合力相互作用。但 IgG3 又不同于 IgM，它很容易扩散至细菌入侵部位。人 IgG2 也能与多糖类抗原作用，但尚未发现自身凝集(autoaggregating)的特性[47]。线虫类通常诱导黏膜的肥大细胞应答，因此小鼠 IgG1 介导肥大细胞脱颗粒可以增强宿主抵抗线虫类寄生虫。

IgG 亚类在疾病中的作用

不同的功能特性可以增强免疫球蛋白对病原微生物的破坏作用，但也可能导致免疫球蛋白损伤宿主。自身凝集特性使小鼠 IgG3 比其他同种型更易成为冷球蛋白(cryoglobulin)，导致血管损伤和血管球性肾炎[48]。与 Fcγ 受体的结合能力使人 IgG1 和 IgG3(而非 IgG2 和 IgG4)介导新生儿溶血性疾病患儿的红细胞破坏[49]。介导肥大细胞脱颗粒的特性则使小鼠 IgG1 参与过敏反应的发生[50]。

IgG 亚类的功能冗余

不同免疫球蛋白的功能特性赋予它们抵抗不同抗原或病原体的能力，但是不应该将这种相互联系作为一种证据，认为某种 IgG 亚类仅对特定的病原体起作用。例如家兔只产生一个同种型[51]，但也表现为免疫功能正常。当然，也有可能是家兔的 IgA 同种型替代了小鼠和人类 IgG 同种型的多样性[51]。被动转移实验中，将针对某种病原体的不同 IgG 同种型输入啮齿类动物，然后用该病原体感染动物，并未如推测的那样，观察到特定 IgG 亚类在抗感染中的作用。与肺炎球菌多糖上磷酸胆碱表位结合的 3 株小鼠单克隆抗体，具有相近或相同的可变区，只是亚类分别为 IgG1、IgG2b 和 IgG3，它们在防止肺炎球菌的感染方面具有相同的作用[52]。正常血清中的 IgG1 和 IgG2 在被动免疫小鼠清除克氏锥虫中也具有相同的效力[53]。4 株具有相同可变区的针对大肠杆菌脂多糖的大鼠单克隆抗体(同种型转换变异体)，均可有效地清除和杀灭注入的大肠杆菌，而 IgM、IgA 和 IgE 的变异体无作用[54]。另一项独立的实验发现，针对大肠杆菌脂多糖的 IgM 与针对同一抗原决定簇的无关 IgG2a 相比，前者能够更有效地保护腹腔感染大肠杆菌的小鼠；而在小剂量下，IgG2a 的作用优于针对同一抗原决定簇的无关 IgG1、IgG2b 或 IgG3[55]。但是同一实验室，在使用同种型转换变异体(isotype-switch variants)重复上述实验时，未能证实不同 IgG 同种型在保护宿主抗细菌感染方面的差异(M. Pollack，私人通讯)。

IgG 亚类功能特性的证据

几个被动免疫实验提示了 IgG 亚类对宿主抗微生物病原体感染的某些影响。如只有来源于约氏疟原虫免疫小鼠血清的 IgG2a 改变了被动免疫小鼠的感染进程[56]；但不清楚导致此结果的原因是由于亚类不同，还是由于亚类浓度不同。一种抗新生隐球菌的单克隆抗体经 IgG2a 和 IgG2b 类别转换，较 IgG1 类别转换更能有效清除小鼠肺和脾中感染的病原体；但这些抗体对脑内感染或感染小鼠的存活均无影响[57]。另一项研究发现，针对新生隐球菌荚膜多糖的 IgG3 单克隆抗体可抑制结合到同一表位的 IgG1 单克隆抗体的保护作用[58]；提示 IgG1 和 IgG3 两类单克隆抗体的不同特性使得前者具有更强的宿主保护作用。鉴于病毒感染和 IgG2a 的产生在小鼠存在很强的相互联系，如果能证实亚类在抗病毒感染中特别有效将是十分有意义的；但是尚未见到运用同种型转换变异体观察不同同种型单克隆抗体在抗感染中作用的研究。

IgG 亚类与人类疾病

小鼠被动转移实验提示，抗感染过程并不需要特定同种型的保护作用，而研究特定免疫球蛋白同种型产生缺陷的人群则为此类实验提供了补充。IgG2 单独缺乏的人比血清 IgG2 水平正常的人更倾向于感染荚膜细菌，但是大多数 IgG2 缺乏个体的临床表现是正常的。此外，尚不清楚 IgG2 低水平与感染的关系是由于缺乏针对荚膜多糖表位的 IgG2 抗体，还是缺乏针对这些表位的抗体，因而与同种型无关[59]。基于相似的理由，也很难解释 IgG1 和 IgG3 低水平与慢性肺部疾病的关系，是否因为需要这些能够固定补体和结合 Fcγ 受体的同种型来抵抗某种肺部病原体感染[60]。

833

IgA

同 IgG 亚类一样,虽然很容易指出 IgA 的某些特性使其特别适合于抗感染,但很难证实这些特性对于保护宿主是必要的。将 1~2 个 IgA 二聚体通过分泌成分连接起来有利于将它们转动至肠腔[61,62]。寡聚体形式可以增强 IgA 与分泌液中病毒和细菌的亲合力[63],同时分泌液也不存在大分子质量抗体在组织中面临的扩散屏障的问题。虽然 IgA 不能通过经典途径固定补体,但是在各种同种型中,IgA 能够最有效地激活补体替代途径[64]。同 IgG 一样,IgA 可以很好地结合至中性粒细胞 Fc 受体[65]。IgA 能够有效抵抗蛋白水解酶的消化作用[61,66],因而宿主和细菌蛋白酶浓度很高的消化道这一类环境特别适合于 IgA 发挥作用。IgA 与黏膜的亲和力可以增强肠道黏膜的屏障作用以抵抗病原体穿透[67];IgA 抗体 α 链上寡糖的甘露糖末端可抑制肠道细菌纤毛与黏膜表皮细胞膜上寡糖的相互作用,从而抑制细菌黏附[68]。但是,尽管存在这些明显的优点,选择性 IgA 合成障碍的小鼠与正常小鼠相比,并未表现出对黏膜病原体,如流感病毒的易感性[69]。此外,人群中 IgA 单独缺陷的比例约为 0.1%[70,71],大多数人无明显免疫功能缺陷[72]。但是少数 IgA 缺陷个体出现较高频率的呼吸道感染、吸收障碍和自身免疫性疾病[73]。在大多数 IgA 缺陷个体,IgM 由分泌成分连接,并取代 IgA 成为最主要的分泌型同种型[74]。至少在部分反复感染的 IgA 缺陷患者中,不存在 IgM 取代 IgA 的情况,因而导致了更全面的免疫缺陷[74,75]。

IgE

IgE 具有与肥大细胞和嗜碱性粒细胞上 IgE 受体(FcεRI)高亲和力结合的独特能力,当 IgE 被抗原交联时,可诱导这些细胞脱颗粒并产生细胞因子[76~79]。除在遗传性过敏症的发病机制中扮演重要角色外,推测 IgE 介导的肥大细胞脱颗粒可能通过释放增强血管渗透性的介质,在激发通常的免疫应答中也发挥重要作用[80~82]。IgE 还在清除肠道与呼吸道多细胞寄生虫的过程中发挥重要作用[83]。该作用间接通过肥大细胞脱颗粒诱导的平滑肌收缩,血管渗透性增强,以及 IgE 介导的抗体依赖的细胞毒作用(ADCC),激活嗜酸性粒细胞杀死大鼠和人体内的寄生虫[82,84,85]。但是在小鼠体内,IgE 的中和作用十分有限(I. M. Katona, J. F. Urban, Jr., 和 F. D. Finkelman,未发表数据),而且,即使在大鼠转移实验中可以发现 IgE 在抗寄生虫感染中的作用,这种作用也弱于 IgG 的作用[86]。除了刺激肥大细胞脱颗粒和产生细胞因子,还发现 IgE 可通过与 FcεRⅡ结合呈递可溶性抗原[87]。但是这种效应也不是惟一的,IgG 也可与抗原形成复合物,通过结合至表达 FcγR 的细胞增强抗原呈递[88,89]。

834

IgD

目前对分泌型 IgD 的功能知之甚少。该同种型的抗体分布在大多数啮齿类和灵长类动物的 B 淋巴细胞,与 IgM 共表达。小鼠 IgD 分泌量个体差异较小,而人类 IgD 分泌量较大,且个体差异较大[90,91]。IgD 免疫复合物可诱导 TCR 的表达从而增强辅助性 T 细胞的功能[92]。但是出生即给予抗 IgD 抗体的小鼠[93,94],或通过同源重组剔除 δ 基因的小鼠并未表现出明显的免疫功能缺陷(R. Kohn, 私人通讯),提示分泌型 IgD 并无独特功能可以显著影响宿主免疫力。

小结

总之,上述观察结果显示:①不同抗原刺激倾向于诱导分泌不同的免疫球蛋白同种型,但是在初次免疫应答中,IgM 总是先于其他同种型分泌;②不同同种型具有不同功能和结构特性,可能使它们特别适合于抵抗不同类型病原体;③产生特定同种型对机体免疫力的益处可能是十分微妙和冗余的,在体内实验中很难加以证实。

细胞水平上免疫球蛋白类别转换的调控机制

研究免疫与随后产生的免疫球蛋白类别之间的关系，结果提示，最初分泌的 IgM 转换为其他同种型并非一个随机事件，而是受到调控的过程。将一株激活的并发生转化的小鼠 T 细胞系培养上清加至 LPS 激活的小鼠 B 细胞，可以抑制 IgG3 分泌，刺激 IgG1 的分泌[95,96]，提示体液因子可以参与类别转换的调控。同时，该发现揭开了纯化和鉴定此类因子的序幕，并最终证实 IL-4 是导致上述两种现象的原因[97,98]。后续研究鉴定了控制小鼠 IgM 转换为除 IgD 以外所有其他同种型的刺激物，以及控制人 IgM 转换为 IgE、IgA 以及至少 3 种 IgG 亚类的刺激物。在一个更有限的范围内，还进行了鼠免疫球蛋白类别转换的体内实验。这些研究证实在细胞水平存在 2 种不同类型刺激物，对于类别转换调控具有重要作用。第一类主要为参与特异性类别转换的刺激物，包括 IL-4、IFN-γ、TGF-β 和 IL-10。它们共同的特点是可以诱导未成熟（胚系）形式的重链 RNA 转录成目的同种型。这部分内容将在本章最后一节介绍。这些因子通常又被称为类别转换因子（switch factors）。诱导某个同种型转换的刺激物通常也可刺激向另外同种型转换，并抑制转换为其他同种型。第二类刺激物或其组合与类别转换因子协同作用，但通过相对非特异性方式诱导 DNA 合成，免疫球蛋白分泌和免疫球蛋白类别转换。部分刺激物可能阻断转换形成某些同种型，但大多数刺激物允许转换形成任何形式的同种型，具体转换成哪一种同种型则取决于特异性刺激物的存在。这些 B 细胞刺激物包括 LPS、交联的 mIg 或 CD40、IL-4 和 IL-5（对小鼠 B 细胞），以及 Epstein-Barr 病毒（EBV）感染、mIg 交联、交联的 CD40 和交联的 TNF-α 受体（对人的 B 细胞）。在分子水平，上述刺激物综合诱导的免疫球蛋白类别转换需要 3 个步骤：①DNA 的合成；②胚系 C_H 的转录；③导致转换重组酶（switch recombinase）产生、激活并与底物相互作用的其他因子。这一部分将在随后详细讨论。

上述基本原则最好通过讨论特定的因子如何调控免疫球蛋白转换成不同的同种型来说明（表 24.1）。

表 24.1　鼠类 Ig 类别转换的体外细胞系统

同种型	效应分子	效应	机制	其他刺激物
IgG3	LPS	+	A	无
	IFN-γ	+	A	抗 Ig-dex + IL-5
	IL-10	+	R	LPS
	IFN-γ	−	R	LPS
	IL-4	−	A	LPS，抗 Ig-dex + IL-5
IgG1	IL-4	+	A	LPS，CD40L，抗 Ig-dex + IL-5
	IFN-γ，TGF-β	−	A	（LPS，CD40L，抗 Ig-dex + IL-5）+ IL-4
	Anti-Ig-dex	−	R	LPS + IL-4
IgG2b	LPS	+	A	无
	TGF-β	+	A	LPS
	IL-4，IFN-γ	−	A	LPS
IgG2a	IFN-γ	+	A	LPS，抗 Ig-dex + IL-5
	IL-4	−	A	（LPS，抗 Ig-dex + IL-5）+ IFN-γ
IgE	IL-4	+	A	LPS，CD40L
	IFN-γ	−	A	（LPS，CD40L）+ IL-4
	Anti-Ig-dex	−	A	LPS + IL-4
IgA	TGF-β	+	A	（LPS，CD40L）+ IL-4 + IL-5 + 抗 Ig-dex
	IL-4	+	R	（LPS，CD40L）+ IL-5 + 抗 Ig-dex + TGF-β
	IL-5	+	R	（LPS，CD40L）+ IL-4 + 抗 Ig-dex + TGF-β
	IL-10	−	R	（LPS，CD40L）+ IL-4 + IL-5 + 抗 Ig-dex + TGF-β

+，诱导 Ig 类别转换；−，抑制 Ig 类别转换；A，转换过程中伴随着相应胚系 CH RNA 表达改变，即可及性效应（accessibility effect）；R，转换过程中不伴随胚系 CH RNA 表达改变，即重组效应（recombination effect）。

IgG 同种型转换的调控机制

小鼠 IgG1

IL-4 促进 IgG1 转换

IL-4 可诱导胚系 γ1 基因转录从而启动小鼠 B 细胞转换为 IgG1[99,102]。检测成熟 γ1 mRNA、膜型和(或)分泌型 IgG1 的表达,发现实际的转换过程还需要另外的刺激因子。这些刺激因子可在 IL-4 存在的情况下诱导未致敏(naive)小鼠 B 细胞转换为 IgG1 的刺激因子,包括:LPS[95,103];IL-5 加偶联葡聚糖(dextran)[104]或 Sepharose[105]的抗免疫球蛋白抗体;CD40 交联[106,112];CD30 交联[113]。IL-4 可刺激分泌 IgG1 的 B 细胞克隆比例大量增加,而在某些系统中还可少量增加克隆的大小[114]。在转换为 IgG1 的过程中,B 细胞并不需要在接受附加刺激的同时暴露于 IL-4。IL-4 脉冲刺激(pulsed)后,即使清除 IL-4,单独使用 LPS 也可诱导 IgG1 转换[103]。

IL-4 非依赖性的 IgG1 转换

IL-4 可以诱导 IgG1 类别转换,但并非 IgG1 转换所必需的。B 细胞与不分泌 IL-4[115]而仅分泌 IL-2 和 IFN-γ 的 Th1 细胞共同培养,也可产生 IgG1,特别是在中和 IFN-γ 并补充 IL-2 后更为明显[116]。如果以葡聚糖偶联的抗 IgD 抗体加上激活的 Th1 细胞培养上清共同刺激,B 细胞可以产生大量的 IgG1[104]。体内实验证实,IL-4 的拮抗剂(抗 IL-4 或抗 IL-4 受体的单克隆抗体)可明显抑制某些慢性刺激(移植物抗宿主病,氯化汞)诱导的 IgG1 应答[117~118],但至少对于某些急性 IgG1 应答(通过注射抗 IgD 抗体诱导或接种线虫类寄生虫)的影响相对较小[119,120]。通过同源重组功能性敲除 IL-4 基因的小鼠,也可发生急性 IgG1 应答[121],但免疫前小鼠的血清 IgG1 水平很低,免疫后的 IgG1 水平也只达到正常小鼠的 10% ~ 50%。尚不清楚使用 IL-4 拮抗剂与 IL-4 基因敲除小鼠之间的差别是由于前者 IL-4 的不完全抑制,还是由于基因敲除小鼠由于长期缺乏 IL-4,产生了抑制 IgG1 应答的细胞因子。不论导致上述差异的原因何在,所有数据均证实 IL-4 启动了 IgG1 的类别转换,并对生理状态的 IgG1 应答有重要作用,但同时也存在刺激 IgG1 类别转换的替代途径。激活的 Th1 细胞的细胞膜[122]、CD40 配体[123]或葡聚糖抗免疫球蛋白抗体[124],可以刺激静息状态下的 B 细胞,使其在没有 IL-4 的情况下表达胚系 γ1 mRNA,提示存在不依赖于 IL-4 的 IgG1 转换机制。

835

IgG1 类别转换的抑制

IgG1 类别转换受 IFN-γ 的抑制。体外实验中,IFN-γ 可抑制 LPS 和 IL-4 诱导的 B 细胞分泌 IgG1[125,126],而抗 IFN-γ 抗体可以增强与分泌 IFN-γ 的 T 细胞共培养的 B 细胞分泌 IgG1[116]。体内实验也得到类似的结果[127]。重组 IFN-γ 可抑制注射抗 IgD 抗体的小鼠分泌 IgG1,抗 IFN-γ 抗体则可以增强注射抗 IgD 抗体或灭活流产布氏杆菌的小鼠分泌 IgG1。此外,抗 IFN-γ 抗体可完全逆转灭活流产布氏杆菌抑制注射 IgD 小鼠分泌 IFN-γ 的能力,提示内源性 IFN-γ 对于下调 IgG1 的分泌具有重要作用。IFN-γ 缺陷小鼠经流感病毒免疫后,其流感病毒特异性 IgG1 的产量明显增加[128]。TGF-β 也可抑制与 LPS 加 IL-4 共培养的 B 细胞分泌 IgG1[129,130]以及 mIgG1$^+$ 细胞的产生(C.M. Snapper,未发表资料)。TGF-β 的体内作用尚不清楚。IFN-α 也可抑制 LPS 加 IL-4 刺激的 B 细胞分泌 IgG1,但是 IFN-α 在体内直接抑制 IgG1 分泌的作用可能依赖于诱导 IFN-γ 分泌增加和/或 IL-4 产生减少[131]。

小鼠 IgG2a

IFN-γ 刺激 IgG2a 转换

IgG2a 类别转换的调控和发生在很大程度上与 IgG1 正好相反:IFN-γ 可诱导 IgG2a 的应答,IL-4 则起抑制作用[126]。IFN-γ 可明显增强 LPS 激活的 B 细胞产生 IgG2a,而抑制 IgG1、IgG2b 和 IgG3 的产生[126,132]。IFN-γ 还可诱导葡聚糖偶联的抗 IgD 抗体以及 T 细胞激活的 B 细胞分泌 IgG2a[133]。此外,NK 细胞产生的 IFN-γ 可在体外和体内实验中增强 IgG2a 应答[134,136]。静息的 mIgM$^+$ B 细胞经 IFN-γ 脉冲刺激后,即使清除 IFN-γ,再

836

与 LPS 共培养，IgG2a 的产量也增加[132]，与 IL-4 脉冲刺激增强 LPS 诱导的 IgG1 产生相类似[103]。IFN-γ 促进 IgG2a 类别转换的机制可能是 IFN-γ 提高胚系 γ2a mRNA 水平[101,137]以及在软琼脂培养中增加 IgG2a 分泌前体细胞的比例[132]。

IgG2a 转换的抑制机制及 IFN-γ 非依赖性 IgG2a 转换

IL-4 可抑制 LPS 和 IFN-γ 诱导的 IgG2a 产生[126]。IL-4 和 IFN-γ 的这种对立关系也见于体内实验中：IL-4 拮抗剂[120]和 IFN-γ[40]可以促进注射抗 IgD 抗体小鼠产生 IgG2a；功能性 IL-4 基因缺陷的小鼠 IgG2a 应答增强[121]；而抗 IFN-γ 抗体可以抑制注射抗 IgD 抗体或灭活流产布氏杆菌的正常小鼠产生 IgG2a[127]。但在这些系统中，抗 IFN-γ 抗体的抑制作用总是不完全的，提示在诱导产生 IgG2a 的过程中可能同时存在 IFN-γ 依赖性的和 IFN-γ 非依赖性的两种机制。对 IFN-γ 受体和 IFN-γ 缺陷小鼠的研究进一步证实了 IgG2a 的转换部分依赖于 IFN-γ。在这些小鼠中，IgG2a 的基础水平下降，对数种蛋白质的 IgG2a 应答也降低，同时伴有或不伴有 IgG1 应答增强[128,138,139]。

IL-12 诱导 IgG2a 的生成

体外实验中，IL-12 可通过诱导 NK 细胞产生 IFN-γ，刺激 LPS 激活的 B 细胞产生 IgG2a[140]。IL-12 也可在体内实验中刺激 IL-12 的产生，其机制可能是通过诱导 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN-γ。在 TD 抗原免疫小鼠的同时，给予 IL-12 较单独 TD 抗原免疫产生更强的 IgG2a 应答[140,141]。而在 TD 抗原免疫的同时注射中和性抗 IL-12 抗体可特异性抑制 IgG2a 应答[141]。给未免疫小鼠注射 IL-12 可提高 IFN-γmRNA 水平，增强 IFN-γ 表达以及提高 IgG2a 血清浓度[142]。IL-12 的其他体内生物学效应十分复杂，取决于 IL-12 的作用时机、延续时间、IL-12 的用量以及 IL－12 作用下 IFN-γ 的产生量。这些效应包括选择性增强 IgG2 和 IgG3 应答，抑制 IgG1 和 IgE 产生（均为 IFN-γ 依赖性的），抑制所有 IgG 的产生（IFN-γ 依赖性的，且见于大剂量和长时间的 IL-12 处理）[142]，增强免疫球蛋白分泌的成熟，即在短暂的 IFN-γ 依赖的早期抑制后，通过直接作用于类别转换后的细胞（IFN-γ 非依赖性），以同种型非特异性的方式增强 IgG 的分泌[140]。

小鼠 IgG3

IFN-γ 刺激或抑制 IgG3 转换，取决于 B 细胞激活物的特性

IgG3 转换类似于 IgG2a 转换，受到 IL-4 的抑制，并在某些情况下受 IFN-γ 的刺激。IFN-γ 刺激 IgG3 转换的证据来源于以下观察。如 IFN-γ 能使右旋糖苷偶联的抗 IgD 抗体和 IL-5 处理的静息初始 B 细胞显著增加 IgG3 分泌，mIgG3$^+$ 细胞比例和胚系 Cγ3 RNA[42]。如果将产生 IFN-γ 的针对某种抗原的特异性 T 细胞克隆转移到已经注射该抗原的小鼠体内，那么将选择性诱导发生 IgG3 和 IgG2a 应答[143]。将能够诱导产生相当数量内源性 IFN-γ 的活菌免疫小鼠，小鼠体内将会发生大量的 IgG3 和 IgG2a 应答[144~146]。与野生型小鼠相比较，IFN-γR$^-$ 小鼠感染病毒后，相对于 IgG1 和 IgG2b，IgG3 的产生减少[139]。但另一方面，当 IFN-γ 增强 LPS 刺激的 B 细胞产生 IgG2a 时，它也明显抑制了 IgG3 的产生，而如果没有 IFN-γ，LPS 刺激的 B 细胞可以产生 IgG3[126]。此外，目前尚无证据表明，抗 IFN-γ 抗体可在体外显著抑制 LPS 诱导的 IgG3 应答，或者在体内抑制多糖诱导的 IgG3 应答（C.M.Snapper, J.J.Mond, 未发表的资料）。因此，IFN-γ 仅在某些情况下诱导 IgG3 应答，但并非在所有情况下都可以。

IL-4 抑制 IgG3 转换

最初发现 IL-4 抑制 LPS 刺激的 B 细胞产生 IgG3[95]，从而证实 IL-4 可以抑制 IgG3 的应答。随后在体内实验中发现，IL-4 的拮抗剂可提高抗 IgD 抗体免疫小鼠的血清 IgG3 水平（A.D.Levine，私人通讯）；而在 IL-4 基因功能缺陷的小鼠体内，抗原特异性的血清总 IgG3 水平升高[121]。

小鼠 IgG2b

TGF-β 刺激 IgG2b 转换

将 TGF-β 加入 LPS 处理的未致敏 B 细胞可选择性增强 IgG2b 分泌，增加 IgG2b 分泌细胞数量[147~149]。

TGF-β的这种作用与胚系 γ2b RNA 稳态水平(steady-state level)相关[147]。但是,TGF-β不能刺激 IL-5 和葡聚糖-抗 IgD 处理的 B 细胞分泌 IgG2b[147],提示只有存在适当的共刺激物(co-stimuli)时,TGF-β才能诱导 IgG2b 转换。目前也无实验证实 TGF-β可在体内诱导 IgG2b 应答。尽管类风湿关节炎患者关节液中的一种可溶性成分,能在体外选择性增强 LPS 激活的鼠 B 细胞分泌 IgG2b,但它只具有部分 TGF-β生化特性而并非 TGF-β[150~153]。IL-4 基因缺陷小鼠的 IgG2b 应答增强,提示 IL-4 能在体内直接或间接抑制 IgG2b 产生[121]。另外,在某些体外系统中,IFN-γ表现出抑制 IgG2b 产生的作用[126],但在体内实验,尚无 IFN-γ限制 IgG2b 产生的报道。

人 IgG 同种型

IL-4 与佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)一起,可诱导抗 CD40 抗体[154]或小鼠胸腺瘤细胞系 EL-4[155]刺激的人 B 细胞分泌 IgG4。与 IL-4 诱导产生的小鼠同种型 IgG1 相类似,人 IgG4 也不能很好地固定补体[18,19];但是 IgG1 是小鼠针对可溶性蛋白产生的主要同种型,而人血清中 IgG4 的含量通常较低[28,59]。

IL-10 可以刺激 IgG1 和 IgG3 转换,证据包括:①IL-10 可以增加 CD40 激活的初始 mIgD⁺ 人 B 细胞分泌上述同种型[156];②IL-10 处理的 B 细胞可以选择性增加胚系 Cγ1 和 Cγ3RNA 表达[157];③IL-10 处理的 CD40 激活的人 IgD⁺ B 细胞会产生适当的环状 DNA 转换切除产物(circular DNA switch excision product)[158]。

尽管 IFN-γ可以刺激小鼠 IgG2a 转换,但是 IFN-γ诱导人免疫球蛋白同种型转换的惟一证据,是它选择性增强静止 mIgM⁺ mIgG⁻ B 细胞表达胚系 γ2RNA;但不清楚这是否与 IgG2 转换增加有关[159]。虽然 IFN-γ在体外可以增强人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)自发分泌 IgG2,而抗 IFN-γ抗体可以抑制其分泌,但是一旦去除 mIgG2⁺ 细胞,这种作用也消失。说明 IFN-γ选择性作用于免疫球蛋白同种型已经转换的 B 细胞,而不是作为一个转换因子来起作用[160]。相反地,由人 Th1 细胞而非 Th2 细胞产生的一个尚未鉴定的细胞因子,可在体外将活化的人 B 细胞转换成 IgG2,但是,这个细胞因子不是 IFN-γ,也不是其他已知的细胞因子[161]。

IgE 转换的调控机制

IL-4 刺激 IgE 转换

IL-4 是小鼠和人 IgE 转换的重要刺激物。纯化的小鼠 B 细胞与 LPS[125,126,162,163]、活化的 T 细胞[111,164,165]或者 CD40 配体共培养时;或者纯化的人 B 细胞与 EBV[166~171]、抗 CD40 抗体[154,172]或者 CD40 配体[173,174]、皮质醇[175~177]、小鼠 EL-4 细胞加 PMA[155]或活化的 T 细胞[154,178~188]共同培养时,加入 IL-4 均可刺激产生 IgE 应答。小鼠 B 细胞与兔抗鼠 IgM 抗体以及分泌 IL-4 的特异性针对兔 IgG 的 T 细胞共同培养时,加入抗 IL-4 抗体可阻断 IgE 的产生[106]。在同一个培养体系中,如果加入 IL-4 而不是抗 IL-4 抗体,可刺激绝大多数分泌免疫球蛋白的 B 细胞克隆产生 IgE 应答,提示 IL-4 可以诱导此系统中 mIgM⁺ B 细胞转换表达 IgE[106]。IL-4 刺激稳态胚系 εRNA 的表达明显增加[99~101,154,166,168,178,189,190],是 IL-4 促进 IgE 转换的另一证据。

体内产生 IgE 的调控机制

早期小鼠体内研究支持这样的观点:IgE 的产生完全依赖于 IL-4。注射抗 IgD 抗体,用抗原和明矾免疫,或者接种线虫动物肠虫,可以诱导初次和再次免疫应答,分泌多克隆的抗原特异性 IgE。但如果加入抗 IL-4 抗体或者抗 IL-4 受体抗体,则会阻断 99%以上的上述效应[119,120,191,192]。IL-4 基因功能缺陷的小鼠注射巴西日本圆线虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)后不能产生可检测到的 IgE 应答[121,193]。在一个体内实验中,IL-4 的拮抗剂不能抑制 IgE 应答,但如果将羊抗小鼠 IgE 抗体注入小鼠体内,则可以刺激产生 IgE 应答[192]。此应答是由免疫前已经转换成 mIgE 的 B 淋巴细胞产生的,因此在应答过程中不需要进行转换,这也解释了为什么不需要 IL-4[194]。不过,小鼠的体内研究也确实发现了 IL-4 非依赖性 IgE 转换的证据[195~198]。在反转录病毒诱导的免疫缺陷性疾病(retrovirus-induced immunodeficiency disease, MAIDS)过程中,IL-4 缺陷小鼠的血清 IgE 水

平相对升高[195]。并且 IL-4 缺陷小鼠注射多克隆山羊抗小鼠 IgD 抗体后，胚系 εRNA 水平增加，Sμ-Sε 重组增强，以及血清 IgE 水平增加，达到可检测的水平，但不及对照组的 1%[195]。与 IL-4 依赖性 IgE 转换一样，IL-4 非依赖的途径也受 IFN-γ 下调[195]。IL-4 缺陷小鼠注射夏氏鼠疟原虫（*Plasmodium chabaudi*）或者利什曼原虫（*Leishmania major*）后，产生的 IgE 较对照组水平有所降低，但注射马来布鲁丝虫（*Brugia malayi*）或者 *N. brasiliensis*，则没有此现象[195,199]。IL-4 缺陷小鼠注射拮抗性抗 CD40 抗体可诱导 IgE 分泌[196]。总之，上述研究证实，IL-4 非依赖性 IgE 转换可在体内发生，并取决于激活信号的特性；但要大量产生 IgE，则必须依赖 IL-4。

IL-13 刺激人 B 细胞 IgE 转换

对于人 B 细胞，IL-13 模拟了许多 IL-4 功能，包括诱导 IgE 转换[200~203]。IL-13 结合到由 IL-4 受体 α 链和其他多肽链组成的受体，并由此传递信号[204]。然而，IL-4 缺陷小鼠的 IgE 转换不太可能是 IL-13 依赖性的：小鼠 B 细胞缺乏可检测到的 IL-13 受体，不能对 IL-13 作出反应，抗 IL-4 受体 α 链的抗体也不能阻断 IL-4 缺陷小鼠注射抗 IgD 抗体后的 IgE 应答[195]。IL-4 和 IL-13 在人 IgE 应答中的相对重要性还不明确。

IgM-IgG-IgE 顺序转换

IL-4 可以刺激小鼠 B 细胞 IgE 和 IgG1 转换，也可刺激人 B 细胞 IgE 和 IgG4 转换。但在转换不同同种型的动力学方面，诱导转换所需 IL-4 浓度和所需共刺激因子都有所不同。相对于 LPS 和 IL-4 刺激小鼠 B 细胞产生 IgG1 应答，小鼠产生 IgE 应答要滞后 12~16 小时[205]。类似地，IL-4 和抗 CD40 抗体刺激人 B 细胞分泌可检测到的 IgG4 大约要比分泌可检测到的 IgE 早 2 天[154]。这些观察到的现象符合以下解释：IgM 转换为 IgE，需要首先转换为 IgG 同种型，再转换成 IgE。这将在本章最后一节讨论。

IgE 转换依赖于 B 细胞激活因子的特性

838

至少在小鼠体内，IgE 的转换不仅依赖于 IL-4，还依赖于活化 B 细胞的方法。因此，IL-4 加上 IL-5，再加上右旋糖酐抗 IgD 抗体（dextran-anti-IgD antibody）或者与细胞表面 FcγRI 结合的抗 IgD 抗体，不能激活 B 细胞表达胚系 CεRNA 和产生 IgE 转换，但可以发生 IgG1 应答[104]。上述试剂使 mIg 紧密交联来激活 B 细胞，但却不能诱导 IgE 分泌，即使存在高浓度 IL-4 也不行。这可能是对宿主的一种保护作用，即通过抑制针对细菌的 IgE 应答，抑制多价细菌可能引起的肥大细胞广泛交联，从而避免发生系统性过敏反应（systemic anaphylaxis）。携带蛋白 A 的金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）可以通过交联 mIg 激活人 B 细胞，并在适当的细胞因子作用下诱导这些细胞分泌 IgE 以外的免疫球蛋白同种型；即使存在 IL-4，也不能诱导 IgE 应答[207]。然而，mIg 交联并不总是阻断 IgE 的分泌，IL-4 加上与不溶性基质（如琼脂糖）偶联的抗 IgD 抗体可刺激培养的小鼠 B 淋巴细胞产生 IgE 应答[104]。

与 IL-4 协同诱导 IgE 分泌的细胞因子

许多细胞因子与 IL-4 协同刺激 IgE 合成。这些细胞因子包括 IL-2、IL-5、IL-6 和 TNFα。IL-2 与 IL-4 协同刺激与 PMA 和小鼠 EL-4 胸腺瘤细胞共同培养的人 B 细胞分泌 IgE[155]。IL-5 增强 LPS 和 IL-4 培养的小鼠 B 细胞分泌 IgE[208]，也可以增强非最适浓度 IL-4 培养的人 PBMC 分泌 IgE[182]。对于 IL-4 培养的人 PBMC[182]，皮质醇和 IL-4 培养的人 B 细胞[175]，或者 IL-4 和抗 CD40 抗体培养的人 B 细胞[172]产生 IgE 应答，内源性 IL-6 是很关键的，因为每一个实验体系产生的应答都可以被抗 IL-6 抗体阻断。但是，尽管这些细胞因子可以刺激 B 细胞分化为抗体分泌细胞，它们并不能特异性地刺激 B 细胞的 IgE 转换。与之形成对照的是，TNF-α 增强 IgE 合成伴随着 IL-4 依赖的胚系 CεRNA 转录增强，以及 TNF-α 的促生长效应[209]。虽然体外实验结果提示，这些细胞因子以 IL-4 依赖的方式刺激 IgE 合成，但是对于注射 IgD 抗体或者接种线虫类寄生虫的小鼠，加入针对 IL-2、IL-2 受体、IL-5、IL-6、IL-6 受体的中和抗体或者阻断抗体都不能影响小鼠体内的 IgE 合成（F. D. Finkelman，J. F. Urban，Jr.，未发表资料）。

CD23 在 IgE 合成中的作用

在 IgE 应答中还有一个细胞因子在发挥诱导作用,这便是 CD23。CD23 为低亲和力的 IgE 受体,IL-4 可以上调 CD23 在 B 细胞上表达[210~213]。一些针对 CD23 的单克隆抗体可抑制 IL-4 培养的人 PBMC[180,214] 以及 IL-4 和皮质醇培养的人 B 细胞[177] 产生 IgE 应答。可溶性 CD23 在一些系统中可上调 IgE 的分泌[215,216]。然而,并没有证据表明 CD23 本身可以调控 IgE 转换。抗 CD23 抗体不能抑制 IL-4 和 EBV(G.T.Thyphronitis,未发表资料)或者 IL-4 和抗 CD40 抗体刺激的 B 细胞产生 IgE 应答[154]。并且,可以阻断 IgE 与小鼠 CD23 结合并调节小鼠 B 细胞所有 CD23 分子的一株抗体,注入小鼠体内后并不影响 IgE 应答;而在体外,用 IL-4 加上 LPS[217] 或者 Th2 克隆[218],或者在体内,以明矾处理的抗原,抗 IgD 抗体,或抗 IgE 抗体,或通过接种线虫类寄生虫(I.M.Katona, J.F.Urban, Jr., D.Conrad, F.D.finkelman,未发表资料)免疫动物可以产生 IgE 应答。另外,CD23 缺陷小鼠注射线虫寄生虫 *N. brasiliensis* 后,可在体内合成正常的多克隆 IgG1 和 IgE[219]。

抑制 IgE 合成的因素

单一一种细胞因子 IL-4 是小鼠产生 IgE 所必需的,而多种不同的其他细胞因子可以特异性抑制 IgE 应答,其抑制作用取决于诱导 IgE 应答所需的共刺激因子。IFN-γ 可以抑制 IL-4 和 LPS 培养的小鼠 B 细胞[125,126] 表达胚系 εmRNA[220] 和分泌 IgE,并特异性抑制 IL-4 培养的人 PBMC[178,180],以及 IL-4 加上 EBV[169,221] 或者 IL-4 加上活化 T 细胞的细胞膜[222] 培养的人 B 细胞分泌 IgE。但是 IFN-γ 不影响 IL-4 和抗 CD40 抗体培养的人 B 细胞分泌 IgE[154]。IFN-α 也可抑制 IL-4 培养的人 PBMC[178,180] 以及 IL-4 加上 EBV 培养的人 B 细胞[169,221] 分泌 IgE。不同于在小鼠 B 细胞所观察到的现象,IFN-α 和 IFN-γ 都不能抑制 IL-4 诱导的人 B 细胞增高胚系 εmRNA 的稳态水平[178]。另外,IL-12 可以抑制 IL-4 和皮质醇刺激的人 B 细胞分泌 IgE[223]。该细胞因子通过诱导 IFN-γ 产生间接抑制 IgE,也可直接作用于 B 细胞抑制 IgE。IL-12 主要通过间接作用(抑制 IL-4 的分泌和刺激 IFN-γ 分泌)抑制小鼠体内 IgE 产生[184]。至少在某些系统中(IL-4 培养的人 PBMCs),前列腺素可以抑制 IgE 的产生[180];但在其他一些系统中(IL-4 和 LPS 培养的小鼠 B 细胞),它们能够促进 IgE 产生,提高胚系 εmRNA 稳态水平[224,225]。IFN-γ[127]、IFN-α[131] 和前列腺素 E2 类似物[226] 在小鼠体内都能选择性抑制注射抗 IgD 抗体引起的 IgE 应答;但尚未证实这种抑制作用是仅限于直接作用的 B 细胞,还是通过降低 IL-4 的产生来起作用。所有观察到的现象可以概括为:IL-4(或在人体中是 IL-13)是诱导 IgE 转换所必需的一个关键性因子;但是,不同的共刺激因子,虽然不是所有的,可以在此应答中相互取代。抑制 IgE 应答的其他因素则依赖于应答所涉及的共刺激因子。

IgA 转换的调控

Ⅱ型细胞因子刺激 IgA 分泌

最初研究证实,来自集合淋巴小结一群 T 细胞可选择性诱导 mIgM⁺ B 细胞发生 IgA 转换[227~229]。虽然其作用机制还不清楚,但随后研究显示,某些细胞因子的释放,特别是Ⅱ型来源的细胞因子(例如 IL-4、IL-5、IL-6),可以刺激 IgA 分泌。实际上,在可溶性蛋白质抗原免疫前后,黏膜组织中主要为Ⅱ型细胞因子,而此部位也正是产生 IgA 的主要部位[230~233]。最初报道,IL-5 可在体外选择性增强 LPS 激活的 B 细胞分泌 IgA,IL-4 可进一步增强此效应[234~236]。随后研究证实,IL-5 刺激 mIgA⁺ B 细胞合成 IgA,而不是作用于 mIgA⁺ B 细胞[237~239]。提示 IL-5 促进 mIgA⁺ 细胞的成熟,使之分泌 IgA,但并不诱导 IgA 的转换。施加 IL-5 可以增强小鼠体内 IgA 黏膜应答[240,241]。然而,IL-5 缺陷小鼠鼻内接种流感病毒所诱导的局部病毒特异性 IgA,与对照组相同,提示至少在此系统中,IL-5 对于体内 IgA 的诱导并不是必不可少的[242]。以可溶性蛋白质抗原加上霍乱毒素口腔免疫 IL-4 缺陷小鼠,结果与对照相比,体内产生的针对可溶性蛋白的黏膜 IgA 应答和系统性 IgA 应答均明显降低[243]。这可能是由于不能在肠道集合淋巴结中诱导特异性 T 细胞和 B 细胞,而非 mIgA⁺ B 细胞分化有缺陷的缘故。与此相反,IL-4 缺陷小鼠能够针对霍乱毒素产生完整的黏膜和系统性 IgA,提示 IL-4

839

对于所有的 IgA 应答并不是必不可少。IL-6 缺陷小鼠实验提示，如果以 CFA 处理的卵清蛋白或疫苗病毒进行黏膜免疫，IL-6 在刺激黏膜抗体应答，特别是 IgA 应答方面，发挥主要作用[241]；但是，如果以 KLH 或 OVA 加上霍乱毒素进行黏膜免疫，或者 H. felis 感染所引起的抗体应答中，则结果并非如此[244]。显然，对于 IL-6 在未免疫小鼠产生黏膜 IgA 的重要性，上述两篇文献是不同的。尚不清楚造成这种差别的主要原因是什么。研究所用小鼠的微生物种群差异，以及所采用的抗原和佐剂的不同，可能是一个原因。

TGF-β 刺激 IgA 转换

TGF-β 可以刺激 LPS 活化的 B 细胞发生 IgA 类别转换[129,130,245~247]。在 LPS 激活的 B 细胞中，TGF-β 选择性增强 $mIgA^-$，而不是 $mIgA^+$ 细胞分泌 IgA；同时，TGF-β 可以抑制 LPS 诱导的 IgM、IgG3 和 IgG1 合成[129,169,246]。IL-2 和 IL-5 可以显著增强 LPS 和 TGF-β 诱导的 IgA 分泌[129,245]。IL-2 似乎作用于转录后水平，因为 IL-2 可以增强 LPS 和 TGF-β 培养的 B 细胞产生 IgA，但不能增加 IgA 分泌细胞的数量，稳态 αmRNA 的水平或者膜型与分泌型 αmRNA 的比例[130]。

除了能够诱导 LPS 激活的 B 细胞发生 IgA 类别转换，TGF-β 也能刺激 T 细胞[248]、CD40 配体[249]或右旋糖酐偶联的抗 IgD 抗体[104,248]激活的小鼠 B 细胞发生 IgA 类别转换。此外，TGF-β 至少在 2 个系统中选择性刺激人 B 细胞 IgA 类别转换[250~253]。在第 1 个系统中，包含美洲商陆丝裂原(pokeweed mitogen, PWM)和活化的 $CD4^+$ T 细胞，此时 TGF-β 可以刺激高度纯化的人 $mIgA^-$，而不是 $mIgA^+$ B 细胞增加 IgA 分泌量，而对 IgM 和 IgG 分泌量无影响[252]。诱导此 IgA 应答需要在培养早期加入 TGF-β，并在培养晚期撤除此细胞因子。在第 2 个系统中，TGF-β 加上抗 CD40 抗体可以诱导 $mIgD^+$，而不是 $mIgD^-$ B 细胞分泌 IgA。在此系统[253]和其他系统[254a]中，需要 IL-10 刺激同种型转换细胞成熟为 IgA 分泌型细胞。有趣的是，在抗 CD40 抗体和 S. aureus Cowan 菌株 I(SAC)的激活作用下，IgA 缺陷患者(IgA-D)的 PBMC 可以分泌 IgM 和 IgG，而不能分泌 IgA；而对照组的 B 细胞在这些条件下可分泌所有 3 种同种型抗体[156]。然而，联合运用 IL-10、抗 CD40 抗体和 SAC 可以诱导 IgA 缺陷患者 PBMC 分泌大量 IgA，对照组 IgA 分泌也进一步增强。另一项研究证实，与对照患者相比较，IgA-D 患者未刺激的 PBMC 含有低水平胚系 CαRNA 和 Sμ-Sα 重组[254b]。然而在体外，PMA 和 TGF-β 刺激 IgA-D 的 PBMC 可明显恢复胚系 CαRNA 水平至对照组水平。这两项研究提示，IgA-D 患者的 B 细胞有能力进行 IgA 转换，只是在体内未接受到合适的刺激。与 IL-10 对人 B 细胞的作用相反，IL-10 强烈抑制小鼠 $mIgA^+$ 细胞产生，对于右旋糖酐偶联的抗 IgD 抗体加上 IL-4、IL-5 和 TGF-β 刺激的小鼠 B 细胞，IL-10 也可强烈抑制 LPS 激活的，而不是 CD40 配体激活的 Sμ-Sα 重组[255]。树突细胞(dendritic cell, DC)也能协同促进 IgA 转换[256]。因此，在体外单独运用 DCs，可诱导大约 10%CD40 活化的初始人 $mIgD^+$ B 细胞表达 mIgA，添加 IL-10 和 TGF-β 可将 $mIgA^+$ 细胞的比例从 5%提高到 40%～50%。

有限稀释法的结果提示，TGF-β 可使 LPS 活化的 IgA 分泌型 B 细胞克隆比例 20～25 倍，但并不影响 IgA 分泌克隆的大小[245,257]。与此相反，IL-2 和 IL-5 均不增加 IgA 分泌克隆的比例。TGF-β 在克隆水平诱导 IgA 类别转换的证据还来自瘤性 B 细胞株 CH12. LX[258] 和 I29，TGF-β 可以诱导它们由分泌 IgM 转换为分泌 IgA[259]。然而，人们最初并不将 TGF-β 作为诱导 IgA 类别转换的主要生理性诱导因子，因为观察发现，TGF-β 仅诱导增加很小比例的 $mIgA^+$ 细胞(无 TGF-β 的情况下为 0.1%～0.3%；存在 TGF-β 的情况下为 1.6%～2.2%)，远远低于肠道集合淋巴结中 $mIgA^+$ 细胞的常规比例[248]。最近，在一个小鼠体外实验系统中，成功诱导出较高比例的 $mIgA^+$ 细胞[249]。最初培养的 B 细胞为 $mIgM^+ mIgA^-$，在存在 IL-4、IL-5、葡聚糖抗 IgD 抗体和 TGF-β 的情况下，用 LPS 或 CD40 配体培养 4 天便会含有 10%～20%的 $mIgA^+$ 细胞。

一个十分有趣的现象是，TGF-β 强烈抑制 B 细胞增殖，而细胞周期抑制剂胸腺嘧啶核苷(thymidine)和羟基脲(hydroxyurea)也可以选择性增加 LPS 诱导的 IgA 分泌型细胞数量[245]，这提示：①抑制 B 细胞增殖对 TGF-β 诱导 IgA 类别转换有一定作用；②许多 B 细胞增殖的生理性抑制因子可在体内促进 IgA 类别转换。

血管紧张肽刺激 IgA 转换

血管紧张肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)也可以诱导成人和胎儿 B 细胞，以及来自骨髓的人前 B 细

胞发生 IgA 类别转换[260]。因此，VIP 可以分别刺激少量的静息期的 $mIgA1^-$ 和 $mIgA2^-$ 成人 B 细胞产生 IgA1 和 IgA2[260]；也可刺激 $mIgM^+$ 胎儿 B 细胞；或者抗 CD40 抗体激活的 $mIgM^-CD19^+$ 前 B 细胞，但不能诱导产生其他同种型抗体。另外 2 种神经肽，生长激素抑制素（somatostatin）和 P 物质，对 IgA 的类别转换无影响。 840

小结

表 24.1 总结了对小鼠和人的免疫球蛋白类别转换有作用的细胞因子。从中可以总结出一些普遍的结论：①在 1 个 B 细胞群体中，细胞因子通常可以诱导多个免疫球蛋白同种型转换，对单个 B 细胞克隆进行连续性处理的特定实例中，可以发生这一现象；②诱导一组免疫球蛋白同种型的细胞因子通常抑制其他免疫球蛋白同种型；③某个特定细胞因子发挥何种免疫球蛋白类别转换功能，通常取决于 B 细胞激活物的特性。

同种型转换的分子生物学

免疫球蛋白类别转换与 C_H 基因缺失有关

单个细胞产生的抗体可由最初的 IgM 转换为针对相同抗原的 IgG[2,262]，该现象提示此过程中存在着相同免疫球蛋白 V_H 区由 C_μ 到 C_γ 转换的过程。另外发现绝大多数浆细胞瘤（plasmacytomas）和杂交瘤（hybridomas）都分泌单一免疫球蛋白同种型，提示导致同种型转换的机制可能消除了表达最初同种型的能力。与此相反，大多数小鼠和人成熟 B 淋巴细胞在单个细胞上同时表达 mIgM 和 mIgD 分子，它们具有完全相同的抗原结合特异性和独特型决定簇说明单个 V_H 区可以与不同 C_H 区组合，而且这些选择性组合可在同一个细胞中同时发生。对免疫球蛋白重链基因复合体的鉴定和测序证实，免疫球蛋白同种型由重链恒定区（constant heavy，C_H）基因编码，它们串联排列，具有相同的转录方向，位于编码抗原特异性的 V_HDJ_H 基因的 3′端。在小鼠，C_H 基因位于 12 号染色体的一段 200kb 区域中，顺序为 5′-μ，δ，$\gamma3$，$\gamma1$，$\gamma2b$，$\gamma2a$，ε 和 α-3′[263]。在人，C_H 基因位于 14 号染色体的一段 300kb 区域中，顺序为 5′-μ，δ，$\gamma3$，$\gamma1$，ψ_ε，$\alpha1$，ψ_γ，$\gamma2$，$\gamma4$，ε 和 $\alpha2$-3′[264]（图 24.1）。同时表达 mIgM 和 mIgD 的成熟静息期 B 细胞，主要通过在 C_μ 膜型或分泌型外显子 3′端终止转录来产生成熟 μmRNA，而成熟 δmRNA 则是通过先形成一段较长的含有 V_HDJ_H、C_μ 和 C_δ 的 RNA 转录物（transcription），再剪接掉 C_μ 而产生的[265~268]。与此相反，对骨髓瘤和杂交瘤以及随后正常 B 细胞的研究证实，不论这些细胞在体外或体内被激活，免疫球蛋白同种型的转换过程均包括：在欲表达 C_H 基因 5′端缺失所有 C_H 基因，而保留的并排的 V_HDJ_H 基因及其 5′端启动子和 3′端增强子，它们位于原来表达的 C_H 基因的 5′端[269~273]。分泌 IgD 841

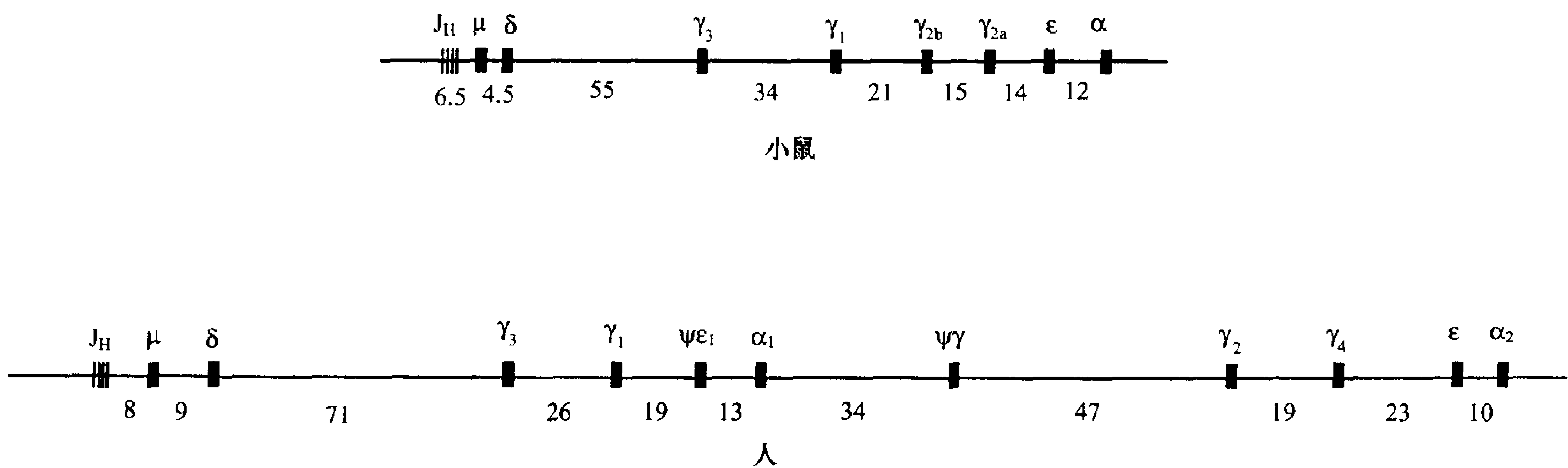


图 24.1 小鼠和人的 Ig 重链基因。图中显示了 J_H 基因、C_H 基因和假基因的相对位置，以及基因之间的大致距离（kb）[263,264]。

的骨髓瘤细胞和杂交瘤细胞[274~280]，以及表达 IgM 和 IgD 以外的膜型同种型但不能分泌 Ig 的正常 B 细胞[281]均是如此。而细胞 2 条染色体上的 V_H 基因，无论表达还是不表达，Ig 重链基因座位都会发生类别转换，而且通常转换成编码相同 C_H 同种型的基因[269,282~284]。实际上，缺失性的同种型转换（deletional isotype weitching）不依赖于有效重排的免疫球蛋白重链和轻链在细胞膜上表达，因为这种转换在 B 细胞以外的前 B 细胞系中也可发生[285~288]。

转换区介导免疫球蛋白类别转换重组

除了确定免疫球蛋白重链基因复合体中 C_H 基因的顺序，DNA 测序研究还证实转换区（switch regions, S regions）的存在，它位于 C_δ 以外每个 C_H 基因的 5′端[289-298]。所有 S 区含有 GAGCT 和 TGGGG 重复序列[290,292,299,300]，提示这些序列在类别转换过程中扮演关键性角色。此外，S 区中常常含有的（C 或 T）AGGTTG 序列通常位于转换重组位点的 5′端，提示它与 GAGCT 和 TGGGG 串联重复序列协同作用，在介导类别转换中发挥重要作用[301]。然而，不同 C_H 基因的 S 区并不相同。主要的差异表现在它们的长度（2 ~ 10 kb）和组成。与 S_μ 的序列同源性由大到小依次为：S_ε、S_α、$S_\gamma3$ 和（$S_\gamma1$、$S_\gamma2b$、$S_\gamma2a$），其中 $S_\gamma1$、$S_\gamma2b$ 和 $S_\gamma2a$ 相互之间的同源性很强，但是 5 个寡核苷酸重复序列以外的部分，它们与 S_μ 几乎没有同源性[299]。某些 S 区含有一些独特的序列[292,295,299,302]，但目前还不清楚这些独特的序列是否在调控特异的同种型转换中发挥作用，如果有，那又是什么作用？S 区含有多重短的识别序列，可能通过增加转换重组发生的概率来提高转换效率。

通过非同源重组 C_H 基因成环和缺失是免疫球蛋白类别转换的主要机制

理论上，在欲表达的 C_H 基因 5′端缺失其他 C_H 基因来完成的同种型转换，可通过两种方式实现：一为同源重组（homologous recombination），即相同的或大致相同的基因片段进行重组；二为非同源性重组（nonhomologous recombination），即包含不同核苷酸序列的基因片段进行重组。转换可以通过以下方式实现：①同一 DNA 片段的 2 个位点进行重组，使欲被切除的 DNA 片段成环（looping out）（图 24.2A）；②姐妹染色单体的 2 个位点进行重组，使其中一个染色单体以及该染色单体进入的细胞获得另一条姐妹染色单体丢失的 C_H 基因（图 24.2B）；③同源染色体的 2 个位点进行重组，一条染色体获得另一条同源染色体上缺失的 C_H 基因（图 24.2C）。重组可以发生于 S 区的特异性位点，也可以发生在 S 区内多个位点。实验观察证实，同一 DNA 片段上，2 个位点发生非同源重组进而导致 DNA 成环和缺失，是最常见的缺失性同种型转换机制。这种重组可发生在 S 区的首选位点（preferred site）上。分析正常 B 细胞同种型转换过程中产生的环状 DNA 切除产物，发现其中含有 5′端缺失的 C_H 基因，从而直接证实缺失是通过 DNA 环的形成和切除来实现的[247,303~307]。在 B 细胞的 V_LJ_L 重组过程中，以及 T 细胞受体的 α 和 β 基因中，也存在类似过程[308~310]。B 细胞肿瘤细胞系基因组中偶尔发生的转换倒置（switch inversion），而非缺失，也存在 DNA 环的形成[285,306,311,312]。

846

无论是姐妹染色单体间的重组，还是同源染色体间的重组，都不是典型的免疫球蛋白同种型转换机制。运用 Southern 斑点分析的方法，研究已经转换成非 IgM 同种型的细胞，结果发现，位于表达的 C_H 基因 5′端的 C_H 基因，要么完全缺如，要么只有单倍体数量[269~280]。这个结果与同源染色体的不等互换相矛盾。然而，正如以下所提到的，家兔 IgA 转换中存在 VDJ 和 C_H 基因簇（gene cluster）的染色体间重组，大约占到此种属 IgA 转换的 3% ~7%[313a,313b]。如果姐妹染色单体不等互换（unequal sister chromatid exchange）是同种型转换的机制，那么应该产生表达三倍体数量 C_μDNA 的正常细胞，但实际上并没有发现这种细胞[290,300,314,315]。不过，偶尔也会发生姐妹染色单体互换导致的类别转换[300]。

不同 C_H 基因 5′端的 S 区之间存在着同源性。然而，在一个表达非 IgM 同种型的克隆中，测定位于 V_HDJ_H 和 C_H 基因之间的重组 S 区序列，结果表明，典型的 S 区重组发生在碱基对同源性较小、甚至完全没有同源性的 DNA 序列之间[317]。此外，对已经完成同种型转换的不同克隆的重组位点进行 DNA 序列测定，结

果证实，重组可以发生在 S 区的多个位点上[292,300,301,316]。对转化 B 细胞的染色体断点（chromosomal breakpoints）进行测序分析，结果证实，事实上大约 40% 的重组发生于 S 区（位于所表达的 C_H 基因 5′端）内的一个位点与 S_μ 以外的一段序列之间[275,317]。尚不清楚染色体断裂点内 S_μ 缺如是由于重组确实发生在 S_μ 以外，还是因为研究中使用的细胞，经过长期培养发生二次缺失事件，进而掩盖了重组位点中原来存在的 S_μ。在同种型转换过程中，DNA 环的剪切位点上存在着 S_μ，这一事实提示第二种可能性更大[247,303~307]。但是，即使在这些 DNA 环上，重组 S 区含有的同源性序列从不超过 5 个碱基，甚至某些重组位点的 DNA 序列完全没有同源性。

对分泌 IgD 的小鼠杂交瘤和浆细胞瘤进行 DNA 序列分析，结果也证实 S 区在同种型转换中的重要作用。不同于表达 mIgM 和 mIgD 的成熟 B 细胞，这些 IgD 分泌细胞已缺失 C_μ 基因[274~280]。在小鼠 C_μ 和 C_δ 间

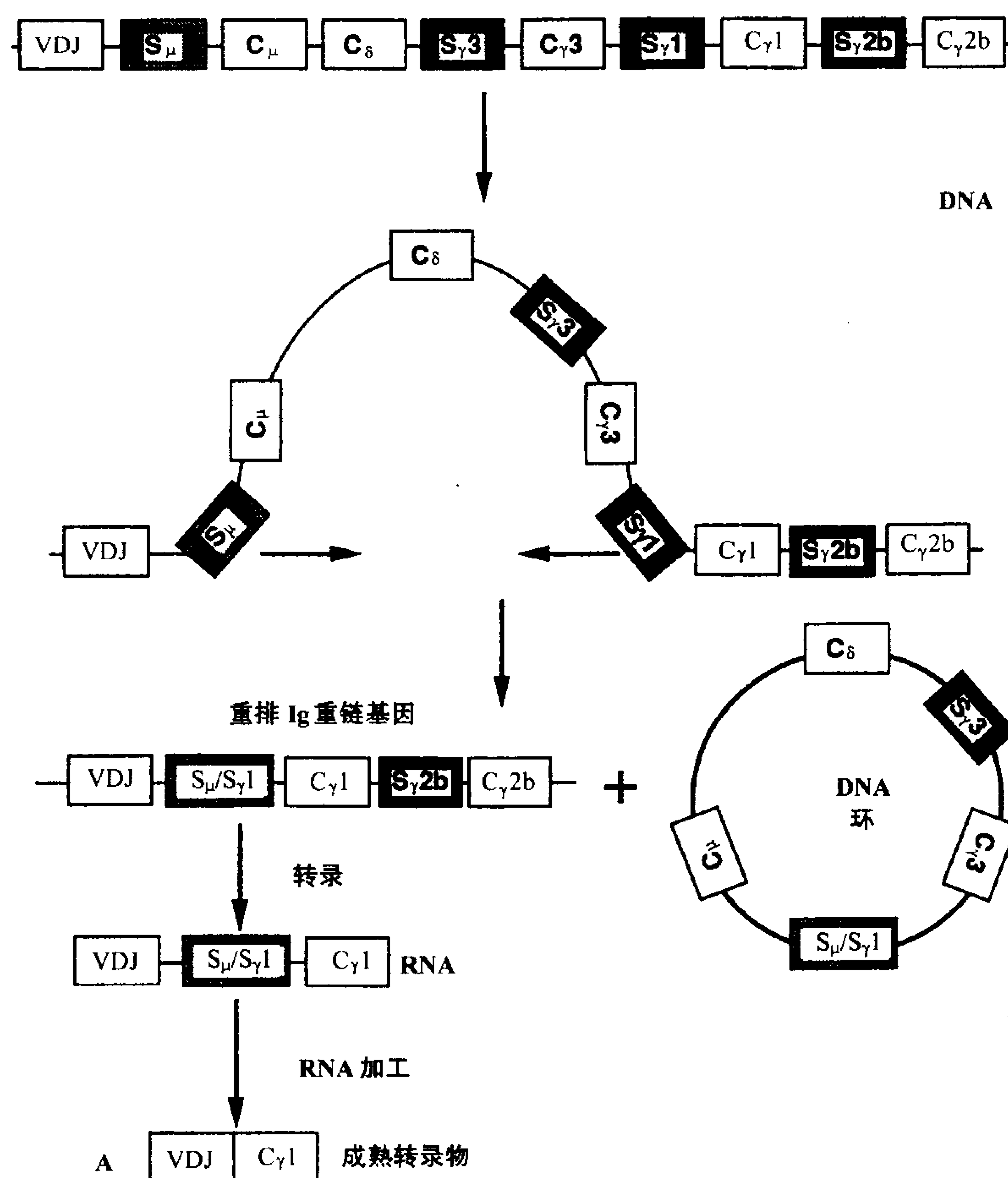


图 24.2A　Ig 同种型转换的可能机制。显示最初表达 IgM 的小鼠 B 细胞合成 IgG1 的 5 种可能机制。A：成环（looping out）：S_μ 上的一个位点与 $S_\gamma1$ 上的一个位点发生 DNA 重组，产生重排的 Ig 重链基因，其中包括由重组 $S_\mu/S_\gamma1$ 内含子分隔开的 VDJ 和 $C_\gamma1$。S_μ 重组位点的 3′端和 $S_\gamma1$ 重组位点的 5′端之间的 DNA 形成环状 DNA。重排基因转录后形成的 RNA 进一步缺失重组转换区，使 VDJ 与 $C_\gamma1$ 的 5′端直接相接。图中未显示 I 区，它们位于每一个 S 区的 5′端（接图 24.2B）。

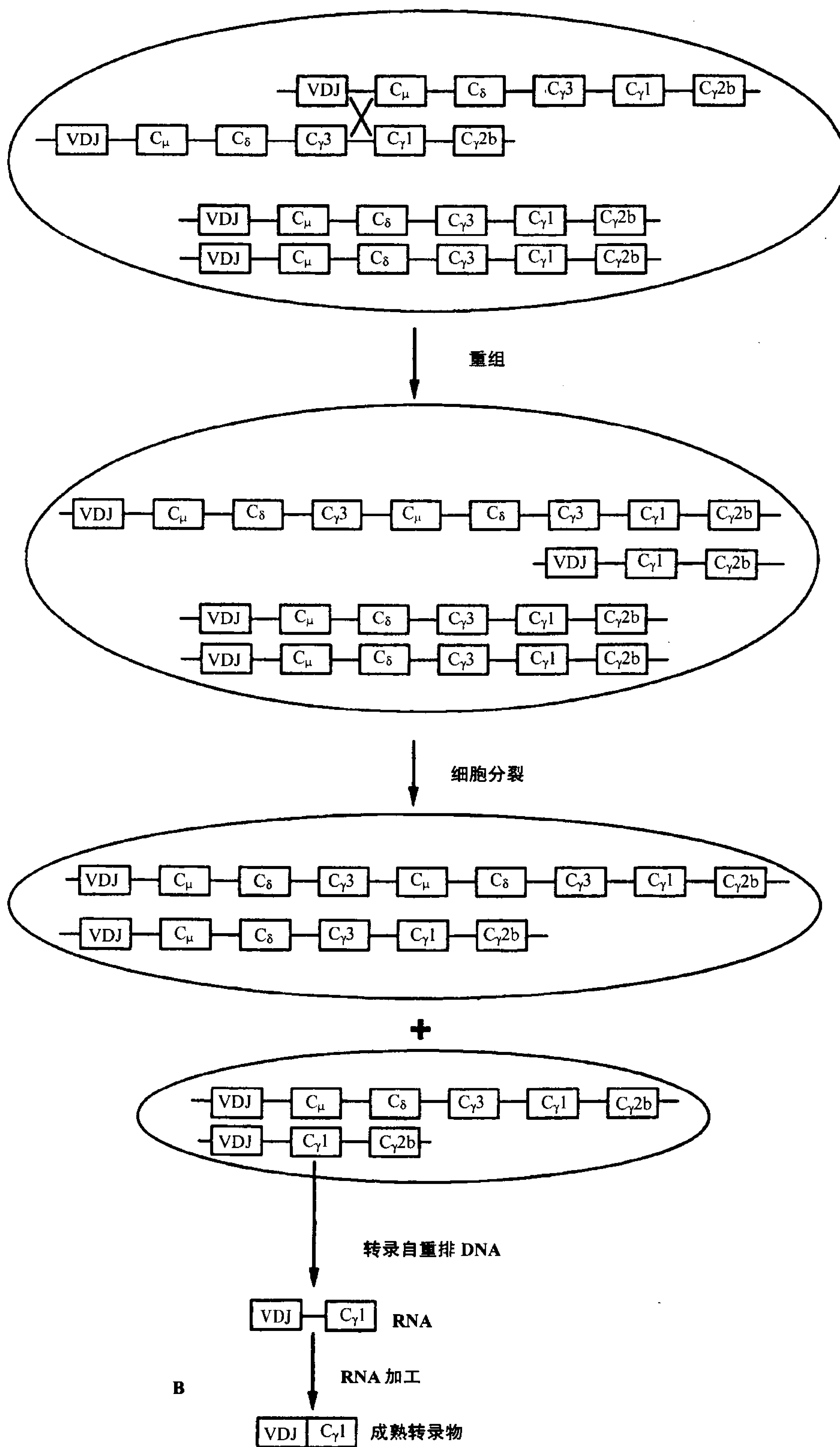


图 24.2B 姐妹染色单体间不等互换(unequal crossing over):小鼠 12 号染色体之一的 2 个姐妹染色单体间发生重组。互换后,一条染色单体缺失 C_μ、C_δ 和 $C_\gamma3$,使 VDJ 和 $C_\gamma1$ 相接;另一条染色单体包含重复的 C_μ、C_δ 和 $C_\gamma3$。细胞分裂使重排的姐妹染色单体分隔开。其中一个子代细胞为 C_μ、C_δ 和 $C_\gamma3$ 三倍体,另一个子代细胞为单倍体。如果细胞中包含 VDJ 与 $C_\gamma1$ 相接的重排 C_H 基因,就可产生一个 γ1 mRNA 转录物(如图 24.2A)(接图 24.2C)。

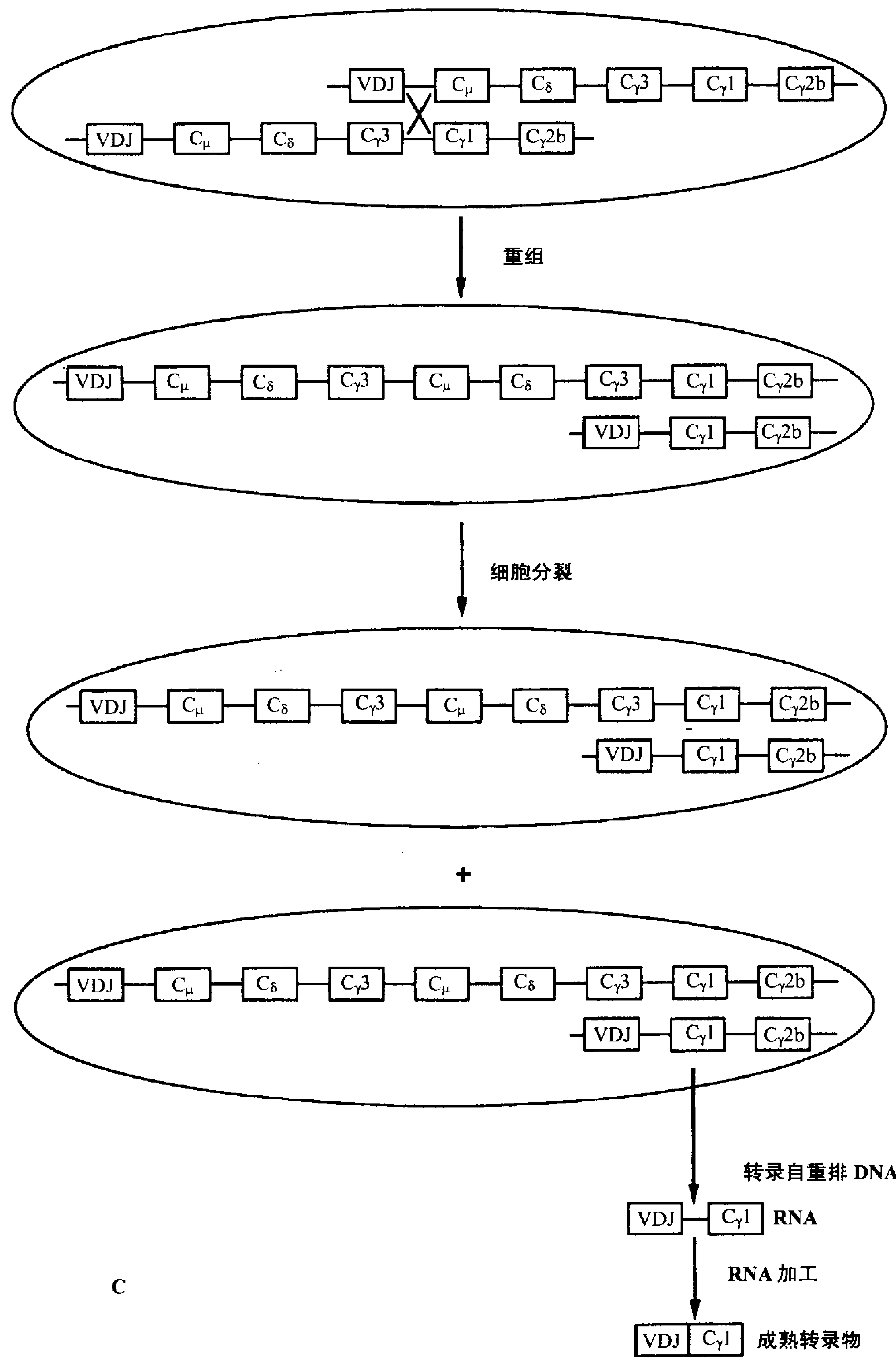


图 24.2C　同源染色体之间的不等互换：小鼠 12 号染色体的 2 个同源染色体之间发生互换，产生 2 个重排的 Ig 重链基因。在其中一个 Ig 重链基因上，VDJ 与 $C_\gamma1$ 直接相接；另一个 Ig 重链基因上，VDJ 和 $C_\gamma1$ 被重复的 C_μ、C_δ 和 $C_\gamma3$ 序列分隔开。细胞分裂形成的子代细胞包含 2 个重排的 12 号染色体，因此所有 C_H 基因为二倍体。包含缺失的 Ig 重链基因可产生 1 个 γ1 mRNA 转录物(如图 24.2A)。(接图 24.2D。)

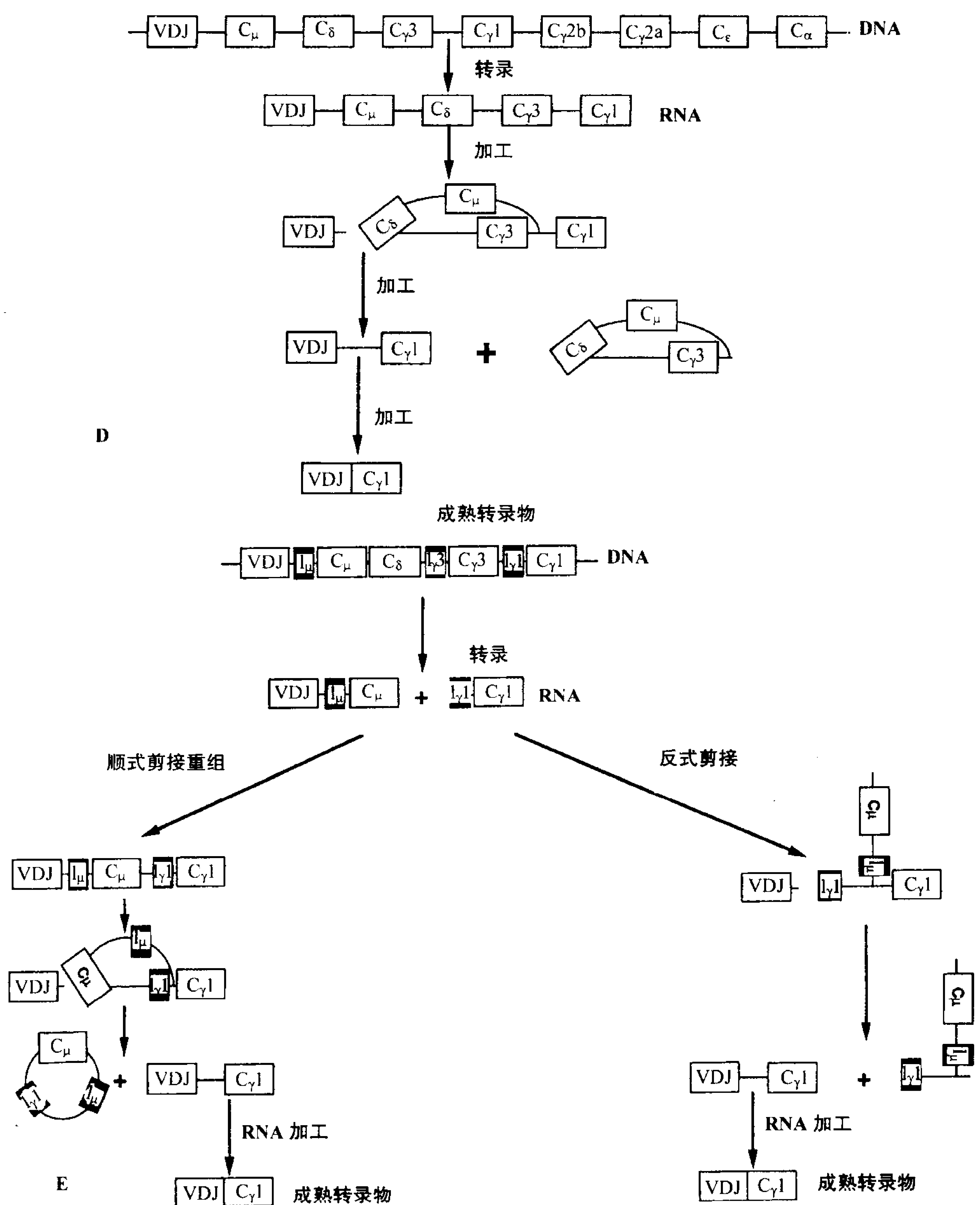


图 24.2D 长转录物的加工过程：包含 VDJ，C_μ，C_δ，$C_\gamma3$ 和 $C_\gamma1$，以及 VDJ 3′端至 $C_\gamma1$ 之间内含子的 RNA 转录自一个未重排的 Ig 重链基因。这个长转录物的加工过程包括：首先剪接掉 C_μ，C_δ，$C_\gamma3$(图中显示通过形成一个套马绳的结构来实现)，然后通过在 VDJ 和 $C_\gamma1$ 之间的内含子剪接来产生成熟的 γ1 mRNA(接图 24.2E)。图 24.2E 非连续转录和重组：产生的 μmRNA 和胚系 γ1 mRNA 均转录自一个未重排的 Ig 重链基因。这些转录物通过两种机制之一产生成熟的 γ1 mRNA。在顺式剪接中(图的左侧)，$VDJC_\mu$ 转录物的 3′端直接与 $I\gamma1C_\gamma1$ 转录物的 5′端相连接。C_μ，I 外显子和 S 内含子(图中未显示)通过形成一个套马绳的结构被剪接掉。通过反式剪接(图的右侧)，以相同的 RNA 前体形成 $VDJC_\gamma1$ 的过程涉及以下步骤：①$I_\mu C_\mu$ 的 5′端首先与 $I_\gamma1C_\gamma1$ 在 $I_\gamma1$ 和 $C_\gamma1$ 外显子的交界处相连接，产生一个 Y 型分支的中间体(Y-branched intermediate)并游离 VDJ；②然后剪接掉 Y 型分支中间体，使 VDJ 与 $C_\gamma1$ 相连接。

并没有发现 S 区，提示 3′端的 S 区对于转换并不是必需的。因此，小鼠发生 IgD 转换的概率较低，可能是由于缺乏有利于转换的 DNA 序列，而不是缺乏非同源重组所必需的 DNA 序列。此外，在 IgD 分泌细胞内，VDJ

常常与 $C_\delta 1$ 外显子 3′端的内含子发生重组，同时缺失编码 δ 链的部分基因[274,275]，提示 3′端 S 区对于转换形成完整的 C_H 基因产物具有重要作用。基于上述观察，有人提出：S 区内串联的重复片段可能是某些蛋白质分子的结合或装配位点，这些蛋白质分子控制或有利于同种型转换；但这些重复片段并不是一定是重组发生的位点。常常观察到 DNA 环上的重组位点是由同源性较小 DNA 重组形成的，但其重要性仍有争议。这问题其实涉及到小鼠转换为 IgD 的重组机制是否与其他同种型转换相同。

人 IgM 转换为 IgD 就是采用经典同源重组方式进行同种型转换的一个典型例子。对分泌 IgD 的人骨髓瘤以及正常人 B 细胞的研究表明，人 C_δ 重组发生在 C_μ 基因 5′端和 3′端的 2 个基本相同的 442 ~ 443bp 重复片段之间，在重复片段 5′端和 3′端的同源性位点处连接[277,318]。然而，分析 2 个建立的分泌 IgD 的细胞系提示，人 IgM 转换为 IgD 也同样可以发生在这些重复片段以外的位置[318]。

转换重组事件涉及的分子参数

重组可能需要通过多种蛋白质分子的结合，将特异性 DNA 区域排列成高度有序的结构[319]。目前已确定小鼠的 2 个 DNA 结合蛋白复合物(DNA-binding protein complex)，它们特异性地与 S_γ 串联重复片段(tandem repeat)中的基序(motif)相互作用[320~322]。其中一个蛋白质复合物最初被称作 SNIP，与 NF-κB p50 的同型二聚体(homodimer)几乎没有什么差别；另一个蛋白质复合物被称作 SNAP，很像一个异型寡聚体(hetero-oligimer)，包含 E2A 基因产物，以及一个螺旋-襻-螺旋转录因子(helix-loop-helix transcription factor)——E47。涉及转换重组的断裂点(breakpoint)在 SNIP 和 SNAP 的结合区内成簇(cluster)[326]。人体内也发现了类似的 SNIP 和 SNAP 转换结合区[323]。事实上，人 IgG3 类别转换中经常使用 SNIP 位点，并在 *G3m(g)*同种型相关的 IgG3 低血清浓度患者体内，发现突变的 SNIP 位点[323]。

因为同种型转换需要 DNA 两条链在转换位点断开，所以研究了转换中刺激双链断裂(double-strand break, DSB)的机制[328]。以 LPS 或者右旋糖酐-抗 IgD 抗体加上 IL-5 激活 B 细胞，而不是单独使用右旋糖酐-抗 IgD 抗体，证实 $S_\gamma 3$ 内的 DSB 开始于活化后 4 小时，并持续到 44 小时。发现的这些 DSB 是：①B 细胞特异性的；②序列特异性的，发生在编码链上的一个一致性序列(consensus sequence)5′-GRGNAGCT-3′内，此序列位于 SNAP 结合位点的边缘；③基因座特异性的；④可诱导的，它们不出现在静止 B 细胞中，但出现在活化后的 B 细胞中。虽然 DSB 伴随着胚系 C_H RNA 的表达同时出现，但尚不知道转录是否需要 DSB 的产生。DSB 周围序列中含有短的反向重复序列(inverted repeat)，后者有利于形成茎环(stem-loop)结构。已有资料提示这些二级结构有助于重组酶(recombinase)的靶向性。

除 p50/NF-κb 和 E47 外，还发现了另外一些转换结合蛋白(switch-binding proteins)[329,330]。S 区引人注目的一点是，其中含有大量富含 G 的串联重复序列。这些重复序列可以形成平行的四链复合物(parallel four-stranded complex)，称作 G4(四重)DNA，可能促进同一条 DNA 链的不同位点发生重组。另外发现，一个被称作 QUAD 的蛋白与这种 G4 结构特异性结合，可能有助于稳定富含 G 的四重 DNA[329]。

847

转换与 V_HDJ_H 重组的分子生物学特性的差异与相似之处

转换重组机制在一些基本方式上与介导 V_HDJ_H 重组的机制截然不同。V_HDJ_H 重组利用有固定间距(12bp 或 23bp)的七聚体(CACTGTG)和九聚体(GGTTTTTGT)信号序列[331,332]，来实现 V_H、D 和 J_H 基因的精确连接；而在类别转换中，S 区串联重复序列的排列变化较大。精确连接是重组的 V_HDJ_H 编码具有抗原特异性的转录产物所必需的；而在类别转换中，S 区会从成熟的 C_H mRNA 中剪接掉。基于此，虽然这两个过程也共用一些蛋白酶，但用来介导这两个过程的酶系统是不一样的。因此，尽管 V_H、D 和 J_H 基因重组中涉及 RAG-1[333] 和 RAG-2[334] 基因产物，这些基因对于转换重组并不是关键性的[335]。但正如以下将要讨论的，K_μ 蛋白复合物对于类别转换[335]、V_HDJ_H 重组以及 DNA 损伤修复都很重要[336~340]。

顺序转换

通过成环和缺失转换某一特定的 C_H 基因并不总是由 C_μ 基因开始，也可以通过顺序缺失事件（sequential deletional events）来实现。最初提出这一点，是因为研究证实：已经完成同种型转换的某些 B 细胞肿瘤中含有部分 S_μ 基因，它们与来自其他非 IgM 非 IgD 同种型的 2 个 S 区片段直接连接[292,297~299,341]。另外一个支持顺序转换（sequential switching）的证据是：取正在转换的正常 B 细胞的环状 DNA（环状 DNA 实际上反映的是类别转换过程中被缺失的部分），结果发现，S_μ 的 S 区序列连接 2 个不同的 S_γ 序列，其中一个为 S_μ 顺次与 S_γ 序列和 S_ε 序列连接，另一个为 S_μ 顺次与 S_γ 序列和 S_α 序列连接[247,311,314]。从 LPS 加上 IL-4 刺激的细胞中提取所有未经选择的环状 DNA，进行限制性分析，结果显示，由 IgE 类别转换产生的含有 $C_\gamma 1$ 的环状 DNA，绝大部分都含有重排的 $C_\gamma 1$ DNA[205]。此外，通过体内注射可以诱导 IL-4 产生的线虫类寄生虫，可以刺激 B 细胞分泌 IgE，再从 B 细胞中克隆环状 DNA 进行分析，结果证实环状 DNA 中存在来自 $S_\gamma 1$、S_μ 和 S_ε 的序列[303]。上述两个现象提示，IgE 类别转换可能通过 IgM-IgG1-IgE 的顺序转换来完成。此外，由体内产生的表达 IgE 的 B 细胞融合制备杂交瘤细胞，再从中提取染色体 DNA，对其中的 S 区进行 Southern 斑点分析，结果证实，12 个包含 VDJ-C_ε 重组的 Ig 重链基因中，有 4 个经历了 S_μ-$S_\gamma 1$-S_ε 的转换重组[311]。这代表了对顺序转换的最小估计，因为如果已经发生了 S_μ/ $S_\gamma 1$-S_ε 的重组，那么 5′端断裂点位于 S_μ 内，$S_\gamma 1$ 便可能已经缺失。

在细胞水平，顺序转换的发生有以下事实支持：①由 LPS 加上和 IL-4 诱导的 B 细胞绝大部分在表达 mIgE 的同时共表达 mIgG1[342]；②抗 IgG1 抗体可以抑制 70%～80%由 LPS 加上 IL-4 诱导的 IgE 分泌[205,311]；③大约有 5%经 LPS 加上 IL-4 刺激后表达胞质性（cytoplasmic，c；分泌型）IgE 的 B 细胞共表达 cIgG1[205,311]。而且，相对于 IgG1 应答，大约 80%由 LPS 加上 IL-4 诱导的 IgE 应答发生延迟[205]，提示在此系统中，绝大部分的，但并不是所有的，IgE 分泌型细胞来源于先转换成 IgG1 的细胞。对人 IgE 分泌型细胞的 S 区序列进行测定，也证实存在 IgM/IgG/IgE 的顺序转换[171,190,343]。最近，又在感染曼蚊血吸虫（*Schistosoma mansoni*）以及特应性皮炎（atopic dermatitis）的患者证实，存在通过 $S_\gamma 1$、$S_\gamma 2$ 或者 $S_\gamma 4$ 实现的 S_μ 到 S_ε 的单个和两个顺序转换[344]。

这些现象与以下两种可能性相一致：①IgE 应答中的顺序转换，可能仅仅是由于某些刺激因子，如 LPS 加 IL-4 活化的 B 细胞更倾向于转换为 IgG1，而不是 IgE；因此大多数转换为 IgE 的 B 细胞首先被诱导转换为 IgG1。②由 IgG1 转换为 IgE 比由 IgM 转换为 IgE 更容易完成。对人 B 细胞的研究支持第一个假说：某些刺激倾向于由 IgM 直接转换为 IgE；而另一些刺激则倾向于通过 IgG 顺序转换为 IgE。例如，EBV 加上 IL-4 培养的人 B 细胞，可被诱导通过 IgG 转换为 IgE[171]；而 IL-2、IL-4 和 PMA 活化的小鼠 EL-4 胸腺瘤细胞培养的人 B 细胞[345]，或者抗 CD40 抗体加上 IL-4[189] 培养的人 B 细胞则直接转换为 IgE。来自 $S_\gamma 1$ 5′端侧翼序列遗传缺陷小鼠的实验数据也支持第一个假说。该小鼠的缺陷序列中包含 γ1 胚系 RNA 转录本的启动子元件以及剪接位点，因此不能转换成 IgG1[346]。但是，如果在体外以 LPS 加上 IL-4 刺激，或者在体内以 *N. brasiliensis* 感染或者以 NP-OVA 免疫，这种小鼠的 B 细胞会以正常频率发生 IgE 转换[347]。

同种型转换所需的分子

诱导大多数免疫球蛋白的同种型转换至少需要 3 个不同过程：将发生转换的 C_H 基因的胚系 RNA 的表达；细胞分裂，以及另外一个尚不清楚的过程。

胚系 C_H RNA 和免疫球蛋白类别转换的可及性模型

最初为探索直接转换可能的发生机制，使用了 2 种细胞。一种为 $mIgM^+$ 小鼠 B 细胞淋巴瘤，I.29（I.29μ）；此细胞可以自发性的，或者经 LPS 处理后，在体外发生转换并表达 IgA、IgE 或者 IgG2a，但不表达 IgG1[348]。另一种细胞为 Abelson-转化的前 B 细胞系（Abelson-transformed pre-B-cell lines，A-MuLV pre-B）；此细胞可以自发性地由 μ 转换为 γ2b[285]。对 I.29μ 的研究提示，编码此细胞系将要转换成的特异性免疫球蛋白同种型的 C_H 基因是转录活跃的。因此，将要转换成 IgA 而不是 IgG1 的 I.29μ 细胞，在类别转换前就组成性

表达稳态水平的 CαRNA，但检测不到 $C_{\gamma}1$ 的 RNA。与此相类似，将转换为 γ2b 的 A-MuLV pre-B 组成型表达稳态水平的 γ2b RNA。不管是 I.29μ 细胞系的 C_{α} 基因，还是 A-MuLV pre-B 的 $C_{\gamma}2b$ 基因，都没有重排；因此它们以胚系结构进行转录。不同于重排 C_H 基因编码的 mRNA，胚系 C_H RNA 缺少 1 个编码 V_HDJ_H 的外显子。因此，这些胚系 CH RNA 转录本不能编码完整的免疫球蛋白重链，因此又被称为无效的 RNA 转录本（sterile RNA transcript）。根据其他上下文，我们知道转录激活（transcriptional activation）的作用在于定向重组的基因[349~351]，这也许是因为转录激活形成一个开放的染色质构型，提供了调节性 DNA 结合蛋白所需的可及性（accessibility），由此提出可及性模型（accessibility model）：C_H 基因的可及性也可定向（target）参与转换重组的 C_H 基因[285,348]。

细胞因子通过调控胚系 C_H 基因转录控制转换

免疫球蛋白同种型转换的可及性模型为理解特定细胞因子诱导活化的正常 B 细胞选择性表达免疫球蛋白类型奠定了基础。因此，除了发现 IL-4 可以刺激 LPS 活化的小鼠 B 细胞分泌 IgG1，还发现该细胞接触 IL-4 后 24~48 小时，即可诱导胚系 γ1 RNA 稳态水平的增高[99~102]。IL-4 诱导胚系 γ1 RNA 先于 IgG1 类别转换的启动。此外，在适当活化的小鼠 B 细胞中还观察到：以相似的方式，IL-4 选择性诱导胚系 εRNA 稳态水平的增高[99~101]；IFN-γ 刺激胚系 γ2a[101] 和 γ3 RNA[42] 水平增加；TGF-β 增强胚系 γ2b[147] 和 αRNA[130,259,352]。同样地，在人 B 细胞，IL-4 和 TGF-β 分别诱导胚系 ε[154,166,168,178,189,190] 和 α[250,251] RNA 稳态水平增加。因此，在所有研究的例子中，某一免疫球蛋白同种型的转换发生以前，目的 C_H 基因特异性胚系 RNA 的稳态水平总是首先被诱导或增加。然而，正如以下将讨论的，最近的数据显示，胚系 C_H 基因的活化是诱导转换重组所必需的，但不是充分条件。可及性模型推测，胚系 C_H RNA 稳态水平的增加是由于 C_H 基因的转录率（transcriptional rate）增加引起的。然而，与可及性模型相反的另一种可能性是，C_H 胚系 RNA 稳态水平增加可能仅仅是由于 RNA 稳定性的选择性增加。为了验证这种假说，最近的研究对 IL-4 或者 TGF-β 刺激的 B 细胞肿瘤进行 C_H 转录的核连续分析（nuclear run-on analysis）。这些研究证实，IL-4 和 TGF-β 分别增加胚系 ε[353] 和 α[259] RNA 的从头转录（de novo transcription），与可及性模型的预测结果相一致。

调控胚系 C_H 基因表达的非细胞因子因素

除细胞因子外，其他因素也可在 C_H 基因可及性水平调控免疫球蛋白同种型转换。例如，源于细菌的、主要刺激免疫球蛋白 IgG3 类别转换的有丝分裂原 LPS，就能够诱导胚系 γ3 RNA 稳态水平增加[101]。此外，虽然单独使用 LPS 不能诱导胚系 εRNA，也只能刺激低水平的胚系 γ1 RNA，但它可以与 IL-4 协同作用，增强这些转录物的表达[101,220,354]。在无 IL-4 的情况下，以刀豆素 A 活化的 $CD4^+$ T_H 1 克隆的细胞膜刺激静息 B 细胞，与新鲜分离的 B 细胞相比，胚系 γ1 RNA 稳态水平表达增加[122]。而且这种对胚系 γ1 RNA 的诱导是特异性的，在此过程中胚系 γ3、γ2b、ε 和 α RNA 水平并没有增加。活化的 T 细胞膜诱导的胚系 C_H RNA 可能是，至少部分是，由表达在活化 T 细胞膜上的 CD40 配体所介导的。在没有外源性细胞因子的情况下，甚至在存在着中和性抗 IL-4 抗体的情况下，膜型 CD40 配体也可诱导静息小鼠 B 细胞表达胚系 γ1 和 ε RNA[123]。此外，CD40 配体和 IL-4 可以协同诱导胚系 γ1 和 ε RNA。与此相反的是，在外源性细胞因子存在的情况下，抗 CD40 抗体刺激的人 B 细胞可以表达除 γ4 和 ε 以外所有同种型胚系转录物[355]。然而，在另一个研究中，单独用抗 CD40 抗体活化人 B 细胞，未能检测到 γ 亚型胚系转录物[356]。尚不清楚导致上述不同研究结果的原因。右旋糖酐-抗 Ig 抗体可以导致静息期小鼠 B 细胞 mIg 的多价交联，这类似于 LPS 或者 CD40 配体的作用，也能影响胚系 C_H 转录。免疫球蛋白多价交联有如下作用：①可在没有其他外源性刺激的情况下，诱导胚系 γ3、γ1 和 γ2b RNA 的产生[124]；②增加 LPS 和 IL-4 活化的 B 细胞产生胚系 γ1 RNA[124]；③增加 LPS 或者 CD40 配体加上 IL-4、IL-5 和 TGF-β 活化的 B 细胞产生胚系 αRNA（P. Zelazowski, C. M. Snapper, 未发表资料）；④抑制 LPS 加上 IL-4 活化的 B 细胞产生胚系 εRNA；⑤抑制 LPS 活化的 B 细胞产生胚系 γ3 和 γ2b；以及⑥抑制 LPS

加上 IFN-γ 诱导的 B 细胞产生胚系 γ2a RNA[124]。在这点上，已经证实，抗 IgM(Fab')2 或者 PMA 均可诱导 B 细胞系胚系 γ1 的启动子活性，IL-4 与这 2 个因子协同作用，诱导 γ1 启动子[386]。

胚系 C_H 转录物的结构

对胚系 C_H 转录物的结构研究促进了对细胞因子选择性诱导 C_H 基因转录激活机制的理解。对于除 IgD 以外的所有小鼠免疫球蛋白同种型[288,352,354,357~361]以及人的 IgM[362]、IgE[178] 和 IgA[251]，编码其胚系转录物的 cDNAs 都已经被分离和鉴定。所有胚系转录产物包含 1 个完整的 C_H RNA，并与由位于该 C_H 基因 S 区 5′端的 DNA 转录而成的 1 个编码序列剪接。该编码序列结构称作 I 区。这种 I_HC_H 胚系 RNA 的转录是从 I 区 5′端开始的，随后连续通过 S 区和 C_H 基因，终止点则位于编码成熟免疫球蛋白重链的 mRNA 终止处的同一 poly(A)位点附近。随即剪接掉 S 区，生成 I_HC_H 转录物。启动转录的启动子不同于典型的启动子，缺乏一个 TATA 框和一个 CCAAT 基序。这也许可以解释为什么胚系 C_H RNA 的转录可从多个位点启动[220,358]。在某些情况下，转录从与 C_H 同种型相接的 I 区开始启动，反式剪接成不同 C_H 同种型的胚系转录物，从而产生嵌合的胚系 C_H 转录产物($I_\mu C_\varepsilon$、$I_\varepsilon C_\mu$、$I_\mu C_\gamma 4$、$I_\gamma C_\mu$、$I_\gamma C_\varepsilon$、$I_\varepsilon C_\gamma$ 和 $I_\gamma 4C_\alpha 1$)。例如，在 IL-4 刺激的 IgD^+(未转换的)人 B 细胞中便发现了这些转录产物[363]。在转换重组之后，也可通过加工含有并列的 I_μ 区和 C_γ 区的单个 RNA 转录物而形成剪接的杂合 $I_\mu C_\gamma$ 转录产物，与成熟 C_γRNA 共表达[364]。

849

胚系 C_H RNA 有功能吗？如果有，那功能是什么？

虽然 C_H 基因的胚系转录作为免疫球蛋白类别转换前奏曲的功能意义尚有待进一步证实，但不同同种型的胚系转录物在结构上的相似性提示，胚系 RNA 可能在转换过程中发挥着一定的作用，有以下几种可能性。①胚系转录物可能是没有功能的，它仅仅反映了转录激活以及重组酶对 C_H 基因的可及性。②胚系转录物可能积极参与了转换过程，具体方式可能是，通过与 C_H DNA 形成三聚体来稳定开放性 DNA 构象[365]；或者通过形成链特异性的 RNA:DNA 杂合体[366]，利用核酸酶敏感的短茎环结构[367]增强 S 区重组活性；又或通过一些直接的酶活性参与重组。③胚系转录物可能编码某种调控蛋白。某些实验已提示存在这种可能性。如研究发现，IgA[357] 和 IgG1[359] 胚系转录物中的读框可分别编码包含 43 和 48 个氨基酸的蛋白质，并且起始密码子 Met 位于有利于高效翻译的位置。此外，在蔗糖梯度液中，胚系 α 转录物与多聚核糖体一同迁移[357]。一个研究小组发现，胚系 C_H 转录物可在体外编码 1 个被截短(truncated)的 C_μ 蛋白[368]。然而，另外一些实验观察到，其他一些胚系转录物的读框较小，且起始密码子 Met 所处位置不利于进行翻译。因而，胚系转录物的上述功能是否在类别转换过程中发挥关键作用尚有争论。④正如下面将要讨论的，在理论上，胚系 C_H RNA 可通过剪接到 VDJ-C_μRNA，从而进行一个新的免疫球蛋白类型的非缺失表达(nondeletional expression)参与类别转换[369~372]。

转换重组酶：采用转换重组底物进行的研究

目前尚不清楚转换重组酶(switch recombinase)、假定的酶或者介导同种型转换的酶的特性。然而，对转换重组底物(switch-recombinase substrate)的分析有助于深入了解同种型转换的机制。大量研究证实，必须经过转录激活，底物才能进行转换重排(switch rearrangement)[373~375,377,378]；这为同种型转换的可及性模型提供了证据。对转换重组酶底物的数项研究也证实，只有被转录的 DNA 链才进行缺失性重排(deletional rearrangement)[365,366,378]。然而，对染色体整合的转换重组底物(chromosomally integrated switch- recombinase substrate)以及附加体底物(episomal substrate)的比较研究发现，不同转换重组酶的活性各不相同。染色体外的转换底物(extrachromosomal switch substrate)[327,373,374,377,379]可在不适合的细胞类型中进行重组，产生非序列重组产物(non-sequence recombination product)[375,376,378]。而对染色体整合的转换重组酶底物的研究发现，重组酶活性是 B 细胞和 S 序列特异性的[373,374,377~379]。对单拷贝的、染色体整合的反转录病毒底物的研究表明，重组活性不

仅是 B 细胞特异性的，而且还是 B 细胞所处时期特异性的（局限于处于前 B 细胞后期和成熟 B 细胞的细胞系）[379]。在这个研究中，重组酶在转录 S 区靶基因时，以随机的方式发挥其活性；也就是说，转换重组是一个机会性事件，其概率与一个细胞产生下一个细胞的可能性是相近的[379]。

胚系 C_H 启动子活性的调控

胚系 C_H 转录物与同种型转换的相关性使人们将注意力集中在 I 区启动子启动 C_H 胚系转录的调控机制。IL-4 可以诱导 $S_\gamma1$ 5′端区域内 DNA 酶 I（DNAse I）超敏感位点（hypersensitivity site）的早期出现[380,381]，而这一区域编码了 $I_\gamma1$，此现象提示，该细胞因子可能调控 $C_\gamma1$ 启动子活性。通常情况下，DNA 酶 I 超敏感位点和调控蛋白结合的 DNA 区域相关联，而这些调控蛋白在转录调控中发挥重要作用[382]。研究发现，LPS 和 IL-4 共同刺激，而不是单独使用 LPS，可在 48 小时内诱导 B 细胞 DNA 中位于 $S_\gamma1$ 区 5′端的 1 个 Msp I 位点的去甲基作用[383]，从而进一步支持了上述观点。C_H DNA 亚甲基化区域（hypomethylated region）与转录激活相关，并可能在维持活化状态方面发挥一定作用[384]。最近，克隆 I 外显子的启动子，并通过将其作为潜在的调控蛋白结合的底物，对 C_H 胚系转录的调控进行了研究。在这些研究中，将 I 外显子启动子与报告基因（reporter gene）连接，如氯霉素乙酰转移酶（chloramphenicol acetyl transferase，CAT）或者萤光素酶（luciferase），构建重组子，转染 B 细胞肿瘤细胞系，再施加各种刺激，检测报道基因活性。对带有 γ1、ε 或 α I 外显子启动子的这种报道基因进行研究，结果发现，调控这些启动子的转录活性的细胞因子，与正常 B 细胞中控制胚系 C_H RNA 表达和指导相应同种型转换的细胞因子相同[353,385-390a,b]。

C_α 启动子的调控

为了研究 C_α 启动子的调控作用，构建了 S_α5′端不同长度区域与荧光素酶共价连接的融合基因[385]。再将它们转染到几个 B 淋巴细胞系中，结果发现构建的启动子活性位于第一个转录起始位点 5′端一个 106bp 的片段内。这个 DNA 片段的启动子活性则依赖于 ATF/CRE 顺式元件（consensus element）的存在，先前已经确定该元件为一段特征性的 DNA 序列（循环的 AMP 应答元件），是 DNA 结合蛋白（活化转录因子）的一个配体[391]。从各种不同类型细胞中制备细胞核抽提物，用电泳迁移率实验（electrophoretic mobility shift assay）进行分析，结果证实，一个推定的转录因子可与 ATF/CRE 基序特异性结合。ATF/CREB 转录因子家族的所有成员均可能与此位点结合，但是尚不清楚参与 Iα 启动子调控的转录因子。除了这个组成性活性外，胚系 C_α 启动子也可被 TGF-β 诱导。诱导活性依赖于转录起始位点 5′端 105 ~ 127bp 的一段区域（因此，标为-127/-105），其中含有 2 个不完全的串联重复序列：5′CACAG(G)CCAGAC3′。这些重复序列对于组成性的胚系 α 表达并不重要。-127/-105 串联重复序列与激活转录协同发挥作用。可被 TGF-β 诱导的 I.29μ 淋巴瘤细胞核抽提物中存在一种或多种转录因子，可与上述重复序列以序列特异性方式结合，但这种结合本身不受先前 TGF-β 处理的影响。在起始位点 5′端 826bp 以外的区域还存在另外一个可被 TGF-β 诱导的元件[385]。此外证实，在人的 $I_\alpha1$ 和 $I_\alpha2$ 启动子 1 个 327bp 长的片段中还存在 1 个与 CRE 相似的位点，在对 PMA 和 TGF-β 刺激应答发挥重要作用[387]。推测在这个片段中还含有 Ets 家族成员和 Sp1 的位点，它们都是在基础性启动子活性（basal promoter activity）发挥重要作用的转录因子。此外，在上游末还观察到一些元件，可以负向调控 $I_\alpha1$ 和 $I_\alpha2$ 的活性。

850

$C_\gamma1$ 和 C_ε 启动子的调控

γ1 和 ε 启动子受到 IL-4 的正向调控[123,261,386,388~90a,b,392~394]。而且，IL-4 可与 LPS 或 CD40 配体协同诱导胚系 γ1 和 ε 转录物。单独使用 CD40 配体，而非 LPS，也能诱导 IL-4 非依赖的胚系 γ1 和 εRNA 的表达。在这点上，似乎 γ1 和 ε 启动子具有相同的转录因子结合位点，这些转录因子包括 STAT6（NF-IL-4）、NF-κB/Rel 蛋白以及 C/EBP 家族成员。IL-4 或 IL-3 与它们的受体结合后可激活 STAT6。采用报告基因的实验方法发现，将 γ1 和 ε 启动子内 STAT6 的结合位点突变后，可消除 IL-4 的启动子活性，但对 CD40 配体没有影响[390a,392,393,395]。对 STAT6 缺陷小鼠 B 细胞的研究提示，对 CD40 配体活化的 B 细胞，STAT6 是 IL-4 刺激胚系

$\gamma1$ 和 εRNA 所必需的，但对于单独使用 CD40 配体活化的 B 细胞，并非诱导 $\gamma1$ 和 εRNA 所必需的[396]。以 CD40 配体加上 IL-4 刺激 STAT6 缺陷的 B 细胞，结果几乎检测不到 IgG1 和 IgE 转换。然而，另一些现象提示，IL-4 可通过 STAT6 非依赖机制促进 IgG1 转换，但对 IgE 转换无影响。在 IL-4 缺陷和 IL-4 受体 α 链缺陷小鼠中，针对胃肠线虫类寄生虫的 IgG1 应答明显减弱，但在 STAT6 缺陷小鼠，此应答却是增强的（F. Finkelman, S. Morris, N. Noben-Trauth, J. Urban，未发表的资料）。相反，在 IL-4 缺陷小鼠以及 Stat6 缺陷小鼠中，针对大多数刺激的 IgE 应答均被强烈抑制。后面这些现象如果被证实的话，将提示 IL-4 至少可以通过两种机制刺激 IgG1 类别转换，这可能有助于解释为什么 IgE 类别转换比 IgG1 转换需要更强和更长时间的 IL-4 刺激。

CD40 配体可以协同 IL-4 诱导胚系 $\gamma1$ 和 εRNA，可能是因为，或至少部分是因为 CD40 配体诱导 NF-κB/Rel 蛋白的表达，后者可与 $\gamma1$ 和 ε 启动子结合[390a,390b,397]。$\gamma1$ 启动子的 CD40 应答区（CD40 response region, CD40RR）内含有 3 个 NF-κB/Rel 蛋白结合位点，而且每一个位点对于 CD40 配体介导的启动子活性都是必需的[397]。CD40 配体诱导 p50，p65，c-Rel 和 RelB 与 CD40RR 结合。采用含有 NF-κB/Rel 表达载体的 B 细胞系证实，p50 加上 RelB 或者 p50 加上 p65，但非 p50 加上 c-Rel，能反式激活（transactivate）$\gamma1$ 启动子。CD40 配体具有诱导胚系 $\gamma1$ RNA 的能力，但 LPS 没有，可能是因为这两种刺激物和（或）参与 $\gamma1$ 启动子活性共同调控（co-regulate）的其他调控因子可诱导不同的 NF-κB/Rel 蛋白分子。CD40 配体可诱导 NF-κB/Rel 蛋白与小鼠胚系 ε 启动子 IL-4 应答区 3′端 2 个串联的 κB 位点结合[390b]。这 2 个 κB 位点突变后，CD40 配体或 IL-4 诱导启动子活性的能力也随之丧失。因此，CD40 配体和 IL-4 协同诱导 ε 启动子活性，可能是因为它们分别与此位点的 NF-κB/Rel 蛋白和 STAT6 结合并相互作用[390a,390b]。

转录因子 C/EBP 家族的一个或多个成员可能也参与介导 $\gamma1$ 和 ε 的启动子活性[390a,392]。采用报告基因实验发现，将 ε 启动子内 C/EBP 结合位点突变后，IL-4 诱导的 ε 启动子活性减弱[390a]。另有研究提示，EBP 家族成员（例如 C/EBPβ 和 C/EBPγ）在刺激 $\gamma1$ 启动子活性方面发挥相似作用[392]。LPS 可诱导成熟 B 细胞中的 C/EBPβ，这至少能部分解释 LPS 和 IL-4 协同诱导 $\gamma1$ 和 ε 启动子活性。

采用报告基因的几个研究结果提示，B 细胞特异性的活化蛋白（B-cell specific activator protein, BSAP 或 Pax-5）在 LPS 和 IL-4 诱导小鼠胚系 ε 启动子中发挥正向作用[353,398]。虽然 BSAP 也可结合人 ε 启动子，但对报告基因的突变分析发现，BSAP 在调控其活性方面不发挥关键作用[399]。然而，另一项研究采用含有人 ε 启动子报告基因的方法，对 2 个 EBV-阴性 B 细胞系进行突变分析，结果提示，BSAP 是 IL-4 和抗 CD40 刺激 ε 胚系转录所必需的[400]。导致这些不同结果的原因尚不清楚。

还有研究提示，鼠的胚系 ε 启动子在静息 B 细胞中处于抑制状态[401, 402]。这种抑制作用似乎是由 2 个不同的结合位点所介导的：一个为 HMG-I(Y)，另一个为 STAT6。作者认为，IL-4 诱导胚系 C_εRNA 表达的多种机制中，这些位点的脱抑制作用至少是其中的一个。有趣的是，这些抑制胚系 ε 启动子的位点似乎也是 IL-4 诱导胚系 C_ε 基因转录所必需的。

研究包含 $C_\gamma1$ 转基因的 B 细胞，结果观察到，在以 LPS、CD40 配体、IL-4 和（或）IFN-γ 诱导胚 $C_\gamma1$ RNA 表达的过程中，1 个 17kb 长的、包含 $I_\gamma1$、$S_\gamma1$ 和 $C_\gamma1$ 的转基因的受调控方式类似于相应的内源性基因，而不需要其他元件[403, 404]。令人惊讶的是，位于 $I_\gamma1$ 以外的调控元件对于转基因胚系 $C_\gamma1$ RNA 表达也很重要[404]。这些元件可能存在于 S_γ49bp 重复序列 5′端一个 900bp 长的区域内，或者在一个含 C_H3 外显子的 600bp 长的片段内。

除诱导转录外的 I 区靶向同种型转换

851

除诱导转录外，I 区可针对特定的 S 区进行靶向性同种型类别转换[405, 406]。Lorenz 等提出，剪接的 I_HC_H RNA 可能也是转换所必需的[406]。Bottaro 等[405]的研究表明，当 LPS/IL-4 可诱导的 I_ε 启动子和外显子被 LPS 可诱导的 Eμ 增强子 V_H 启动子取代时，虽然转录实际上通过靶向的等位基因 S_ε 区，但 IgE 转换被顺式抑制 10～100 倍[405]。Lorenz 等[406]报道，包含剪接供体信号的 $I_\gamma1$ 外显子序列对于正常水平的 *IgG1* 转换是必要

的，而且是足够的，因而意味着剪接的胚系转录产物或者剪接复合体（splicesome complex）在某些方面对于随后的转换重组是必需的。然而，随后的研究发现，保留 I 外显子剪接供体的 γ1 基因座突变体具有的转录活性远高于转换缺陷、没有如此剪接供体信号的 γ1 基因座突变体。由于较高的转录活性可能促进转换，因此胚系转录产物或它的剪接中间体在随后的转换重组中的直接作用尚不清楚。

DNA 合成

除胚系 C_H 基因表达外，DNA 合成也是 B 细胞同种型转换所必需的[96, 407, 408]。DNA 合成抑制剂，如胸腺嘧啶核苷（thymidine）、羟基脲（hydroxyurea）和溴脱氧尿苷（bromodeoxyuridine），可选择性抑制 IgG，这与有丝分裂原刺激 B 细胞产生 IgM 不同[96]。阿非迪霉素（aphidicolin）处理的 B 细胞在受 LPS 和 IL-4 刺激时，DNA 合成以及 IgM 转换为 IgG1 的过程均被阻断；撤除阿非迪霉素后，两种现象均可逆转[409]。而且，将抑制细胞分裂但不抑制细胞核分裂的细胞松弛素 B 加入 LPS 活化的 B 细胞，可导致同时表达 IgM 和 IgG 的多核细胞聚集。提示，IgG 转换可能涉及一个不对称的细胞分裂，其中一个子代细胞分泌 IgG，而另一个分泌 IgM[408]。以计算机模型分析基于 LPS 活化的 B 细胞的细胞周期动力学，结果提示，LPS 诱导后第一个 S 期内，在 S_μ 位点发生了重排[407]。对发生 IgM 到 IgA 类别转换的 B 细胞淋巴瘤 I.29 的研究，则提供了一个令人信服的证据表明，DNA 复制与免疫球蛋白类别转换之间存在直接关联[410, 411]。有 5 个克隆，在同一位点上存在重组的 S_μ 和 S_α，并具有相同的核苷酸序列，因而这些克隆来源于同一个已进行 IgM 到 IgA 转换的亲本细胞[292, 300, 301, 316]。对这 5 个克隆进行分析发现，可根据数个点突变、少量缺失和 S_μ-S_α S 区内重复的不同，将这些克隆分为两组[324]。这些突变仅发生在 DNA 的一条链上，因而只可能发生在 DNA 的合成时期；在随后的细胞分裂过程中，这条链只能进入发生了 IgA 转换的一半后代细胞中[325]。如果先发生类别转换或者在类别转换后经历一次或多次细胞分裂，或者如果在类别转换之后细胞分裂过程中伴随 S 区内高突变率，那么便观察不到这种具有相同 S_μ-S_α S 区，并可根据几个点突变、重复和缺失突变的不同分为两组的 B 细胞类型。总之，资料强烈提示，免疫球蛋白类别转换发生在 DNA 复制过程中，而且发生在这个时间内的，而不是在转换之后的 DNA 合成，在 S 区内具有错误倾向性。

类别转换所需的其他因素

胚系 C_H 基因表达和 B 细胞 DNA 合成是诱导同种型转换所必需的，但并不足以实现同种型转换。已经证实，在细胞因子、B 细胞激活因子、药物，或者转录因子的影响下，同种型转换过程中即使胚系 C_H RNA 表达无相应变化，也存在一种显著变化[410]。以下汇总资料提示，除胚系 C_H基因可接近性的改变外，影响转换重组酶和（或）其靶向因子的调控过程也参与同种型转换调控。

IL-4

IL-4 可促进转染的和正常的小鼠 B 细胞 IgA 转换，但不影响胚系 αRNA 表达。将抗 IL-4 单抗加入培养的 $mIgM^+$ I.29μ 淋巴瘤细胞，可抑制 LPS 或 LPS 另上 TGF-β 诱导产生的 $mIgA^+$ 细胞，但不改变胚系 αRNA 水平[259]。单独施加 IL-4 可诱导培养的 $mIgM^+$ C_H12.LX 淋巴瘤细胞产生 12% 的 $mIgA^+$ 细胞，而不改变胚系 αRNA 表达[411]。TGF-β 加上 IL-5 和右旋糖酐抗 IgD 的情况下，IL-4 也可促进 LPS 或 CD40 配体激活的正常 B 细胞发生 IgA 转换[249]。在此系统中，IL-4 诱导的 $mIgA^+$ 细胞和 S_μ-S_α 重组事件也与胚系 αRNA 的变化无关（P. Zelazowski，C.M. Snapper，未发表资料）。

IL-5

右旋糖酐抗 IgD 和 IL-4 激活的小鼠 B 细胞中，IL-5 诱导 $mIgG1^+$ 细胞和 S_μ-$S_\gamma1$ 重组事件不伴随胚系 γ1 RNA 表达[412]。存在 LPS 的情况下，IL-5 也可促进琼脂糖抗 Ig 活化的正常小鼠 B 淋巴母细胞的 IgE 和 IgG1 转换，而不改变相应胚系 ε 和 γ1 RNA 水平[105]。最后，在 TGF-β 加上 IL-4 和右旋糖酐抗 IgD 的情况下，IL-5 可刺激 LPS 或 CD40 配体激活的小鼠 B 细胞发育为 $mIgA^+$ 细胞和 S_μ-S_α 重组事件，而不改变胚系 αRNA 水平（P.

Zelazowski, C.M. Snapper,未发表资料)。

IL-10

IL-10 可增加 LPS 激活的鼠 B 细胞中 mIgG3⁺ 细胞比例,并促进 S_{μ}-$S_{\gamma}3$ 重组事件,而不影响胚系 γ3 RNA 水平。而且,IL-10 可抑制 LPS 加上 IL-4,IL-5,TGF-β 和右旋糖酐抗 IgD 激活的 B 细胞生成 mIgA⁺ 细胞和 S_{μ}-$S_{\gamma}3$ 重组事件,而不降低胚系 αRNA 水平[255]。正如较早前提及的,IL-10 可诱导抗 CD40 抗体活化的 mIgD⁺ 人 B 细胞分泌 IgG1 和 IgG3[156,158],但是与小鼠 B 细胞对 IL-10 的应答不同的是,人 B 细胞对 IL-10 的应答会改变胚系 C_H RNA,因此,人 B 细胞似乎调控转换[157]。

852

IFN-γ

IFN-γ 可抑制 LPS 诱导的 IgG3 分泌和小鼠 mIgG3⁺ 细胞的产生,而不改变胚系 γ3 RNA 表达[101,124,126]。存在 IL-4 的情况下,IFN-γ 可抑制 T 细胞激活的人 B 细胞分泌 IgE,但它不降低胚系 εRNA[168]。

膜免疫球蛋白交联

右旋糖酐抗 IgD 可抑制 LPS 加上 IL-4 活化的小鼠 B 细胞分泌 IgG1 和 IgE 以及 mIgG1⁺ 和 mIgE⁺ 细胞的产生[109]。但是,右旋糖酐抗 IgD 抑制这些培养物的胚系 εRNA 水平,与可及性模型预测的一样,它可诱导胚系 γ1 RNA 增加 7 倍[124]。

CD40 活化

人 B 细胞同时感染 EBV 和受到 IL-4 刺激,能诱导发生 IgE 转换[166~171]。然而,IL-4 可诱导环状 EBV 转染的 B 细胞明显增加胚系 εRNA 水平,但是,除非加入活化的辅助性 T 细胞到培养物中,不能刺激 IgE 转换或者表达成熟 εmRNA[168]。在此项研究中,负责 IgE 转换的辅助性 T 细胞尚未被鉴定,但其上可能含有 CD40 配体[154,172,189]。一个研究证实,CD40 配体可促进培养于 TGF-β 中的 mIgM⁺ C_H12.LX 淋巴瘤细胞发生 IgA 转换,但没有进一步增加胚系 αRNA 水平[411]。

NF-κB/Rel 蛋白(p50 和 c-Rel)

虽然从 p50/NF-κB 缺陷小鼠纯化的静息 B 细胞表达正常水平的胚系 αRNA,但 IgA 类别转换有缺陷[413]。尽管 p50 结合位点与 $S_{\gamma}3$、$S_{\gamma}1$ 和 $S_{\gamma}2b$ 内的重组位点靠近,提示该因子参与同种型转换,但是,p50 缺陷的 B 细胞具有与正常细胞相近的 IgG1 转换水平。这提示,p50 不是此同种型转换所必需的。而且,在 c-rel 反式激活区域内遗传缺陷的小鼠 B 细胞,尽管与对照组相比,表达正常水平胚系 εRNA,但是不能进行 IgE 转换[414]。与此相反的,RelB 缺陷[415]或者 p52 缺陷[416]的 B 细胞在同种型转换中无明显缺陷。

色甘酸二钠

色甘酸二钠(disodium cromoglycate, DSCG)是一个过敏性疾病中通常使用的预防性治疗药物,可抑制抗 CD40 抗体加上 IL-4 体外活化的人 B 细胞分泌 IgE 和 S_{μ}-S_{ε} 重组事件[417]。这些作用并不伴随着相应的胚系 εRNA 减少。

K_{μ} 在转换重组中的作用

尚不知道介导转换重组过程的所有因素,但可能包括许多参与 DNA 复制、修复和(或)重组的调控蛋白,理论上,这些调控蛋白的表达也是可以调控的。K_{μ} 便是这种蛋白复合物的一个代表。K_{μ} 在 DNA 链断裂修复和 VDJ 重组中发挥作用[336~340]。这个复合物由 1 个 $K_{\mu}70/K_{\mu}86$ 异型二聚体组成,它可以识别并结合到双链 DNA 末端、缺口 DNA 或以茎环结构结尾的 duplex DNA。它一旦与 DNA 结合,$K_{\mu}70/K_{\mu}86$ 异型二聚体可结合并激活 1 个 DNA 依赖的蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK),后者能磷酸化具有调控功能的其他蛋白分子。在这点上,来自 RAG-2 缺陷小鼠和 SCID 小鼠 B 细胞前体细胞受到抗 CD40 单抗加上 IL-4 刺激后进行 S_{μ}-S_{ε} 重组的能力是相当的[335]。RAG 基因(RAG-1 和 RAG-2)是介导 VDJ 重组的关键因素[333,334]。SCID 小鼠缺乏 $K_{\mu}70/K_{\mu}86$ 相关的 DNA 依赖的丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(DNA-dependent serine-threonine protein kinase, DNA-PK; p350),后者参与 VDJ 重组[418]。同时存在抗 CD40 单抗和 IL-4 的情况下,RAG-2 和 SCID 小鼠 B 细胞的前体细胞均表达胚系 εRNA[335]。然而,RAG-2 缺陷的小鼠 B 细胞前体细胞在此条件下发生了 S_{μ}-

S_ε 重组，而 SCID 小鼠不是这样。提示，DNA-PK，而非 RAG-2，是介导转换重组的一个关键性因素。

促进转换重组的各种刺激物也可上调正常小鼠 B 细胞中 K_μ 的核表达[431]。静息 B 细胞表达相对较少的核 K_μ。采用右旋糖酐抗 IgD 使膜免疫球蛋白交联后，可强烈刺激静息 B 细胞表达核 K_μ，并在 IL-5 的作用下进一步加强。同样的，联合使用 IL-4 和 CD40 配体，而非单独使用，可强烈诱导 K_μ 表达。相反，IL-4 不能增强右旋糖酐抗 IgD 活化的 B 细胞表达 K_μ[431]。

总之，尽管转换重组的机制及其靶向因素的特性尚有待阐明，但是，以上资料提示，这些因素中至少有一些能被细胞因子、激动剂、药物和转录因子所调控。这些模型系统将有助于阐明这些因子的特性。

非缺失转换

本章内容一直集中于基因的缺失和重组，并将其看作同种型转换的机制。之所以这样加以重点介绍，是基于两方面原因：一是因为绝大多数研究认为此种机制是同种型转换的最重要方式；二是因为人们直观地认为，通过基因缺失和重组机制可能会比基于转录的或转录后调控的机制产生更稳定的同种型转换。然而已经发现，IgM 和 IgD 能同时表达在成熟 B 细胞膜上，而且同一 B 细胞产生这两种同种型的过程是在转录水平被调控的[265,267]，因而有理由相信其他免疫球蛋白同种型的表达也能通过非 C_μ 或 C_δ 基因缺失的机制来实现。实际上，数项研究均提示，非 IgM/IgD 同种型的表达可通过另外的作用机制。如经体外刺激表达 $C_\delta 3'$端 C_H 基因的细胞可产生一个长的 mRNA 转录物，然后经不同剪接（图 24.2D），编码 μ 链或 α 链[419]；然而，该实验方法技术性很高，其结果尚未被证实。另一项研究报道，B 细胞经体内刺激，可同时表达膜型 IgM、IgD 和 IgE，且没有经历 C_μ 缺失[420]；然而这些细胞表达的 IgE 是亲细胞性的（如 IgE 可能由其他细胞产生，再与这些细胞上的 Fcε 受体结合）[421]。EBV 加上辅助性 T 细胞培养的人 B 细胞可分泌 IgM、IgD 和 IgE，而没有发生 C_μ 或 C_δ 的缺失[422,423]；然而其他实验室对这些细胞进行分析后证实，只有 IgM 的分泌（G. Thyphronitis，F. Finkelman，未发表的数据），而且克隆的 EBV 转染的人 B 细胞尽管分泌 IgE，但其 $C_\varepsilon 5'$端的 C_H 基因已经发生缺失[170]。当然，这并不能排除除 IgM 以外的同种型通过非缺失机制发生非稳定分泌的可能。

853

证实非缺失同种型转换的最好例子是一种小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞 BCL1 的转换变异体，称为 BCL1.B2。它共表达 mIgM 和 mIgG1，并可分泌这两种同种型，而且两种同种型具有相同的独特型决定簇。BCL1.B2 含有 μ 和 γ1 的膜型和分泌型两种 mRNA[424,425]。这些观察强烈提示，编码 IgM 和 IgG1 的 VDJ 是相同的[424]。BCL1.B2 中存在 12 号染色体的 2 个拷贝，且都易位到 16 号染色体上。其中一个拷贝的 12 号染色体缺失所有的 C_H 基因[425]。而另一个拷贝的 12 号染色体上含有全套 C_H 基因，Southern 斑点分析显示没有发生重排[425]。此 BCL1 亚克隆通过一种非连续的转录机制来实现双 μ/γ1 合成[372]。尽管发现 μ 和 γ1 连接在同一核前 RNA（nuclear pre-RNA）内，但是 γ1RNA 合成仅仅起始于 $C_\gamma 1$ 的上游。γ1 mRNA 初级转录单位（primary transcription unit）的长度与 μmRNA 的相似（大约 15kb），而不是一个 150kb 长的连续的前 RNA。提示双同种型的表达可以通过非持续产生的 RNA 转录物相连接来实现，而不是通过一个长的 RNA 转录物经不同剪接而成[372]。成熟的 γ1 mRNA 在 BCL1.B2 内的生成，可通过 $VDJC_\mu$ 转录物和 $C_\gamma 1$ 转录物的反式剪接（trans-splicing），或者通过顺式剪接（splicing in cis）后 2 个 RNA 的连接来实现（图 24.2E）。这两个过程所用机制的不同在于非连续转录的 2 个 RNA 分子的哪一个部分相连接。顺式剪接，首先是一个转录物的 3′端（如 $VDJI\mu S_\mu C_\mu$）直接与第二个转录物（如 $I_\gamma 1S_\gamma 1C_\gamma 1$）的 5′端相连接，然后剪接掉最后不包含的 RNA 部分来产生 VDJ $C_\gamma 1$。而反式剪接，由同一 RNA 前体产生 VDJ $C_\gamma 1$ 的步骤包括：①$I\mu S_\mu C_\mu$ 的 5′端首先与 $I_\gamma 1S_\gamma 1C_\gamma 1$ 在 $S_\gamma 1$ 和 $C_\gamma 1$ 外显子的交界处相连接，产生 1 个 Y 型分支的中间体（Y-branched intermediate）并游离 VDJ；②剪接掉 Y 型分支中间体，使 VDJ 与 $C_\gamma 1$ 相连接。在低等真核细胞[299,300]和植物叶绿体[426]中也已经发现反式剪接。

通过任何一种机制实现的非连续性 RNA 转录是两种免疫球蛋白同种型同时表达的一种方式。而通过转基因动物技术，将人的 μ 融合至小鼠 Ig 重链基因座以外的基因组中[369,370]，提供了非连续性 RNA 转录的另

一个证据。在这些实验中，在体外以 LPS 加上 IL-4 刺激转基因小鼠的脾细胞，可使一小部分细胞表达包含杂交重链的免疫球蛋白，其重链由人的 VDJ 与小鼠的 $C_{\gamma}1$ 连接而成[369]。这些细胞含有转基因可变区与内源性 $C_{\gamma}1$ 相连接的 mRNA。由于转入基因并不位于内源性 12 号染色体上的 Ig 重链基因座，因而上述的 RNA 不可能通过染色体内的重组来产生。以 LPS 加上 IL-4 刺激后[370]，纯化共表达转入 μ 基因与小鼠内源性 γ 基因的细胞，分析结果证实了 RNA 的杂交，但未检测到 DNA 重排。这些发现的另一种解释是可能存在染色体之间 S 区的重组(S-S 重组)。但是，由于尚未找到表达杂交 mRNA 而未发生 DNA 重排的克隆 B 细胞，还不能排除杂交 mRNA 可能源于一小部分经历了 DNA 重排的细胞。

与上述实验结果相反的是，在另一个实验体系中，将 ARS 特异性的 μ 转入小鼠基因组，结果发现，经体内免疫后，此基因可与内源性的 C_{γ} 相连接，且证实这是通过染色体之间的重组来实现的[427,428]。对重组的 S 区进行序列分析，结果提示，这种染色体之间的重组与介导经典的染色体内转换重组的酶体系是相同的，而不是同源重组。ARS 与人转基因系统的差别在于，前者是由特异性抗原诱导的，而后者是由有丝分裂原与细胞因子来诱导 B 细胞多克隆的增殖和分化。研究[370]提示，经体内抗原刺激后导致的大量克隆扩增，使得通过偶而发生的染色体间重组产生的 B 细胞数量也可能大大增加。与此不同的是，在以有丝分裂原加上细胞因子的系统中，发生扩增的克隆数量较少，因而这种偶尔发生的事件就很容易观察到。

染色体间的类别转换也可发生于更接近生理条件的情况下。如在未免疫的家兔中，3% ~ 7% 的血清 IgA 是通过体内染色体间的类别转换实现的[313a,313b]。但是，尚不知道其中的机制。另外，已报道在小鼠杂交瘤[429]中也存在染色体间类别转换，这也许可以解释偶尔观察到的一种现象，即本来分泌某种同种型的骨髓瘤或杂交瘤细胞转换为分泌该基因 5′端的 C_H 基因编码的同种型[430]。不论其作用机制是什么，目前尚不清楚非缺失性类别转换在生理状态下的重要程度。在理论上，这可能是类别转换过程中的一个中间阶段，使新的免疫球蛋白同种型得以表达，并可能使免疫球蛋白特异性的 B 细胞在成环和缺失前得到调控。在任何一种事件中，两种机制都并不需要相互排斥。

致谢

感谢与 Ken Marcu，Michael Berton，Amy Kenter，Janet Stavnezer 以及 Fred Alt 之间进行的有益讨论；感谢 Janet Stavnezer，Barbara Birshtein 以及 Amy Kenter 为本章所做的重要审定；感谢多位研究者提供他们尚未发表的资料。

(邹　强 译)

参 考 文 献

1. Pritsch O, Hudry-Clergeon G, Buckle M, et al. Can immunoglobulin C(H)1 constant region domain modulate antigen binding affinity of antibodies. *J Clin Invest* 1996;98:2235–2243.
2. Nossal GJV, Szenberg A, Ada GL, Austin GM. Single cell studies on 19S antibody production. *J Exp Med* 1964;119:485–502.
3. Wall R, Kuehl M. Biosynthesis and regulation of immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 1983;1:393–422.
4. Gearhart P, Johnson ND, Douglas R, Hood L. IgG antibodies to phosphorylcholine exhibit more diversity than their IgM counterparts. *Nature* 1981;291:29–34.
5. Wysocki L, Manser T, Gefter ML. Somatic evolution of variable region structures during an immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1847–1851.
6. Crothers DM, Metzger H. The influence of polyvalency on the binding properties of antibodies. *Immunochemistry* 1972;9:341–357.
7. Hornick CL, Karush F. Antibody affinity—III. The role of multivalence. *Immunochemistry* 1972;9:325–340.
8. Borsos T, Rapp HJ. Complement fixation on cell surfaces by 19S and 7S antibodies. *Science* 1965;150:505–506.
9. Solomon A, Fahey JL. Plasmapheresis therapy in macroglobulinemia. *Ann Intern Med* 1963;58:789–800.
10. Waldmann TA, Strober W. Metabolism of immunoglobulins. *Prog Allergy* 1969;13:1–110.
11. Vieira P, Rajewsky K. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur J Immunol* 1988;18:313–316.
12. Fish S, Zenowich E, Fleming M, Manser T. Molecular analysis of original antigenic sin. I. Clonal selection, somatic mutation, and isotype switching during a memory B cell response. *J Exp Med* 1989;170:1191–1209.
13. Cohen S, Milstein C. Structure and biological properties of immunoglobulins. *Adv Immunol* 1967;7:1–89.
14. Tomasi TB, Bienenstock J. Secretory immunoglobulins. *Adv Immunol* 1968;9:1–96.
15. Neuberger MS, Rajewsky K. Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur J Immunol* 1981;11:1012–1016.
16. Ey PL, Russel-Jones GJ, Jenkins CR. Isotypes of mouse IgG-I. Evidence for "non-complement-fixing" IgG1 antibodies and characterization of their capacity to interfere with IgG2 sensitization of target red blood cells for lysis by complement. *Mol Immunol* 1980;17:699–710.
17. Waldmann H. Manipulation of T-cell responses with monoclonal antibodies. *Ann Rev Immunol* 1989;7:407–444.
18. Bruggemann MG, Williams GT, Bindon CI, et al. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med* 1987;166:1351–1361.
19. Dangl JL, Wensel TG, Morrison SL, Stryer L, Herzenberg LA, Oi VT. Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse antibodies. *EMBO J* 1988;7:1989–1994.
20. Unkeless JC, Eisen HN. The presence of two Fc receptors on mouse

macrophages: evidence from a variant cell line and differential trypsin sensitivity. *J Exp Med* 1977;145:931–947.

21. Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* 1988;6:251–281.
22. Denham S, Barfoot R, Jackson E. A receptor for monomeric IgG2b on rat macrophages. *Immunology* 1987;62:69–74.
23. Ravetch JV, Kinet J-P. Fc Receptors. *Annu Rev Immunol* 1991;9:457–492.
24. Looney RJ, Abraham GN, Anderson CL. Human monocytes and U937 cells bear two distinct Fc receptors for IgG. *J Immunol* 1986;136:1641–1647.
25. Guyre PM, Morganelli PM, Miller R. Recombinant immune interferon increases immunoglobulin G Fc receptors on cultured human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1983;72:393–397.
26. Bach MK, Bloch KH, Austen KF. IgE and IgG2a antibody-mediated release of histamine from rat peritoneal cells. II. Interaction of IgG2a and IgE at the target cell. *J Exp Med* 1971;133:772–784.
27. Conrad DH, Wingard JR, Ishizaka T. The interaction of human and rodent IgE with the human basophil IgE receptor. *J Immunol* 1983;130:327–333.
28. Jefferis, R. Structure-function relationships of IgG subclasses. In: Shakib F, ed. *The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation.* Oxford: Pergamon Press, 1990:93–108.
29. Ghetie V, Hubbard JG, Kim J-K, Tsen M-F, Lee Y, Ward ES. Abnormally short serum half-lives of IgG in β2-microglobulin-deficient mice. *Eur J Immunol* 1996;26:690–696.
30. Junghans RP, Anderson CL. The protection receptor for IgG catabolism is the β_2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5512–5516.
31. Slack JH, Der-Balian G, Nahm MH, Davie JM. Subclass restriction of murine antibodies. II. The IgG plaque-forming response to thymus-independent type 1 and type 2 antigen in normal mice and mice expressing an X-linked immunodeficiency. *J Exp Med* 1980;151:853–862.
32. Scott MG, Fleischman JB. Preferential idiotype-isotype association in antibodies to dinitrophenyl antigens. *J Immunol* 1982;128:2622–2628.
33. Perlmutter R, Hansburg D, Briles DE, Nicolotti R, Davie JM. Subclass restriction of murine anti-carbohydrate antibodies. *J Immunol* 1978;121:566–572.
34. Der Balian GP, Slack J, Clevinger BL, Bazin H, Davie JM. Subclass restriction of murine antibodies. III. Antigens that stimulate IgG3 in mice stimulate IgG2c in rats. *J Exp Med* 1980;152:209–218.
35. Riesen WF, Skvaril F, Braun DG. Natural infection of man with group A streptococci. Levels; restriction in class, subclass, and type; and clonal appearance of polysaccharide group-specific antibodies. *Scand J Immunol* 1976;5:383–390.
36. Yount WJ, Dorner MM, Kunkel HG, Kabat EA. Studies on human antibodies. VI. Selected variations in subgroup composition and genetic markers. *J Exp Med* 1968;127:633–646.
37. Barrett DJ, Ayoub EM. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin Exp Immunol* 1986;63:127–134.
38. Coutelier JP, Vanderlogt TTM, Heesen FWA, Vink A, Van Snick J. Virally induced modulation of murine IgG antibody subclasses. *J Exp Med* 1988;168: 2373–2378.
39. Skvaril F, Schilt U. Characterization of the subclass and light chain types of IgG antibodies to rubella. *Clin Exp Immunol* 1984;55:671–676.
40. Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL. Interferon-γ regulates the isotypes of immunoglobulin secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol* 1988;140:1022–1027.
41. Thyphronitis G, Kinoshita T, Inoue K, et al. Modulation of mouse complement receptors 1 and 2 suppresses antibody responses *in vivo*. *J Immunol* 1991;147: 224–230.
42. Snapper CM, McIntyre TM, Mandler R, et al. Induction of IgG3 secretion by interferon-γ: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *J Exp Med* 1992;175:1367–1371.
43. Zakroff SGH, Beck L, Spiegelberg HL. The IgE and IgG subclass responses of mice to four helminth parasites. *Cell Immunol* 1989;199:193–198.
44. Evengard B, Hammarstrom L, Smith CIE, Johansson SGO, Linder E. Subclass distribution and IgE responses after treatment in human schistosomiasis. *Clin Exp Immunol* 1988;73:383–388.
45. Otteson EA, Skvaril F, Tripathy SP, Poindexter RW, Hussain R. Prominence of IgG4 in the IgG antibody response to human filariasis. *J Immunol* 1985;134: 2707–2712.
46. Aalberse RC, van der Gaag R, Leewen J. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *J Immunol* 1983;130:722–726.
47. Greenspan NS, Cooper LJN. Intermolecular cooperativity: a clue to why mice have IgG3? *Immunol Today* 1992;13:164–168.
48. Berney T, Shibata T, Izui S. Murine cryoglobulinemia: pathogenic and protective IgG3 self-associating antibodies. *J Immunol* 1991;147:3331–3335.
49. Weiner E. The ability of IgG subclasses to cause the elimination of targets *in vivo* and to mediate their destruction by phagocytosis/cytolysis *in vitro*. In: Shakib F, ed. *The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation.* Oxford: Pergamon Press, 1990:135–160.
50. Lee HK, Lee HH, Park YM, Ha TY. Induction of active systemic anaphylaxis by IgG antibodies. *FASEB J* 1992;6:A1609.
51. Knight KL, Becker RS. Isolation of genes encoding bovine IgM, IgG, IgA, and IgE chains. *Vet Immunol Immunopathol* 1987;17:17–24.
52. Briles DE, Forman C, Hudak S, Claflin JL. The effects of subclass on the ability of anti-phosphocholine antibodies to protect mice from fatal infection with Streptococcus pneumoniae. *J Mol Cell Immunol* 1984;1:305–309.
53. Brodskyn CI, Silva AM, Takehara HA, Mota I. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Cell Biol* 1989;67:343–348.
54. Pelkonen S, Pluschke G. Use of hybridoma immunoglobulin switch variants in the analysis of the protective properties of anti-lipopolysaccharide antibodies in *Escherichia coli* K1 infection. *Immunology* 1989;68:260–264.
55. Oishi K, Koles NL, Guelde G, Pollack M. Antibacterial and protective properties of monoclonal antibodies reactive with *Escherichia coli* 0111:B4 lipopolysaccharide: relation to antibody isotype and complement-fixing activity. *J Infect Dis* 1992;165:34–56.
56. White WI, Evans CB, Taylor DW. Antimalarial antibodies of the immunoglobulin IgG2a isotype modulate parasitemias in mice infected with *Plasmodium yoelii*. *Infect Immun* 1991;59:3547–3554.
57. Sanford JE, Lupan DM, Schlageter AM, Kozel TR. Passive immunization against Cryptococcus neoformans with an isotype-switch family of monoclonal antibodies reactive with cryptococcal polysaccharide. *Infect Immun* 1990;58: 1919–1923.
58. Nussbaum G, Yuan R, Casadevall A, Scharff MD. Immunoglobulin G3 blocking antibodies to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med* 1996; 183:1905–1909.
59. Scott MG, Briles DE, Nahm MH. Selective IgG subclass expression: biologic, clinical and functional aspects. In: Shakib F, ed. *The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation.* Oxford: Pergamon Press, 1990:161–183.
60. Nilssen DE, Soderstrom R, Brandtzaeg P, et al. Isotype distribution of mucosal IgG-producing cells in patients with various IgG subclass deficiencies. *Clin Exp Immunol* 1991;83:17–24.
61. Mestecky J, McGhee JR. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol* 1987;40:153–245.
62. Kühn LC, Kraehenbuhl J-P. The membrane receptor for polymeric immunoglobulin is structurally related to secretory component. *J Biol Chem* 1981;256: 12490–12495.
63. Taylor HP, Dimmock NJ. Mechanism of neutralization of influenza-virus by secretory IgA is different from that of monomeric IgA or IgG. *J Exp Med* 1985; 161:198–209.
64. Lucisano Valim YM, Lachmann PJ. The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the chimeric anti-PIP antibodies with human Fc regions. *Clin Exp Immunol* 1991;84:1–8.
65. Henson PM, Johnson HB, Spiegelberg HL. The release of granule enzymes from human neutrophils stimulated by aggregated immunoglobulins of different classes and subclasses. *J Immunol* 1972;109:1182–1192.
66. Killian M, Mestecky J, Russell MW. Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin proteases. *Microbiol Rev* 1988;52:296–303.
67. Magnusson K-E, Stjernström I. Mucosal barrier mechanisms. Interplay between secretory IgA (SIgA), IgG and mucins on the surface properties and association of salmonellae with intestine and granulocytes. *Immunology* 1982;45:239–248.
68. Wold AE, Mestecky J, Tomana M, et al. Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. *Infect Immun* 1990;58:3073–3077.
69. Mbawuike IN, Pacheco S, Acuna CL, Walz KC, Harriman GR. $IgA^{-/-}$ knockout mice are not more susceptible to influenza virus infection. American Association of Immunologists Late Breaking Abstracts. LB28), 1997.
70. Bachman R. Studies on the serum gamma A-globulin level. III. The frequency of a-gamma A-globulinemia. *Scand J Clin Lab Invest* 1965;17:316–320.
71. Ropars C, Muller A, Paint N, Beige D, Avenard G. Large scale detection of IgA deficient blood donors. *J Immunol Methods* 1982;54:183–189.
72. Burks AW Jr, Steele RW. Selective IgA deficiency. *Ann Allergy* 1986;57:3–10.
73. Ammann AJ, Hong R. Selective IgA deficiency: presentation of 30 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1971:50:223–236.
74. Bkrandtzaeg P, Fjellanger I, Gjeruldsen ST. Immunoglobulin M: local synthesis and selective secretion in patients with immunoglobulin A deficiency. *Science* 1968;160:789–791.
75. Mellander L, Bjorkander J, Carlsson B, Hanson LA. Secretory antibodies in IgA deficient and immunosuppressed individuals. *J Clin Immunol* 1986;6:284–291.
76. Ishizaka T, Tomioka H, Ishizaka K. Degranulation of human basophil leukocytes by anti-IgD antibody. *J Immunol* 1971;106:705–710.
77. Kulczycki A Jr, Metzger H. The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. II. Quantitative aspects of the binding reaction. *J Exp Med* 1974;140: 1676–1695.
78. Conrad DH, Bazin H, Sehan AH, Froese A. Binding parameters of the interactions between rat IgE and rat mast cell receptors. *J Immunol* 1975;114:1688–1691.
79. Ishizaka T, Ishizaka K. Triggering of histamine release from rat mast cells by divalent antibodies against IgE receptors. *J Immunol* 1978;120:800–805.
80. Wasserman SI. The mast cell and synovial inflammation: or, what's a nice cell like you doing in a joint like this? *Arthritis Rheum* 1984;27:841–844.

81. Bridges AJ, Malone DG, Jicinsky J, et al. Human synovial mast cell involvement in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Relation to disease type, clinical activity, and antirheumatic therapy. *Arthritis Rheum* 1991;34:1116–1124.
82. Peters SP, Schleimer RP, Naclerio RM, et al. The pathophysiology of human mast cells. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:1196–1200.
83. Askenase PW. Immunopathology of parasitic disease: involvement of basophils and mast cells. *Springer Semin Immunopathol* 1980;2:417–442.
84. Capron M, Bazin H, Joseph M, Capron A. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J Immunol* 1981;126:1764–1768.
85. Kojima S, Yamamoto N, Kanazawa T, Ovary Z. Monoclonal IgE-dependent eosinophil cytotoxicity to haptenated schistosomula of *Schistosoma japonicum*: enhancement of the cytotoxicity and expression of Fc receptor for IgE by Nippostrongylus brasiliensis infection. *J Immunol* 1985;134:2719–2722.
86. Ahmad A, Wang CH, Bell RG. A role for IgE in intestinal immunity: expression of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in rats transfused with IgE and thoracic duct lymphocytes. *J Immunol* 1991;146:3563–3570.
87. Kehry MR, Yamashita LC. Low-affinity IgE receptor (CD23) function on mouse B cells: role in IgE-dependent antigen focusing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7556–7560.
88. Cohen BE, Rosenthal AS, Paul WE. Antigen-macrophage interaction. II. Relative roles of cytophilic antibodies and other membrane sites. *J Immunol* 1973; 111:820–828.
89. Celis E, Chang TW. Antibodies to hepatitis B surface antigen potentiate the response of human T lymphocyte clones to the same antigen. *Science* 1984;224: 297–299.
90. Rowe DS, Fahey JL. A new class of human immunoglobulins. II. Normal serum IgD. *J Exp Med* 1965;121:185–199.
91. Finkelman FD, Woods VL, Berning A, Scher I. Demonstration of mouse serum IgD. *J Immunol* 1979;123:1253–1259.
92. Coico RF, Siskind GW, Thorbecke GJ. Role of IgD and T delta cells in the regulation of the humoral immune response. *Immunol Rev* 1988;105:45–67.
93. Finkelman FD, Mond JJ, Metcalf ES. Effects of neonatal anti-δ treatment on the murine immune system. I. Suppression of development of surface IgD^+ B cells and expansion of a surface IgM^- IgD^- B lymphocyte population. *J Immunol* 1983;131:593–605.
94. Metcalf ES, Mond JJ, Finkelman FD. Effects of neonatal anti-δ treatment on the murine immune system. II. Functional capacity of a stable $sIgM^+sIa^-sIgD^-$ B cell population. *J Immunol* 1983;131:601–605.
95. Isakson PC, Pure E, Vitetta ES, Krammer PH. T cell-derived B cell differentiation factor(s). Effect on the isotype switch of murine B cells. *J Exp Med* 1982; 155:734–748.
96. Severinson E, Bergstedt-Lindqvist S, van der Loo W, Fernandez C. Characterization of the IgG response induced by polyclonal B cell activators. *Immunol Rev* 1982;67:73–85.
97. Vitetta ES, Ohara J, Myers CD, Layton JE, Krammer PH, Paul WE. Serological, biochemical, and functional identity of B cell-stimulatory factor I and B cell differentiation factor for IgG1. *J Exp Med* 1985;162:1726–1731.
98. Sideras P, Bergstedt-Lindqvist S, Severinson E. Partial biochemical characterization of IgG1-inducing factor. *Eur J Immunol* 1985;15:593–598.
99. Stavnezer J, Radcliffe G, Lin Y-C, et al. Immunoglobulin heavy-chain switching may be directed by prior induction of transcripts from constant-region genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7704–7708.
100. Rothman P, Lutzker S, Cook W, Coffman R, Alt FW. Mitogen plus interleukin 4 induction of Cε transcripts in B lymphoid cells. *J Exp Med* 1988;168: 2385–2389.
101. Severinson E, Fernandez C, Stavnezer J. Induction of germ-line immunoglobulin heavy chain transcripts by mitogens and interleukins prior to switch recombination. *Eur J Immunol* 1990;20:1079–1084.
102. Esser C, Radbruch A. Rapid induction of transcription of unrearranged Sg1 switch regions in activated murine B cells by interleukin 4. *EMBO J* 1989;8: 483–488.
103. Snapper CM, Paul WE. B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1987;139:10–17.
104. Snapper CM, Peçanha LMT, Levine AD, Mond JJ. IgE class switching is critically dependent upon the nature of the B cell activator, in addition to the presence of IL-4. *J Immunol* 1991;147:1163–1170.
105. Purkerson JM, Isakson PC. Interleukin 5 (IL-5) provides a signal that is required in addition to IL-4 for isotype switching to immunoglobulin (Ig) G1 and IgE. *J Exp Med* 1992;175:973–982.
106. Lebman D, Coffman RL. Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J Exp Med* 1988;168:853–862.
107. Hodgkin PD, Yamashita LC, Coffman RL Kehry MR. Separation of events mediating B cell proliferation and Ig production by using T cell membranes and lymphokines. *J Immunol* 1990;145:2025–2034.
108. Hodgkin PD, Yamashita LC, Seymour B, Coffman RL, Kehry MR. Membranes from both Th1 and Th2 T cell clones stimulate B cell proliferation and prepare B cells for lymphokine-induced differentiation to secrete Ig. *J Immunol* 1991; 147:3696–3702.
109. Peçanha LMT, Yamaguchi H, Lees A, Noelle RJ, Mond JJ Snapper CM. Dextran-conjugated anti-IgD antibodies inhibit T cell-mediated IgE production but augment the synthesis of IgM and IgG. *J Immunol* 1993;150:2160–2168.
110. Hodgkin PD, Castle BE, Kehry MR. B cell differentiation induced by helper T cell membranes: evidence for sequential isotype switching and a requirement for lymphokines during proliferation. *Eur J Immunol* 1994;24:239–246.
111. Snapper CM, Kehry MR, Castle BE, Mond JJ. Multivalent, but not divalent, antigen receptor cross-linkers synergize with CD40 ligand for induction of Ig synthesis and class switching in normal murine B cells. *J Immunol* 1995;154: 1177–1187.
112. Nakanishi K, Kiyoshi M, Kashiwamura S-I, et al. IL-4 and anti-CD40 protect against Fas-mediated B cell apoptosis and induce B cell growth and differentiation. *Int Immunol* 1996;8:791–798.
113. Shanebeck KD, Maliszewski CR, Kennedy MK, et al. Regulation of murine B cell growth and differentiation by CD30 ligand. *Eur J Immunol* 1995;25: 2147–2153.
114. Layton JE, Vitetta ES, Uhr JW, Krammer PH. Clonal analysis of B cells induced to secrete IgG by T cell-derived lymphokine(s). *J Exp Med* 1984;160: 1850–1863.
115. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348–2357.
116. Coffman RL, Seymour BWP, Lebman DA, et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 1988; 102:5–28.
117. Schurmans S, Heusser CH, Qin H-Y, Merino J, Brighouse, G Lambert P-H. In vivo effects of anti-IL-4 monoclonal antibody on neonatal induction of tolerance and on an associated autoimmune syndrome. *J Immunol* 1990;145:2465–2473.
118. Ochel M, Vohn H-W, Pfeiffer C, Gleichmann E. IL-4 is required for the IgE and IgG1 increase and IgG1 autoantibody formation in mice treated with mercuric chloride. *J Immunol* 1991;146:3006–3011.
119. Finkelman FD, Katona IM, Urban JFJ, Snapper CM, Ohara J, Paul WE. Suppression of in vivo polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B-cell stimulatory factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83: 9675–9678.
120. Finkelman FD, Urban JFJ, Beckmann MP, Schooley KA, Holmes JM, Katona IM. Regulation of murine in vivo IgG and IgE responses by a monoclonal anti-IL-4 receptor antibody. *Int Immunol* 1991;3:599–607.
121. Kühn R, Rajewsky K, Muller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 1991;254:707–710.
122. Schultz CL, Rothman P, Kuhn R, et al. T helper cell membranes promote IL-4-independent expression of germ-line Cγ1 transcripts in B cells. *J Immunol* 1992; 149:60–64.
123. Warren WD, Berton MT. Induction of germ-line γ1 and ε Ig gene expression in murine B cells. *J Immunol* 1995;155:5637–5646.
124. Zelazowski P, Collins JT, Dunnick W, Snapper CM. Antigen receptor cross-linking differentially regulates germ-line C_H ribonucleic acid expression in murine B cells. *J Immunol* 1995;154:1223–1231.
125. Coffman RL, Carty J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-γ. *J Immunol* 1986;136:949–954.
126. Snapper CM, Paul WE. Inteferon-γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987;236:944–947.
127. Finkelman FD, Katona IM, Mosmann T, Coffman RL. IFN-γ regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol* 1988; 140:1022–1027.
128. Graham MB, Dalton DK, Giltinan D, Braciale VL, Stewart TA Braciale TJ. Response to influenza infection in mice with a targeted disruption in the interferon γ gene. *J Exp Med* 1993;178:1725–1732.
129. Coffman RL, Lebman DA, Shrader B. Transforming growth factor β specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:1039–1044.
130. Lebman DA, Lee FD, Coffman RL. Mechanism for transforming growth factor β and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures. *J Immunol* 1990;144:952–959.
131. Finkelman FD, Svetic A, Gresser I, et al. Regulation by interferon α of immunoglobulin isotype selection and lymphokine production in mice. *J Exp Med* 1991;174:1179–1188.
132. Snapper CM, Peschel C, Paul WE. IFN-γ stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1988;140: 2121–2127.
133. Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 1988;334:255–258.
134. Amigorena S, Bonnerot C, Fridman WH, Teillaud J-L. Recombinant interleukin 2-activated natural killer cells regulate IgG2a production. *Eur J Immunol* 1990; 20:1781–1787.
135. Michael A, Shao A, Yuan D. Productive interactions between B and natural killer cells. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1991;10:71–82.
136. Wilder JA, Koh CY Yuan D. The role of NK cells during in vivo antigen-specific antibody responses. *J Immunol* 1996;156:146–152.
137. Collins JT Dunnick WA. Germline transcripts of the murine immunoglobulin γ2a gene: structure and induction by IFN-γ. *Int Immunol* 1993;5:885–891.
138. Huang S, Hendriks W, Althage A, et al. Immune response in mice that lack interferon-γ receptor. *Science* 1993;259:1742–1745.

139. Schijns VECJ, Haagmans BL, Rijke EO, Huang S, Aguet M Horzinek M. IFN-γ receptor-deficient mice generate antiviral Th1-characteristic cytokine profiles but altered antibody responses. *J Immunol* 1994;153:2029–2037.
140. Metzger DW, Buchanan JM, Collins JT, et al. Enhancement of humoral immunity by interleukin-12. *Ann NY Acad Sci* 1996;795:100–115.
141. McKnight AJ, Zimmer GJ, Fogelman I, Wolf SF, Abbas AK. Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo. *J Immunol* 1994;152: 2172–2179.
142. Morris SC, Madden KB, Adamovicz JJ, et al. Effects of IL-12 on in vivo cytokine gene expression and Ig isotype selection. *J Immunol* 1994;152:1047–1056.
143. Rizzo LV, DeKruyff RH, Umetsu DT. Generation of B cell memory and affinity maturation. Induction with Th1 and Th2 T cell clones. *J Immunol* 1992;148: 3733–3739.
144. Elzer PH, Jacobson RH, Nielsen KH, Douglas JT, Winter AJ. BALB/c mice infected with *Brucella abortus* express protracted polyclonal responses of both IgG2a and IgG3 isotypes. *Immunol Lett* 1994;42:145–150.
145. de Bagues MPJ, Elzer PH, Blasco JM, et al. Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infections or immunization with subcellular vaccines. *Infect Immun* 1994;62:632–638.
146. Thatte J, Rath S, Bal V. Immunization with live versus killed *Salmonella typhimurium* leads to the generation of an IFN-γ-dominant versus an IL-4-dominant immune response. *Int Immunol* 1993;5:1431–1436.
147. McIntyre TM, Klinman DR, Rothman P, et al. Transforming growth factor-β selectively stimulates IgG2b secretion by LPS-activated murine B cells. *J Exp Med* 1993;177:1031–1037.
148. Sonoda E, Hitoshi Y, Yamaguchi N, et al. Differential regulation of IgA production by TGF-β and IL-5: TGF-β induces surface IgA-positive cells bearing IL-5 receptor, whereas IL-5 promotes their survival and maturation into IgA-secreting cells. *Cell Immunol* 1992;140:158–172.
149. Garcia B, Rodriguez R, Angulo I, Heath AW, Howard MC, Subiza LL. Differential effects of transforming growth factor-β1 on IgA vs. IgG2b production by lipopolysaccharide-stimulated lymph node B cells: a comparative study with spleen B cells. *Eur J Immunol* 1996;26:2364–2370.
150. Moller E, Strom H. Biological characterization of T cell-replacing factor in synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Scand J Immunol* 1988;27:717–724.
151. Abedi-Valugerdi M, Ridderstad A, Strom H, Moller E. Relationship between IgG2b-inducing activity in rheumatoid arthritis synovial fluid and other well-known cytokines and inflammatory mediators. *Arthritis Rheum* 1991;34: 1461–1465.
152. Abedi-Valugerdi M, Ridderstad A, Strom H, Moller G, Moller E. Partial biochemical characterization and purification of IgG2b inducing factor as a new cytokine from synovial fluid of patients with rheumtoid arthritis. *Scand J Immunol* 1993;37:430–436.
153. Ridderstad A, Lettesjo H, Abedi-Valugerdi M, Moller E. Differential sensitivity to transforming growth factor (TGF)-β of CBA and of CBA/N B cells demonstrates that the IgG2b inducing factor in synovial fluid from rheumatiod arthritis patients is not identical to TGF-β. *Int Immunol* 1995;7:459–469.
154. Gascan H, Gauchat J-F, Aversa G, Van Vlasselaer P, De Vries JE. Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4+ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. *J Immunol* 1991;147:8–13.
155. Lundgren M, Persson U, Larsson P, et al. Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *Eur J Immunol* 1989;19:1311–1315.
156. Briere F, Servet-Delprat C, Bridon J-M, Saint-Remy J-M, Banchereau J. Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D⁺ (sIgD⁺) B cells to secrete IgG1 and IgG3. *J Exp Med* 1994;179:757–762.
157. Fujieda S, Saxon A, Zhang Ke. Direct evidence that gamma 1 and gamma 3 switching in human B cells is interleukin-10 dependent. *Mol Immunol* 1996;33: 1335–1343.
158. Malisan F, Briere F, Bridon J-M, et al. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183:937–947.
159. Kitani A Strober W. Regulation of Cγ subclass germ-line transcripts in human peripheral blood B cells. *J Immunol* 1993;151:3478–3488.
160. Kawano Y, Noma T Yata J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines. *J Immunol* 1994;153:4948–4958.
161. Servet-Delprat C, Bridon J-M, Djossou O, Yahia SA, Banchereau J, Briere F. Delayed IgG2 humoral response in infants is not due to intrinsic T or B cell defects. *Int Immunol* 1996;8:1495–1502.
162. Snapper CM, Finkelman FD, Paul WE. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J Exp Med* 1988;167:183–196.
163. Coffman RL, Ohara J, Bond MW, Carty J, Zlotnik A, Paul WE. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J Immunol* 1986;136:4538–4541.
164. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 1992;357:80–82.
165. Maliszewski CR, Grabstein K, Fanslow WC, Armitage R, Spriggs MK, Sato TA. Recombinant CD40 ligand stimulation of murine B cell growth and differentiation: cooperative effects of cytokines. *Eur J Immunol* 1993;23: 1044–1049.
166. Jabara HH, Schneider LC, Shapira SK, et al. Induction of germ-line and mature Cε transcripts in human B cells stimulated with rIL-4 and EBV. *J Immunol* 1990; 145:3468–3473.
167. Shapira SK, Jabara HH, Thienes CP, et al. Deletional switch recombination occurs in interleukin-4-induced isotype switching to IgE expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7528–7532.
168. Gauchat J-F, Gascan H, de Waal Malefyt R, de Vries JE. Regulation of germ-line ε transcription and induction of ε switching in cloned EBV-transformed and malignant human B cell lines by cytokines and CD4+ T cells. *J Immunol* 1992;148:2291–2299.
169. Thyphronitis G, Tsokos GC, June CH, Levine AD, Finkelman FD. IgE secretion by Epstein-Barr virus-infected purified human B lymphocytes is stimulated by interleukin 4 and suppressed by interferon-γ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86: 5580–5584.
170. Thyphronitis G, Max EE, Finkelman FD. Generation and cloning of stable human IgE-secreting cells that have rearranged the Cε gene. *J Immunol* 1991; 146:1496–1502.
171. Mills FC, Thyphronitis G, Finkelman FD, Max EE. Immunoglobulin μ-ε isotype switch in IL-4 treated human B lymphoblastoid cells; evidence for a sequential switch. *J Immunol* 1992;149:1075–1085.
172. Jabara HH, Fu SM, Geha RS, Vercelli D. CD40 and IgE: Synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *J Exp Med* 1990;172:1861–1864.
173. Armitage RJ, Macduff BM, Spriggs MK, Fanslow WC. Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 lignad are modulated by soluble cytokines. *J Immunol* 1993;150:3671–3680.
174. Lederman S, Yellin MJ, Cleary AM, et al. T-BAM/CD40-L on helper T lymphocytes augments lymphokine-induced B cell Ig isotype switch recombination and rescues B cells from programmed cell death. *J Immunol* 1994;152:2163–2171.
175. Jabara HH, Ahern DJ, Vercelli D, Geha RS. Hydrocortisone and IL-4 induce IgE isotype switching in human B cells. *J Immunol* 1991;147:1557–1560.
176. Sarfati M, Luo H, Delespesse G. IgE synthesis by chronic lymphocytic leukemia cells. *J Exp Med* 1989;170:1775–1780.
177. Wu CY, Sarfati M, Heusser C, et al. Glucocorticoids increase the synthesis of immunoglobulin E by interleukin 4-stimulated human lymphocytes. *J Clin Invest* 1991;87:870–877.
178. Gauchat J-F, Lebman DA, Coffman RL, Gascan H, de Vries JE. Structure and expression of germline ε transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production. *J Exp Med* 1990;172:463–473.
179. Gascan H, Gauchat J-F, Roncarolo M-G, Yssel H, Spits H, de Vries JE. Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. *J Exp Med* 1991;173:747–750.
180. Pene J, Rousset F, Briere F, et al. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons γ and α and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6880–6884.
181. Parronchi P, Tiri A, Macchia D, et al. Noncognate contact-dependent B cell activation can promote IL-4-dependent in vitro human IgE synthesis. *J Immunol* 1990;144:2102–2108.
182. Vercelli D, Jabara HH, Arai K-I, Yokota T, Geha RS. Endogenous interleukin 6 plays an obligatory role in interleukin 4-dependent human IgE synthesis. *Eur J Immunol* 1989;19:1419–1424.
183. DeKruyff RH, Turner T, Abrams JS, Palladino MA Jr, Umetsu DT. Induction of human IgE synthesis by CD4+ T cell clones. Requirement for interleukin 4 and low molecular weight B cell growth factor. *J Exp Med* 1989;170:1477–1493.
184. Del Prete G, Maggi E, Parronchi P, et al. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J Immunol* 1988;140:4193–4198.
185. Pene J, Rousset F, Briere F, et al. IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-γ. *J Immunol* 1988;141:1218–1224.
186. Vercelli D, Jabara HH, Arai K, Geha RS. Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens. *J Exp Med* 1989;169:1295–1307.
187. Gascan H, Aversa GG, Gauchat J-F, et al. Membranes of activated CD4+ T cells expressing T cell receptor (TcR) αβ or TcR γδ induce IgE synthesis by human B cells in the presence of interleukin-4. *Eur J Immunol* 1992;22:1133–1141.
188. Maggi E, Del Prete G, Macchia C, et al. Profiles of lymphokine activities and helper function for IgE in human T cell clones. *Eur J Immunol* 1988;18: 1045–1050.
189. Shapira SK, Vercelli D, Jabara HH, Fu SM, Geha RS. Molecular analysis of the induction of immunoglobulin E synthesis in human B cells by interleukin 4 and engagement of CD40 antigen. *J Exp Med* 1992;175:289–292.
190. Jabara HH, Loh R, Ramesh N, Vercelli D, Geha RS. Sequential switching from μ to ε via γ4 in human B cells stimulated with IL-4 and hydrocortisone. *J Immunol* 1993;151:4528–4533.
191. Finkelman FD, Katona IM, Urban JF Jr, et al. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J Immunol* 1988;141:2335–2341.
192. Katona IM, Urban JFJ, Kang SS, Paul WE, Finkelman FD. IL-4 requirements for the generation of in vivo IgE responses. *J Immunol* 1991;146:4215–4221.
193. Kopf M, Gros GL, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Koehler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature 1993;*

362:245–248.
194. Thyphronitis G, Katona IM, Gause WC, Finkelman FD. Germline and productive Cε gene expression during in vivo IgE responses. *J Immunol* 1993;151: 4128–4136.
195. Morawetz RA, Gabriele L, Rizzo LV, et al. Interleukin (IL)-4-independent immunoglobulin class switch to immunoglobulin (Ig)E in the mouse. *J Exp Med* 1996;184:1651–1661.
196. Ferlin WG, Severinson E, Strom L, et al. CD40 signaling induces interleukin-4-independent IgE switching in vivo. *Eur J Immunol* 1996;26:2911–2915.
197. Von Der Weid T, Kopf M, Kohler G, Langhorne J. The immune response to *Plasmodium chabaudi* malaria in interleukin-4-deficient mice. *Eur J Immunol* 1994; 24:2285–2293.
198. Noben-Trauth N, Kropf P, Muller I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science* 1996;271:987–990.
199. Lawrence RA, Allen JE, Gregory WF, Kopf M, Maizels RM. Infection of IL-4-deficient mice with the parasitic nematode *Brugia malayi* demonstrates that the host resistance is not dependent on a T helper 2-dominated immune response. *J Immunol* 1995:154:5995–6001.
200. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3730–3734.
201. Zurawski G, de Vries JE. Interleukin-13, an interleukin-4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* 1993;15:19–26.
202. Cocks BG, Malefyt RW, Galizzi J-P, de Vries JE Aversa G. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *Int Immunol* 1993;5:657–663.
203. Defrance T, Carayon P, Billian G, et al. Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J Exp Med* 1994;179:135–143.
204. Hilton DJ, Zhang JG, Metcalf D, Alexander WS, Nicola NA, Willson TA. Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:497–501.
205. Mandler R, Finkelman FD, Levine AD, Snapper CM. Interleukin-4 induction of IgE class switching by LPS-activated murine B cells occurs predominantly through sequential switching. *J Immunol* 1993;150:407–418.
206. Cho S-W, Conrad DH. A new multivalent B cell activation model-anti-IgD bound to FcγRI: properties and comparison with CD40L-mediated activation. *Int Immunol* 1997;9:239–248.
207. Yokota T, Arai N, De Vries J, et al. Molecular biology of interleukin 4 and interleukin 5 genes and biology of their products that stimulate B cells, T cells, and hemopoietic cells. *Immunol Rev* 1988;102:137–187.
208. McHeyzer-Williams MG. Combinations of interleukins 2, 4, and 5, regulate the secretion of murine immunoglobulin isotypes. *Eur J Immunol* 1989;19:2025–2030.
209. Gauchat JF, Aversio G, Gascan H, de Vries, JE. Modulation of IL-4 induced germline ε RNA synthesis in human B cells by tumor necrosis factor-α, anti-CD40 monoclonal antibodies or transforming growth factor-β correlates with levels of IgE production. *Int Immunol* 1992;4:397–406.
210. Kikutani H, Suemura M, Owaki H, et al. Fcε receptor, a specific differentiation marker transiently expressed on mature B cells prior to isotype switching. *J Exp Med* 1986;164:1455–1469.
211. Defrance T, Aubry JP, Rousset F, et al. Human recombinant interleukin 4 induces Fcε receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J Exp Med* 1987; 165:1459–1467.
212. Hudak SA, Gollnick SO, Conrad DH, Kehry MR. Murine B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) increases expression of the Fc receptor for IgE on mouse B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:4606–4610.
213. Conrad DH, Waldschmidt TJ, Lee WT, et al. Effect of B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) on Fcε and Fcγ receptor expression on murine B lymphocytes and B cell lines. *J Immunol* 1987;139:2290–2296.
214. Chretien I, Pene J, Briere F, de Waal Malefijt R, Rousset F, de Vries JE. Regulation of human IgE synthesis. I. Human IgE synthesis in vitro is determined by the reciprocal antagonistic effects of interleukin 4 and interferon-γ. *Eur J Immunol* 1990;20:243–251.
215. Pene J, Chretien I, Rousset F, Briere F, Bonnefoy JY, De Vries J. Modulation of IL-4-induced human IgE production in vitro by IFN-γ and IL-5: the role of soluble CD23 (sCD23). *J Cell Biochem* 1989;39:253–264.
216. Delespesse G, Sarfati M, Hofstetter H. Human IgE-binding factors. *Immunol Today* 1989;10:159–164.
217. Conrad DH, Keegan AD, Kali KR, Van Dusen R, Rao M, Levine AD. Superinduction of low affinity IgE receptors on murine B lymphocytes by LPS and interleukin-4. *J Immunol* 1988;141:1091–1097
218. Keegan AD, Snapper CM, Van Dusen R, Paul WE, Conrad DH. Superinduction of the murine B cell FcεRII by T helper cell clones. Role of IL-4. *J Immunol* 1989;142:3868–3874.
219. Stief A, Texido G, Sansig G, Eibel H, Le Gros G, van der Putten H. Mice deficient in CD23 reveal its modulatory role in IgE production but no role in T and B cell development. *J Immunol* 1994;152:3378–3390.
220. Berton MT, Uhr JW, Vitetta ES. Synthesis of germ-line γl immunoglobulin heavy-chain transcripts in resting B cells: induction by interleukin 4 and inhibition by interferon γ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2829–2833.
221. Thyphronitis G, Banchereau J, Heusser C, Tsokos GC, Levine AD, Finkelman FD. Kinetics of interleukin-4 induction and inteferon-γ inhibition of IgE secretion by Epstein-Barr virus-infected human peripheral blood B cells. *Cell Immunol* 1991;133:408–419.
222. Aversa GG, Punnonen J, Gauchat JF, de Vries JE. The CD4+ T cell costimulatory signal required for IL-4 induced IgE switching is mediated by the 26 kD membrane form of TNF-α. *Eighth International Congress of Immunology Abstracts.* Budapest: Springer-Verlag, 1992:34.
223. Kiniwa M, Gately M, Guller V, Chizzonite R, Fargeas C, Delespesse G. Recombinant interleukin-12 suppresses the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4 stimulated human lymphocytes. *J Clin Invest* 1992;90:262–266.
224. Roper RL, Conrad DH, Brown DM, Warner GL, Phipps RP. Prostaglandin E_2 promotes IL-4-induced IgE and IgG1 synthesis. *J Immunol* 1990;145: 2644–2651.
225. Roper RL, Phipps RP. Prostaglandin E enhances class switching to IgE and IgG1. *Eighth International Congress of Immunology Abstracts.* Budapest: Springer-Verlag, 1992:37.
226. Manning JA, Finkelman FD, Collins PW, Levine AD. Complete and selective inhibition of polyclonal IgE synthesis in vivo by a PGE_2 analogue (*submitted*).
227. Kiyono H, McGhee JR, Mosteller LM, et al. Murine Peyer's patch T cell clones. Characterization of antigen-specific helper T cells for immuoglobulin A responses. *J Exp Med* 1982;156:1115–1130.
228. Kawanishi H, Saltzman LE, Strober W. Mechanisms regulating IgA class-specific immunoglobulin production in murine gut-associated lymphoid tissues. I. T cell derived from Peyer's patches that switch sIgM B cells to sIgA B cells in vitro. *J Exp Med* 1983;157:433–450.
229. Kawanishi H, Saltzman LE, Strober W. Characteristics and regulatory function of murine Con-A-induced, clone T cells obtained from Peyer's patch and spleen: mechanisms regulating isotype-specific immunoglobulin production by Peyer's patch B cells. *J Immunol* 1982;129:475–479.
230. Xu-Amano J, Aicher WK, Taguchi T, Kiyono H, McGhee JR. Selective induction of Th2 cells in murine Peyer's patches by oral immunization. *Int Immunol* 1992; 4:433–440.
231. Xu-Amano J, Kiyono H, Jackson RJ, et al. Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J Exp Med* 1993;178:1309–1320.
232. Taguchi T, McGhee JR, Coffman RL, et al. Analysis of Th1 and Th2 cells in murine gut-associated tissues. Frequencies of CD4+ and CD8+ T cells that secrete IFN-γ and IL-5. *J Immunol* 1990;145:68–77.
233. Mega J, McGhee JR, Kiyono H. Cytokine and Ig-producing cells in mucosal effector tissues: analysis of IL-5 and IFN-γ-producing T cells, T cell receptor expression, and IgA plasma cells from mouse salivary gland-associated tissues. *J Immunol* 1992;148:2030–2039.
234. Coffman RL, Shrader B, Carty J, Mosmann TR, Bond MW. A mouse T cell product that preferentially enhances IgA production. I. Biologic characterization. *J Immunol* 1987;139:3685–3690.
235. Bond MW, Shrader B, Mosmann TR, Coffman RL. A mouse T cell product that preferentially enhances IgA production. II. Physicochemical characterization. *J Immunol* 1987;139:3691–3696.
236. Murray PD, McKenzie DT, Swain SL, Kagnoff MF. Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J Immunol* 1987;139:2669–2674.
237. Harriman GR, Kunimoto DY, Elliott JF, Paetkau V, Strober W. The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *J Immunol* 1988;140:3033–3039.
238. Schoenbeck S, McKenzie DT, Kagnoff MF. Interleukin 5 is a differentiation factor for IgA B cells. *Eur J Immunol* 1989;19:965–969.
239. Sonoda E, Matsumoto R, Hitoshi Y, et al. Transforming growth factor β induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J Exp Med* 1989;170:1415–1420.
240. Pockley AG, Montgomery PC. In vivo adjuvant effect of interleukins 5 and 6 on rat tear IgA antiobdy responses. *Immunology* 1991;73:19–23.
241. Ramsay AJ, Kohonen Corish M. Interleukin-5 expressed by a recombinant virus vector enhances specific mucosal IgA responses in vivo. *Eur J Immunol* 1993; 23:3141–3145.
242. Kopf M, Brombacher F, Hodgkin PD, et al. IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity* 1996;4:15–24.
243. Vajdy M, Kosco-Vilbois MH, Kopf M, Kohler G, Lycke N. Impaired mucosal immune responses in interleukin 4-targeted mice. *J Exp Med* 1995;181:41–53.
244. Bromander AK, Ekman L, Kopf M, Nedrud JG, Lycke NY. IL-6-deficient mice exhibit normal mucosal IgA responses to local immunizations and *Helicobacter felis* infection. *J Immunol* 1996;156:4290–4297.
245. Kim P-H, Kagnoff MF. Transforming growth factor-β1 is a costimulator for IgA production. *J Immunol* 1990;144:3411–3416.
246. Sonoda E, Matsumoto R, Hitoshi Y, et al. Transforming growth factor β induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J Exp Med* 1989;170:1415–1420.
247. Matsuoka M, Yoshida K, Maeda T, Usuda S, Sakano H. Switch circular DNA formed in cytokine-treated mouse splenocytes: evidence for intramolecular DNA deletion in immunoglobulin class switching. *Cell* 1990;62:135–142.
248. Ehrhardt RO, Strober W, Harriman GR. Effect of transforming growth factor

(TGF)-β1 on IgA isotype expression. TGF-β1 induces a small increase in sIgA+ B cells regardless of the method of B cell activation. *J Immunol* 1992;148: 3830–3836.

249. McIntyre TM, Kehry MR, Snapper CM. Novel *in vitro* model for high-rate IgA class switching. *J Immunol* 1995;154:3156–3161.
250. Islam KB, Nilsson L, Sideras P, Hammarstrom L, Smith CIE. TGF-β1 induces germ-line transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes. *Int Immunol* 1991;3:1099–1106.
251. Nilsson L, Islam KB, Olafsson O, et al. Structure of TGF-β1-induced human immunoglobulin Cα1 and Cα2 germ-line transcripts. *Int Immunol* 1991;3: 1107–1115.
252. van Vlasselaer P, Punnonen J, de Vries JE. Transforming growth factor-β directs IgA switching in human B cells. *J Immunol* 1992;148:2062–2067.
253. Defrance T, Vanbervliet B, Briere F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor β cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med* 1992;175:671–682.
254a. Kitani A, Strober W. Differential regulation of Cα1 and Cα2 germ-line and mature mRNA transcripts in human peripheral blood B cells. *J Immunol.* 1994; 153:1466–1477.
254b. Islam KB, Baskin B, Nilsson L, Hammarstrom L, Sideras P, Smith CIE. Molecular analysis of IgA deficiency: evidence for impaired switching to IgA. *J Immunol* 1994;152:1442–1452.
255. Shparago N, Zelazowski P, Jin L, et al. IL-10 selectively regulates murine Ig isotype switching. *Int Immunol* 1996;8:781–790.
256. Fayette J, Dubois B, Vandenabeele S, et al. Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA_1 and IgA_2. *J Exp Med* 1997;185:1909–1918.
257. Kagnoff MF, Kim PH. Effects of transforming growth factor beta-1 and interleukin-5 on IgA isotype switching at the clonal level. *Immunol Res* 1991;10:396–399.
258. Whitmore AC, Prowse DM, Haughton G, Arnold LW. Ig isotype switching in B lymphocytes. The effect of T cell-derived interleukins, cytokines, cholera toxin, and antigen on isotype switch frequency of a cloned B cell lymphoma. *Int Immunol* 1991;3:95–103.
259. Shockett P, Stavnezer J. Effect of cytokines on switching to IgA and α germline transcripts in the B lymphoma I.29μ. *J Immunol* 1991;147:4374–4383.
260. Kimata H, Fujimoto M. Vasoactive intestinal peptide specifically induces human IgA1 and IgA2. *Eur J Immunol* 1994;24:2262–2265.
261. Kimata H, Fujimoto M. Induction of IgA1 and IgA2 production in immature human fetal B cells and pre-B cells by vasoactive intestinal peptide. *Blood* 1995; 85:2098–2104.
262. Wabl MR, Forni L, Loor F. Switch in immunoglobulin class production observed in single clones of committed lymphocytes. *Science* 1978;199:1078–1080.
263. Shimizu A, Takahashi N, Yaoita Y, Honjo T. Organization of the constant-region gene family of the mouse immunoglobulin heavy chain. *Cell* 1982;28:499–506.
264. Hofker MH, Walter MA, Cox DW. Complete physical map of the human immunoglobulin heavy chain constant region gene complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5567–5571.
265. Maki R, Roeder W, Traunecker A, et al. The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. *Cell* 1981;24:353–365.
266. Moore KW, Rogers J, Hunkapiller T, et al. Expression of IgD may use both DNA rearrangement and RNA splicing mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:1800–1804.
267. Knapp MR, Liu C-P, Newell N, et al. Simultaneous expression of immunoglobulin μ and δ heavy chains by a cloned B-cell lymphoma: a single copy of the VH gene is shared by two adjacent CH genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79: 2996–3000.
268. Yuan D, Tucker PW. Transcriptional regulation of the μ-δ gene in normal murine B lymphocytes. *J Exp Med* 1984;160:564–583.
269. Coleclough C, Cooper D, Perry RP. Rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes during B-lymphocyte development as revealed by studies of mouse plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:1422–1426.
270. Rabbitts TH, Forster A, Dunnick W, Bentley DL. The role of gene deletion in the immunoglobulin heavy chain switch. *Nature* 1980;283:351–356.
271. Cory S, Adams JM. Deletions are associated with somatic rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* 1980;19:37–51.
272. Honjo T, Kataoka T. Organization of immunglobulin heavy chain genes and allelic deletion model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:2140–2144.
273. Snapper CM, Finkelman FD. Rapid loss of IgM expression by normal murine B cells undergoing IgG1 and IgE class switching after in vivo immunization. *J Immunol* 1990;145:3654–3660.
274. Mountz JD, Mushinski JF, Owens JD, Finkelman FD. The in vivo generation of murine IgD-secreting cells is accompanied by deletion of the Cμ gene and occasional deletion of the gene for the Cδ1 domain. *J Immunol* 1990;145:1583–1591.
275. Owens JD Jr, Finkelman FD, Mountz JD, Mushinski JF. Nonhomologous recombination at sites within the mouse J_H-Cδ locus accompanies Cμ deletion and switch to immunoglobulin D secretion. *Mol Cell Biol* 1991;11:5660–5670.
276. Word CJ, White MB, Kuziel WA, Shen AL, Blattner FR, Tucker PW. The human immunoglobulin Cμ-Cδ locus: complete nucleotide and structural analysis. *Int Immunol* 1990;1:296–309.
277. Yasui H, Akahori Y, Hirano M, Yamada K, Kurosawa Y. Class switch from mu to delta is mediated by homologous recombination between σm and Σm sequences in human immunoglobulin gene loci. *Eur J Immunol* 1989;19:1399–1403.
278. Gilliam AC, Shen A, Richards JE, Blattner FR, Mushinski JF, Tucker PW. Illegitimate recombination generates a class switch from Cμ to Cδ in an IgD-secreting plasmacytoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:4161–4168.
279. Klein S, Sablitzky F, Radbruch A. Deletion of the IgH enhancer does not reduce immunoglobulin heavy chain production of a hybridoma IgD class switch variant. *EMBO J* 1984;3:2473–2476.
280. Sablitzky F, Radbruch A, Rajewsky K. Spontaneous immunoglobulin class switching in myeloma and hybridoma cell lines differs from physiological class switching. *Immunol Rev* 1982;67:59–72.
281. Irsch J, Burrows P, Cooper M, et al. Class switch recombination in human B lymphocytes. *Eighth International Congress of Immunology Abstracts.* Budapest: Springer-Verlag, 1992:35.
282. DePinho R, Kruger K, Andrews N, Lutzker S, Baltimore D, Alt FW. Molecular basis of heavy-chain class switching and switch region deletion in an Abelson virus-transformed cell line. *Mol Cell Biol* 1984;4:2905–2910.
283. Lang RB, Stanton LW, Marcu KB. On immunoglobulin heavy chain gene switching: two gamma-2b genes are rearranged via switch sequences in MPC11 cells but only one is expressed. *Nucleic Acids Res* 1982;10:611.
284. Radbruch A, Muller W, Rajewsky K. Class switch recombination is IgG1 specific on active and inactive IgH loci of IgG1-secreting B-cell blasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3954–3957.
285. Yancopoulos GD, DePinho RA, Zimmerman KA, Lutzker SG, Rosenberg N, Alt FW. Secondary genomic rearrangement events in pre-B cells: V_HDJ_H replacement by a LINE-1 sequence and directed class switching. *EMBO J* 1986;5:3259–3266.
286. Burrows PD, Beck-Engeser GB, Wabl MR. Immunoglobulin heavy-chain class switching in a pre-B cell line is accompanied by DNA rearrangement. *Nature* 1983;306:243–246.
287. Vogler LB, Crist WM, Bockman DE, Pearl ER, Lawton AR, Cooper MD. Pre-B-cell leukemia. A new phenotype of childhood lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1978;298:872–878.
288. Rothman P, Chen Y-Y, Lutzker S, et al. Structure and expression of germ line immunoglobulin heavy-chain ε transcripts: interleukin-4 plus lipopolysaccharide-directed switching to Cε. *Mol Cell Biol* 1990;10:1672–1679.
289. Davis MM, Calame K, Early PW, et al. An immunoglobulin heavy chain gene is formed by at least two recombinational events. *Nature* 1980;283:773–739.
290. Sakano H, Maki R, Kurosawa Y, Roeder W, Tonegawa S. Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 1980;286:676–683.
291. Dunnick W, Rabbitts TH, Milstein C. An immunoglobulin deletion mutant with implications for the heavy-chain switch and RNA splicing. *Nature* 1980; 286:669–675.
292. Davis MM, Kim SK, Hood LE. DNA sequences mediating class switching in α-immunoglobulins. *Science* 1980;209:1360–1365.
293. Kataoka T, Miyata T, Honjo T. Repetitive sequences in class-switch recombination regions of immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* 1981;23:357–368.
294. Stanton LW, Marcu K. Nucleotide sequence and properties of the murine γ3 immunoglobulin heavy chain gene switch region: implications for successive Cγ gene switching. *Nucleic Acids Res* 1982;10:5993–6006.
295. Mowatt MR, Dunnick WA. DNA sequence of the murine γ1 switch segment reveals novel structural elements. *J Immunol* 1986;136:2674–2683.
296. Szurek P, Petrini J, Dunnick W. Complete nucleotide sequence of the murine γ3 switch region and analysis of switch rebombination sites in two γ3-expressing hybridomas. *J Immunol* 1985;135:620–626.
297. Schultz C, Petrini J, Collins J, et al. Patterns and extent of isotype-specificity in the murine H chain switch DNA rearrangement. *J Immunol* 1990;144:363–370.
298. Hummel M, Berry JK, Dunnick W. Switch region content of hybridomas: the two spleen cell Igh loci tend to rearrange to the same isotype. *J Immunol* 1987; 138:3539–3548.
299. Nikaido T, Yamawaki-Kataoka Y, Honjo T. Nucleotide sequences of switch regions of immunoglobulin Cε and Cγ genes and their comparison. *J Biol Chem* 1982;257:7322–7329.
300. Obata M, Kataoka T, Nakai S, et al. Structure of a rearranged γ1 chain gene and its implication to immunoglobulin class-switch mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:2437–2441.
301. Marcu KB, Lang RB, Stanton LW, Harris LJ. A model for the molecular requirements of immunoglobulin heavy chain switching. *Nature* 1982;298:87–89.
302. Wu TT, Reid-Miller M, Perry HM, Kabat EA. Long identical repeats in the mouse γ2b switch region and their implications for the mechanism of class switching. *EMBO J* 1984;3:2033–2040.
303. Yoshida K, Matsuoka M, Usuda S, Mori A, Ishizaka K, Sakano H. Immunoglobulin switch circular DNA in the mouse infected with Nippostrongylus brasiliensis: evidence for successive class switching from μ to ε via γ1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7829–7833.
304. Schwedler U, Jack H-M, Wabl M. Circular DNA is a product of the immunoglobulin class switch rearrangement. *Nature* 1990;345:452–455.
305. Iwasato T, Shimizu A, Honjo T, Yamagishi H. Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination. *Cell* 1990;62:143–149.
306. Jack H-M, McDowell M, Steinberg CM, Wabl M. Looping out and deletion

mechanism for the immunoglobulin heavy-chain class switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1581–1585.
307. Iwasato T, Arakawa H, Shimizu A, Honjo T, Yamagishi H. Biased distribution of recombination sites within S regions upon immunoglobulin class switch recombination induced by transforming growth factor β and lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1992;175:1539–1546.
308. Davis DD, Yoshida K, Kingsbury L, Sakano H. Circular DNA resulting from recombination between V-(D)-J joining signals and switch repetitive sequences in mouse thymocytes. *J Exp Med* 1991;173:743–746.
309. Okazaki K, Davis DD, Sakano H. T cell receptor β gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell* 1987;49:477–485.
310. Fujimoto S, Yamagishi H. Isolation of an excision product of T-cell receptor α-chain gene rearrangements. *Nature* 1987;327:242–243.
311. Siebenkotten G, Esser C, Wabl M, Radbruch A. The murine IgG1/IgE class switch program. *Eur J Immunol* 1992;22:1827–1834.
312. Wabl M, Meyer J, Beck-Engeser G, Tenkhoff M, Burrows PD. Critical test of a sister chromatid exchange model for the immunoglobulin heavy-chain class switch. *Nature* 1985:313:687–689.
313a. Knight KL, Malek TR, Hanly WC. Recombinant rabbit secretory immunoglobulin molecules: alpha chains with maternal (paternal) variable-region allotypes and paternal (maternal) constant region allotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974;71:1169–1173.
313b. Knight, KL, Kingzette M, Crane MA, Zhai S-K. Transchromosomally derived Ig heavy chains. *J Immunol* 1995;155:684–691.
314. DePinho R, Kruger K, Andrews N, Lutzker S, Baltimore D, Alt FW. Molecular basis of heavy-chain class switching and switch region deletion in an Abelson virus-transformed cell line. *Mol Cell Biol* 1984;4:2905.
315. Tilley SA, Birshtein BK. Unequal sister chromatid exhange. A mechanism affecting immunoglobulin gene arrangement and expression. *J Exp Med* 1985; 162:675.
316. Kim S, Davis M, Sinn E, Patten P, Hood L. Antibody diversity: somatic hypermutation of rearranged VH genes. *Cell* 1981;27:573–581.
317. Dunnick WA, Hertz GZ, Scappino LA, Gritzmacher CA. DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res* 1993;21: 365–372.
318. White MB, Word CJ, Humphries CG, Blattner FR, Tucker PW. Immunoglobulin D switching can occur through homologous recombination in human B cells. *Mol Cell Biol* 1990;10:3690–3699.
319. Matthews K. DNA looping. *Microbiol Rev* 1992;56:123–136.
320. Wuerffel R, Jamieson CE, Morgan L, Merkulov GV, Sen R, Kenter AL. Switch recombination breakpoints are strictly correlated with DNA recognition motifs for immunoglobulin Sγ3 DNA-binding proteins. *J Exp Med* 1992;176:339–349.
321. Kenter AL, Wuerffel R, Sen R, Jamieson CE, Merkulov GV. Switch recombination breakpoints occur at nonrandom postions in the Sγ tandem repeat. *J Immunol* 1993;151:4718–4731.
322. Ma L, Hu B, Kenter AL. Immunoglobulin Sγ specific DNA binding protein SNAP is related to the HLH transcription factor E47. *Int Immunol* 1997;9: 1021–1029.
323. Pan Q, Rabbani H, Mills FC, Severinson E, Hammarstrom L. Allotype-associated variation in the human γ3 switch region as a basis for differences in IgG3 production. *J Immunol* 1997;158:5849–5859.
324. Dunnick W, Wilson M, Stavnezer J. Mutations, duplication, and deletion of recombined switch regions suggest a role for DNA replication in the immunoglobulin heavy-chain switch. *Mol Cell Biol* 1989;9:1850–1856.
325. Dunnick W, Stavnezer J. Copy choice mechanism of immunoglobulin heavy-chain switch recombination. *Mol Cell Biol* 1990;10:397–400.
326. Du J, Zhu Y, Shanmugam A, Kenter AL. Analysis of immunoglobulin Sγ3 recombination breakpoints by PCR: implication for the mechanism of isotype switching. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3066–3073.
327. Li J, Daniels GA, Lieber MR. Asymmetric mutation around the recombination break point of immunoglobulin class switch sequences on extrachromosomal substrates. *Nucleic Acids Res* 1996;24:2104–2111.
328. Wuerffel RA, Du J, Thompson RJ, Kenter AL. Immunoglobulin Sγ3 DNA specific double strand breaks are induced in mitogen activated B cells and are implicated in switch recombination. *J Immunol* 1997;159:4139–4144.
329. Weisman-Shomer P, Fry M. QUAD, a protein from hepatocyte chromatin that binds selectively to guanine-rich quadruplex DNA. *J Biol Chem* 1993;268: 3306–3312.
330. Muraiso T, Nomoto S, Yamazaki H, Mishima Y, Kominami R. A single-stranded DNA binding protein from mouse tumor cells specifically recognizes the C-rich strand of the (AGG:CCT)n repeats that can alter DNA conformation. *Nucl Acids Res* 1992;20:6631–6635.
331. Sakano H, Huppi K, Heinrich G, Tonegawa S. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* 1979;280:288–294.
332. Max EE, Seidman JG, Leder P. Sequences of five potential recombination sites encoded close to an immunoglobulin kappa constant region gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3450–3454.
333. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1 deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992;68: 869–877.
334. Shinkai Y, Rathbun G, Lam K-P, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992;68: 855–867.
335. Rolink A, Melchers F, Andersson J. The SCID but not the RAG-2 gene product is required for Sμ-Sε heavy chain class switching. *Immunity* 1996;5:319–330.
336. Rathmell WK, Chu G. A DNA end-binding factor involved in double-strand break repair and V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* 1994;14:4741–4748.
337. Rathmell WK, Chu G. Involvement of the Ku autoantigen in the cellular response to DNA double strand breaks. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:7623–7627.
338. Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, et al. Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science* 1994;265:1442–1445.
339. Smider V, Rathmell WK, Lieber MR, Chu G. Restoration of X-ray resistance and V(D)J recombination in mutant cells by Ku cDNA. *Science* 1994;266:288–291.
340. Boubnov NV, Hall KT, Wills Z, et al. Complementation of the ionizing radiation sensitivity, DNA end binding, and V(D)J recombination defects of double-strand break repair mutants by the p86 Ku autoantigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:890–894.
341. Kataoka T, Kawakami T, Takahashi N, Honjo T. Rearrangement of immunoglobulin γ1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:919–923.
342. Snapper CM, Finkelman FD, Stefany D, Conrad DH, Paul WE. IL-4 induces co-expression of intrinsic membrane IgG1 and IgE by murine B cells stimulated with lipopolysaccharide. *J Immunol* 1988;141:489–498.
343. Zhang K, Mills FC, Saxon A. Switch circles from IL-4-directed ε class switching from human B lymphocytes. *J Immunol* 1994;152:3427–3435.
344. Baskin B, Islam KB, Evengard B, Emtestam L, Smith CIE. Direct and sequential switching from μ to ε in patients with Schistosoma mansoni infection and atopic dermatitis. *Eur J Immunol* 1997;27:130–135.
345. Brinkmann V, Müller S, Heusser CH. T cell dependent differentiation of human B cells: direct switch from IgM to IgE and sequential switch from IgM via IgG to IgA production. *Mol Immunol* 1997 (in press).
346. Jung S, Rajewsky K, Radbruch A. Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science* 1993;259:984–987.
347. Jung S, Siebenkotten G, Radbruch A. Frequency of immunoglobulin E class switching is autonomously determined and independent of prior switching to other classes. *J Exp Med* 1994;179:2023–2026.
348. Stavnezer-Nordgren J, Sirlin S. Specificity of immunoglobulin heavy chain switch correlates with activity of germline heavy chain genes prior to switching. *EMBO J* 1986;5:95–102.
349. Ikeda H, Matsumoto T. Transcription promotes rec A-independent recombination mediated by DNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4571–4575.
350. Voelkel-Meiman K, Keil RL, Roeder GS. Recombination-stimulating sequences in yeast ribosomal DNA correspond to sequences regulating transcription by RNA polymerase I. *Cell* 1987;48:1071–1079.
351. Blackwell KT, Moore MW, Yancopoulos GD, Suh H, Selsing E, Alt FW. Recombination between immunoglobulin variable region gene segments is enhanced by transcription. *Nature* 1986;324:585–589.
352. Lebman DA, Nomura DY, Coffman RL, Lee FD. Molecular characterization of germ-line immunoglobulin A transcripts produced during transforming growth factor type β-induced isotype switching. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 3962–3966.
353. Rothman P, Li SC, Gorham B, Glimcher L, Alt F, Boothby M. Identification of a conserved lipopolysaccharide-plus-interleukin-4-responsive element located at the promoter of germ line ε transcripts. *Mol Cell Biol* 1991;11:5551–5561.
354. Gerondakis S. Structure and expression of murine germ-line immunoglobulin ε heavy chain transcripts induced by interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1581–1585.
355. Jumper MD, Splawski JB, Lipsky PE, Meek K. Ligation of CD40 induces sterile transcripts of multiple Ig H chain isotypes in human B cells. *J Immunol* 1994; 152:438–445.
356. Fujieda S, Zhang K, Saxon A. IL-4 plus CD40 monoclonal antibody induces human B cells γ subclass-specific isotype switch: switching to γ1, γ3, and γ4, but not γ2. *J Immunol* 1995;155:2318–2328.
357. Radcliffe G, Lin Y-C, Julius M, Marcu KB, Stavnezer J. Structure of germ line immunoglobulin α heavy-chain RNA and its location on polysomes. *Mol Cell Biol* 1990;10:382–386.
358. Lutzker S, Alt FW. Structure and expression of germ line immunoglobulin g2b transcripts. *Mol Cell Biol.* 1988;8:1849–1852.
359. Xu M, Stavnezer J. Structure of germline immunoglobulin heavy-chain γ1 transcripts in interleukin 4 treated mouse spleen cells. *Dev Immunol* 1990;1: 11–17.
360. Lennon GG, Perry RP. Cμ-containing transcripts initiate heterogeneously within the IgH enhancer region and contain a novel 5′-nontranslatable exon. *Nature* 1985;318:475–478.
361. Collins J, Dunnick W. Production and regulation of germline transcripts of the γ2a gene prior to switch recombination. *Eighth International Congress of Immunology Abstracts*. Budapest: Springer-Verlag, 1992:35.
362. Neale GA, Kitchingman GR. mRNA transcripts initiating within the human immunoglobulin mu heavy chain enhancer region contain a non-translatable exon and are extremetly heterogeneous at the 5′ end. *Nucleic Acids Res* 1991;

exon and are extremetly heterogeneous at the 5′ end. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:2427–2433.
363. Fujieda S, Lin YQ, Saxon A. Zhang K. Multiple types of chimeric germ-line Ig heavy chain transcripts in human B cells: evidence for *trans*-splicing of human Ig RNA. *J Immunol* 1996;157:3450–3459.
364. Li SC, Rothman PB, Zhang J, Chan C, Hirsh D, Alt FW. Expression of Im-Cg hybrid germline transcripts subsequent to immunoglobulin heavy chain class switching. *Int Immunol* 1994;6:491–497.
365. Reaban ME, Griffin JA. Induction of RNA-stabilized DNA conformers by transcription of an immunoglobulin switch region. *Nature* 1990;348:342–344.
366. Daniels GA, Lieber MR. Strand specificity in the transcriptional targeting of recombination at immunoglobulin switch sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5625–5629.
367. Baar JN, Pennell M, Shulman MJ. Analysis of a hot spot for DNA insertion suggests a mechanism for Ig switch recombination. *J Immunol* 1996;157: 3430–3435.
368. Bachl JC, Truck W, Wabl M. Translatable immunoglobulin germ-line transcript. *Eur J Immunol* 1996;26:870–874.
369. Shimizu A, Nussenzweig MC, Mizuta T-R, Leder P, Honjo T. Immunoglobulin double-isotype expression by trans-mRNA in a human immunoglobulin transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8020–8023.
370. Shimizu A, Nussenzweig MC, Han J, Sanchez M, Honjo T. Trans-splicing as a possible mechanism for the multiple isotype expression of the immunoglobulin gene. *J Exp Med* 1991;173:1385–1393.
371. Han H, Okamoto M, Honjo T, Shimizu A. Regulated expression of immunogloulin trans-mRNA consisting of the variable region of a transgenic μ chain and constant regions of endogenous isotypes. *Int Immunol* 1991;3: 1197–1206.
372. Nolan-Willard M, Berton MT, Tucker P. Coexpression of μ and γl heavy chains can occur by a discontinuous transcription mechanism from the same unrearranged chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1234–1238.
373. Ott DE, Alt FW, Marcu KB. Immunoglobulin heavy chain switch region recombination within a retroviral vector in murine pre-B cells. *EMBO J* 1987;6: 577–584.
374. Ott DE, Marcu KB. Molecular requirements for immunoglobulin heavy chain constant region gene switch-recombination revealed with switch-substrate retroviruses. *Int Immunol* 1989;1:582–591.
375. Leung H, Maizels N. Transcriptional regulatory elements stimulate recombination in extrachromosomal substrates carrying immunoglobulin switch-region sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4154–4158.
376. Leung H, Maizels N. Regulation and targeting of recombination in extrachromosomal substrates carrying immunoglobulin switch region sequences. *Mol Cell Biol* 1994;14:1450–1458.
377. Ballantyne J, Ozsvath L, Bondarchuk K, Marcu KB. Chromosomally integrated retroviral substrates are sensitive indicators of an antibody class switch recombinase-like activity. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;194:439–448.
378. Daniels GA, Lieber MR. RNA:DNA complex formation upon transcription of immunoglobulin switch regions: implications for the mechanism and regulation of class switch recombination. *Nucleic Acids Res* 1995a;23:5006–5011.
379. Ballantyne J, Henry DL, Marcu KB. Antibody class switch recombinase activity is B cell-stage specific and functions stochastically in the absence of targeted accessibility control. *Int Immunol* 1997;9:963–974.
380. Schmitz J, Radbruch A. An interleukin-4-induced DNase I hypersensitive site indicates opening of the γl switch region prior to switch recombination. *Int Immunol* 1989;1:570–575.
381. Berton MT, Vitetta ES. Interleukin 4 induces changes in the chromatin structure of γl switch region in resting B cells before switch recombination. *J Exp Med* 1990;172:375–378.
382. Elgin SCR. DNAaseI-hypersensitive sites of chromatin. *Cell* 1981;27:413–415.
383. Burger C, Radbruch A. Protective methylation of immunoglobulin and T cell receptor (TcR) gene loci prior to induction of class switch and TcR recombination. *Eur J Immunol* 1990;20:2285–2291.
384. Kolata G. Fitting methylation into development. *Science* 1985;228:1183–1184.
385. Lin Y-CA Stavnezer J. Regulation of transcription of the germ-line Igα constant region gene by an ATF element and by novel transforming growth factor-β1-responsive elements. *J Immunol* 1992;149:2914–2925.
386. Xu M, Stavnezer J. Regulation of transcription of immunoglobulin germ-line γl RNA: analysis of the promoter/enhancer. *EMBO J* 1992;11:145–155.
387. Nilsson L, Paschalis S. The human Iα1 and Iα2 germline promoter elements: proximal positive and distal negative elements may regulate the tissue specific expression of Cα1 and Cα2 germline transcripts. *Int Immunol* 1993;5:271–282.
388. Ichiki T, Takahashi W, Watanabe T. Regulation of the expression of human Cε germline transcript. *J Immunol* 1993;150:5408–5417.
389. Albrecht B, Peiritsch S, Woisetschlager M. A bifunctional control element in the human IgE germline promoter involved in repression and IL-4 activation. *Int Immunol* 1994;6:1143–1151.
390a. Delphin S, Stavnezer J. Characterization of an interleukin 4 (IL-4) responsive region in the immunoglobulin heavy chain germline ε promoter: regulation by NF-IL-4, a C/EBP family member and NF-κB/p50. *J Exp Med* 1995;181:181–192.
390b. Iciek LA, Delphin SA, Stavnezer J. CD40 cross-linking induces Igε germline transcripts in B cells via activation of NF-κ B. *J Immunol* 1997;158:4769–4779.
391. Lin YS, Green MR. Interaction of a common cellular transcription factor, ATF, with regulatory elements in both E1A- and cyclic AMP-inducible promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:3396–3400.
392. Lundgren M, Larsson C, Femino A, Xu M, Stavnezer J, Severinson E. Activation of the Ig germ-line γl promoter. *J Immunol* 1994;153:2983–2995.
393. Berton MT, Linehan LA. IL-4 activates a latent DNA-binding factor that binds a shared IFN-γ and IL-4 response element present in the germ-line γl Ig promoter. *J Immunol* 1995;154:4513–4525.
394. Fujita K, Jumper MD, Meek K, Lipsky PE. Evidence for a CD40 response element, distinct from the IL-4 response element, in the germline ε promoter. *Int Immunol* 1995;7:1529–1533.
395. Hou J, Schindler W, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 1994;265:1701–1706.
396. Berton MT, Warren WD, Linehan LA, Grusby MJ. The role of Stat6 in IL-4- and CD40-mediated germline Ig gene transcription and switch recombination in murine B cells. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:S259.
397. Lin S-C, Stavnezer J. Activation of NF-κB/Rel by CD40 engagement induces the mouse germ line immunoglobulin Cγl promoter. *Mol Cell Biol* 1996;16: 4591–4603.
398. Liao F, Birshtein BK, Busslinger M, Rothman P. The transcription factor BSAP (NF-HB) is essential for immunoglobulin germ-line ε transcription. *J Immunol* 1994;152:2904–2911.
399. Albrecht B, Peiritsch S, Messner B, Woisetschlager M. The transcription factor B cell-specific activator protein is not involved in the IL-4-induced activation of the human IgE germline promoter. *J Immunol* 1996;157:1538–1543.
400. Thienes CP, De Monte L, Monticelli S, Busslinger M, Gould HJ, Vercelli D. The transcription factor B cell-specific activator protein (BSAP) enhances both IL-4- and CD40-mediated activation of the human ε germline promoter. *J Immunol* 1997;158:5874–5882.
401. Kim J, Reeves R, Rothman P, Boothby M. The non-histone chromosomal protein HMG-I(Y) contributes to repression of the immunoglobulin heavy chain germline ε RNA promoter. *Eur J Immunol* 1995;25:798–808.
402. Wang DZ, Cherrington A, Famakin-Mosuro B, Boothby M. Independent pathways for de-repression of the mouse Ig heavy chain germ-line ε promoter: an IL-4 NAF/NF-IL-4 site as a context-dependent negative element. *Int Immunol* 1996;8:977–989.
403. Elenich LA, Ford CS, and Dunnick WA. The γl heavy chain gene includes all of the cis-acting elements necessary for expression of properly regulated germ-line transcripts. *J Immunol* 1996;157:176–182.
404. Elenich LA, Ford CS, Collins JT, Dunnick WA. γl heavy chain transgenes are responsive to interferon-γ repression and CD40 ligation. *J Immunol* 1997;158: 4564–4573.
405. Bottaro A, Lansford R, Xu L, Zhang J, Rothman P, Alt FW. S region transcription per se promotes basal IgE class switch recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *EMBO J* 1994;13:665–674.
406. Lorenz M, Jung S, Radbruch A. Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science* 1995;267:1825–1828.
407. Kenter AL, Watson JV. Cell cycle kinetics model of LPS-stimulated spleen cells correlates switch region rearrangements with S phase. *J Immunol Methods* 1987; 97:111–117.
408. van der Loo W, Severinson-Gronowicz E, Strober S, Herzenberg LA. Cell differentiation in the presence of cytochalasin B: studies on the "switch" to IgG secretion after polyclonal B cell activation. *J Immunol* 1979;122:1203–1208.
409. Chu CC, Paul WE, Max EE. Analysis of DNA synthesis requirement for deletional switching in normal B cells, *Eighth International Congress of Immunology Abstracts*. Bucapest: Springer-Verlag, 1992:34.
410. Snapper CM, Marcu KB, Zelazowski P. The Ig class switch: beyond "accessibility". *Immunity* 1997;6:217–223.
411. Nakamura M, Kondo S, Sugai M, Nazarea M, Imamura S, Honjo T. High frequency class switching of IgM⁻ B lymphoma clone CH12F3 to IgA⁻ cells. *Int Immunol* 1996;8:193–201.
412. Mandler R, Chu CC, Paul WE, Max EE, Paul WE, Snapper CM. Interleukin 5 induces Sμ-Sγl DNA rearrangement in B cells activated with dextran-anti-IgD antibodies and interleukin 4: a three component model for Ig class switching. *J Exp Med* 1993;178:1577–1586.
413. Snapper CM, Zelazowski P, Rosas FR, et al. B cells from p50/NF-κB konckout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line C_H transcription, and Ig class switching. *J Immunol* 1996;156:183–191.
414. Zelazowski P, Carrasco D, Rosas FR, Moorman MA, Bravo R, Snapper CM. B cells genetically deficient in the c-Rel transactivation domain have selective defects in germline C_H transcription and Ig class switching. *J Immunol* 1997;159:3133–3139.
415. Snapper CM, Rosas FR, Zelazowski P, et al. B cells lacking RelB are defective in proliferative responses but undergo normal B cell maturation to Ig secretion and Ig class switching. *J Exp Med* 1996;184:1537–1541.
416. Caamano JH, Rizzo C, Durham SK, et al. Nuclear factor (NF)-KB2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J Exp Med* 1998;185–196.
417. Loh RKS, Jabara HH, Geha RS. Disodium cromoglycate inhibits Sμ-Sε deletional switch recombination and IgE synthesis in human B cells. *J Exp Med* 1994;180:663–671.

418. Blunt T, Finnie NJ, Taccioli GE, et al. Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* 1995;80:813–823.
419. Perlmutter AP, Gilbert W. Antibodies of the secondary response can be expressed without switch recombination in normal mouse B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:7189–7193.
420. Yaoita Y, Kumagai Y, Okumura K, Honjo T. Expression of lymphocyte surface IgE does not require switch recombination. *Nature* 1982;297:697–699.
421. Katona IM, Urban JF Jr, Finkelman FD. B cells that simultaneously express surface IgM and IgE in *Nippostrongylus brasiliensis*-infected SJA/9 mice do not provide evidence for isotype switching without gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:511–515.
422. MacKenzie T, Dosch H-M. Clonal and molecular characteristics of the human IgE-committed B cell subset. *J Exp Med* 1989;169:407–430.
423. Chan MA, Benedict SH, Dosch HM, Hui MF, Stein LD. Expression of IgE from a nonrearranged epsilon locus in cloned B-lymphoblastoid cells that also express IgM. *J Immunol* 1990;144:3363–3368.
424. Chen Y-W, Word CJ, Jones S, Uhr JW, Tucker PW, Vitetta ES. Double isotype production by a neoplastic B cell line. I. Cellular and biochemical characterization of a variant of BCL1 that expresses and secretes both IgM and IgG1. *J Exp Med* 1986;164:548–561.
425. Chen Y-W, Word C, Dev V, Uhr JW, Vitetta ES, Tucker PW. Double isotype production by a neoplastic B cell line. II. Allelically excluded production of μ and γ1 heavy chains without CH gene rearrangement. *J Exp Med* 1986;164:562–579.
426. Koller B, Fromm H, Galun E, Edelman M. Evidence for *in vivo* trans splicing of pre-mRNAs in tobacco chloroplasts. *Cell* 1987;48:111–119.
427. Durdik J, Gerstein RM, Rath S, Robbins PF, Nisonoff A, Selsing E. Isotype switching by a microinjected μ immunoglobulin heavy chain gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2346–2350.
428. Gerstein RM, Frankel WN, Hsieh C-L, et al. Isotype switching of an immunoglobulin heavy chain transgene occurs by DNA recombination between different chromosomes. *Cell* 1990;63:537–548.
429. Kipps TJ, Herzenberg LA. Homologous chromosome recombination generating immunoglobulin allotype and isotype switch variants. *EMBO J* 1986;5:263–268.
430. Radbruch A, Liseegand B, Rajewsky K. Isolation of variants of mouse myeloma X63 that express changed immunoglobulin class. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:2909–2913.
431. Zelazowski P, Max EE, Snapper CM. Induction of Ku in normal murine B cells by cytokines that promote switch recombination. *J Immunol* 1997;159:2559–2562.

第25章　亲和力成熟

Claudia Berek①

引言

多年前人们就已知道，体液免疫应答被诱导后，血清中抗原特异性抗体的亲和力常常随时间而增强。这种抗体亲和力逐渐增强的现象被命名为免疫应答的成熟[1]。很长一段时间，人们对于导致抗体亲和力改变的机制相当不清楚。今天，我们能够用分子学的术语来描述这个过程，并且对细胞水平上允许成熟过程发生的许多相互反应有详细的了解。然而，即使在今天，这个机制仍未完全明了。在讨论细节之前，将给出一些背景知识以使亲和力成熟的过程更容易被理解。

863

一个细胞——一种抗体分子

根据 Burnet 的克隆选择学说[2]，一个 B 细胞产生一种单一类型的抗体分子。在 B 细胞发育的过程中，通过特异性的 V_H、D 或 J_H 基因的重排产生重链可变区（V_H），通过特异性的 V_L 和 J_L 基因片段的重排产生轻链可变区（V_L）[3]。这些 V(D)J 元件和在它们连接过程中产生的独特的重排模式可被认为是特定的 B 细胞克隆的克隆标记。那么，是否在暴露于抗原之前，B 细胞就被委托去合成某种特殊的限定了亲和力和特异性的免疫球蛋白分子？亲和力成熟是如何实现的？

主要有两种方式来改善免疫应答的质量。最明显的选择是被抗原活化的 B 细胞群的转换。在 20 世纪 60 年代，Nussenzweig 和 Benacerraf[4]注意到免疫后随着时间的推移豚鼠特异性的抗体库有漂移现象：早期应答以低亲和力的 λ 型的抗体为主，随后的应答以高亲和力的 κ 型分子为主。第二选择是用相同的 B 细胞群但改变它们的受体。Weigert 等（1970）的工作提示 B 细胞内超变机制能被活化，导致 V 区基因的多样性[5]。对 10 个来自不同骨髓瘤蛋白的 λ 型 L 链进行测序，结果显示 6 个是一致的，而其他 4 个序列有 1～3 个氨基酸的差别（图 25.1）。Weigert 得出结论：所有这些序列来自于单个 V_λ 胚系基因，4 个可变的序列通过体细胞超变机制被多样化。这一远见卓识为亲和力成熟的实验分析设定了舞台。然而，又花了 8 年时间，通过对小

① C. Berek: Deutsches Rheuma ForschungsZentrum, Berlin. D-10117 Berlin, Germany.

鼠基因组 DNA 的分析才证实了 Weigert 的结论[6]。

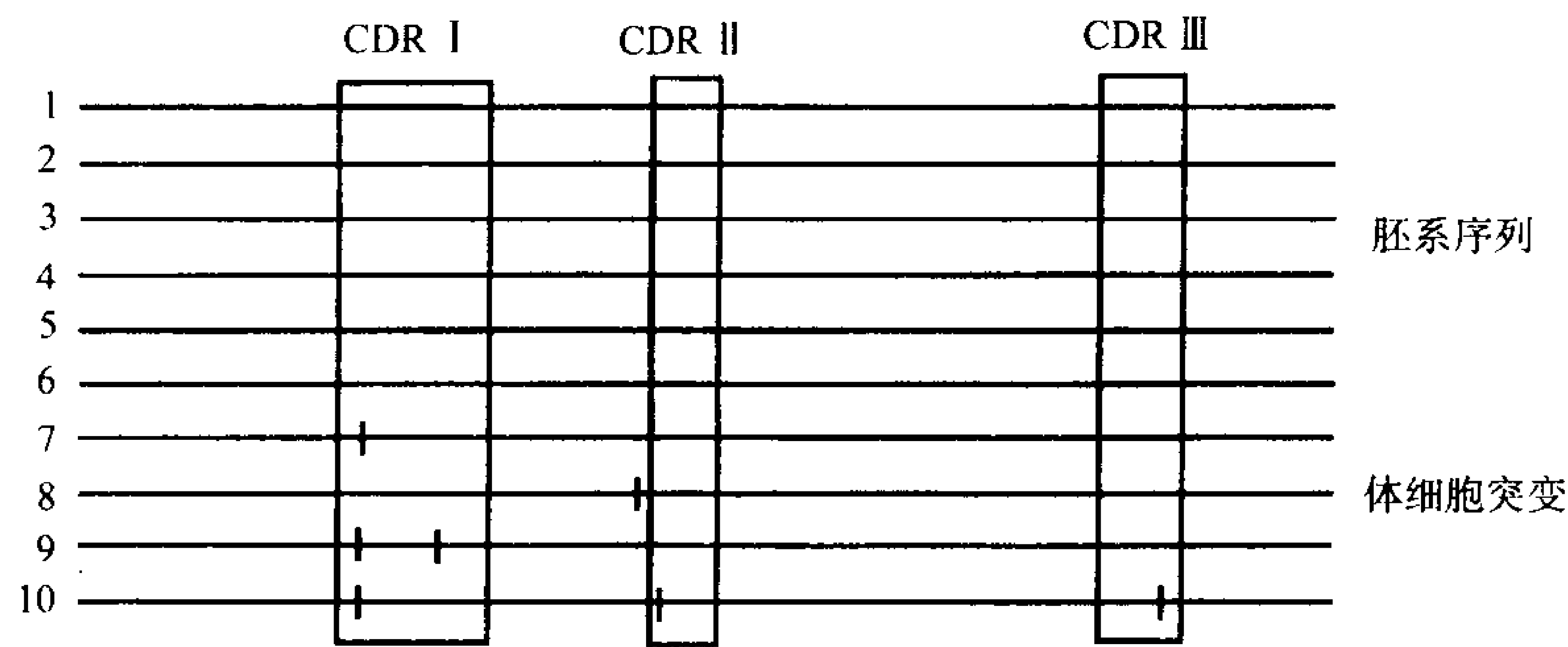


图 25.1 小鼠 Vλ 蛋白序列的图表比较。垂直棒表示 1 个氨基酸的不同。互补决定区(CDR)被显示(引自 Weigert 等的资料[5]。)

现在已经知道,表达一种抗体分子[通过其 V(D)J 重排来定义]变异体的一个 B 细胞克隆可以被产生;某些变异体可偶然地有对抗原更高的亲和力。为产生突变体并使之亲和力成熟,这些高亲和力变异体细胞不得不被优先选择并进一步分化成分泌抗体的浆细胞。通过这种方式,尽管同样的 V(D)J 重排被保留,但抗体分子的结构将会改变。

最近发现抗原活化的 B 细胞可再次表达像 Ragl 和 Rag2 这样的酶,以前仅仅发现它们在骨髓的前 B 细胞中存在[7]。这些酶对于产生 V(D)J 的重排是必需的。因此,我们不再排除在成熟的 IgD^+/IgM^+ B 细胞中发生二次重排的可能性。这些二次重排将产生带有改变了受体的 B 细胞。

864

抗体

对不同 V 区的比较显示,多样性集中在序列的某些部分[8]。Kabat 和 Wu 的变异性图(第三章,图 3.4)显示,那些对于抗体分子整体结构所必需的残基是保守的,而 V 区的其他部分是高度可变的。从三维结构可清楚的看到,在蛋白折叠形成抗体分子结合位点的过程中,这些 V_L 和 V_H 基因的超变区被聚集在一起。由于这个原因,这些 V 区部分被称为互补决定区(CDR)。V 区较保守的部分形成框架区(FR)。每一个 V 区由 4 个框架区组成(FR 1、FR2、FR3 和 FR4),它们通过 3 个互补决定区(CDRl、CDR2 和 CDR3)隔开(图 25.1)。

免疫应答

引言

考虑到可利用的胚系基因的数目、随机组合、不同基因元件连接过程中产生的多样性,理论上小鼠体内能产生具有 10^{10}个不同 B 细胞受体的库[9]。在这个巨大的 B 细胞库里,许多受体将能够结合有复杂表面结构的蛋白抗原,如鸡卵溶菌酶(图 25.2)。因此像这样一个蛋白能诱导异种免疫应答并不令人吃惊。

865

图 25.2 显示了针对鸡卵溶菌酶的 3 个不同特异性抗体分子与鸡卵溶菌酶的复合体的晶体结构[10]。这些抗体中的每一个抗体分子在溶菌酶的表面有 1 个不同的靶位点。抗体分子的结合位点与蛋白表面之间的紧密相互作用是通过化学力如氢键或静电引力和范德华式相互作用等所建立起来,并遵循互补程度与结合亲和力相关的原则。用抗原免疫后,可活化的大多数 B 细胞将有中等程度的互补,及相应的中等程度的亲和力。另一方面,相对稀有的带有高亲和力受体的 B 细胞将有更多的机会被抗原活化。在这种情况下频率和亲和力将决定初次免疫应答的库。

为了研究应答的成熟,我们需要一种能诱导相当严格免疫应答的抗原。小的化合物是理想的,如 4-羟基-3-硝基苯基-乙酰(NP),2-苯基-5-恶唑啉(phOx),磷酰胆碱(PC)或 pazophenylarsonate(Ars)。然而,它们本身不

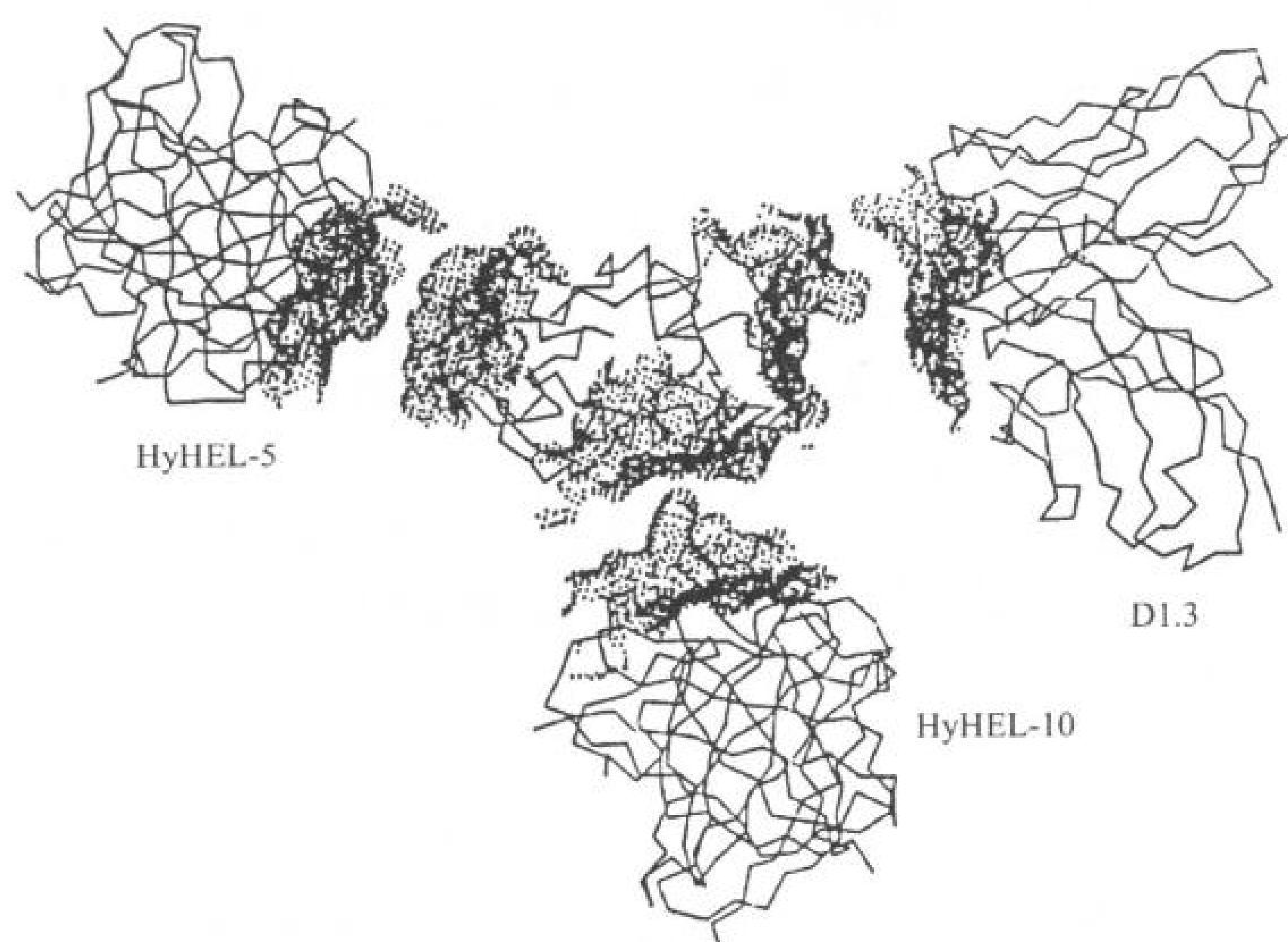


图25.2　溶菌酶和3个抗溶菌酶抗体图。显示了溶菌酶与3株不同抗体(HyHEL-5,HyHEL-10和D1.3)CDR之间的范德华相互作用[10]。

能诱导免疫应答。这些小的化合物——半抗原,仅仅当它们与大的载体蛋白偶联后才具有免疫原性。作为例子,下文将详细描述对半抗原phOx的免疫应答。在针对半抗原NP(11-13)、Ars[14,15]或PC[16~18]、对蛋白抗原[19]以及当用病毒感染小鼠[20,21]的免疫应答中,已经观察到可比较的结果。

除了严格的免疫应答,我们需要一些技术,可以对表达在抗原活化B细胞内的V_H和V_L基因进行迅速的分析。随着一种重要技术的发展以及其他技术的应用,Milstein及其合作者使得在分子研究亲和力成熟成为可能,杂交瘤技术的建立,允许免疫应答不同阶段的抗原活化B细胞无限增值化[22]。RNA双脱氧测序的应用允许对V区mRNA进行直接分析[23]。

初始库的选择

为了观察免疫应答的发育,用偶联到载体蛋白鸡血清白蛋白上的半抗原phOx(phOxCSA)注射BALB/c小鼠,随后分析不同时相点的免疫应答[24]。脾细胞与非分泌融合细胞株融合,分泌特异性phOx抗体的杂交瘤被筛选出来。通过直接对mRNA测序测定了重和轻链V区核酸序列。图25.3(上部)显示了免疫后7d被融合脾细胞的实验结果[25]。对phOx的早期免疫应答令人惊奇的一致。大部分杂交瘤株使用1个特定的V_L基因,称为V_κOx1,1个特殊的V_H基因,V_HOx1[25]。即使在重链和轻链序列的CDRⅢ区,也几乎没有多样性。在V_HOx1序列中,V基因片段与D和J_H基因片段以这样一种方式相连,以致全长CDRⅢ是4个氨基酸。所有的例子中CDRⅢ的第一个残基是天冬氨酸,第三个残基是甘氨酸。仅仅中间一个残基是可变的(图25.3中没有显示)。同样地,大多数杂交瘤株表达同型L链。V_κOx1基因片段与J_κ5相连,导致96位是亮氨酸残基。少量V_κOx1基因片段与J_κ4相连的例子中,仍产生亮氨酸残基(图25.3中没有显示)。这些表达V_κOx1-V_HOx1的杂交瘤株分泌对phOx抗原相对高亲和力的抗体。在此实验中,没有见到表达针对抗原phOx的低亲和力受体的B细胞[9]。这些数据提示,从一个多样的有效的库中,通过严格的筛选过程,仅仅少量的B细胞脱颖而出,参与亲和力成熟。

超变和选择

V区的比较结果显示,免疫应答诱导7天后序列没有突变。来自独立杂交瘤的V_H和V_L区与胚系基因

序列是一致的。抗原免疫后 2 星期,脾细胞融合,结果非常不同[26]。当每一个分离的 V_H 和 V_κ 与胚系基因比较时,显示有多个核苷酸的改变(图 25.3,下部)。体细胞突变机制使得抗原活化的 B 细胞编码的胚系受体多样化。

尽管体细胞突变相当随机地分布于 V_H 区,但 V_κ 序列中的情况却不同(图 25.3,下部)。核苷酸改变在于 CDRI 和 FR2 之间的边缘积累。在所有的这些序列中,V 区 CDRI 34 位的组氨酸被谷氨酰胺或天冬酰胺所取代。此外,在许多序列中,残基 36(FR2)、酪氨酸,改变为苯丙氨酸。组氨酸的三联体密码是 CAC,通过单核苷酸的改变能够产生 7 种不同的氨基酸。在缺乏选择的情况下,人们预计所有的这些改变将以相同的频率发生。然而,在这些序列的任何一个中,没有观察到任何一个氨基酸替代为脯氨酸、酪氨酸、亮氨酸、天冬氨酸或精氨酸。在这些来自 phOx 特异性杂交瘤系的序列中仅仅观察到 2 个氨基酸改变,改变为谷氨酰胺或改变为非常相似的天冬酰胺。

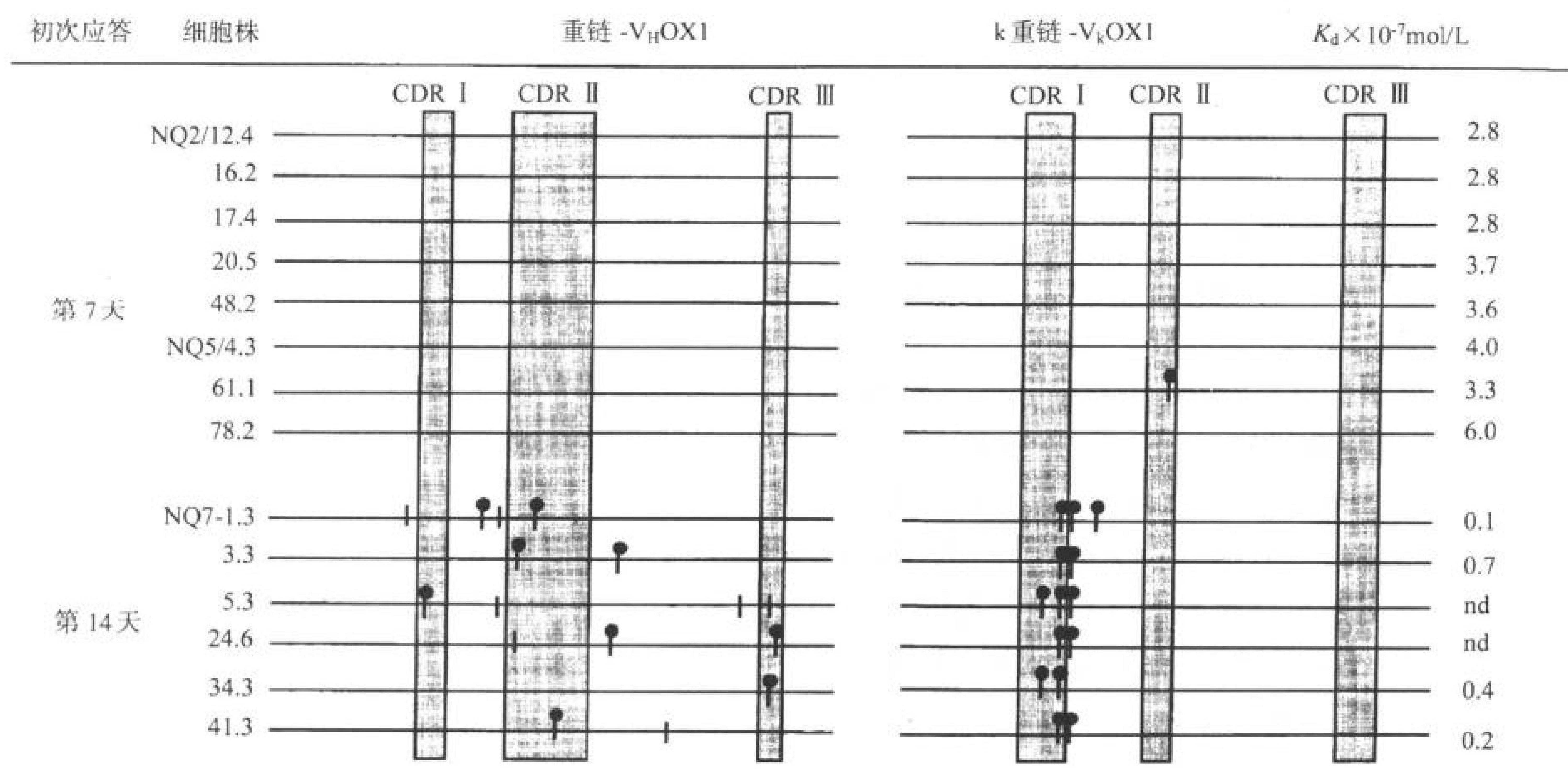


图 25.3 对 phOx 的初次免疫应答。图中显示了在 V_HOx1 和 V_kOx1 mRNA 序列中观察到的体细胞多样性。第 7 天和 14 天的结果被比较。垂直线表示沉默突变,线上的环表示替代突变。右边给出了 V_HOx1-V_kOx1 抗体的亲和力。(资料来自 Kaartinen 等[25]和 Griffiths 等[26]。)

已显示从组氨酸到谷氨酰胺或天冬酰胺的单个氨基酸改变导致亲和力提高了接近 10 倍。因此,免疫后 14 天,B 细胞库通过超变实现了多样化,并发生了对高亲和力突变体的强有力的筛选。

随时间的体细胞突变的积累

当用同样的方法分析记忆应答,几乎所有的表达 V_κOx1 κ 轻链的杂交瘤系在 CDRI 的 34 位有由组氨酸到谷氨酰胺或天冬酰胺的替代突变[26,27]。因此,仅仅高亲和力的 B 细胞分化为记忆细胞以及在再次和三次免疫应答中重新被活化。而且,这些序列比免疫后 14 天分离的序列带有更多的体细胞突变。从早期初次应答(□)、晚期初次应答(■),到再次应答(●)以及最终的三次应答(▲),在 V_κOx1 – V_HOx1 抗体中体细胞突变的数目增多(图 25.4)[25~27]。人们观察到了体细胞突变的逐步积累,同时也观察到了对抗原 phOx 的亲和力的增强(图 25.4)。因此,当记忆细胞被抗原再次活化,超变机制被重新启动。新的变异体被产生,带有最高亲和力的那些变异体将被选择分化为浆细胞及更进一步的记忆细胞。

图25.4 由于体细胞突变,VHOx1 - VκOx1 抗体亲和力增强。左边显示从早期初次应答(□)、晚期初次应答(■),再次应答(●)以及3次应答(▲)的抗体中所观察到的体细胞突变的数目。右边显示了这些抗体的解离常数。(数据来自 Kaartinen 等[25]、Griffiths 等[26]和 Berek 等[27]。)

867

来自其他实验系统的数据已经提示某些记忆细胞可能停止突变。当记忆细胞被转移到辐射的小鼠,被抗原活化,尽管没有进一步的体细胞突变,这些细胞被克隆性扩增[28,29]。在带有自身免疫性疾病的小鼠,长期慢性活化的记忆细胞仍在增值,但超变被灭活[30]。

细胞库的漂移

867

通过体细胞突变和选择改良抗体结合位点仅仅是亲和力成熟的一部分。另外,也观察到了细胞库的漂移。尽管大多数的初次应答杂交瘤系表达 V_{κ}Ox1 - V_HOx1 组合型抗体,但在对抗体的记忆应答中抗体有漂移,观察到了 V_{κ}Ox1 κ链与其他的 V_H 区组合[31]。比较这些 V_H 区的 CDR 后发现,通过连接 V、D 和 J 片段产生的 CDRIII 中,在 V_HOx1 重链总有1个规则的氨基酸序列[9]。这一惊人的发现支持这样一个观点:在含有 V_{κ}Ox1 轻链的 phOx 特异性抗体中,重链高度保守的 CDRIII 对于高亲和力的结合是必需的。另外,在记忆应答中,早期初次应答没有分离到表达重链 - 轻链组合的杂交瘤[31]。在其他的半抗原应答中,可比较的结果被获得。例如,对 NP 的免疫应答中,在 V_H186.2 基因(在 C57/B16 小鼠编码大多数的 NP 特异性抗体的重链)的 CDRIII 有一个向 V_H 区的漂移,在 D 片段的 3′一半显示更高程度的 N 区多样性[13]。在其他的免疫应答中,发现了在初次应答很少观察到的向着 V_H 和 V_L 组合的漂移[17,20,21]。因此,看起来记忆应答库比初次应答库更多样化像是一个普遍现象。虽然体细胞超变是抗原特异性应答多样化中的一个主要因素,但另外,还有一个向着选择性的 V(D)J 重排漂移。对于改善抗体的亲和力,两个机制可能同等重要。

漂移可以用动力学来解释。在记忆应答中,那些比由 V_{κ}Ox1 和 V_HOx1 编码的规则抗体有更快解离常数的 V_H-V_{κ} 组合子更为有利。phOx 结合位点的晶体学结构揭示有一个深而窄的结合袋[32]。因此,对半抗原的结合意味着克服一个高活化的能量障碍。通过降低 K_{off} 而延长半抗原抗体复合物生命周期的点突变,Ox1 抗体的亲和力被提高。由于可更加迅速结合抗原 phOx,因而表达不同 V_H 和 V_{κ} 基因组合的 B 细胞具有动力学优势。表达像这样的 V_H 和 V_{κ} 基因组合的 B 细胞被选择进入记忆应答,指出了在免疫应答的成熟中结合常数的生物学意义。

已提出不同的机制来解释在初次和记忆应答之间观察到的库的漂移，像 B 细胞克隆的衰老或通过独特型网络的调节[9]。但没有一个给出了完全满意的解释。究竟什么驱动了库的漂移仍不清楚。

生发中心

对杂交瘤系表达的 V_H 和 V_L 序列的分析显示，在被抗原活化后的 14 天之内，抗原特异的 B 细胞群迅速发生改变。第一，库通过超变机制变得多样化；第二，高亲和力 B 细胞克隆被选择(图 25.3)。这些过程发生在何处？免疫后第一天，抗原活化的 B 细胞迁移到外周淋巴组织的初级滤泡，在此抗原特异 B 细胞的迅速克隆扩增导致形成生发中心(GC)[33~36]。对直接从冷冻组织切片分离的单个 GC 的分析已经证明：在 GC 微环境内增殖的 B 细胞经历了体细胞突变的过程，以致单个初始 B 细胞能产生变异的后代[37,38]。对抗原亲和力有改善的稀有突变体被选择并分化为记忆细胞或浆细胞[38~42]。

生发中心的结构

人扁桃体组织提供了典型的 GC 来源[43]。这些 GC 由 2 个区组成，暗区和明区(图 25.5)。暗区 B 细胞被称作中央母细胞，增值的发生就是在 GC 这一部分。明区 B 细胞被称为中央细胞，与滤泡树突细胞(FDC)紧密相关[44-47]，FDC 的长分支胞质突起形成一个致密的网络使 GC B 细胞缠在一起。与树突细胞[它们以结合到主要组织相容性复合体(MHC)II 类分子上的肽的形式呈递处理过的抗原]相反，FDC 结合完整的抗原抗体复合物。这些抗原抗体复合物通过补体或者 Fc 受体结合到 FDC 的表面[46]。人们认为对呈递到这些 FDC 表面的抗原的竞争可阳性选择高亲和力的突变体，允许它们分化为记忆细胞或浆细胞。GC T 细胞，大部分被限制在明区，主要是辅助性 $CD4^+$ 细胞，在细胞的分化过程中扮演重要角色[48]。那些没有被抗原选择的 B 细胞通过凋亡死去[49]，在主要位于明区与暗区边界的可染体(tingible body)巨噬细胞中能检测到细胞碎片。

868

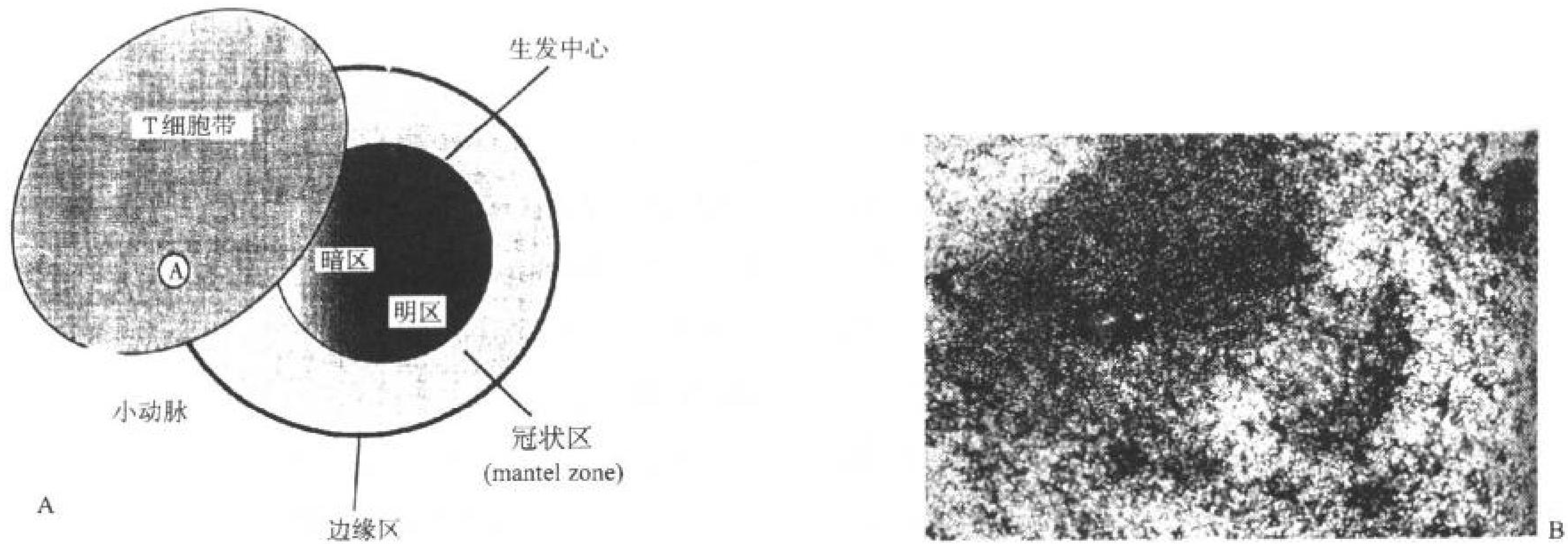


图 25.5　GC 的结构。脾组织切片(B)的图解说明(A)。phOx 免疫后 10 天制备脾组织切片。用抗 CD3 抗体染色显示 T 细胞主要位于小动脉周围淋巴细胞鞘。GC 的暗区为对增殖细胞的染色结果(浅阴影)，明区用特异性针对 FDC 的抗体染色(深阴影)[62]。在所有的例子中 GC 的暗区与 T 细胞带毗连，而明区则位于较远端。(S.A. Camacho 友情提供。)

生发中心发育所需的因子

GC 的发育是一个复杂的过程，对其仅有部分了解。然而，迄今为止许多重要的方面已被鉴定。例如，组织微结构的产生；B 细胞的活化；B 细胞的迁移；T/B 细胞的相互作用以及 FDC 网络的有效性。

组织的微结构

对于产生完整功能淋巴器官微结构所必需的分子和细胞相互作用远未明了。但是，利用基因敲除小鼠

试验已经确定了许多必需的元素。肿瘤坏死因子(TNF-α)、淋巴毒素(LT)、LTα、LTβ或任何它们的受体，TNFRI 和 TNFRRP(TNFRβ),这些分子中的任何一个基因被破坏[50~53]的动物,其淋巴器官发生是异常的。LTα或 LTβ被敲除的小鼠,脾白髓的T和B细胞带(初级滤泡)(图25.6)是紊乱的,这样,将没有GC的发育[50,53]。另一方面,如果TNF-α或TNFR1被敲除,脾的微结构似乎发育正常[51];然而,初级滤泡明显消失[52]。B细胞通过边缘血窦进入小动脉周围淋巴细胞鞘(periarteriolar lymphocyte sheath,PALS)似乎受阻。相反,B细胞似乎在边缘区聚集(脾白髓和红髓交界的地区)(图25.6)。边缘区血窦内皮细胞上表达的黏附分子的改变可能阻断了B细胞的迁移,因而阻止了初级滤泡的形成。而且,在TNF-α或TNFRI缺陷的小鼠,没有FDC网络的发育。但是,这种效应可能在功能性FDC网络的发育中是次要的,其发育依赖成熟B细胞的存在。B细胞缺乏小鼠或SCID小鼠,FDC网络缺失[54,55]。

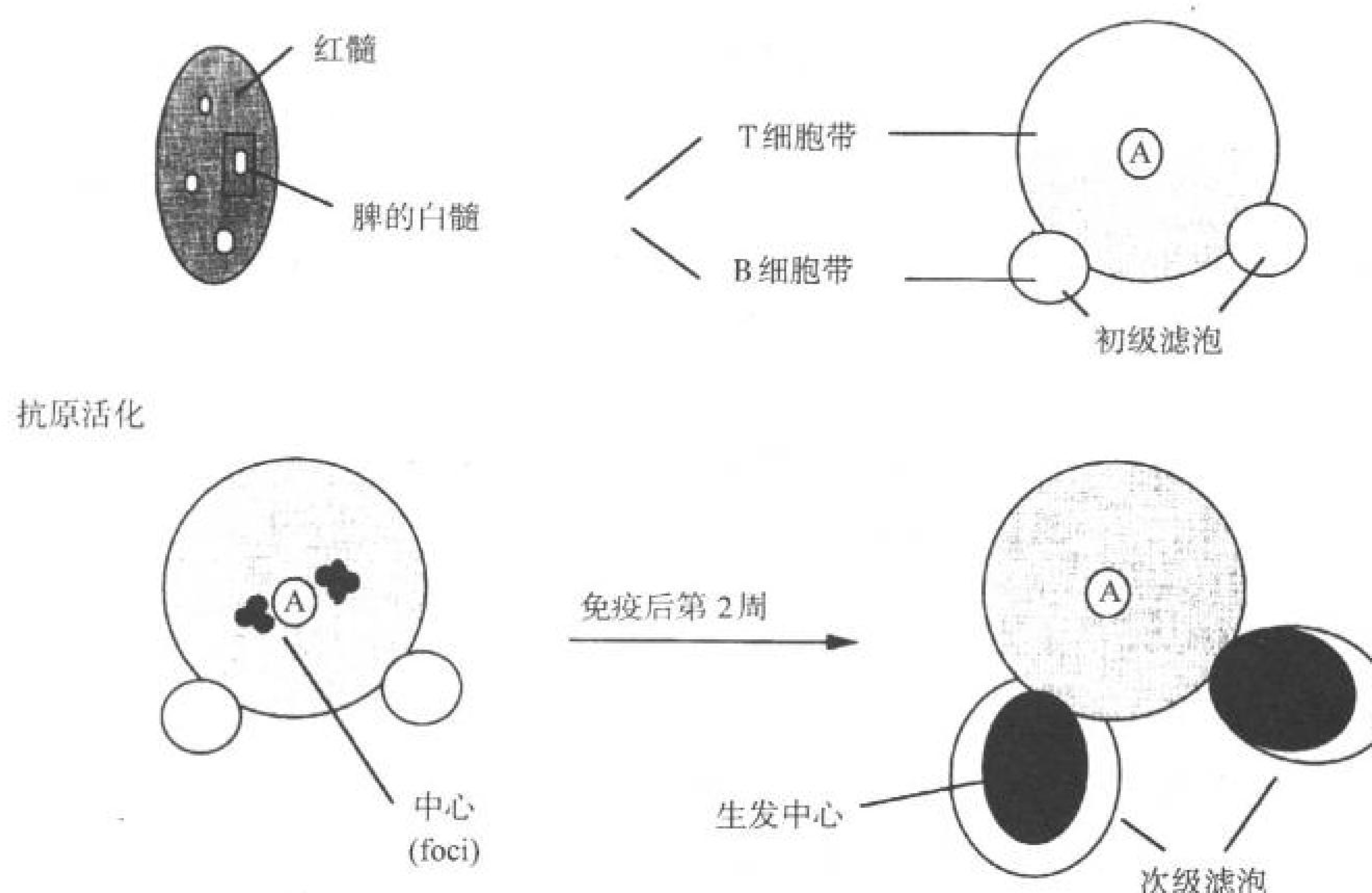


图25.6 脾的显微解剖学。脾的白髓,可分为T和B细胞区。T细胞位于PALS,而初始 IgD^+/IgM^+ B细胞驻留形成初级滤泡。免疫后,抗原活化B细胞的中心出现在小动脉周围。这些B细胞是短期存活的浆细胞前体,以T细胞依赖抗原免疫2周后,GC已经完全发育,初级滤泡变成了次级滤泡。

B细胞的活化

从初始B细胞活化到GC形成阶段,不仅需要通过抗原受体的信号,也需要CD21-CD19复合物的额外信号。CD21(补体受体CR2)遭到破坏的小鼠,GC的数目和大小均减少。当同系 $CD21^+$ B细胞被转入CD21缺陷的小鼠时,这种效应可被逆转,表明将抗原—补体复合物交联的抗原受体和补体受体增强了活化B细胞引发GC形成的能力[56]。

B细胞的迁移

小鼠GC B细胞的一个特性是它们可强有力地结合花生凝集素(PNA);因此,它们被称为 PNA^{hi} 细胞[57]。这提供了识别和分离GC B细胞的便利途径。人们用公认的趋化因子受体BLR1缺陷小鼠的脾进行了有趣的观察。当这些小鼠用T细胞依赖的抗原免疫,脾中有 PNA^{hi} B细胞发育,但没有形成GC。PNA^{hi} 细胞在T细胞区聚集,提示这些小鼠中B细胞由PALS迁出受损。

869

T细胞/B细胞的相互作用

GC仅在T细胞依赖的免疫应答中才见到,辅助分子与T和B细胞的相互作用对GC的正常发育至关重

要。高 IgM 综合征患者编码 CD40 配体的基因发生了突变,CD40 配体表达在 T 细胞上,是 T 和 B 细胞相互作用所必需的[59]。在这些患者,没有形成 GC,也没有 V 基因库因超变而致的多样性。而且,表达 IgM 的 B 细胞也不能转化为产生 IgG 的 B 细胞,提示类型转换也可能发生在 GC 内。CD40 和 CD40 配体并不是涉及到引发 GC 形成所必需的 T/B 细胞相互作用的惟一分子。B 细胞上 B7 和 T 细胞上的 CD28/CTLA-4 之间的相互作用似乎也是至关重要的[60]。当用 T 细胞依赖的抗原刺激时,B7-1 和 B7-2 均缺陷的小鼠不能形成 GC。在产生大量可溶性 CTLA-4 的转基因小鼠中,T/B 细胞的相互作用被抑制。这些小鼠也缺乏形成 GC 的能力,并表现出弱的免疫应答亲和力成熟[61]。

FDC 网络

FDC 网络对于 GC 建立和免疫应答的亲和力成熟是必需的。B 细胞和 FDC 的首次相互作用似乎是抗原非依赖性的,由 FDC 表面的诸如 ICAM-1 和 VCAM 等黏附分子介导[46]。这种相互作用可能通过促进初级滤泡中抗原活化的 B 细胞增殖而启动 GC 的形成。此外,体外培养表明当与 FDC 相互作用时,B 细胞会发生表型的改变[62]。MHC II 类分子的表达上调,B 细胞似乎更像母细胞样。而且,在 FDC 网络内增殖 B 细胞下调 IgD,这与 B 细胞在 PALS 内增殖相反,仅 IgM 呈阳性。但是,FDC 网络最重要的已知功能是将抗原-抗体复合物呈递到 B 细胞表面[63,64]。正是此功能驱动了高亲和力的体细胞突变被选择并存活下来的过程。因为与抗原的竞争决定了哪些 B 细胞可被选择分化为记忆细胞或浆细胞。

870

最后,FDC 网络作为抗原贮存库发挥作用。即使在 GC 反应已经平息后的数月,仍可检测到与 FDC 相关的抗原-抗体复合物[44]。人们认为这种抗原在记忆细胞的维持中起关键作用。

生发中心发育的动力学

当前的观点普遍认为在 T 细胞依赖的免疫应答中,B 细胞在 PALS 中被活化。免疫后不久,增殖 B 细胞的中心(foci)在小动脉附近变得明显(图 25.6)[66]。这些细胞中,部分将分化为分泌 IgM 抗体的浆细胞,而其他的可能迁移到初级滤泡成为 GC 反应的前体。从 PALS 和邻近的 GC 结构中分离的 B 细胞具有一致的 V(D)J 重排,这一发现支持上述观点[67]。另一种观点是初级抗体形成细胞和次级记忆细胞来自不同的前体。依据热稳定抗原(J11D)表达的不同,外周 B 细胞可分为 2 个类型。尽管 J11d^{lo}细胞是 GC 反应的前体,并可产生记忆细胞,J11d^{hi}细胞是初级抗体形成细胞的前体[68]。

免疫后 3~4 天,最先的几小簇增殖 PNA^{hi}B 细胞在 FDC 网络变得明显。在这一早期阶段,GC 并不表现典型的明区和暗区结构。事实上,所有的 PNA^{hi}结合 B 细胞均在 FDC 的网络内,尽管它们表达增殖细胞所特有的 Ki67 核抗原。

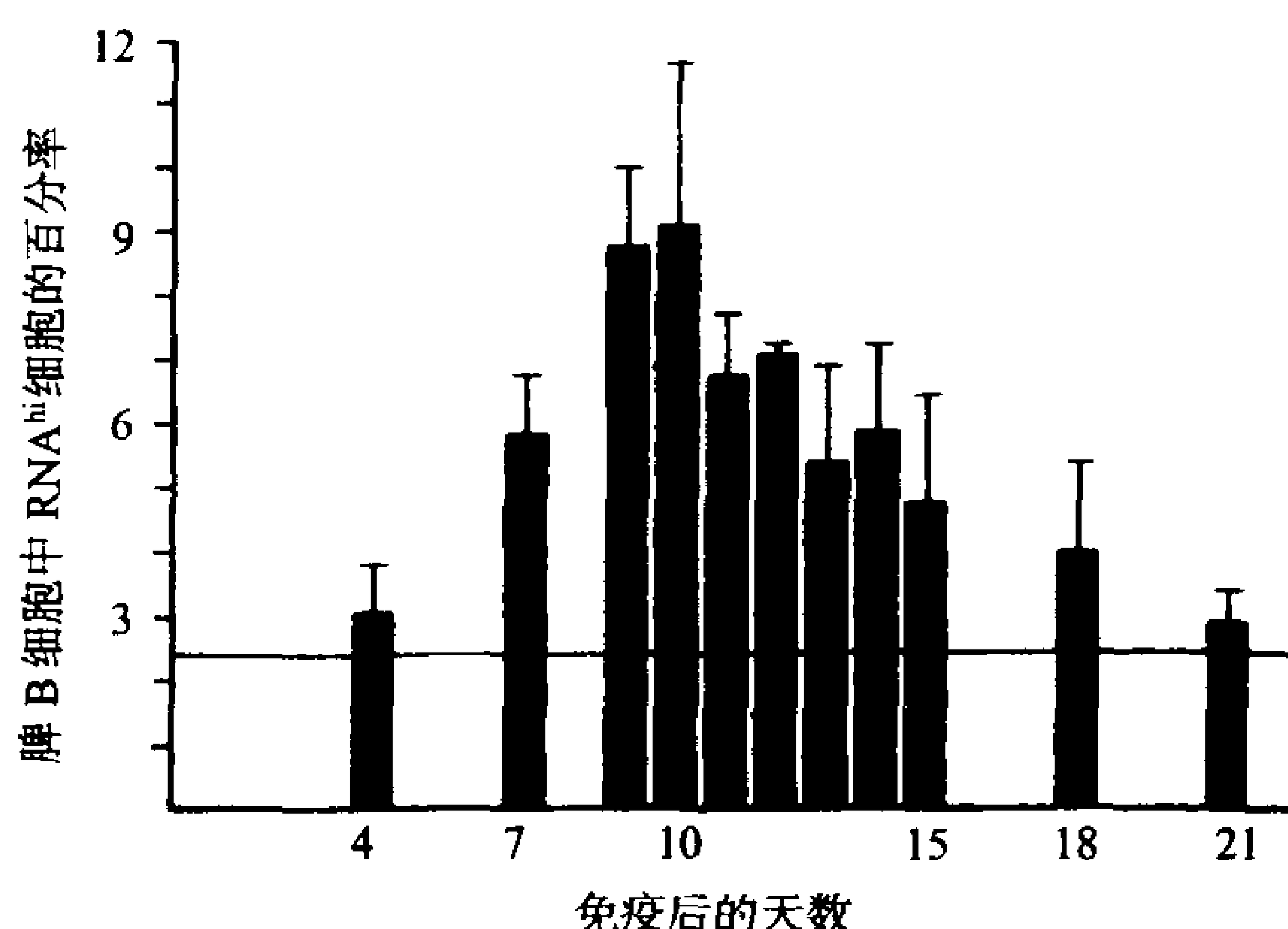


图 25.7　GC 反应的动力学。用 phOx 免疫小鼠,在不同天数内制备脾细胞。通过荧光活化细胞分选仪检测所有 B 细胞中 PNA^{hi}细胞的百分率。(经允许资料引自 Apel 和 Berek[72]。)

GC B 细胞快速增殖,细胞周期短达 6~8 小时[69~71]。仅 3 天,一个单细胞可发育成为 1000 个细胞的克隆,至第 8 天,FDC 网络已充满中央母细胞。初级滤泡中的 IgD$^+$/IgM$^+$ 初始 B 细胞被排出,形成所谓的冠状区(mantel zone)(图 25.5)。初级滤泡发育为次级滤泡。随后的几天,形成了有明区和暗区的典型 GC 结构,在 FDC 网络中很少见到中央母细胞,暗区似乎是纷乱复杂的。至第 15 天,GC 中所剩余的是充满了中央细胞的 FDC 网络,即使在这一 GC 反应的较晚阶段,FDC 网络中仍可检测到数群增殖的 B 细胞。

以 PNA 作为 GC B 细胞的标志,实验表明直到大约免疫后 10 天,PNA^{hi} 细胞的数目仍在增加[72]。

到这一时相点，大约 10% 的脾 B 细胞是 PNA^{hi}（图 25.7）。随后，PNA^{hi} 细胞迅速减少，大多数通过凋亡死亡。至免疫后 3～4 周，脾组织中仅见到残留的 GC。GC 反应平息了。

在生发中心内的亲和力成熟

对库的选择

尽管完全发育的 GC 是寡克隆的[73]，但反应可能始于被抗原活化的 B 细胞的一个异质群体。为了研究 GC B 细胞的多样性，Rajewsky 实验小组发展了一种技术，允许对从冷冻组织切片中直接分离的单个细胞进行分析[74]。用特异的抗体对人扁桃体 GC 的暗区和明区进行染色。挑出单个细胞，提取 DNA，重排的 V 区基因被扩增、克隆、测序[74]。暗区见到了较高程度的克隆多样性，支持 GC 随时间推移而变成寡克隆的说法。

相似地，对抗原 NP 免疫 C57/B16 的 GC 发育动力学分析表明，NP 特异 B 细胞的多样化群体参与了早期的 GC 反应[75]，但是至第 8 天，多数 B 细胞克隆表达 NP 特异性高亲和力抗体 V_H186.2/DFL16.1 的特性。有趣的是，仅这些序列积累了体细胞突变。

总之，这些数据提示即使当它们是低亲和力的时候，抗原活化的 B 细胞迁移至初级滤泡。似乎只有对抗原最高亲和力的 B 细胞才能在 GC 反应中成功建立克隆后代。其他细胞可能通过凋亡而死亡。以这种方式，开始相当的多克隆很快减少为寡克隆的 GC 发育。

生发中心 B 细胞库的多样化

在 1991 年，通过显微操作从一冷冻组织切片中分离到了单个的 GC，并测定了 V 基因库[37]。从这些 NP 特异的 B 细胞中提取 DNA，重排的 V_H186.2 基因通过 PCR 被特异扩增。多个有相同 V(D)J 重排的序列被分离，它们很可能源于单个的 B 细胞克隆。但是，这些序列之间的差别高达 9 个核苷酸。有些体细胞突变对所有的序列都是普遍的，而一些突变只在单一序列中见到。根据体细胞突变的方式可能绘出表示这一 B 细胞克隆的分段克隆内多样性家系树（图 25.8）。这些实验表明，GC 中的 B 细胞在增殖过程中，经超变机制引入了核苷酸置换，且这些突变以分段方式在 V 区积累。

用荧光活化的细胞分选方法分选不同的扁桃体 B 细胞群体，得到了 GC 中产生 B 细胞多样化的证据[76]。用一组可结合到不同 B 细胞上特异表面抗原（CD 抗原，分化簇）的单抗，5 个不同 B 细胞亚群被区分（表 25.1）。对这些群体中表达的 V 区基因的分析表明：仅在 GC（Bm3 和 Bm4 亚群）和记忆 B 细胞（亚群 Bm5）中见到了体细胞突变。这样，在从初始 IgD^+（亚群 Bm1 和 Bm2）转换为 IgD-GC B 细胞（亚群 Bm3 和 Bm4）之后即启动了超变机制。 871

表 25.1 扁桃体 B 细胞亚群

	IgD	CD38	CD77	体细胞突变	分化阶段
Bm1, Bm2	+	—		胚系	天然 B 白细胞
Bm3	—	+	+	突变的	中央母细胞
Bm4	—	+	—	突变的	中央细胞
Bm5	—	—		突变的	记忆 B 细胞

在荧光活化细胞分选中，CD38 被用来作为人 GC 细胞的标志，CD77 区分中央母细胞和中央细胞。IgD 的表达被用作初始 B 细胞的标志（资料摘自参考文献[76]）。

生发中心的亲和力选择

抗体序列中引入氨基酸置换可能是无效的，或可能导致抗体对该抗原亲和力的改变。从对 V 区多样性 872

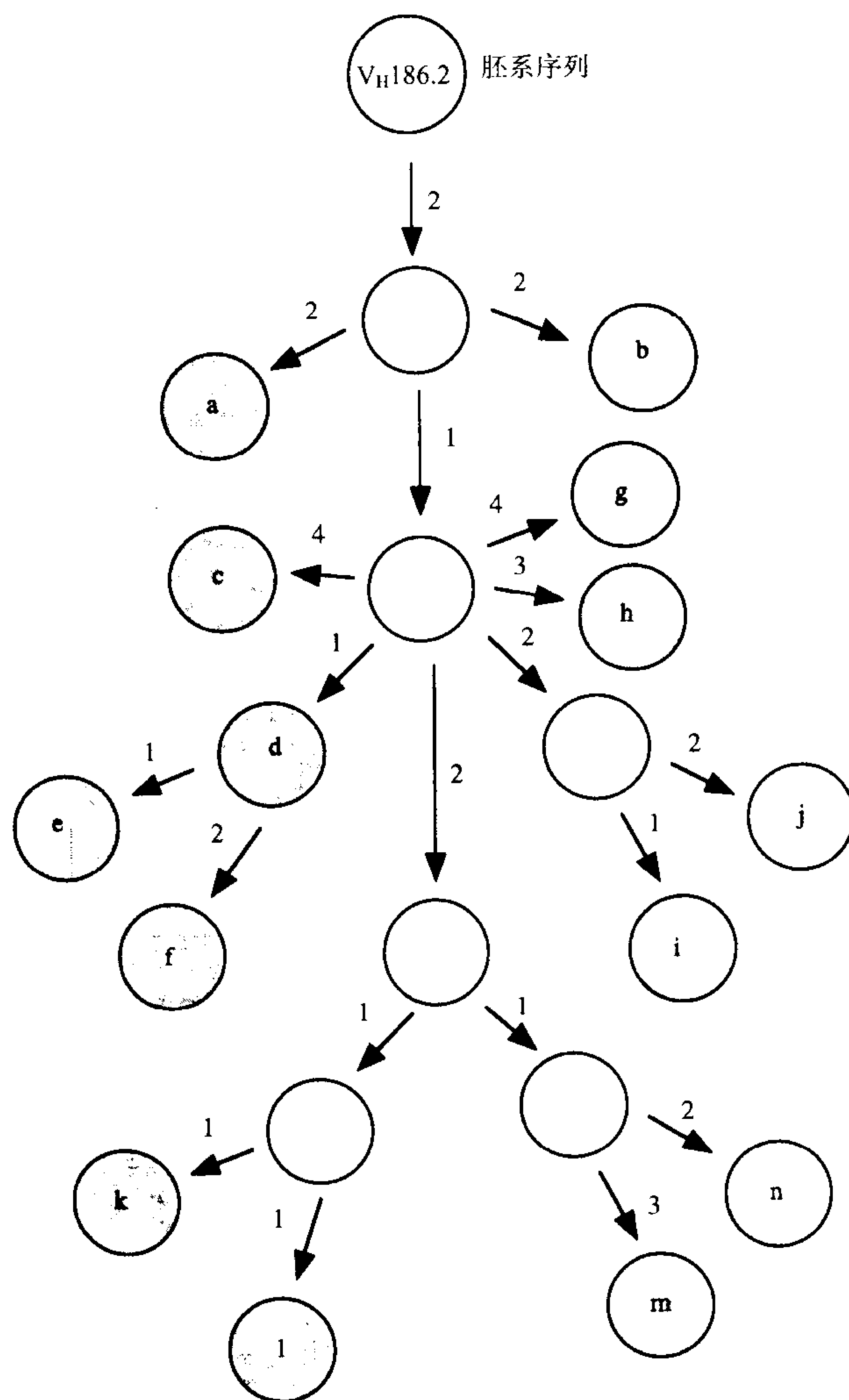


图 25.8 GC B 细胞中 V 基因序列的克隆内多样性。图中显示了体细胞突变的分段积累。阴影环表示分离的序列。开放环代表假定的中间体。箭头旁边的数字表示额外体细胞突变的数目。(资料经允许引自 Jacob 等。)

的评价及对突变方式的分析中,Weigert[77]得出结论:多数替代突变对于抗体的亲和力都是不利的。改变了蛋白正确折叠能力的突变将导致结构上无功能抗体的产生。而且,无意突变、插入或缺失可能阻止蛋白质的表达。CDR 中的替代突变可能降低对抗原的亲和力,或导致产生与母系细胞系特异性不同的抗体。CDR 中的这些替代突变,或甚至 FR 中的,抗原亲和力改善的相当稀少。因此,若没有强有力地选择,基于体细胞突变的免疫应答的亲和力成熟将是不可能的。

对抗原 phOx 免疫小鼠脾组织中分离的单个 GC 进行分析,得到了一个有趣的结果[38]。在许多 GC 中,所有的 V_κOx1 序列,CDRI 都携带有关键突变:从 His 到 Asp 的置换,这可使亲和力系数增加 10。这些数据表明,带有增加了抗原亲和力的体细胞突变的 B 细胞获得了比其他细胞优先增殖的权力。这样,GC 中的 B 细胞克隆从稀少细胞经快速扩增而得到发育,这些稀少细胞经过体细胞突变提高了对抗原受体的亲和力。

对这种有效亲和力选择的一种解释是 GC 周期中的细胞在各个时相间超变机制的开和关[78]。在增殖过程中,产生了不同亲和力的变异体,之后与 FDC 表面呈递抗原接触,在此选择将发生。尽管多数 GC 细胞通过凋亡而死亡,但少数高亲和力的突变体被选择分化为记忆细胞或浆细胞。另外,被选择的细胞可能重新进入增殖周期,多样化,然后重新进行选择。就像瞄准顶峰,然后通过崎岖的地形徒步前进一样,通过多个细小的步骤获得高亲和力的受体[79]。

某一特定突变被引入 V 区某一特定位置的机会很低,假定超变是随机的机制,V_kOx1 轻链的 CDRI 中 34

位的 His 转变为 Asp 的概率为 1/900。已知超变仅在免疫后第二周才被活化[39,40,75]，GC B 细胞克隆可能达到一定数量，使得某个细胞获得增强亲和力的突变成为可能。这些即是被选择接管 GC 并分化为记忆细胞或浆细胞的细胞。

关于选择的机制知之甚少。免疫后不久，高浓度的抗原将被呈递，并活化高、低亲和力受体的 B 细胞。最初认为低浓度下，抗原仅能被带有高亲和力受体的 B 细胞捕获[1]。这被认为导致了不同突变受体对抗原的强有力的竞争。随着发现结合到 FDC 表面的复合抗原而非游离抗原指导亲和力成熟，这种概念有待于修正。很可能，竞争事实上仅仅是为了接近免疫复合物中的抗原。另一方面，B 细胞可能从这些复合物中清除抗原，内在化和加工它，然后以与 MHC II 类抗原相关的方式表达在其表面。这些 B 细胞能独占可得到的 T 细胞的辅助。

分泌高亲和力抗体的浆细胞的发育

对抗原成功的 B 细胞应答涉及到初始 B 细胞发育成两种高度分化的细胞类型。它们是合成和分泌抗体的浆细胞，以及提供建立再次应答途径的记忆细胞。此节中我们将探讨浆细胞被选择的方式。

正如我们所见到的，在免疫后的最初几天，抗原活化的 B 细胞迁移到脾的 T 细胞区。并观察到了 B 细胞增殖的中心与 PALS 有关(图 25.6)[66]。许多这些 B 细胞将分化为浆细胞，它们分泌未突变的 IgM 型抗体，通常亲和力较低。但是，这些早期抗体对有机体的存活可能是必需的。它们是抗原特异的一级防御线，为 T 细胞依赖的免疫应答的建立提供了时间。在应答的第二周期间，当初级滤泡发育成为含次级滤泡的 GC 时，这些中心是纷乱的[66,67]。

分泌高亲和力抗体的浆细胞在 GC 中发育。通过使高亲和力突变体早期选择性地分化为抗体分泌细胞，血清抗体的亲和力成熟在初次应答时即发生。至免疫后 14 天，高亲和力的浆细胞出现在骨髓[42]。它们似乎负责初次免疫应答中长期产生高亲和力的抗体。

从骨髓浆细胞[42]及从源于免疫后 2 周的脾组织的杂交瘤细胞系[26]分离的 V 区序列，仅携带有少数体细胞突变。然而，提高了亲和力的突变体事实上存在于所有的序列中。相反，在同一时相点源于 PNA^{hi} 细胞的序列显示：①存在更高频率的体细胞突变；②仅其中一部分带有提高了亲和力的突变体[39]。这些数据提示在应答早期，当有高亲和力受体的首批 B 细胞在 GC 产生时，它们中某些可被选择分化为浆细胞。与抗原的高亲和力相互作用似乎关闭了超变机制，这些细胞被推入一种分化途径。以这种方式，系统保证在最短的时间内产生分泌高亲和力抗体的浆细胞。

在遭受细胞病变病毒(cytopathic virus)感染的过程中，如水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus)，注射后第一周即可见到中和抗体。这些早期抗体有惊人的高亲和力[21]。它们表现出 10^{-9} 数量级的结合亲和力。更为惊奇的是，重和轻链的 V 区缺乏体细胞突变。似乎在进化过程中，一个允许快速形成高亲和力的 V 基因库被选择了。在免疫应答的后期阶段分离到的 IgG 序列，其 V 基因中积累了体细胞突变。中和能力大约比早期初次应答抗体高 2 个数量级。

异位生发中心

GC 可能不仅在脾、扁桃体、派尔集合淋巴结(Peyer's patches)及其他外周淋巴器官中发育，而且在某种情况下，也在非淋巴组织中发育。许多自身免疫性疾病，在感染组织中发现了 GC 样结构：桥本甲状腺炎的甲状腺[80]、重症肌无力患者的胸腺和 Sjogren 综合征患者的唾液腺[82]。通过直接分离 GC 样结构和分析重排的 V 区基因，表明在风湿症患者的滑膜组织也存在 GC 反应。序列分析显示在克隆相关的 B 细胞中体细胞突变分段积累，表明滑膜组织的 GC 样结构中 B 细胞增殖并经历了超变[83]。

873

在这些 GC 样结构中，典型的暗区和明区不明显。FDC 网络存在于中央。正如所预期的，FDC 的网络中存在 B 细胞，但通常在明区发现的 $CD4^+$ T 细胞却消失。

慢性炎症组织炎性细胞因子的过量产生可能提供了异位 GC 样结构发育的环境。局部过度表达 LT 诱

导了 GC 的发育与这一解释相符。

体细胞超变

超变的定义

突变如何被引入到重排的 V 区基因？一种可能是基因的转换[85]，一种在鸡中产生初级 V 区基因库的机制[86,87]。此处，尽管可得到许多假基因，但仅存在 1 个功能性 V 基因。库由基因转换产生，即将假基因序列的短片段复制到功能 V 基因中。在兔中，非常相似的系统被用于产生初级库[88]。但是，基因转换不可能是体细胞超变背后的机制。所有的证据都支持体细胞超变机制，将单个核苷酸置换逐步引入到重排的 V 区基因中。尽管人的序列中有轻微的突变聚集成簇的倾向[89]，但单个的核苷酸置换是最常观察到的改变。而且，在体细胞多样化过程中，对可能作为供体序列的基因广泛研究均失败了。

超变是一个高度调节的过程。通常，仅在抗原活化 B 细胞后，超变才被打开[90]，尽管绵羊 B 细胞发育产生多样化初级库过程中，核苷酸置换就被引入到重和轻链的 V 区[91]。用丝裂原如 LPS，或用 T 细胞非依赖性抗原如细菌多糖激活 B 细胞[92]，将导致增殖和分化，但不能导致体细胞突变的积累，并且没有亲和力成熟[93]。因此，B 细胞增殖单独不足以诱导超变。同时经 B 细胞自身抗原受体及经 CD21 刺激，发现补体受体是必需的[56]，T 细胞辅助[48]及与 FDC 网络的相互作用也是必需的[46]。只有那样，GC 微环境才能建立，这对于亲和力成熟是必需的。

以被认为大约高于自发突变背景率百万倍的频率，超变将核苷酸置换引入重组的 V 区基因。很难计算真实的超变率。许多均是可变的，如细胞分裂时间、超变的活化期、可选择的突变产生的频率等。而且，不清楚是否突变率是恒定的，或在高超变率和低超变率阶段之间细胞是否波动(oscillate)。有趣的是，尽管计算的方法相当不同[11,24,94]，但平均的超变率达 10^{-3} 数量级/碱基对/细胞代是普遍认同的。因为 V 区的长度大约是 300 个核苷酸，这意味着每三次分裂就有 1 个核苷酸被引入到重链的 V 区，1 个被引入到轻链的 V 区。

超变是一个高度特异的机制。仅在重排的 V 区[95~97]及其 3′和 5′侧翼序列中[97~100]见到置换。靶序列大约 1500 个核苷酸的范围，被认为是突变区域(图 25.9)[101]。图 25.9 显示，体细胞突变的频率在重组的 V 区

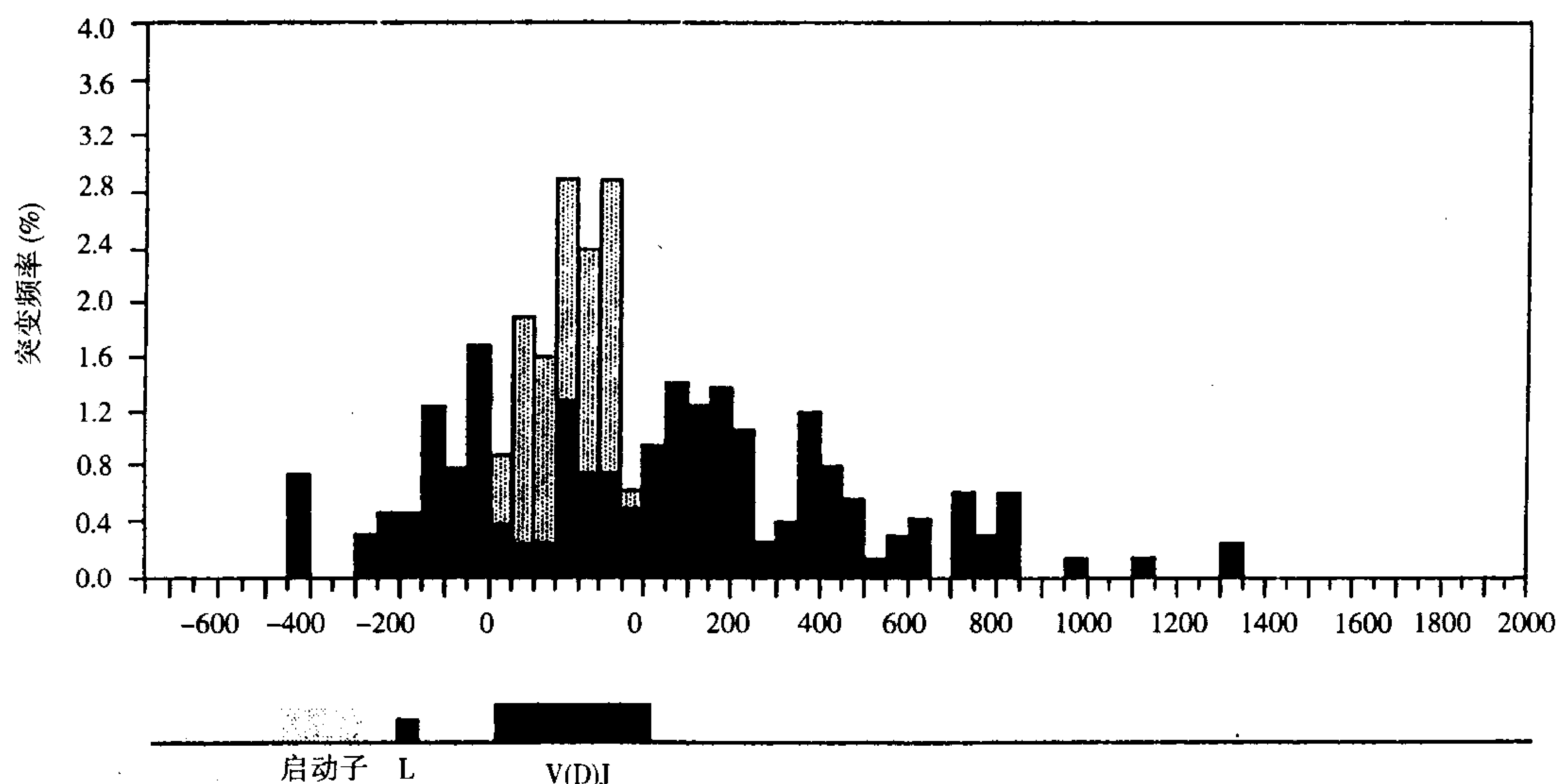


图 25.9 超变区。数据来自重排到不同 J 基因片段的 $17V_H$ 和 V_κ 片段汇编结果[98]。底部图表示启动子，先导序列(leader)和 V(D)J 基因的位置。图的横座标数字如下：负数对应于 5′侧翼核苷酸；编码区没有标出数字，但代表 350bp；正数对应于 3′侧翼核苷酸。横座标表示平均 50 个核苷酸增量中每碱基对突变的频率。黑色条代表侧翼区突变的频率，亮斑点条代表突变，黑斑点条示沉默替换。

基因最高，在邻近的侧翼区序列则下降。体细胞突变的5′边界在先导内含子（leader intron）内，在转录起始位点上游仅能见到极少的突变[99]。恒定区的基因通常没有体细胞突变。一个例外是小鼠的 Cλ1 基因，有报道其中有为数不多的体细胞突变[100]。这一恒定区基因通常与 J 区片段接近，以致体细胞突变有可能轻微的溢出，导致 V 和 C 区的置换。

体细胞超变的作用靶点无需特殊结构特征的 V 基因序列。将 V 基因序列用 C 区，或用完全无关的 DNA 序列，如人 β 球蛋白基因，果蝇内含子 DNA，细菌 *neo* 或 *gpt*，甚至人工序列[101-105]替代。在所有这些情况下，突变均以相似的突变率引入到原先的 V 区序列。

体细胞突变的分析

重排 V 区基因内的每一个碱基有同等的突变几率吗？因为从高亲和力 B 细胞 V 区所见到的体细胞突变模式被高强度的选择，这些序列不能给我们一个确切的突变特异性图像。为了理解此机制，不得不分析序列中那些没暴露于选择压力下的体细胞突变模式。实例是侧翼区序列[97-100]，作为旁观者效应取自体细胞突变的没被选择过的客转基因[106,107]，和无功能的重排 V 区[108]。表 25.2 显示了过客转基因中所见到的没选择的体细胞突变的分布[106]。很清楚，转换（A↔G 和 C↔T 置换）比颠换（A→C 或 T，G→C 或 T，T→A 或 G，和 C→A 或 G）更频繁。而且，对编码链评定，G 碱基置换比 C 碱基更频繁，A 比 T 更频繁。这种对嘧啶的置换偏差不能归因于 V 区基因不均衡的碱基组成。此现象在来自抗原未选择的和选择的 B 细胞 V 区基因序列中均被观察到[12,15,26,27,76]。这提示超变机制能区分 2 条链：人们在超变机制中谈到的链偏差。链偏差不仅在 Ig 基因中观察到，当 1 个 neo 基因被插入到 V 基因位置，其也被见到，这意味着这种影响不是序列特异的[103]。

874

表 25.2　过客转基因中的替换

从	到				观察到的突变/%
	A	G	C	T	
A	–	46	29	25	33(33)
G	68	–	24	8	35(38)
C	20	0	–	80	21(18)
T	14	14	72	–	10(11)

过客转基因编码链中体细胞突变被分析。对于 4 个碱基中的每一个，碱基替换数目以占总数百分率的形式给出。考虑到在 V 区基因中分析以不同频率出现的这 4 个碱基，括号中给出了准确的值（资料来自参考文献[106]）。

像我们已经见到的，对于 1500 碱基对的突变区的定义，精确的 DNA 序列不是决定性的。对 V 区序列没有任何特异性。然而，当人们近看突变模式，它变得更清晰：在这个区内初始序列对体细胞突变的分布确实有影响。对每一个可能的三联体的可突变性的比较显示：一些三联体密码（体细胞突变的热点）比另外一些（冷点）更可能被当作靶位点[101,109]。其中一个对超变偏爱的靶是共有序列 RGYW（R = A 或 G；Y = C 或 T；W = A 或 T）。它覆盖了所描述的第一个热点，许多 V 区基因的第一 CDR 的丝氨酸 31 的 AGY 密码子。在选择和未选择序列中第二个残基，G，频繁地被改变为 A 或 C（AGY→ACY 或 AAY）。通过 DNA 测序这个热点至少部分被限定。AGC 三联体被同样编码丝氨酸的 TCA 替代，将此位点变为冷点[110]。

CDR 经常是体细胞突变的热点[91,106]。例如，当观察 AGY 和 TCN 丝氨酸密码子在 V 区基因的分布时，我们发现 CDR 内 AGY 超过 TCN 丝氨酸而占有优势[111]。看起来似乎 CDR 已经以这样一种方式进化：体细胞突变机制偏爱将突变靶向到 V 区基因的这个部分。

对于每一个三联体，我们可以计算替代（R）沉默突变（S）的预期比率。例如，编码甘氨酸的三联体是 GGx。9 个可能的核苷酸替代中的 6 个导致氨基酸替代突变，得到 R/S 值为 2(6/3)。另一方面，组氨酸（CAC）可能的置换中 8/9 导致氨基酸的改变，比例为 8(8/1)。对 V 区序列的分析表明，CDR 的进化选择中密码子的使用导致了高比例的 R/S 突变。以这种方式，氨基酸的改变被引入到编码结合位点 V 区的这些部位更有可

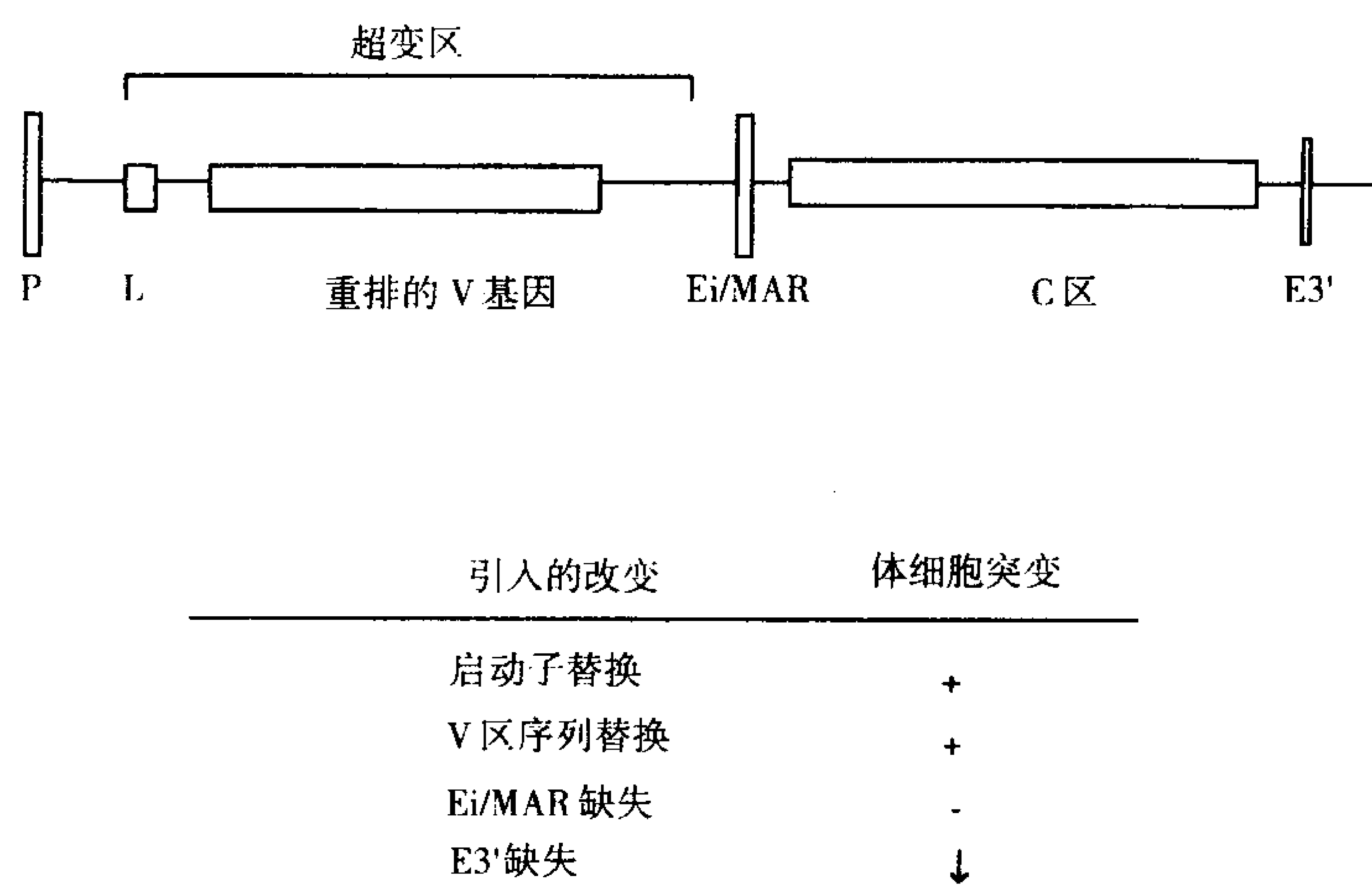
能。

V 区 FR 和 CDR 中 R/S 的比例经常被作为亲和力成熟的间接标志。热点旁边,体细胞突变被随机引入。随机分布的任何偏差可被认为是选择机制发挥作用的指针。但是,对这种数据的解释必须小心。原则上说,期望 FR 中低比例的替代突变以便保持三维结构。但在 CDR 中,或高或低的值可能是阳性抗原选择的指针。在某些位置,氨基酸改变是不利的,期望对于替代突变发生阴性选择,沉默突变发生阳性选择。这种情况下,沉默突变均匀地在 CDR 中积累[24]。

875

超变机制的调控

胚系表达一个额外 V 区基因的转基因小鼠已被用于分析将超变机制靶向到 V 区基因所必需的顺式作用元件(图 25.10)。应用 Igκ 转基因的不同构件体,发现 2 个元件对有效超变是必需的:启动子[112]和转录增强子序列,3′增强子(E3′)和内含子 - 增强子(Ei)/基质黏附区(MAR)[113]。E3′的缺失仅仅导致体细胞突变数目的减少。序列依然突变。相反,Ei/MAR 区域缺失后,未检测到体细胞突变[113]。



引入的改变	体细胞突变
启动子替换	+
V 区序列替换	+
Ei/MAR 缺失	-
E3'缺失	↓

图 25.10 顺式作用元件对 κ 转基因超变的影响。对于超变的活化作用,活性启动子(P)和 Ei/MAR 的存在是必要的[101]。当 E3′缺失时体细胞突变的数目减少(↓)。

启动子本身似乎并不含超变机制活化所必需的任何特异序列。用 β 球蛋白最小启动子替代 V 基因启动子的构件体仍然可引起突变。但无活性 Ig 启动子对于驱动突变是无效的,提示一个有活性的启动子对于超变是必需的[105]。当这些元件分别被插入 C 区序列 5′或 3′端时,启动子和 Ei/MAR 区域对于超变机制靶向的重要性被强调。通过在 C 区上游插入一个新的转录起始位点,则 C 区聚集了大量的体细胞突变。

因为 V 区序列 5′端的一个区域限定了超变区域的起始部位,似乎很可能在这里,引入作用将 1 个突变因子带入基因中。将先导序列和 V_κ 胚系基因分开的内含子中有这样一个序列[114]。然而,V_H 胚系基因的内含子区域内不能检测到一个相同的序列。

超变机制

在增殖的细胞中超变机制被活化。因而,最初认为这一机制与 DNA 复制相联系。Brenner 和 Milstein[115]起初提示,超变可能来自错误倾向的 DNA 合成。推测一个 DNA 聚合酶缺乏 3′到 5′的核酸外切酶的校正活性,因而很可能导致错配掺入。为了解释体细胞突变的链偏差,提出了一个在 DNA 复制时可以将超变靶向到前导链或滞后链的机制。但是,在试图将超变与特定 DNA 聚合酶活性相联系时却没有成功。

许多观察暗示超变是一种转录过程中被活化的错配倾向 DNA 修复机制的形式:①超变依赖于活化的启

动子[105~112];②超变区域起始于启动子区域的下游[97~99];③转录增强子序列对于超变是必需的[113];④存在链偏差[101]。尽管转录可产生 mRNA 的错误,人们通常认为这种错误不是 DNA 的突变。这样,问题就出现了:体细胞突变是如何被特异性引入重排的 V 区基因及其侧翼序列。一种观点是,内含子增强子/MAR 区域的序列可能启动了区域性的单链缺刻。为了使转录继续进行,这些损害必须被修复。一种错误倾向 DNA 聚合酶被募集以完成此工作。在修复过程中,单核苷酸的错配被引入转录的 DNA 链[101]。另一种可能性是与转录起始复合物相关的一种突变因子[112]。这种突变因子干扰了 RNA 聚合酶Ⅱ,在无 DNA 损伤的情况下,诱导了转录酶的终止。一种无偿的(gratuitous)转录偶联修复机制[112]可能在被转录的 DNA 链中引入突变。只有在细胞分裂后,引入到 DNA 链的错配在子细胞中才被作为体细胞突变固定下来。突变区域的大小将预测在转录起始位点的下游大约 2000 个核苷酸之后,RNA 聚合酶的终止不会发生。

876

尽管经过深入细致的努力,仍未了解体细胞超变的机制。所缺乏的是研究这一机制的体外系统。近来,经与 Ig 受体交联,通过活化 Burkitt 淋巴瘤细胞系在体外起动超变机制成为可能。通过与活化的 T 细胞系共培养,B 细胞将增殖并积累体细胞突变[116]。这样的体外系统将有助于阐明长期探寻的超变机制。

结论

自 Flemming 首次注意到淋巴组织中滤泡大量增殖的区域,至今仅过去 100 多年。因为他认为白细胞是在那里产生的,所以称这些区域为生发中心。如今我们知道这种解释仅部分正确,因为成年人的初始 B 细胞是在骨髓而非外周淋巴组织产生。然而,生发中心的确是成熟的、高亲和力 B 细胞产生的地方。

“亲和力成熟”一词最初在 20 世纪 60 年代被引入,以描述体液免疫应答中亲和力随时间的推移而典型增强的现象。从那以后,我们已了解了许多关于导致高亲和力 B 细胞产生的分子和细胞过程。但是,正如这一简短的综述所显示的,有许多问题仍待解决。超变机制的分子基础以及允许亲和力成熟所需的细胞相互作用本质仍了解不多。在探明产生生发中心特异的微环境以及在描绘 B 细胞活化、迁移入初级滤泡、最终选择性地分化为高亲和力的效应细胞或长期的记忆细胞所必需的细胞间的联络和信号方面已取得了进展。但在这些基本过程被完全弄清楚之前还有许多余下的工作要做。生发中心及在其中所发生的过程仍将是未来许多年极具吸引力的研究领域。

(郭 波 译)

参 考 文 献

1. Siskind GW, Benacerraf B. Cell selection by antigen in the immune response. *Adv Immunol* 1969;10:1–50.
2. Burnet FM. *The clonal selection theory of immunity*. London: Cambridge University Press, 1959.
3. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575–581.
4. Nussenzweig V, Benacerraf B. Quantitative variations in the L chain types in guinea pig antihapten antibodies. *J Exp Med* 1966;124:805–818.
5. Weigert MG, Cesari IM, Yonkovitch SJ, Cohn M. Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody. *Nature* 1970;228:1045–1047.
6. Bernard O, Hozumi N, Tonegawa S. Sequences of mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic changes. *Cell* 1978;15:1133–1144.
7. Han S, Zheng B, Schatz DG, Spanapoulou E, Kelsoe G. Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells. *Science* 1996;274:2094–2097.
8. Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of immunological interest. Bethesda, MD: NIH Publication, 1991.
9. Berek C, Milstein C. The dynamic nature of the antibody repertoire. *Immunol Rev* 1988;105:5–26.
10. Davies DR, Sheriff S, Padlan EA, Silverton EW, Cohen GH, Smith-Gill SJ. Three dimensional structures of two Fab complexes with lysozyme. In: Smith-Gill SJ, Sercarz EE, eds. *The immune response to structurally defined proteins: the lysozyme model*. Schenectady, NY: Adenine Press, 1989.
11. Allen D, Cumano A, Dildrop R, et al. Timing, genetic requirements and functional consequences of somatic hypermutation during B-cell development. *Immunol Rev* 1987;96:5–22.
12. Weiss U, Zoebelein R, Rajewsky K. Accumulation of somatic mutants in the B cell compartment after primary immunization with a T cell-dependent antigen. *Eur J Immunol* 1992;22:511–517.
13. Weiss U, Rajewsky K. The repertoire of somatic antibody mutants accumulating in the memory compartment after primary immunization is restricted through affinity maturation and mirrors that expressed in the secondary response. *J Exp Med* 1990;172:1681–1689.
14. Wysocki L, Manser T, Gefter ML. Somatic evolution of variable region structures during an immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:1847–1851.
15. Manser T, Wysocki LJ, Margolies MN, Gefter ML. Evolution of antibody variable region structure during the immune response. *Immunol Rev* 1987;96:141–162.
16. Gearhart PJ, Johnson ND, Douglas R, Hood L. IgG antibodies to phosphorylcholine exhibit more diversity than their IgM counterparts. *Nature* 1981;291:29–34.
17. Stenzel-Poore MP, Rittenberg MB. Clonal diversity, somatic mutation, and immune memory to phosphorylcholine-keyhole limpet hemocyanin. *J Immunol* 1989;143:4123–4133.
18. Chien NC, Pollock RR, Desaymard C, Scharff MD. Point mutations cause the somatic diversification of IgM and IgG2a anti phosphorylcholine antibodies. *J Exp Med* 1988;167:945–973.
19. Kocks C, Rajewsky K. Stepwise intraclonal maturation of antibody affinity through somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:8206–8210.
20. Clarke SH, Staudt LM, Kavaler J, Schwartz D, Gerhard WU, Weigert MG. V region gene usage and somatic mutation in the primary and secondary reponses to influenza virus hemagglutinin. *J Immunol* 1990;144:2795–2801.
21. Kalinke U, Bucher EM, Ernst B, et al. The role of somatic mutation in the gen-

eration of the protective humoral immune response against vesicular stomatitis virus. *Immunity* 1996;5:639–652.
22. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495–497.
23. Hamlyn PH, Browniee GG, Cheng CC, Gait MJ, Milstein C. Complete sequence of constant and 3′ noncoding regions of an immunoglobulin mRNA using the dideoxynucleotide method of RNA sequencing. *Cell* 1978;15:1067–1075.
24. Berek C, Milstein C. Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunol Rev* 1987;96:23–41.
25. Kaartinen M, Griffiths GM, Markham AF, Milstein C. mRNA sequences define an unusually restricted IgG response to 2-phenyloxazolone and its early diversification. *Nature* 1983;304:320–324.
26. Griffiths GM, Berek C, Kaartinen M, Milstein C. Somatic mutation and the maturation of the immmune response to 2-phenyloxazolone. *Nature* 1984;312:271–275.
27. Berek C, Jarvis JM, Milstein C. Activation of memory and virgin B cell clones in hyperimmune animals. *Eur J Immunol* 1987;17:1121–1129.
28. Siekevitz M, Kocks C, Rajewsky K, Dildrop R. Analysis of somatic mutation and class switching in naive and memory B cells generating adoptive primary and secondary responses. *Cell* 1987;48:757–770.
29. Dell CL, Lu YX, Claflin JL. Molecular analysis of clonal stability and longevity in B cell memory. *J Immunol* 1989;143:3364–3370.
30. Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A, Wolfowicz CB, Rothstein TL, Weigert MG. The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. *Nature* 1987;328:805–811.
31. Berek C, Griffiths GM, Milstein C. Molecular events during maturation of the immune response to oxazolone. *Nature* 1985;316:412–418.
32. Foote J, Milstein C. Kinetic maturation of the immune response. *Nature* 1991;352:530–532.
33. Coico RF, Bhogal BS, Thorbecke GJ. Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. *J Immunol* 1983;131:2254–2257.
34. Rouse RV, Reichert RA, Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. Localization of lymphocyte subpopulations in peripheral lymphoid organs: directed lymphocyte migration and segregation into specific microenvironments. *Am J Anat* 1984;170:391–405.
35. Nieuwenhuis P, Opstelten D. Functional anatomy of germinal centers. *Am J Anat* 1984;170:421–435.
36. MacLennan IC, Gray D. Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. *Immunol Rev* 1986;91:61–85.
37. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 1991;354:389–392.
38. Ziegner M, Steinhauser G, Berek C. Development of antibody diversity in single germinal centers: selective expansion of high-affinity variants. *Eur J Immunol* 1994;24:2393–2400.
39. Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 1991;67:1121–1129.
40. McHeyzer-Williams MG, McLean MJ, Lalor PA, Nossal GJ. Antigen-driven B cell differentiation in vivo. *J Exp Med* 1993;178:295–307.
41. Liu AH, Jena PK, Wysocki LJ. Tracing the development of single memory-lineage B cells in a highly defined immune response. *J Exp Med* 1996;183:2053–2063.
42. Smith KGC, Light A, Nossal GJV, Tarlington DM. The extent of affinity maturation differs between memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *EMBO J* 1997;16:2996–3006.
43. Liu Y-J, Johnson GD, Gordon J, MacLennan IC. Germinal centres in T-cell–dependent antibody responses. *Immunol Today* 1992;13:17–21.
44. Nossal GJV, Ada GL. *Antigens, lymphoid cells and the immune response.* New York: Academic Press, 1971.
45. Mandel TE, Phipps RP, Abbot A, Tew JG. The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev* 1980;53:29–59.
46. Schriever F, Nadler LM. The central role of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *Adv Immunol* 1992;51:243–284.
47. Rademakers LHPM. Dark and light zones of germinal centres of the human tonsil: an ultrastructural study with emphasis on heterogeneity of follicular dendritic cells. *Cell Tissue Res* 1994;269:359–368.
48. MacLennan ICM. Germinal centers. *Ann Rev Immunol* 1994;12:117–139.
49. Liu Y-J, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 1989;342:929–931.
50. De Togni P, Goeller J, Ruddle NH, et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 1994;264:703–707.
51. Matsumoto M, Mariathasan S, Baranyay F, Peschon JJ, Chaplin DD. Role of lymphotoxin and the type I TNF receptor in the formation of germinal center. *Science* 1996;271:1289–1291.
52. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNFα-deficient mice: a critical requirement for TNFα in the formation of primary B cell follicle, follicular dendritic cell networks and germinal centres, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996;184:1397–1411.
53. Koni PA, Sacca R, Lawton P, Browning JL, Ruddle NH, Flavell RA. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins α and β revealed in lymphotoxin b–deficient mice. *Immunity* 1997;6:491–500.
54. Cerny A, Zinkernagel RM, Groscurth P. Development of follicular dendritic cells in lymph nodes of B-cell–depleted mice. *Cell Tissue Res* 1988;254:449–454.
55. Yoshida K, van den Berg TK, Dijkstra CD. The functional state of follicular dendritic cells in severe combined immunodeficient (SCID) mice: role of lymphocytes. *Eur J Immunol* 1994;24:464–468.
56. Ahearn JM, Fischer MB, Croix D, et al. Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity* 1996;4:251–262.
57. Rose ML, Birbeck MC, Wallis VJ, Forrester JA, Davies AJS. Peanut lectin binding properties of germinal centres of mouse lymphoid tissue. *Nature* 1980;284:364–366.
58. Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 1996;87:1037–1047.
59. Facchetti F, Appiani C, Salvi L, Levy J, Notarangelo LD. Immunologic analysis of ineffective CD40–CD40 ligand interaction in lymphoid tissues from patients with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Abortive germinal center cell reaction and severe depletion of follicular dendritic cells. *J Immunol* 1995;154:6624–6633.
60. Borriello F, Sethna MP, Boyd SD, et al. B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1997;6:303–313.
61. Lane P, Burdet C, Hubele S, et al. B cell function in mice transgenic for mCTLA4-H gamma 1: lack of germinal centers correlated with poor affinity maturation and class switching despite normal priming of $CD4^-$ T cells. *J Exp Med* 1994;179:819–830.
62. Kosco-Vilbois MH, Zentgraf H, Gerdes J, Bonnefoy J-Y. To B or not to B a germinal center? *Immunol Today* 1997;18:225–230.
63. Klaus GG, Humphrey JH, Kunkl A, Dongworth DW. The follicular dendritic cell: its role in antigen presentation in the generation of immunological memory. *Immunol Rev* 1980;53:3–28.
64. Szakal AK, Kosco MH, Tew JG. Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses: structure functions relationships. *Ann Rev Immunol* 1989;7:91–109.
65. Gray D, Skarvall H. B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* 1988;336:70–73.
66. Jacob J, Kassir R, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med* 1991;173:1165–1175.
67. Jacob J, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med* 1992;176:679–687.
68. Linton PJ, Decker DJ, Klinman NR. Primary antibody-forming cells and secondary B cells are generated from separate precursor cell subpopulations. *Cell* 1989;59:1049–1059.
69. Fliedner TM, Kesse M, Crokite EP, Robertson JS. Cell proliferation in germinal centers of the rat spleen. *Ann N Y Acad Sci* 1964;113:578–594.
70. Zaitoun AM. Cell population kinetics of the germinal centres of lymph nodes of BALB/c mice. *J Anat* 1980;130:131–137.
71. MacLennan IC, Johnson GD, Liu YJ, Gordon J. The heterogeneity of follicular reactions. *Res Immunol* 1991;142:253–257.
72. Apel M, Berek C. Differentiation of B cells in germinal centers. In: Imhof BA, Berrih-Aknin S, Ezine S, eds. *Lymphatic tissues and in vivo immune responses.* New York: Marcel Dekker, 1991:355–359.
73. Kroese FGM, Timens W, Nieuwenhuis P. Germinal center reaction and B lymphocytes: morphology and function. *Curr Top Pathol* 1990;84:103–100.
74. Küppers R, Zhao M, Hansmann M-L, Rajewsky K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J* 1993;12:4955–4967.
75. Jacob J, Przylepa J, Miller C, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal centers. *J Exp Med* 1993;178:1293–1307.
76. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med* 1994;180:329–339.
77. Weigert M. The influence of somatic mutation on the immune response. *Prog Immunol* 1986;VI:138–142.
78. Kepler TB, Perelson AS. Cyclic re-entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation. *Immunol Today* 1993;14:412–415.
79. Kauffman SA, Weinberger ED, Perelson AS. Maturation of the immune response via adaptive walks on affinity landscapes. In: Perelson AS, ed. *Theoretical immunology.* Part one: SFI studies in the sciences of complexity. Reading, MA: Addison-Wesley, 1988:349–382.
80. Bigazzi PE. Hashimoto's disease. In: Bona AC, Siminovitch KA, Zanetti M, Theophilopoulos AN, eds. *The molecular pathology of autoimmune diseases.* Chur: Harwood Academic Publishers, 1993:493–510.
81. Guigou V, Emilie D, Berrih-Aknin S, Fumoux F, Fougerau M, Schiff C. Individual germinal centres of myasthenia gravis human thymuses contain polyclonal

activated B cells that express all the VH and Vκ families. *Clin Exp Immunol* 1991;83:262–266.
82. Friemark BR, Fantozzi R, Bone R, Bordin G, Fox R. Detection of clonally expanded salivary gland lymphocytes in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1989;32:859–869.
83. Schröder AE, Greiner A, Seyfert C, Berek C. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:221–225.
84. Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, Ruddle NH. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J Exp Med* 1996;183: 1461–1472.
85. Maizels N. Somatic hypermutation: how many mechanisms diversify V region sequences? *Cell* 1995;83:9–12.
86. Reynaud C-A, Anquez V, Grimal H, Weill J-C. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* 1987;48: 379–388.
87. McCormack WT, Thompson CB. Chicken Ig_L variable region gene conversions display pseudogene donor preference and 5 to 3 polarity. *Genes Dev* 1990;4: 548–558.
88. Becker RS, Knight KL. Somatic diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits. *Cell* 1990;63: 987–997.
89. Klein R, Jaenichen R, Zachau HG. Expressed human immunoglobulin k genes and their hypermutation. *Eur J Immunol* 1993;23:3248–3271.
90. Manser T, Gefter ML. The molecular evolution of the immune response: idiotope-specific suppression indicates that B cells express germ-line–encoded V genes prior to antigenic stimulation. *Eur J Immunol* 1986;16:1439–1444.
91. Reynaud CA, Garcia C, Hein WR, Weill J-C. Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process. *Cell* 1995;80:115–125.
92. Manser T. Mitogen-driven B cell proliferation and differntiationare not accompanied by hypermtation of immunoglobulin variable regio genes. *J Immunol* 1987;139:234–238.
93. Maizels N, Bothwell A. The T cell independent immune response to the hapten NP uses a large repertoire of heavy chain genes. *Cell* 1985;43:715–720.
94. McKean D, Huppi K, Bell M, Staudt L, Gerhard W, Weigert M. Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:3180–3184.
95. Gorski J, Rollini P, Mach B. Somatic mutations of immunoglobulin variable genes are restricted to the rearranged V gene. *Science* 1983;220:1179–1181.
96. Roes J, Hüppi K, Rajewsky K, Sablitzky F. V gene rearrangement is required to fully activate the hypermutation mechanism in B cells. *J Immunol* 1989;142: 1022–1026.
97. Weber JS, Berry J, Litwin S, Claflin JL. Somatic hypermutation of the JC intron is makedly reduced in unrearranged kappa and H alleles and is unevenly distributed in rearranged alleles. *J Immunol* 1991;146:3218–3226.
98. Lebecque SG, Gearhart PJ. Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5′ boundary is near the promotor, and 3 boundary is about 1 kb from V(D)J gene. *J Exp Med* 1990;172:1717–1727.
99. Rothenfluh HS, Taylor L, Bothwell ALM, Both GW, Steele EJ. Somatic hypermutation in 5′ flanking regions of heavy chain antibody variable regions. *Eur J Immunol* 1993;23:2152–2159.
100. Motoyama N, Miwa T, Suzuki Y, Okada H, Azuma T. Comparison of somatic mutation frequency among immunoglobulin genes. *J Exp Med* 1994;179: 395–403.
101. Wagner SD, Neuberger MS. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Ann Rev Immunol* 1996;14:441–457.
102. Azuma T, Motoyama N, Fields LE, Loh DY. Mutations of the chloramphenicol acetyl transferase transgene driven by the immunoglobulin promotor and intron enhancer. *Int Immunol* 1993;5:121–130.
103. Yelamos J, Klix N, Goyenechea B, et al. Targeting of non-Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation. *Nature* 1995;376:225–229.
104. Storb U, Peters A, Klotz E, et al. *Sem Immunol* 1997;8:131–140.
105. Tumas-Brundage K, Manser T. The transcriptional promotor regulates hypermutation of the antibody heavy chain locus. *J Exp Med* 1997;185:239–250.
106. Betz AG, Rada C, Pannell R, Milstein C, Neuberger MS. Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hot spots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90: 2385–2388.
107. Hackett J Jr, Rogerson BJ, O'Brien RL, Storb U. Analysis of somatic mutations in kappa transgenes. *J Exp Med* 1990;172:131–137.
108. Dörner T, Brezinschek RI, Foster SJ, Domiati R, Lipsky PE. Analyis of the frequency and pattern of somatic mutations within nonproductively rearranged human variable heavy chain genes. *J Immunol* 1997;158:2779–2789.
109. Smith DS, Creadon G, Jena PK, Portanova JP, Kotzin BL, Wysocki LJ. Di- and trinucleotide target preferences of somatic mutagenesis in normal and autoreactive B cells. *J Immunol* 1996;156:2642–2652.
110. Goyenechea B, Milstein C. Modifying the sequence of an immunoglobulin V-gene alters the resulting pattern of hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:13979–13984.
111. Wagner SD, Milstein C, Neuberger MS. Codon bias targets mutation. *Nature* 1995;376:732.
112. Peters A, Storb U. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* 1996;4:57–65.
113. Betz AG, Milstein C, González-Fernández A, Pannel R, Larson T, Neuberger MS. Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment site. *Cell* 1994; 77:239–148.
114. Rada C, González-Fernández A, Jarvis JM, Milstein C. The 5′ boundary of somatic hypermutation in a Vκ gene is in the leader intron. *Eur J Immunol* 1994; 1453–1457.
115. Brenner S, Milstein C. Origin of antibody variation. *Nature* 1966;211:242–243.
116. Denepoux S, Razanajaona D, Blanchard D, Meffe G, Capra JD, Banchereau J. Induction of somatic mutation in a human B cell line in vitro. *Immunity* 1997; 6:35–46.
117. Flemming W. Schlussbemerkungen über die Zellvermehrung in den lymphoiden Drüsen. *Arch Mikrosk Anat* 1997;24:355.

第 26 章　CD4$^+$ 与 CD8$^+$ 效应 T 细胞表型的分化

Robert A. Seder and Timothy M. Mosmann[①]

区分 Th1 与 Th2 细胞表型

细胞因子分泌 CD4$^+$ T 细胞异质性的证据:人与小鼠细胞间存在不同吗? • 克隆水平与群体水平存在 Th1 与 Th2 细胞的证据 • IFN-γ 与 IL-4 分泌细胞在单细胞水平与群体水平存在的体外证据 • Th1 与 Th2 细胞存在的体内证据 • 不同刺激产生的细胞因子的多样性 • 其他 Th 表型 • Th1 与 Th2 细胞可区分的可能的细胞表面标志 • 可根据表达不同细胞因子或趋化因子受体区分 Th1 与 Th2 吗?

体外初始 CD4$^+$ T 细胞分化为 Th1 与 Th2 细胞

Th1 与 Th2 细胞来源于共同的白细胞介素分泌前体细胞 • CD4$^+$ T 前体细胞在分化为 Th1 或 Th2 细胞过程中是否经过一个中间阶段? • 效应 CD4$^+$ Th 细胞

影响 Th1 细胞分化的细胞因子

IL-12 在促进 IFN-γ 分泌中的作用 • IFN-γ 在调节 Th1 细胞分化中的作用 • IFN-α 在诱导 IFN-γ 产生中的作用 • TGF-β 在诱导 IFN-γ 产生中的作用 • IL-18 在诱导 IFN-γ 产生中的作用

作用于 Th2 分泌的细胞因子

IL-4 在诱导鼠 IL-4 产生中的作用 • IL-4 在诱导人 IL-4 产生中的作用 • IL-2 在诱导 IL-4 产生中的作用 • IL-6 在诱导 IL-4 产生中的作用 • IL-1 在诱导 IL-4 产生中的作用

辅助分子

B7/CD28 共刺激在诱导 Th1 与 Th2 分化中的作用 • B7-1 与 B7-2 分别在调节 Th1 与 Th2 分化中的直接作用 • 短暂表达 B7-1 与 B7-2 在调节 CD4$^+$ T 细胞细胞因子产生中可能起作用 • 刺激强度 • CD40L/CD40 在调节 Th1 与 Th2 分化中的作用 • CD4 信号传导在调节 Th1 与 Th2 分化中的作用

抗原剂量

在对蛋白或多肽多克隆激活反应中抗原剂量的作用 • 抗原剂量对特定 T 细胞受体的作用 • 体内病原体剂量的效应 • 抗原剂量对效应 T 细胞的作用

T 细胞发育库

抗原呈递细胞在 Th1 与 Th2 分化中的作用

树突细胞 • 单核细胞与巨噬细胞 • B 细胞·调节 Th1 与 Th2 分化的遗传学基础

Th1 与 Th2 细胞分化的分子学基础

T 细胞亚群细胞内信号由 STAT 蛋白介导 • 生物化学递质与转录因子在 Th 细胞分化中的作用

细胞因子来源对 Th1 与 Th2 分化的影响

角质细胞(角质形成细胞) • 经典 T 细胞 • 表达限制性 TCR 的 T 细胞亚群 • 自然杀伤性 T 细胞 • NK 细胞 • 巨噬细胞 • 树突细胞 • 巨核细胞、嗜酸性粒细胞与嗜碱性粒细胞

固醇类性激素 • 应激性类固醇激素 • 其他类固醇激素 • 前列腺素 E2 • 肾上腺受体激动剂 • 维生素 A 与 D

---

① R. A. Seder: Clinical Immunology Section, Laboratory of Clinical Investigation, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Natiooal Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892. T. M. Mosmann: Written in part during the tenure as Fogarty Scholar-in-Residence at the National Institutes of Health.

免疫系统采取一种极其复杂的机制以保护自身免受各种外源性病原体侵袭,同时抑制对自身抗原发生免疫反应。除了决定是否应答(抗原特异性)外,免疫系统必须对每一病原体发生较为适当的功能效应(效应特异性),其中介导与调节这些功能效应的关键细胞之一为上 $CD4^+$ T 细胞,而且已证实 $CD4^+$ T 细胞分泌的特定细胞因子在精细调节其自身功能过程中起主要作用。因此,确定 $CD4^+$ T 细胞分泌的细胞因子的类型及其调节机制对理解免疫系统怎样进行调节起至关重要的作用。 880

10 年前已有永生化小鼠 $CD4^+$ T 细胞克隆分泌的细胞因子特性鉴定[1]的报道,在这些研究中,已证实 $CD4^+$ T 细胞可产生两种不同类型的细胞因子,依其产生的细胞因子不同可分别命名为辅助 T 细胞 1(Th1)及辅助 T 细胞 2(Th2),Th1 细胞主要产生白细胞介素-2(IL-2),肿瘤坏死因子 γ(INF-γ)与淋巴毒素(LT),Th2 克隆主要产生 IL-4、IL-5、IL-6 与 IL-13[2]。后来,从 Th2 克隆又分离出 IL-9 与 IL-10。最后发现 Th1 与 Th2 均可分泌 IL-3、GM-CSF、TNFα(表 26.1)。

表 26.1　CD4T 细胞亚群细胞因子的表达

细胞因子	Th1	Th2	Th0	Thp
IFN-γ	+	−	+	−
淋巴毒素	+		−	
IL-2	+(−)	−	+	+
IL-3	+	+	+	−
GM-CSF	+	+	+	
TNF-α	+	+		
MIP-α	+	+		
MIP-β	+	+		
TCA-3(I-309)	+	+		
IL-4	−	+	+	−
IL-5	−	+	+	−
IL-6	−(+)	+		
IL-9	−	+		
IL-10	−(+)	+		−
IL-13	−(+)	+		

所有的细胞因子均为相应的 T 细胞亚群仅在 T 细胞活化时表达,通常是通过 T 细胞受体活化。

空白表示该因子是否合成未知。

括号表示可能的选择性分泌,尤其在人 T 细胞中。人 IL-6、IL-10、IL-13 的分泌不仅限于 Th2 亚型,虽然 Th2 细胞通常分泌高水平的此类细胞因子。

CD4⁺ T细胞可根据其分泌的细胞因子类型分为两种不同的亚群这一发现引起人们极大兴趣。这是因为，Th1细胞因子(如IL-2、INF-γ)与细胞免疫功能如迟发性超敏反应(DTH)相联系，而Th2细胞因子(如IL-2、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13)，可增加B细胞抗体产生从而在某些方面类似于超敏反应[6]。除此以外，人们发现，Th1与Th2细胞产生特异的细胞因子(如INF-γ与IL-4)分别对其相对立的细胞亚型具有有效的抑制作用[9]，因此，细胞因子的特性的差异可导致不同的功能效应，并且交互调节细胞亚群间的功能。在下面的章节里将讨论支持存在Th1与Th2两类细胞的证据，为了叙述方便，将在下面章节中使用Th1与Th2作为功能性限定的概念。

区分Th1与Th2细胞表型

细胞因子分泌CD4⁺ T细胞异质性的证据：人与小鼠细胞间存在不同吗？

小鼠CD4⁺ T细胞克隆的Th1与Th2亚型最初鉴定使人们对这些型别是否亦存在于人体内的免疫反应过程中产生极大兴趣。虽然初期实验提示许多人T细胞克隆均可同时产生Th1与Th2样细胞因子[10~12]，后来逐步鉴出人对过敏原起反应的T细胞克隆主要表现为Th2类模式，而对分技杆菌起反应的克隆则主要分泌Th1类细胞因子[13~15]。

虽然这些研究表明在人及小鼠存在有Th1与Th2极化细胞，但亦有证据证明一些小鼠[16,17]尤其是一些人细胞克隆均可产生IL-4与IFN-γ。这些细胞被称作Th0细胞，可能处于Th1与Th2极化细胞之间或为具有其自身功能效应特征的终末期细胞。除此以外，检测短期建立的T细胞系与克隆的细胞因子mRNA与蛋白质表达水平显示，细胞在细胞因子产生方面有丰富的异质性[17~19]。这些依据使人们猜测在单个细胞水平，有广泛的细胞因子谱和/或细胞因子分泌多样性的特征，而并非存在有截然不同的Th1与Th2细胞[20]，一些材料证实克隆细胞系细胞因子共表达模式为随机性支持此观点[20]。然而，在另一些克隆细胞系，即使在分化时无外源细胞因子诱导影响，仍可发现可区分的非随机性的Th1与Th2样特征的细胞[21]，总之，毫无疑问存在有代表稳定分化状态的极化的Th1与Th2细胞模式，但是否其他的细胞因子分泌模式代表独立的或附加的亚群仍不十分清楚。

881

克隆水平与群体水平存在Th1与Th2细胞的证据

我们上面强调在T细胞复杂动态的分化过程中区分Th细胞为Th1与Th2两种截然不同的细胞过于简单化，重要的是应该强调在体外与体内感染与自身免疫性疾病的实验模型中，充足的证据表明，在生理条件下Th1与Th2细胞在单细胞与群体水平均存在。在许多主要的免疫反应中，存在有明显的Th1与Th2样细胞因子极化分泌的特点，因此描述主要T细胞表型的功能与相互间的作用就显得很重要，其他表型毫无疑问存在且对许多免疫反应有作用，但其具体功能仍不十分清楚。

IFN-γ与IL-4分泌细胞在单细胞水平与群体水平存在的体外证据

一旦Th1与Th2细胞极化模式在鼠CD4⁺ T细胞克隆被确认，建立实验模型以研究Th1与Th2细胞的分化就引起人们较大兴趣，至今，已建立了体外T细胞呈递模型，在这些模型中，初始T细胞经短期多克隆激活剂作用或特异抗原刺激活化数天再次刺激后分析上清IL-4与IFN-γ的分泌活性[22~25]。在此类研究中，已明确IL-4与IFN-γ分泌细胞可在群体水平区分，但在单细胞水平IL-4与IFN-γ分泌的几率仍知之甚少甚或不知。此问题首次是在单细胞水平分析CD4⁺ T细胞分化过程中细胞因子基因表达情况所提出来的[26]，虽然在二次刺激后，只产生相对少的IL-4与IFN-γ分泌细胞，表达IL-4与IFN-γ的细胞实际上是可分离的，提示在单细胞水平上具有可区分性。最近，使用免疫荧光技术在单细胞水平检测细胞内IL-4与IFN-γ蛋白细胞因子表达。发现IL-4与IFN-γ在不同的细胞中表达[27]，在短期激活的小鼠T细胞受体TCR/TγCD4⁺ T细胞在有利于IFN-γ分泌的环境下，约有85%细胞显示具有IFN-γ荧光，但无IL-4荧光。相对应的在利于诱导分

泌 IL-4 的条件下,约有 51%细胞显示具有 IL-4 荧光,但无 IFN-γ 荧光。在相似诱导条件下采用多克隆丝裂原诱导人初始 $CD4^+$ T 细胞分别在促进 Th1 与 Th2 分化条件下发现约有 32%细胞分泌 IFN-γ,12%产生 IL-4[29],因此,这些实验表明在精密控制的条件下,可在分别促进 Th1 与 Th2 各自分化的环境下无论在群体水平还是单细胞水平可分别诱导细胞产生 IFN-γ 或 IL-4。

Th1 与 Th2 细胞存在的体内证据

体外实验观察到 T 细胞可区分为明显的细胞因子分泌亚群,并且有不同功能,引起人们极大兴趣。通过建立体内小鼠感染或自身免疫性疾病模型与在人多种疾病中获得的细胞均发现在体内存在有 Th1 与 Th2 细胞因子表达或分泌模式。

最早的或许也是最好的 Th1/Th2 在体内存在的证据,为大型杜氏利什曼原虫感染实验模型。疾病敏感性与抵抗性分别与 Th2 或 Th1 型反应相关联[30,31],而且,令人振奋的发现是,敏感小鼠可通过将 Th2 反应转变为 Th1 反应而产生抵抗作用,以后发现 Th1/Th2 模式在体内免疫反应中起重要作用。除了大型杜氏利什曼原虫外,其他感染性病原体均可分别在体内产生以 Th1 或 Th2 为主的反应(第 38 章),超敏反应患者中,$CD4^+$ T 细胞克隆显示有倾向于 Th2 细胞因子分泌的模式[13,14],检测其他各种超敏反应、感染与自身免疫性疾病中细胞因子表明,产生的细胞因子强烈倾向于 Th1 或 Th2 样细胞因子分泌模式[31,32]。最近,在一些小鼠自身免疫疾病实验模型中,Th1 反应与疾病恶化相关联,而 Th2 反应则趋于保护性(第 34 章)。虽然 Th2 效应也可导致自身免疫性病理过程(如在实验性 Th1 细胞缺陷性脑脊髓炎 EAE[35,36],迄今许多器官特异性自身免疫模型似乎多为 Th1 介导;然而 Th2 反应亦可能参与一些全身性自身免疫反应[37],如汞介导的自身免疫[38,39]及人系统性红斑狼疮[40]与 NZB/W 系[41]但非 MRL 系小鼠的 SLE 模型[42]。

总之,体外与体内研究均显示在群体水平,存在有强倾向于 Th1 或 Th2 细胞因子分泌模式的证据,而且通过体内与体外精密实验条件下,在特异抗原或多克隆激活剂反复刺激下,均很好地证明存在有 Th1 型与 Th2 型反应。因此,虽然群体中单细胞水平上细胞因子分泌类型有异质性,总的生物学反应结果经常是以 Th1 或 Th2 反应为主,而 Th1 或 Th2 分别代表 $CD4^+$ T 细胞分泌 IFN-γ 与 LT 和 IL -4 与 IL-5。然而所谓的Ⅰ型与Ⅱ型反应[43]所指的是分别以 Th1 或 Th2 细胞因子为主介导的反应,而不是暗指这些细胞因子由 $CD4^+$ T 细胞产生,因为Ⅰ型反应 IFN-γ 可能由 $CD8^+$ T 细胞或 NK 细胞产生。同样的,Ⅱ型反应 IL -4 可能由嗜碱性粒细胞或肥大细胞产生,或 IL-10 由角质细胞与巨噬细胞产生。

882

虽然 IL-10 经常被用作 Th2 反应的标志,但必须指出的是,IL-10 的生理性来源细胞除 Th2 外附加的也许是主要的为巨噬细胞[44]。而且 IL-10 与 IL-4 表达并不总是相关的,IL-10 也可在抗炎反应及 Th2 类反应过程中表达。第三,B 细胞也可产生 IL-10[45],且一些 $CD4^+$ T 细胞或克隆均可产生 IFN-γ 和 IL-10,因此 IL-10 不能用做 Th2 反应特异性的标记[46~48]。

不同刺激产生的细胞因子的多样性

虽然在完全分化 Th1 或 Th2 细胞,细胞因子分泌模式为相对稳定的,但在某些情况下可改变此模式。除了抗原或凝集素外[49,50],Ca^{2+} 离子载体与 PMA(佛波酯)共同刺激也可诱导细胞因子合成,细胞因子模式也可被抗原浓度或细胞因子信号(见后文)所改变。因此,由体外强烈刺激诱导产生细胞因子模式外推体内真实细胞因子分泌反应时应慎重考虑。

其他 Th 表型

除了根据 Th1 与 Th2 细胞因子模式确定不同表型外,已较为明确的是确认许多 $CD4^+$ T 细胞也产生其他细胞因子模式。除了上述代表对特定抗原特异的人 T 细胞组成性 Th0 细胞外,有一种可产生 IFN-γ 与 IL-10 但非 IL-4 的 T 细胞亚群。因为 IL-10 包括 IFN-γ 为许多免疫反应的有效抑制剂,此型细胞的可能作用为自我调节 Th1 反应,其他由 $CD4^+$ T 细胞系或克隆产生的细胞群诸如仅产生 TGF-β 但非 *IL-4* 与 *IFN-γ* 的被称作

Th3 细胞，该型细胞可能在介导自身免疫性疾病免疫抑制效应中起重要作用[52,53]。

Th1 与 Th2 细胞可区分的可能的细胞表面标志

确定是否在分化的 Th1 与 Th2 细胞上是否有可区分的膜表面标志引起人们较大兴趣，许多早期研究集中于 CD45(一种在 T 细胞活化过程中表达有所改变的细胞表面标记)表达是否有所不同，或许可成为区分标记[54,55]。再者，最近更多研究表明，其他细胞表面标记如 CD27[56,57]，CD30[58,61]与 CD31[62]，在可产生 INF-γ 或 IL-4 的细胞表面上优先表达。在一些研究中发现 Th1 与 Th2 型细胞上述分子表达有一定偏移，其他研究则发现在 Th1 与 Th2 细胞这些标记为非特异的，而是 T 细胞活化或经细胞因子作用后的标志性反应。例如 CD30 由 IL-4 诱导表达，被 IFN-γ 所抑制[64]，因此，Th2 而非 Th1 克隆可能表达 CD30，然而在混杂群体中，两种细胞亚型 CD30 表达可能依赖于细胞因子之间的平衡状态。除上述活化标记外，一种分布于活化的人 $CD4^+$ T 细胞的糖蛋白被克隆命名为 SLAM[64]，表达 SLAM 并不能区分细胞分泌 IL-4 而非 IFN-γ，$CD4^+$ T 细胞尤其是 Th2 细胞表达 SLAM 可增加 IFN-γ 分泌，但无 IL-4 与 IL-5 分泌增加。因此 SLAM 在细胞活化时可选择性诱导 Th1 细胞因子分泌。

可根据表达不同细胞因子或趋化因子受体区分 Th1 与 Th2 吗?

研究是否已定型的分泌 IL-4 的 Th2 细胞可被诱导(如被 IL-12 诱导产生 IFN-γ)逆转的过程中，已明确体外短期活化产生的 Th2 细胞对 IL-12 无反应性，因其细胞表面无功能性 IL-12β2 亚单位表达[65,66]。根据这一发现，IL-12β2 亚单位可被用作区分 Th1 与 Th2 细胞的表面标记。一些报道建议，可依据 IFN-β 亚单位链是否表达而区分 Th1 与 Th2 型细胞。小鼠[67,68]与人[69]体外模型中，Th1 型细胞 IFN-β 链表达量明显降低。相反，Th2 型细胞仍表达此亚单位。基于这些研究，IFN-γRβ 似可被用作 Th2 细胞选择性表达标记，Th2 细胞选择性表达 IFN-γRβ 链可使 IFN-γ 转变该细胞的功能效应(见后文，交互调节)，重要的是应该指出，虽然 Th2 细胞在 IFN-γ 作用下 IFN-γRβ 链表达下降[20]，抗 IFN-γ 抗体可诱导 IFN-γRβ 在 Th1 细胞表达[70]。这些事实提示，Th1 细胞自分泌 IFN-γ 可下调其自身受体表达，可以解释为什么 Th1 而非 Th2 细胞该受体表达量降低。因此体内混杂群体中局部产生 IFN-γ 可诱导所有 T 细胞 IFN-γ 受体表达降低，而非仅 Th1 细胞。相似的 IL-12Rβ2 在混杂群体中不仅仅在 Th1 细胞表达，因为 IFN-γ 可诱导 Th2 细胞表达 IL-12Rβ2[65]，且 IFN-γ 在 Th1 细胞 IL-12 反应中所必需[71]。而且这些受体的存在或消失并不总与 Th1 或 Th2 细胞等同，例如 Th0 细胞尚可在其他细胞类型表达。总之，体外研究结果虽然诱人，进一步分析在多种疾病状态下体外分离的 $CD4^+$ T 细胞 IL-12Rβ2 及 IFN-γ 亚单位表达情况，以决定这些因子是否是区分或 Th2 分化的生理性选择标记亦有必要。图 26.1 总结出细胞因子受体表达的一些最新的信息。

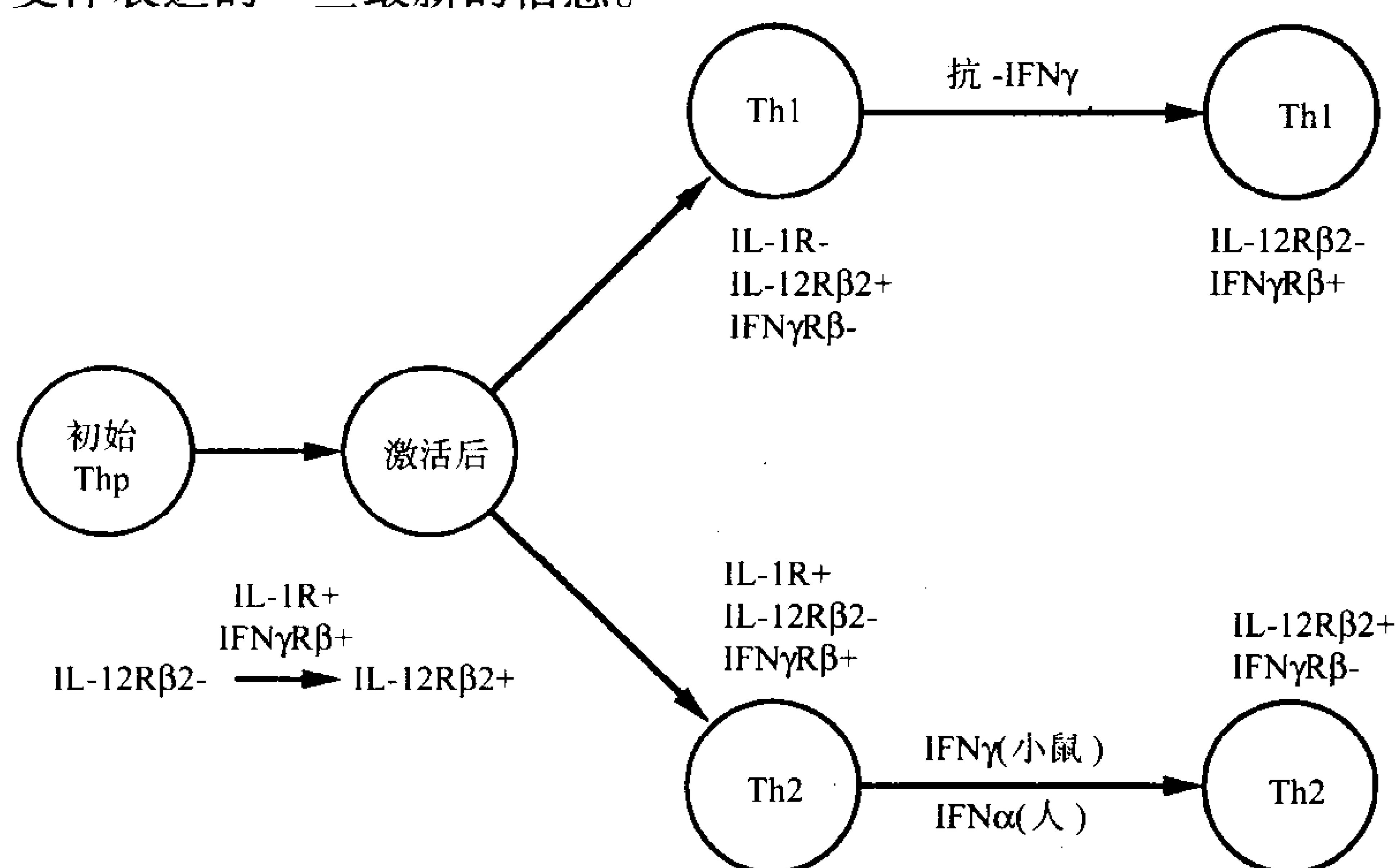


图 26.1　在 Th1 与 Th2 细胞分化前后效应 T 细胞的细胞因子受体表达。

与 CC 型趋化因子 Eotaxin 结合的趋化因子受体 CCR3 主要表达于 Th2 细胞[72]。虽然 $CCR3^+$ 细胞，即使在 Th1 为主的细胞群也倾向于分泌 IL-4，但 $CCR3^+$ 与 $CCR3^-$ 细胞群中也包含有一些 Th0 细胞[72]，因此与前述其他标记分子一样，Eotaxin 受体似乎不是 Th2 细胞绝对的细胞标记。

体外初始 $CD4^+$ T 细胞分化为 Th1 与 Th2 细胞

Th1 与 Th2 细胞来源于共同的白细胞介素分泌前体细胞

为了确定调节 Th1 或 Th2 细胞分泌的因子，从同一起源的细胞群经过反复刺激来研究其激活后是否可分化成可分泌不同细胞因子如 IFN-γ 和 IL-4 的细胞则显得很重要。至今，表达 $CD44^{lo}$，$CD62L^{hi}$，$CD45RB^{hi}$（小鼠）与 $CD45RA^+$（人）的小致密淋巴细胞细胞被用于体外研究小鼠与人 Th1 或 Th2 分化，该细胞经过初次刺激产生 IL-2 但非 IFN-γ 或 IL-4。TCR 特异性似乎并不影响细胞分化[25,73,74]，这一事实由单纯 IL-2 分泌 $CD4^+$ T 细胞，称为前体 T 辅助细胞（Thp），依刺激的条件不同可分化为 IL-2 或 IL-4 分泌细胞[75]或 Th1 或 Th2 细胞[76]的实验进一步证实，这些证据显然说明 Th1 或 Th2 细胞从同一前体细胞分化而来。前体细胞可能是一种小型静息初始 $CD45RB^{high}$，$CD62L^{high}$，$CD44^{low}$ T 细胞，或为一种激活的 $CD45RB^{low}$，$CD62L^{low}$，$CD44^{high}$ 前体 T 细胞（Thpp），但此两种细胞型别在后续分化为 Th1 或 Th2 细胞群的过程中则均被相似的细胞因子来调节。

883

$CD4^+$ T 前体细胞在分化为 Th1 或 Th2 细胞过程中是否经过一个中间阶段？

一个重要的仍未解决的问题是，IL-2 分泌前体 $CD4^+$ T 细胞在分化为 Th1 或 Th2 细胞过程中经历了一个随机性的过程还是经历了一个确定有序的细胞因子分泌中间状态。在提出这一问题后，使用转基因小鼠 $CD4^+$ T 细胞，其 IL-4 启动子下游插入一个 HSV-TK(疱疹胸苷激酶基因)。激活此类 $CD4^+$ T 细胞在 gancylovir（受 HSV-TK 影响产生毒性作用产物）存在条件下抑制 IL-4 与 IFN-γ 分泌细胞的发育，证实细胞分化为分泌 IFN-γ 或 IL-4 的效应细胞过程中经历了一个 IL-4 mRNA 表达的共同阶段[77]。然而，另一实验使用原位杂交技术测定 T 细胞发育细胞因子基因表达时，发现在初期活化过程中产生 IL-4 的细胞数量很少。而且，并未报道有显著多量的细胞同时产生 IL-4 与 IFN-γ[26]，虽然这些似乎相互矛盾的结果可能来自技术上的原因，在分化的 Th1 或 Th2 细胞过程中是否存在一个共同的中间阶段仍然是个谜。

效应 $CD4^+$ Th 细胞

短期体外或体内激活后，初始（前体）$CD4^+$ T 细胞在再刺激时发育成可分泌 IL-4 或 IFN-γ 的效应细胞。这些激活的 $CD4^+$ T 具有可大量分泌前述细胞因子的能力，在生理上起重要作用，鉴于此，这些细胞被称为效应 Th 细胞。与初始前体 $CD4^+$ T 细胞不同，效应细胞在短期体外刺激时个体较大，但可恢复为小的静息状态且可被迅速再激活产生大量细胞因子，其表型为 $CD44^{high}$，$CD62L^{low}$，$CD45RB^{low}$（小鼠）与 $CD45RO^+$（人）。

在本章中我们主要用 IL-4 而非 IL-5 代表 Th2 细胞产生的细胞因子，是基于下述事实：许多工作的目的在于检测调节 IL-4 产生而非 IL-5 分泌的细胞、生化与分子因素的作用。而且，IL-4 在 Th2 反应中在两方面有重要作用：IL-4 对 Th2 一些功能效应的特性有作用，其亦为前体细胞后续分化为 Th2 细胞的主要诱导因子。而对于 Th1 细胞来说，IL-2 与 IFN-γ 已被用作为 Th1 反应的标志。然而，因为未定型的前体 $CD4^+$ Thp 与 Thpp 细胞，以及分化的 Th1 细胞均可产生 IL-2，而一些成熟 Th1 细胞仅产生 IFN-γ 而非 IL-2，因此我们将 IFN-γ 作为 Th1 细胞特异细胞因子。与 IL-4 相同，IFN-γ 也可促进分化细胞产生更多 IFN-γ。虽然淋巴毒素在人与小鼠均为 Th1 细胞特异性，该细胞因子在技术上还难以鉴定，因其与 TNF-α 有交叉的生物学活性，目前可采用的 ELISA 方法测定该细胞因子并不如测定其他细胞因子同样有效。在下面章节中，将讨论一些影响初始 $CD4^+$ T 前体细胞在分化为 IL-4 或 IFN-γ 分泌效应细胞的因素。

884

影响 Th1 细胞分化的细胞因子

在本节开始时，虽然我们强调体外有许多因素介入调节 Th1 与 Th2 分化过程，很明显影响这一过程的最重要的因素为培养体系中存在的细胞因子的类型与数量。在图 26.2 与图 26.3 中表示出细胞因子与其他可溶性因子在促进有潜在分化潜能的细胞向 Th1 与 Th2 分化的影响作用。

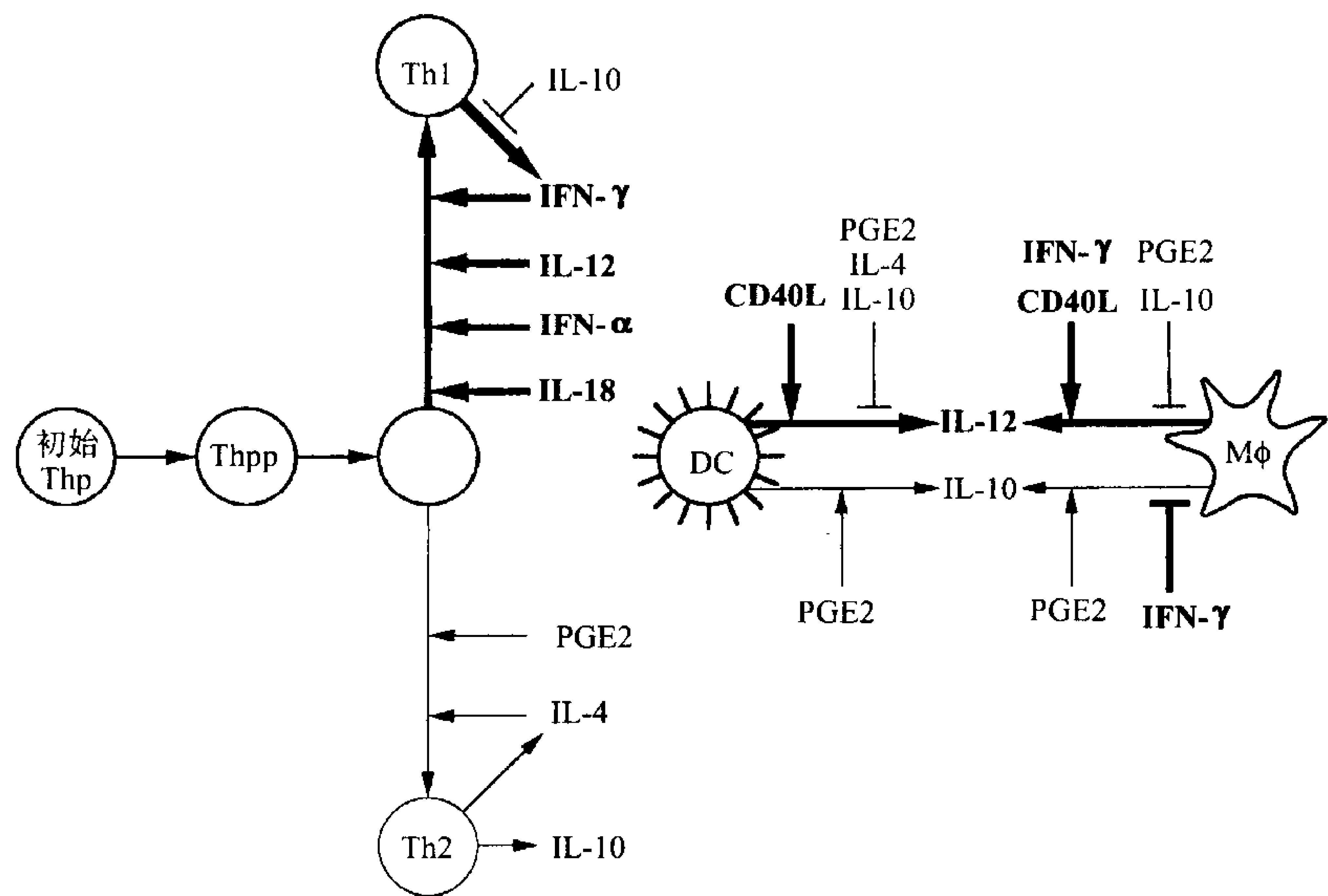


图 26.2 促进 Th1 细胞分化的可溶性细胞因子。粗箭头表示刺激效应，横线表示抑制或阻断效应。图示一些已知的重要的细胞因子，与巨噬细胞和树突细胞分泌的细胞因子的调节也有描述，虽然其他 APC(如 B 细胞)或细胞因子也影响此选择分化效应，但其调节机制尚不清楚。

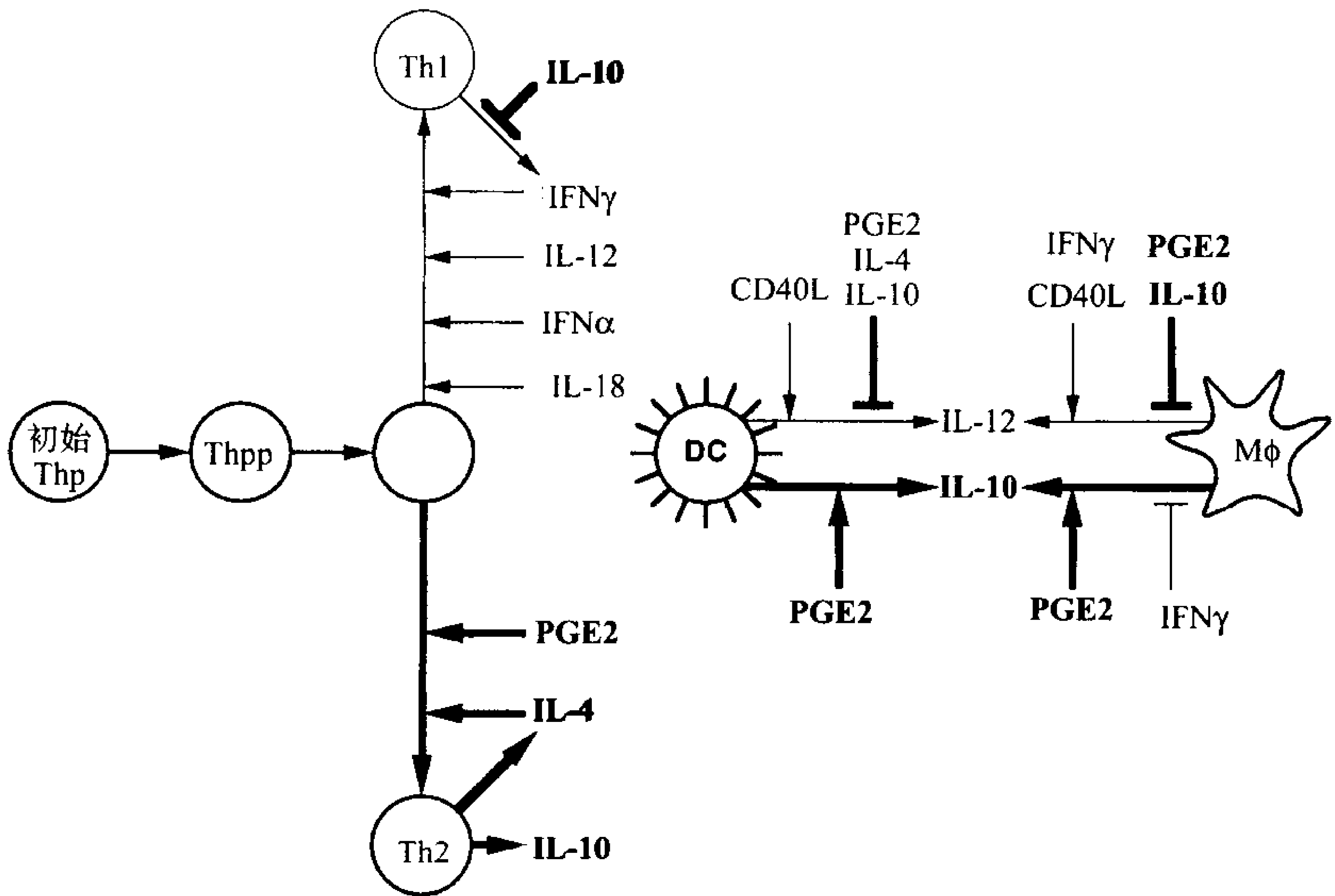


图 26.3 促进 Th2 细胞分化的可溶性因子。

IL-12 在促进 IFN-γ 分泌中的作用

IL-12 首先描述为刺激活化细胞毒性 T 淋巴细胞或 NK 细胞的异源二聚体[78,79]，重要的是其为 NK 细胞[80]与 T 淋巴细胞[81-83]有效地促进 IFN-γ 分泌的刺激因子，基于其可刺激 IFN-γ 产生，一些学者致力于研究其在体外诱导 Th1 细胞分化中的作用。在一系列小鼠体外研究中，检测了内源性与外源性 IL-12 在促进 IFN-γ 分泌中的作用，一项研究报告检测了内源性抗原呈递细胞(APC)产生 IL-12 是否可影响 Th1 反应，显示巨噬细胞在热灭活的 L. Mnocytogenes (HKLM)作用下可诱导 Th1 发育[81]，和抑制 IL-4 分泌细胞的发育。而且抗 IL-12 抑制巨噬细胞在 HKLM 作用下产生 IFN-γ，从而提供了明确的证据表明 APC 通过产生细胞因子(IL-12)可影响诱导产生的 Th 反应类型(见下文)。另外采用体外激活模型实验证明外源性 IL-12 可以以辅助细胞非依赖方式直接诱导纯化的 $CD4^+$ T 细胞产生 IFN-γ[82,84]。这些研究得出 IL-12 为 IFN-γ 分泌 Th1 细胞的主要诱导因子。

在其他相关的实验中，采用人 $CD4^+$ T 细胞证实，在淋巴细胞培养体系存在 IL-12 时过敏原属尘螨 I 群(一种可产生 Th2 型细胞系的抗原)激活，可导致产生少量 IL-4 与较多量 IFN-γ 的细胞发育。相反，培养体系中存在 PPD (一种产生 Th1 型细胞系的抗原)，在抗 IL-12 存在条件下可诱导 PPD 特异性 T 细胞克隆 IL-4 分泌增加，及 Th0 但非 Th1 型克隆生长[83]。在后续研究工作中，IL-12 虽然不可抑制 IL-4 分泌细胞分化但可诱导刺激祖细胞克隆、分化为高 IFN-γ 分泌性克隆[85]。因此，与上述体外小鼠刺激模型相似，IL-12 对特异抗原或多克隆刺激剂活化的细胞 IFN-γ 分泌量有明显影响作用。然而，在人培养刺激体系中 IL-12 在产生 IFN-γ 分泌 Th1 细胞与抑制 IL-4 分泌 Th2 细胞发育与小鼠体外刺激模型(见型别逆转一节)相比较并无明显作用。这一点进一步提示，人 T 细胞较小鼠细胞而言相对较不易极化为 Th1 或 Th2 表型。

885

最后，IL-12 在调节 IFN-γ 反应中的作用最有力的证据是使用 IL-12 缺陷小鼠[86]。在体内与体外刺激活化时，有明确的(80%～85%)但非绝对性的 IFN-γ 分泌缺陷。而且，在 STAT4(一种 IL-12 信号传递中介蛋白)缺陷小鼠 IFN-γ 分泌缺陷[87,88]。总之，这些数据提示，IL-12 如不是在 Th1 发育反应中绝对需要，其在免疫反应启动阶段产生功能性 Th1 反应很可能亦为必要。而且，在许多病例(如自身免疫性疾病)，可能需要 IL-12 维持 Th1 反应[89,90]。总之，迄今实验数据提示 IL-12 在调节 Th1 分化与扩增反应中是一种最重要的生理性调节因子，然而，不能排斥有可能在一些免疫反应中，其他细胞因子在无 IL-12 存在条件下在调节 IFN-γ 反应中亦有作用。

IFN-γ 在调节 Th1 细胞分化中的作用

在研究 Th1/Th2 分化过程中一个很有趣且困惑的方面，是影响 T 细胞分化为特定的 Th 亚型的因子，亦是确定该型别特异性的因子。因此，对于 Th1 极化来说，IFN-γ 自身可诱导 IFN-γ 产生，这一事实已有深入研究。初期工作在人与小鼠体外实验模型显示含 IFN-γ 培养体系可诱导 Th1 但非 Th2 克隆生长[91-93]。因此当时认为，IFN-γ 选择性抑制 Th2 细胞但非 Th1 细胞生长。后续体外研究中，认真研究了内源性与外源性 IFN-γ 在介导 IFN-γ 产生中的作用。大多数研究明确显示加入外源性 IFN-γ 于培养体系在再刺激下并不可诱导显著性 IFN-γ 产生增加。相反，$CD4^+$ T 细胞在 APC-非依赖方式(如抗-CD3)的作用下，在抗 IFN-γ 中和抗体存在条件下，再刺激过程中有显著性 IFN-γ 分泌减少。提示在这种刺激情况下，IFN-γ 在调节 IFN-γ 产生中起明确作用[82,94,95]。应指出在更加符合生理的条件下，$CD4^+$ T 细胞被 APC 与特异抗原激活，抑制内源性 IFN-γ 分泌在再激活时，与以 APC-非依赖方式激活相比有相对较低程度的(<2 倍)的 IFN-γ 产生抑制。而且更为重要的，在培养体系中存在抗 IFN-γ 可部分抑制(<2 倍)IL-12 对 IFN-γ 的促进分泌的作用[94,96,97]，后一发现与 IFN-γ 导致小鼠 $CD4^+$ T 细胞 IL-12Rβ 链亚单位表达增加相一致[65]。最后，应着重指出 IFN-γ 调节分泌 IFN-γ 的作用仅限于表达 CD62L 的初始 $CD4^+$ T 细胞[97]。

886

总之，体外 IFN-γ 可增加单核细胞 IL-12 分泌[98,99]，并增加鼠 $CD4^+$ T 细胞表达高亲和性 IL-12Rβ2 链，证明其在体外调节性增强 Th1 反应的程度起重要作用[94,97]。然而，IFN-γ 受体缺陷小鼠感染模型实验提示，

IFN-γ 体内生型条件下在诱导 Ⅰ 型反应中并非绝对必不可少。受体缺陷鼠允许在无 IFN-γ 通过其受体传递信号的条件下，增加 IFN-γ 产生。在这些实验中，IFN-γR$^{-/-}$ 感染大型杜氏利什曼原虫[100]，假性狂犬病病毒[101]或 *L. monocytogenes* 与野生型对照相比，产生 IFN-γ 水平如非增多至少并不减少，因此强有力地证实 IFN-γ 通过其受体信号传递在介导 IFN-γ 产生中并非必要。而且，在单核细胞源利什曼原虫感染 IFN-γR$^{-/-}$ 小鼠胸腺细胞，可迅速检测到 IL-12 p40 亚单位[102]，提示 IL-12 在诱导 IFN-γ 中起作用。总之，这些结果提示体内对上述胞内病原体 IFN-γ 在介导 IFN-γ 产生中并非必需，而 IL-12 在诱导这些反应中起重要作用。

IFN-α 在诱导 IFN-γ 产生中的作用

IFN-α 为 Ⅰ 型干扰素，在一些实验模型中高度影响 IFN-γ 的产生。在研究由人外周血单个核细胞（PB-MCs）诱导产生的抗原特异性 T 细胞克隆研究中，IFN-α 在克隆化前的培养体系中抑制 Th2 细胞产生而利于诱导抗原特异性 Th1 克隆的产生[103,104]。另一体外研究中，于人淋巴细胞培养体系加入一种 IFN-α 诱导因子双链多聚肌苷酸（poly I:C），在过敏原 *D. pteronyssinus* 存在时导致 IL-4 与 IL-5 产生减少而诱导 Th1 克隆增加。而且，在加入抗 IFN-α 与抗 IL-2 于培养体系后可抑制双链多聚肌苷酸（poly I:C）诱导 的 Th1 克隆发育，因此进一步证实 IFN-α 在介导 Th1 克隆发育中起重要作用[105]。在最近研究中，培养体系中加入 IFN-α 在再刺激时可诱导 IFN-γ 产生明显增加。有趣的是，即使在 IL-12 中和抗体存在条件下也发生诱导增强，提示 IFN-α 可直接诱导 CD4$^+$ T 细胞 IFN-γ 产生[66]。除此以外在同一研究证实 IFN-α 可诱导表达 IL-12Rβ 链，对 IL-12 反应性增加以及促使 IFN-γ 产生。

在体外小鼠实验模型中研究了 IFN-α 在 Th1 发育中的作用及其与 IFN-γ 和 IL-12 的关系[97]。与上述结果相反，体外加入 IFN-α 增加 IFN-γ 分泌的作用很微弱，虽然 IL-4 产生有少量减少。而且，IFN-α 抑制体外与体内小鼠病毒感染 IL-12 与 IFN-γ 产生[106]，提示 IFN-α 在 Th1 诱导中有负调控作用。然而小鼠注射 IFN-α 或 polyI:C IL-4 mRNA 表达量降低，IFN-γmRNA 表达量增加[107]。这些结果提示，在小鼠 IFN-α 在 Th1 分化中起正调控或负调控作用。总之，这些数据支持这一观点，IFN-α 在人 CD4$^+$ T 细胞较鼠 CD4$^+$ T 细胞调节 IFN-γ 中的作用更加明确。

TGF-β 在诱导 IFN-γ 产生中的作用

TGF-β 体外可促使 Th1 细胞产生。然而该细胞因子在许多细胞类型中调节作用复杂，现似乎 TGF-β 对 Th1 反应起促进与抑制双重作用，在下面将详细讨论细胞因子交互调节的效应。

IL-18 在诱导 IFN-γ 产生中的作用

一种已被分离鉴定的新细胞因子（IL-18），初期称作 IFN-γ 诱导因子（IGIF），可增加脾 NK 细胞活性。后续研究证实，IL-18 可刺激人 T 细胞分泌大量 IFN-γ[108]，IL-18 作用似乎依赖于 IL-12，因为 IL-12 诱导 T 细胞表达 IL-18 受体[109]。这点可解释 IL-18 与 IL-12 协同作用可刺激 IFN-γ 产生，因此，后续研究应该弄清楚在体内 IL-18 是否有非依赖 IL-12 的介导免疫反应的作用。

作用于 Th2 分泌的细胞因子

IL-4 在诱导鼠 IL-4 产生中的作用

体外研究在各种条件下使用多克隆激活剂作用数日活化小鼠初始 CD4$^+$ T 细胞，经再刺激细胞因子产生的类型，初次阐明 IL-4 在诱导 IL-4 分泌细胞中具有作用。在这些实验清楚证明，在幼维前体细胞培养体系中存在 IL-4，可诱导 Th2 细胞发育[22,24,110,111]。另外需要指出的是：首先，诱导 IL-4 分泌细胞需足够量的 IL-4。其次，IL-4 可以 APC-非依赖方式诱导分化为 IL-4 分泌细胞，证明 IL-4 对 CD4$^+$ T 细胞有直接作用[24]。细胞在 IL-4 存在条件下培养 2d 在再刺激条件下即可产生 IL-4，提示 IL-4 分泌细胞分化过程在抗体刺激后短期

即可发生。最后，对细胞色素 c 或卵白蛋白等某一特定抗原特异的 TCR 转基因小鼠 $CD4^+$ T 细胞系（该体系与前述多克隆激活剂诱导实验相比更加符合生理特点，而且还可转变 APC 类型与抗原剂量，以观察其是否对 IL-4 分泌细胞分化有作用见下述）的实验结果与前述发现一致，在培养体系中存在 IL-4 无论 APC 类型有何不同，均可诱导 IL-4 分泌细胞的发育[23,25]。

使用 IL-4，STAT-6 或 IL-4α 缺陷小鼠均显著表明 IL-4 在调节 IL-4 分泌中有作用。研究表明在 *N. brasiliensis* 感染后，IL-4 缺陷小鼠 IgG1 与 IgE 产量显著减少，野生小鼠实验性线虫感染显示 IL-4 依赖性 IgE 产生量增加[112]，Th2 类细胞因子 IL-5 与 IL-9 水平亦下降[113]。除此外，缺陷 IL-4α 或 STAT6（一种 IL-4 信号传递关键分子）在 *N. brasiliensis* 感染反应中 IL-4 产生明显受损[114~117]。因此，体内研究充实了体外研究，证明 IL-4 在初始 $CD4^+$ T 细胞 IL-4 产生中起主要调节作用。而且，发现 IL-4 为促进向 IL-4 分泌细胞分化的基本调节因子引发了一个问题，初始驱动该反应的高 IL-4 从哪里来，这将在下面单独一节中加以讨论。

887

IL-4 在诱导人 IL-4 产生中的作用

IL-4 在影响人 $CD4^+$ 抗原刺激似 T 细胞的分化中的作用研究较为深入。在初期探究 IL-4 在 Th2 分化中的作用的实验中，总外周血单个核细胞体外初次以可诱导分化为 Th1 或 Th2 细胞的抗原剂激活化后，重新用多克隆激活剂刺激可诱导分别产生 IL-γ 和 IFN-4。在这些研究中，总外周血单个核细胞用 Th1 诱导抗原如 PPD 激活可产生 PPD 特异 T 细胞克隆，并产生 IFN-γ 但少量的 IL-4；然而，在 IL-4 存在于培养体系中用 PPD 刺激产生 PPD 特异 T 细胞克隆不仅只产生 IFN-γ，而且有 IL-4 与 IL-5。另一方面，总外周血单个核细胞在 IL-4 与 Th2 诱导抗原如过敏原 DeRp1 刺激作用下，可产生 DeRp1 特异 T 细胞系与克隆，并产生 IL-4、IL-5，但只有少量 IFN-γ，抗 IL-4 存在于培养体系条件下显著减少 DeRp1 特异性 T 细胞发育为 IL-4 分泌性 T 细胞系[93]。在继之体外研究检测人初始 $CD4^+$ T 细胞发育，在 IL-4 与抗 CD3 单抗培养体系中，再刺激可诱导 IL-4 与 IL-5 产生增加，IFN-γ 产生减少。这些结果与前述报道 IL-4 可诱导培养体系产生相对多但非绝对的 Th2 型别的结果相一致[118]。

因此，虽然这些结果正如前言所述，证明 IL-4 在人 Th2 细胞调节分化中起主要作用，细胞因子对人 $CD4^+$ T 细胞分化为 Th2 极化的影响，与小鼠短期建立的 Th1 与 Th2 细胞系相比而言较弱一些。

IL-2 在诱导 IL-4 产生中的作用

IL-4 除了在体外诱导产生 Th2 细胞起主要作用外，在体外培养体系中亦需要存在 IL-2[24,119]，IL-2 并非仅在这些体系中对维持细胞分化与细胞生长起作用，因为即使内源性 IL-2 被中和后 IL-4 的存在仍可维持细胞分化。此外体内小鼠利什曼原虫感染模型实验表明，正常情况下产生的 IL-4 易感小鼠品系如在感染时用抗 IL-2 抗体，则对感染产生抵抗作用[120]，同时 IL-4 的产生量相应减少。

虽然，IL-2 在体外对 Th2 分化似起重要作用，强有力的证据却证实，IL-2 在体内 IL-4 产生中并非绝对必需。发现 $IL-2^{-/-}$ 与 IL-2Rβ 链$^{-/-}$ 小鼠血清 IgG1 与 IgE 水平很高，从而提示有 IL-4 产生支持上述观点。有趣的是这些小鼠在无菌环境下可诱生严重结肠炎，并在病变范围 IFN-γ 产生增加[121,122]，提示 Th1 与 Th2 反应均增加，$IL-2^{-/-}$ 小鼠总体上缺乏调节应答能力而在 Th1 与 Th2 诱导分化中无偏向性。而且，$IL-2^{-/-}$ 小鼠在体内 TNP-KLH 免疫条件下与野生型小鼠相比胸腺细胞 IL-4 产量大大降低[123]。这些结果与 IL-2 总体上可增加 T 细胞反应水平，而 IL-4 产生则分别可被增加或抑制，依赖于 Th1 还是 Th2 反应为主相一致。

IL-6 在诱导 IL-4 产生中的作用

已有报道在培养体系存在 IL-6 条件下，体外可诱导小鼠产生分泌 IL-4 的细胞[124]，重要的是当培养体系加入 IL-4 中和抗体，IL-6 增强 IL-4 分泌细胞分化作用即被抑制。提示 IL-6 可迅速诱导定量内源性 IL-4 从而导致向 Th2 分化，并更强调了 IL-4 在调节此过程的作用。最后由于 IL-6 由多种 APC 产生，提示 APC 在介导 Th2 细胞分化中起潜在作用。后续研究应检验体内 IL-6 介导 Th2 反应的作用，以验证是否生理条件下这一

分子在 IL-4 产生中起作用。

IL-1 在诱导 IL-4 产生中的作用

最初证实 IL-1 在维持小鼠 Th2 但非 Th1 克隆的增殖能力起重要作用[91,125,126],这一现象提出了是否 IL-1 参与调节 IL-4 分泌细胞分化这一问题,但加入外源 IL-1 或抑制外源 IL-1,在小鼠体外模型并无改变 IL-4 产生的效应[25,127]。

反之,IL-4 在人初始 CD4$^+$ T 细胞 IL-4 诱导分泌中似起作用,这一事实的最初证实是,IL-1 抗体存在于培养体系的条件下,在过敏原(Der,p,I)存在下导致抗原特异性 CD4$^+$ 细胞分化为 Th0/Th1 型而非 Th0/Th2 样克隆[128]。在另一实验中,作外评估 IL-4 诱导人 CD4$^+$ 初始 T 细胞分化为 IL-4 分泌细胞的必要性,细胞经固相化 CD3 抗体活化并加入外源 IL-Iβ 与 CD28 抗体,在二次刺激时 IL-4 产生增加。这一结果令人鼓舞,因为初期刺激培养体系中加入抗 IL-4 抗体,再刺激 IL-4 诱导亦未被抑制。因此该结果提示在 APC-非依赖性激活培养体系中,IL-1β 与 CD28 抗体在培养体系中可以以 IL-4 非依赖性方式诱导分化产生 IL-4 分泌细胞[129],应该避免误解的是,在这些实验中使用 CD3 单克隆抗体作为激活剂情况下诱导分化产生 IL-4,也许与 APC 呈递条件下的后果并不相同。

辅助分子

除了细胞因子外,另一影响 T 细胞分化的因素是 APC 膜表面辅助分子与 T 细胞相应受体的相互作用,研究较为深入的是 B7/CD28 与 CD40/CD40L 共刺激途径在介导 T 细胞激活与分化中的作用。虽然 CD40/CD40L 相互作用在 Th1 诱导分化中的作用很清楚,B7/CD28 共刺激在诱导 Th1 与 Th2 分化中的作用则较为复杂,并未完全弄清。在本节中将阐述辅助分子影响 Th 细胞分化中的作用。

B7/CD28 共刺激在诱导 Th1 与 Th2 分化中的作用

B7/CD28 辅因子信号传递在初期激活初始 T 细胞,在防止细胞免疫无应答或耐受中起了不可缺少的作用[130],由于该作用在 T 细胞活化过程中很重要,B7/CD28 在调节 T 细胞分化中的作用成为研究很深入的领域。研究 B7/CD28 辅信号影响 Th 细胞发育情况较为复杂,因为 APC 上至少存在两种不同的 B7 分子(B7-1,B7-2),均可与 T 细胞 CD28(组成型表达并传递活化信号)与 CTLA4(激活后表达传递抑制信号)[131]作用,而且,B7-1 与 B-2 可根据 APC 细胞类别与活化状态而表达水平有很大变化[132,133],因此,可能这种辅助分子(B7-1,B7-2)在质与量上改变 CD4$^+$ T 细胞特异细胞因子产生中起独特作用,下述将讨论 B7/CD28 辅信号途径在影响 Th 细胞分化的可能机制。

B7-1 与 B7-2 分别在调节 Th1 与 Th2 分化中的直接作用

首先在小鼠 EAE 模型中,显示 B7-1 与 B7-2 可在不同程度影响 CD4$^+$ T 细胞细胞因子的分泌类型。在该项实验中,提示 B7-1 与 B7-2 共刺激可分别增加 IFN-γ 与 IL-4 分泌[134],体外研究使用人 CD4$^+$ T 细胞显示 B7-2 但非 B7-1 转化的纤维母细胞诱导 T 细胞激活可导致 IL-4 分泌[135,136],提示 B7-2 可能在选择性诱导 IL-4 中起更大作用。然而,小鼠[137]与人[138]体外研究表明,B7-1 与 B7-2 转染细胞均可诱导激活的 CD4$^+$ T 细胞 IL-4 与 IFN-γ 分泌,而高度纯化初始 CD4$^+$ T 细胞,无论 B7-1 还是 B7-2 转化细胞均不能诱导产生 IL-4。在最近小鼠体外[139]与体内实验[140]表明,B7-1 与 B7-2 均无强制性与选择性诱导 IL-4 或 IFN-γ 的作用。因此,至今仍无明显证据证明 B7-1 与 B7-2 诱导 CD4$^+$ T 细胞可传递不同信号,导致 Th1 或 Th2 分化亚型产生[141],也许 B7-1 与 B7-2 在分别诱导分化产生 IFN-γ 与 IL-4 主要依其共刺激时间而定。

短暂表达 B7-1 与 B7-2 在调节 CD4$^+$ T 细胞细胞因子产生中可能起作用

B7-1 与 B-2 无论在启动免疫反应时,还是在已建立免疫反应后在 APC 的诱导表达的时间内,在诱导

IFN-γ 与 IL-4 产生中可能起重要作用。在启动免疫反应时，B7-2 在某些 APC 如树突细胞表达量较 B7-1 为多[133]。与 CD28 共刺激在诱导 IL-4 产生较诱导 IFN-γ 可能更重要相一致，在启动反应时阻断 B7-2 可减少诱导产生的 IL-4[134,142]，使用 CTLA-4Ig 抑制 B7-1 与 B7-2，均可抑制 Th2 类细胞因子产生，但 Th1 分化反应维持不变[143~145]，这些材料均证实在启动免疫反应时短暂表达 B7-1 与 B7-2 的机制对促进 Th2 类细胞因子产生的重要性。应着重提出的是，一但 CD4$^+$ T 细胞激活，CD28/B7 辅刺激在调节 IL-4 与 IFN-γ 产生中的作用也许就不同了。无论体外[146,147]与体内[148]分化的小鼠 Th1 细胞均需 B7 持续刺激激活，而 Th2 细胞在 B7 不存在条件下亦可发生分化反应。抗 B7-2 可阻断 Th2 反应，因为早期 B7-2 表达与早期辅刺激促进 Th2 分化相一致，而抗 B7-1 能抑制 Th1 反应因为晚期 B7-1 表达，与分化的 Th1 细胞需持续依赖辅刺激信号相一致。在图 26.4 中表示了这一机制的可能原因。

889

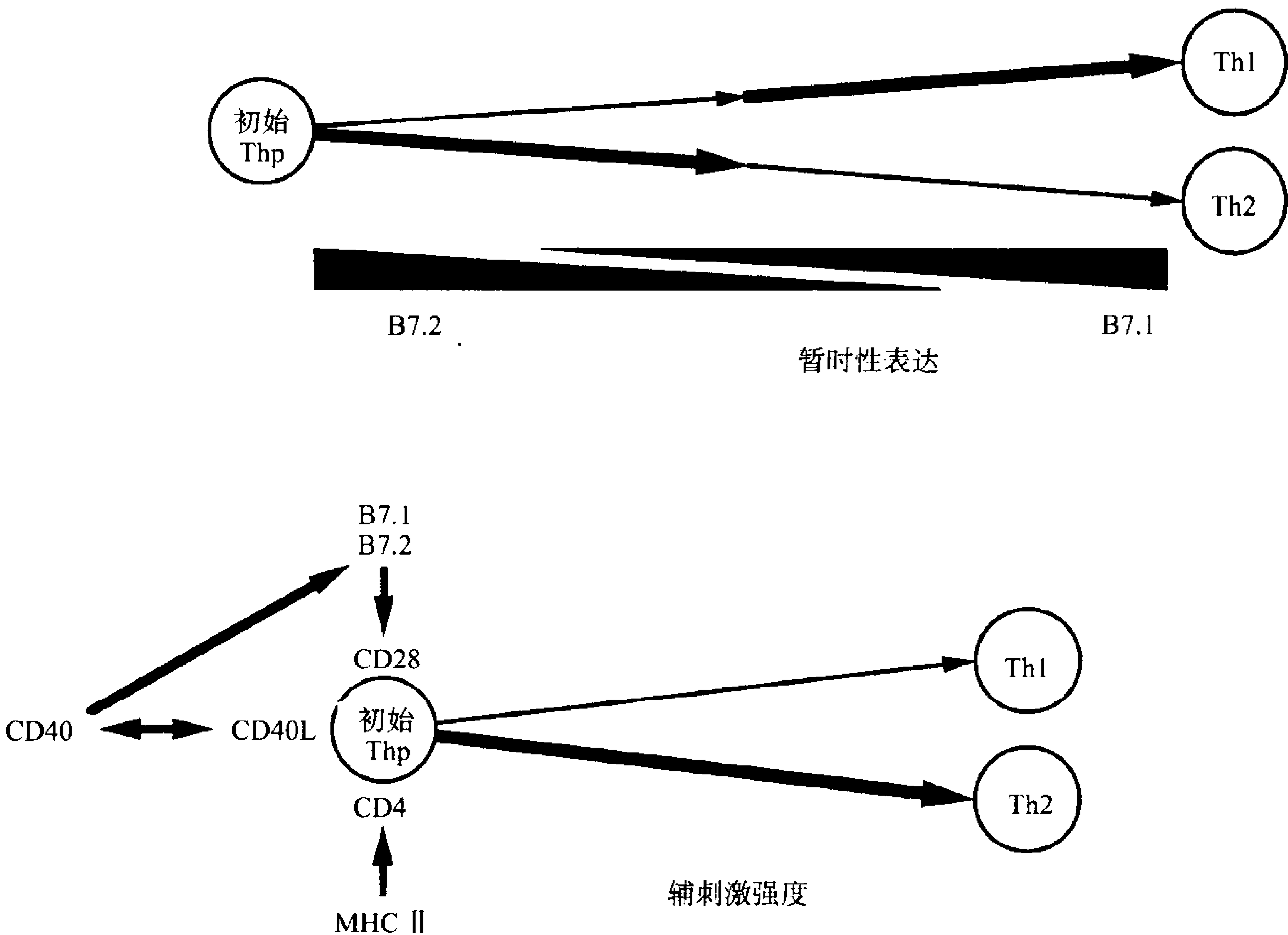


图 26.4 促进 Th1 与 Th2 细胞分化的辅助刺激因子，图中表示不同辅刺激因子在 Th1 与 Th2 细胞分化中的效应。第一，B7.1 与 B7.2 早期与晚期表达在 Th1 与 Th2 细胞分化过程中可能需要 CD28 的共刺激信号；第二，Th2 细胞分化可能被 CD40L、CD28 与 CD4 的总体辅助刺激有所增强。

刺激强度

暂不管 B7-1 或 B7-2 可能具有的不同分化作用，B7/CD28 辅信号亦可通过影响 CD4$^+$ T 细胞活化的程度来调节 Th1 与 Th2 细胞的分化[149,150]。例如，在相对低水平的 T 细胞刺激条件下，可诱导 IFN-γ 产生；在高水平刺激条件下，诱导产生 IL-4，体外鼠[137]与人[151~154]实验证明，反复用 B7 转化细胞或反复直接用 CD28 刺激 CD4$^+$ T 细胞可诱导产生或增加 IL-4 的分泌[154]支持这一观点。另一直接证据是 CD28 缺陷小鼠哺育成为 NOD 小鼠后，体外细胞有相对 IL-4 分泌缺陷，证实 CD28 刺激信号在 IL-4 产生中起作用[155]。应该指出，也有数据表明 B7/CD28 辅信号在 IL-4 分泌中并非必需，体外研究显示只要在 IL-2 存在条件下，无 B7/CD28 辅信号，CD4$^+$ T 细胞 IL-4 分泌也可诱导产生支持这一点[119,156]。而且，CD28 缺陷小鼠感染 *H. polygyrus* 维持其 Th2 样特征性反应[157]，并且，无论在抵抗或易感基因背景的条件下，该小鼠在感染大型杜氏利什曼原虫的后分别保持其各自产生 IFN-γ 与 IL-4 亚型的特征，显示在 CD28 辅信号不存在的条件下，IFN-γ 与 IL-4 的分泌在体内均可产生[158]。总之，这些数据提示 CD28/B7 依赖性 Th2 细胞因子的诱导并非绝对，而且可依免疫刺

激的类型而有所改变。因此,对于繁殖速度快的病原体(如 *H. polygyrus*, 大型杜氏利什曼原虫)可在无 CD28 刺激存在条件下足以刺激诱导产生 IL-4,或对于蛋白质或自身抗原(如 NOD)CD28 可降低诱导 IL-4 产生的激活阈值。上述后面的例子支持这一观点,通过 CD28 共刺激途径介导刺激活化的水平可影响产生反应的类型,IL-4 产生亦许要依赖于较高水平的 T 细胞活化。

强刺激信号与 IL-4 反应相关联,这与高浓度抗原多数诱导 Th1 反应,低浓度抗原多数诱导 Th2 反应不相一致(见下文)。提示,亦许 CD3/TCR 复合体介导的信号强度与共刺激信号及其相关激酶介导的信号,在影响 Th1 或 Th2 分化方面有所不同。

总之,B7-1 与 B7-2 调节 Th 反应的能力更依赖于 B7-1 或 B7-2 在 $CD4^+$ T 细胞提供辅信号的强度与时间。其他因素如细胞因子环境、附加的辅因子作用(CD40L/CD40,见下文)与激活抗原的特性(如感染还是自身抗原)及启动 T 细胞活化的时间,亦对 B7 辅信号调节 Th1 或 Th2 反应起附加影响作用。

CD40L/CD40 在调节 Th1 与 Th2 分化中的作用

CD40 配体(CD40L)/CD40 共刺激途径在免疫反应中起主要的调节作用。最初工作证实 CD40L/CD40 刺激在 B 细胞活化与同种型转换中起重要作用[159,160]。最近,已明确这一途径在调节 CD4 + T 细胞增殖与细胞因子分泌反应(如 IL-4 与 IFN-γ)亦至关重要[161~163],CD40L/CD40 辅信号调节上述反应的机制已证实是通过增加各种辅刺激分子配基诸如 B7 表达而介导[164,165]。除此以外,体外实验显示 CD40L/CD40 相互作用,可诱导单核细胞与树突细胞明显著的 IL-12 分泌,提示这种相互作用在影响 Th1 分化中起重要作用[166-168],体内实验当正常对大型杜氏利什曼原虫有抗病性的小鼠突变为 $CD40L^{-/-}$ 感染大型杜氏利什曼原虫时,其 IFN-γ 与 IL-12 产生明显缺陷[169,170]支持上述观点。因此 CD40L/CD40 辅刺激可通过 B7/CD28 辅刺激信号,和/或诱导产生 IL-12 在调节 Th1 反应中起重要作用。

890

CD4 信号传导在调节 Th1 与 Th2 分化中的作用

CD4 在 T 细胞活化过程中被认为有双重功能:首先,CD4 与 TCR—MHCII 类复合物结合,增强结合强度;其次,CD4 胞内段与蛋白激酶 P56Lck 相联系,导致经 CD4 传递活化信号[171,172],CD4 这种功能似乎在 Th2 分化中更加重要,因为体外用 MHC 游离肽阻断 CD4-MHCⅡ类分子相互作用导致偏于诱导 IFN-γ 反应[173],CD4 缺陷小鼠可增强针对蛋白或寄生虫抗原的 Th1 但非 Th2 反应[174,175]。CD4 胞内段缺失突变体保存有部分的但非所有的 Th2 反应的功能[175],提示 CD4 的黏附与信号传递的特性均对向 Th2 分化有作用。

抗原剂量

抗原剂量可能强烈影响免疫反应过程中的诱生的功能效应细胞的类型,早期使用鞭毛蛋白免疫大鼠提示,低剂量在调节后续的迟发性超敏反应(DTH)应答更有效,较高剂量却可诱导抗体产生,非常高剂量又可诱发 DTH 反应[176]。由于 DTH 与抗体反应经常是抗原诱导的 Th1 或 Th2 细胞因子极化反应的结果,因此已有许多实验检测了抗原剂量在细胞因子极化反应中的作用。

在对蛋白或多肽多克隆激活反应中抗原剂量的作用

体内与体外小鼠对人Ⅱ型胶原的反应显示有依赖于反应小鼠的 MHC 类型的明显双歧性。$H2^s$ 小鼠可增长 Th1 样 DTH 反应,$H2^b$ 小鼠则产生抗体与 Th2 样细胞因子[177],这与 $I\text{-}A^s$ 与主要的胶原肽亲合力高,该肽与 $I\text{-}A^b$ 亲合力却正好相反则很弱相一致。高亲和力结合往往与 ATC 表面肽-MHC 复合物数量增加相关[128],因此,高密度配基倾向于诱导 Th1 反应,体外用大剂量肽可诱导 $H2^b$ 细胞 Th1 反应支持这一点。使用胶原肽变异体可获得相似结果:与 $I\text{-}A^s$ 结合较弱的肽诱导 Th2 反应,而与 $I\text{-}A^b$ 结合较强的肽则诱发 Th1 反应[179]。

而且,在另一种肽抗原体系[180],体内用高亲和力多肽诱发 Th1 反应,而低亲和力多肽在低剂量诱发 Th2 反应而高剂量诱发 Th1 反应。

抗原剂量对特定 T 细胞受体的作用

识别特定的抗原多肽的 TCR 转基因小鼠,提供了抗原剂量在选择 Th1 与 Th2 分化中的作用的又一证据。高剂量蛾细胞色素 c 多肽抗原体外可诱导特异性初始 T 细胞分化为 Th1 细胞,而低剂量可诱导 Th2 反应[181]。然而在相似的研究中,TCR 转基因小鼠识别卵蛋白多肽,极低剂量、中等剂量与极高剂量抗原可分别诱导 Th2,Th1 与 Th2 反应[182],虽然肽与 MHC 和 TCR 的亲合力不同,因此很难比较不同 TCR 与多肽的浓度,但如果假认在某一实验中极低剂量与中等剂量[182]与其他实验低与高剂量相对应[181],则可使这些结果相符合。然而,这些结果显示,抗原剂量的效应不可被单独剂量依赖性转换所解释。

也许可能不同肽的作用在某些方面是由于质而非量的差别而引起,从而介导不同信号,野生型蛾细胞色素 c 仅可诱导 Th1 分化反应,而另一对 TCR 结合力弱但对 MHC 有正常亲合力、在所有试用剂量范围均可诱生 IL-4 与 IFN-γ 分泌性 T 细胞[183],改变过的多肽在各种剂量似仅诱发 Th2 分化效应,由于一些非定型前体细胞在初次刺激培养 4 天后仍然存在,在二次抗原刺激时用野生型多肽似可诱导其分化为 Th1 细胞[183]。低亲和力多肽似起到部分性激动剂的作用,而即使在饱和浓度下也不可诱发高水平信号传递,因此仅可诱发 Th2 分化反应[184]。

抗原剂量可通过细胞因子人为操作的影响而改变分化途径[182,183],提示细胞因子在介导分化效应中起主要作用,或抗原剂量可通过转化细胞因子产生的类型为中介介导分化效应。

体内病原体剂量的效应

体内病原体剂量的效应很难与在体外与体内使用可溶性抗原或多肽所产生的效应相一致。BALB/c 小鼠通常易感于大型杜氏利什曼原虫,因为其可诱导较强的 Th2 反应。通过调节细胞因子水平[30]或减少感染

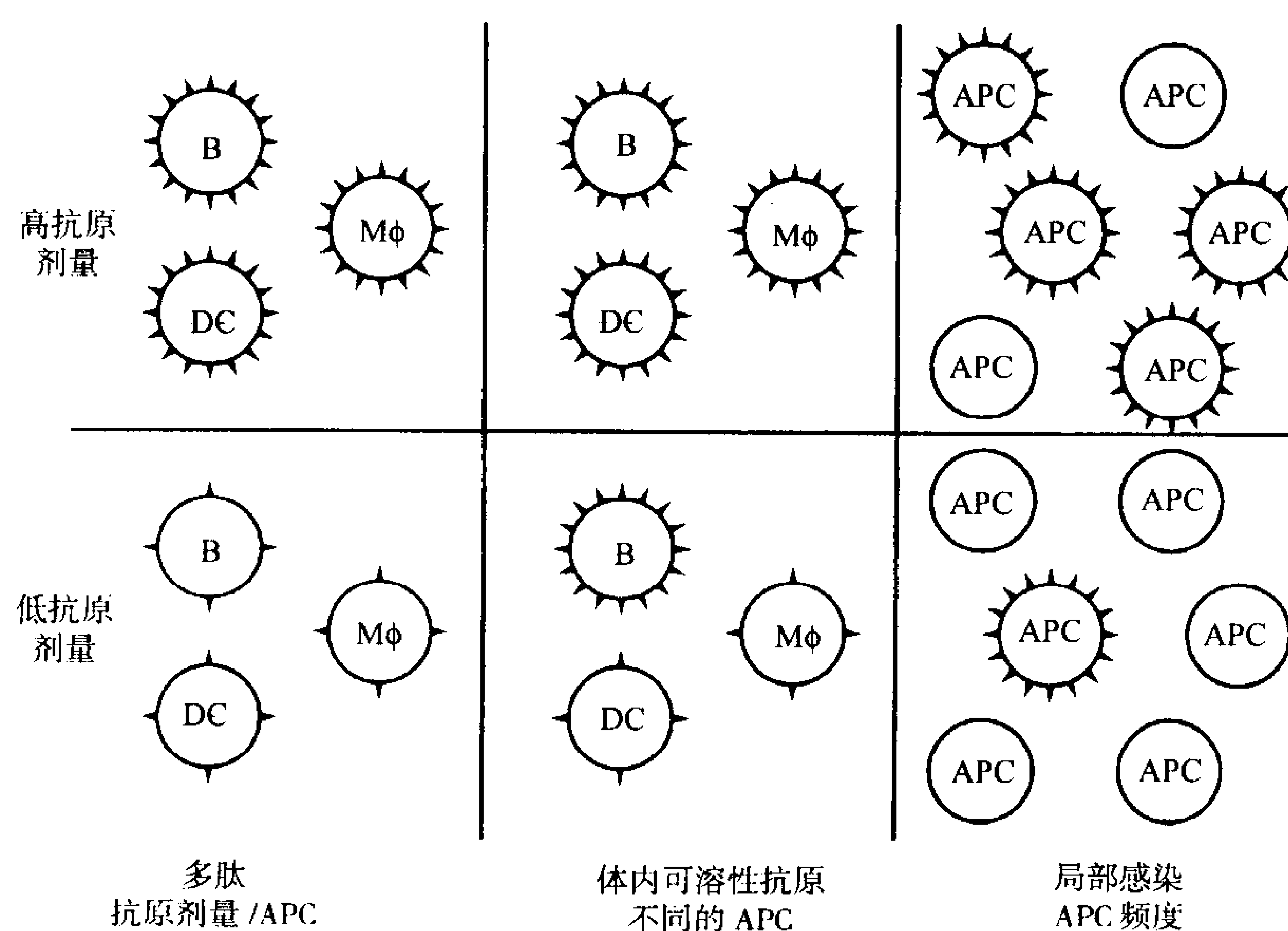


图 26.5 不同抗原剂量呈递给 T 细胞的三种方式。在体外与体内抗原肽似均匀分布于 APC 细胞表面,因此主要区别在于不同抗原剂量下每一 APC 细胞抗原肽分布密度。可溶性蛋白在低剂量趋于有抗原特异性 B 细胞呈递,而高剂量则由所有细胞呈递。在感染过程中,尤其在胞内寄生虫感染时,呈递抗原的 APC 比例较少和(或)趋于局限性分布于特定部位,但每一 APC 仍呈递大量的抗原肽。

寄生虫的量[185]可诱生治疗性的 Th1 反应。在另一感染实验中，鞭毛虫感染 BALB/K 小鼠通常情况引起强 Th2 反应，但接种低剂量鞭毛虫卵可诱生倾向于 Th1 的反应与寄生虫抵抗性[186]，因此在这两种感染模型中，高剂量与低剂量抗原水平可分别诱导 Th2 与 Th1 反应。

虽然体内实验结果可以这样解释，即认为体内的低剂量与高剂量感染微生物的结果与体外中等剂量与很高剂量相符[182]，但转变感染因子的剂量与转变肽或可溶性蛋白抗原的剂量所致的效应却很不一致（图 26.5），低感染病原体数将降低感染灶的数量，但每一 APC，尤其是在利什曼感染的巨噬细胞，可能仍可呈递大量的抗原肽，因此在低感染剂量，T 细胞将被少量但可呈递高浓度抗原肽的 APC 而被激活，因此与低剂量多肽刺激实验结果很不相似（如常见的 APC 和低水平多肽）。低感染剂量的影响与在易感性 BALB/c 小鼠利什曼原虫感染时除去 CD4⁺ T 细胞的后果相类似[187]，该操作减少了反应性 T 细胞的数量导致向 Th1 反应转变及产生疾病抵抗性。

891

另外应注意的是，体外与体内的相似结果可能并非来自相同的机制。体外实验结果在简单的非扩增性 APC 体系中，可能主要受配基密度的影响。而体内，不同抗原剂量可被不同的 APCs 所呈递（图 26.5）。例如低剂量蛋白可能倾向于被抗原特异性 B 细胞捕获，处理与呈递，且在早期反应中将得到增殖。虽然 B 细胞在高配基密度条件下支持向 Th1 分化[188]，其在体外与体内则倾向于诱导 Th2 反应（见下文）。因此，体内低剂量蛋白或多肽诱导 Th2 反应可被体外实验倾向于主要由 B 细胞呈递抗原与配基密度效应所解释。

抗原剂量效应的另一可能解释是 APC，如树突细胞或巨噬细胞可表达不同的细胞因子或辅助分子，依赖于感染的密度而定。APC 自身分泌的多种细胞因子可大大影响反应的特性，APC 产生 IL-12 与 IL-10 的平衡作用可被不同的感染水平所影响，这一点可以理解。

抗原剂量对效应 T 细胞的作用

不同的抗原剂量对已完全分化的效应 T 细胞仍有作用，虽然 Th2 细胞可被大范围的抗原浓度完全活化，Th1 细胞仅在中等浓度而非高浓度抗原所活化[189]。同样，转化的 Th1 或 Th2 克隆显示高抗原剂量利于表现出 Th2 辅助效应，低抗原剂量在诱导 Th1 辅助效应中更有效[190]。即使 T 细胞产生的细胞因子可依抗原剂量所改变，抗原特异性人 T 细胞克隆在低抗原浓度下产生 IL-4，在高抗原浓度下则产生 IL-4 与 IFN-γ[191]。在相似的研究中，过敏原特异性外周血细胞在低剂量抗原刺激，尤其在 B 细胞呈递条件下，可产生更多量的 IL-4，而高剂量且又单核细胞呈递条件下，IL-4 分泌减少[192]。

总之，抗原剂量在诱发的反应类型中有明显且强效的作用。依实验体系不同，其作用可导致相反的效应结果，提示有多种机制介入。与前述已讨论过 B7 辅因子效应相似，抗原剂量的效应可能与其他因素亦有关，如初始 APC 的特性，抗原存在时间与抗原特异性 B 细胞群的潜在增殖能力。

T 细胞发育库

不同抗原经常诱生 Th1 或 Th2 样特征性反应；如过敏原通常诱导 Th2 反应，而分枝杆菌抗原诱导 Th1 反应。TCR 特异性与 T 细胞产生细胞因子类型之间的相互关系引起诸多关注，总的来说，似乎这两种特性并无直接关系，虽然在一些系统中一些特殊的限制性 TCR 识别 T 细胞群已被确认为 IL-4 的早期来源（见下文）。

892

在一些抗原体系中，抗原的相同的识别表位均可诱生 Th1 或 Th2 反应[193~198]，小鼠识别大型杜氏利什曼原虫的 Th1 与 Th2 细胞可识别相同的表位，其 TCRα 与 β 基因亦很相似[74]。更多的证据提示，TCR 特异性与细胞因子分泌型别并不相关，如 TCR 转基因小鼠表达同种 TCR 的 T 细胞可分化为 Th1 或 Th2 细胞，依其分化过程中的细胞因子环境而定[23,25]。最后，单个初始 CD4⁺ 初始细胞均可分化为 Th1 或 Th2 型别[75,76]。因此对单个初始 T 细胞，已表达的 TCR 具抗原识别特异性，其细胞因子分泌型别却仍未定型。

然而仍有一些证据表明，特定的抗原或表位倾向于诱导 Th1 或 Th2 反应[199~201]，这可能不是 TCR 特异性与细胞因子类型直接联系所造成，而很可能是由于下述一种或多种原因：抗原（甚至肽）的物理特性，可引导

抗原在特定场所或由特异 APC 呈递，一些抗原可能有佐剂效应可非特异的刺激特定的 APC，抗原可能有不同的半衰期，导致激活动力学不同；或抗原与多肽与以前已诱导特定反应类型的抗原间有交叉反应，从而导致再激活已形成的特定细胞因子模式影响新的反应。

总之，事实证明这一模式，初始 T 细胞具有双向成多向分化能力，即 TCR 的特异性不可直接决定后续的 Th1、Th2 或其他型别的分化。

抗原呈递细胞在 Th1 与 Th2 分化中的作用

APC 通过 MHC Ⅱ类分子呈递抗原，在产生抗原特异性 $CD4^+$ T 细胞反应中有主要作用。不同 APC 刺激初期免疫反应的能力有所不同已被多数人接受。鉴于此，人们普遍认同树突细胞在单细胞水平上激活前体 T 细胞的能力最强，虽然单核细胞和激活的 B 细胞亦足以激活前体 T 细胞[202]，虽然 APC 行使许多不同的功能是通过表达各种辅助分子，但现已弄清 APC 也可有效的分泌各种免疫调节性细胞因子以影响产生的 Th 反应型别。本节将着重讨论 APC 产生的不同的细胞因子，与表达的辅助分子在影响 Th1 与 Th2 型细胞发育中的作用。

树突细胞

在体外小鼠诱导呈递实验模型，最初显示树突细胞可依赖于培养体系有/无 IL-4 而分别[25]诱发初始 T 细胞足量 IFN-γ 与 IL-4 的产生，后续工作显示，可在 CD40L/CD40 辅刺激下[166~168,205]由树突细胞诱导产生 IL-12[203,204]，提示树突细胞可诱导增加 IFN-γ 特异性反应。虽然后面的这些工作提示树突细胞呈递抗体偏于诱导 Th1 反应，但亦有体内实验证实树突细胞亦可诱导 Th2 型反应[206]，树突细胞可增强 IL-4 产生可能是由于树突细胞与初始 $CD4^+$ T 细胞相互作用时的细胞因子环境所造成。正如前述，如果在初次刺激时，有足够量的 IL-4 存在，树突细胞可诱生大量 IL-4。而且，由于已证实 IL-10 抑制树突细胞刺激 Th1 细胞 IFN-γ 产生[207]可能是通过抑制 IL-12 分泌[208]，有可能在最初活化时在 IL-10 存在情况下则偏于 Th2 反应。相似的，有证据表明其他信号如前列腺素 E2 (PGE2)，可诱导 APC 前体分化为树突细胞，产生低水平 IL-12 与高水平 IL-10，并优先诱导 Th2 分化[209]。最后，由于树突细胞表达相对高水平的 MHCⅡ类分子与组成型表达辅助刺激分子如 B7-2，从而可诱导相对高水平的 T 细胞活化，以上述机制诱导 IL-4 产生。因此，作为一种可能是主要的 APC 启动免疫反应，树突细胞可通过刺激时的条件来引导 Th1 或 Th2 反应。

单核细胞与巨噬细胞

早期小鼠体外实验探寻 APC 在影响 Th1 与 Th2 分化的作用，提示采用巨噬细胞而非 B 细胞作为 APC 可诱导初始 T 细胞 IFN-γ 产生[210]，后续体外实验提示，吞噬细胞在细菌产物作用下可诱导产生 IL-12[211]，提供了巨噬细胞可选择性诱导 IFN-γ 产生一种的机制。巨噬细胞可直接诱导 IFN-γ 产生，在巨噬细胞被 *L. monocytogenes* 感染可通过 IL-12 依赖方式增加 Th1 类细胞分化实验进一步阐明[81,96]，这些体外实验与一些其他体内实验，提示许多其他以巨噬细胞为靶目标的胞内感染[212~214]可通过产生 IL-12 而强有力诱导 Th1 反应，提供了巨噬细胞可引导 Th1 类细胞因子产生的有力证据。Th1 反应亦可由 IL-12 刺激下 $F4/80^+$ 腹膜巨噬细胞产生 IFN-γ 而增强[215]。再者，应指出的是巨噬细胞亦可产生 IL-10，在许多这些同样的刺激条件下，为有力的具与 IL-12 相反调节作用的细胞因子。另一巨噬细胞因子 IL-6 在同样状态下亦可增加 Th2 分化[124]。因此，巨噬细胞在 Th 细胞分化中有双重效应，依赖于产生 IL-10 或 IL-12 以何为主。

B 细胞

B 细胞也提示在诱导 Th 反应中很重要。与巨噬细胞与树突细胞相似，B 细胞还可分泌细胞因子影响 Th1 与 Th2 样细胞的发生。由于 IL-12 最初由 B 淋巴母细胞克隆鉴定出，理论上 B 细胞亦应主要影响 Th1 反

应，虽然生理条件下体外体内正常B细胞分泌IL-12的作用仍有待证实。除此外，$CD5^+$(B1)B细胞为IL-10的来源之一[216]，如上所述可导致下调Th1反应[207]，间接增强IL-4分泌细胞的发育。在体内小鼠去除B细胞显示针对蛋白抗原而非多肽抗原的T细胞呈递反应受损[217]，或在chabaudi chaubaudi疟原虫感染条件下IL-4与IL-10产生减少而IFN-γ产生增多[218]，进一步证实了这种调节方式。另一体内证据来源于转基因识别补体C5a的TCR小鼠模型。在该小鼠，B细胞抗原呈递编于Th2样反应[219]。其他支持B细胞诱导Th2反应的证据来源于小鼠注射抗IgD抗体可(可导致多克隆B细胞活化)诱导有效IL-4分泌[220]，而且，抗IgD抗体的诱导IL-4分泌效应在$CD28^{-/-}$小鼠丧失，提示前述T细胞活化通过B7/CD28途径在诱导IL-4分泌中的重要作用[221]。尤其在低浓度抗原条件下，B细胞在调节IL-4产生中作用可能是由于通过其膜受体结合抗原能力更强，从而诱导产生高密度的抗原-MHC复合物[192,222-224]。虽然高密度配基，即使在B细胞可导致Th1分化[188]，选择性低浓度抗原集聚于B细胞却可增强Th2反应，因为B细胞无论是通过诱导Th2反应的细胞因子，或辅助分子的表达，或由于缺乏Th1诱导信号如IL-2，本身更趋向于增加Th2反应。最后，虽然有足够证据证明B细胞可选择性增强Th2反应，体内实验证实IL-4在B细胞不存在条件下亦可诱生[206]，显示其他APC如数突细胞亦足以诱导Th2分化。

总之，APC影响诱导Th反应型别似有两种主要机制。首先，APC通过产生细胞因子如IL-12可直接增强Th1反应，而产生IL-10可减弱Th1反应间接增加Th2细胞因子分泌。其次，APC通过其表达MHCⅡ类分子或辅助分子(如B7，CD40)水平不同，或其呈递抗原能力不同，影响$CD4^+$ T细胞不同的水平活化从而影响Th反应类型。重要的是应重申，T细胞与APC接触时的局部细胞因子环境在调节Th1/Th2分化中可能是最主要的调节因素。前面章节提到，在体外研究中加入外源IL-4或IL-12于培养体系中，可诱导IL-4或IFN-γ分泌细胞产生而与刺激的APC类型无关支持上述观点[25]。而且，其他免疫调节因子如IL-10与TGF-β可影响APC分泌细胞因子与共刺激因子类型，从而亦可能在影响引导产生的Th反应类型中的重要作用。

调节Th1与Th2分化的遗传学基础

体外研究Th1与Th2细胞分化发现，在BALB/c小鼠初始$CD4^+$ T细胞在中性条件下刺激活化(无外源IL-4或IL-12)，在再刺激时较B10.D2小鼠可产生更多的IL-4[225]，这个事实与BALB/c小鼠，由于IL-4分泌增强易感于大型杜氏利什曼原虫相一致，而B10.D2小鼠IL-4产生减少、IFN-γ产生增加从而对感染有抗性[31]。总之，该实验提示BALB/c小鼠遗传上倾向于T细胞在抗原刺激下产生更多的IL-4。早期IL-4的产生对增强Th2反应的发育与稳定性的重要性在于其可下调IL-12Rβ2亚单位表达与后续IL-12反应[68]，因此，现今工作焦点在于研究BALB/c小鼠增强IL-4分泌的遗传学基础，从而对于理解是否在变应原与寄生虫感染性疾病倾向于Th2反应。已鉴定出至少有6个基因参与抗利什曼原虫感染反应表明，调节极化反应的遗传学基础可能很复杂[226]。

Th1与Th2细胞分化的分子学基础

T细胞亚群细胞内信号由STAT蛋白介导

因为IL-12与IL-4为控制Th1与Th2细胞分化的主要决定因素，确立这些细胞因子调节IFN-γ与IL-4产生的分子生物学机制引起广泛兴趣。在过去几年内，鉴定出一类称为细胞因子诱导的信号传递与转录的活化因子(STAT)，对理解细胞因子如何特异调节$CD4^+$ T细胞分化为Th1与Th2细胞加深了认识。在特定细胞因子及受体相互作用下，存在下游离胞浆中STAT蛋白被酪氨酸激酶JAK家族成员磷酸化而二聚化后转运至核内与特异DNA序列相互作用调节基因转录[227,228]，事实上，IL-4与IL-12可分别活化特定的STAT蛋白(见下文)，从而在分子水平上调节Th1与Th2分化。

关于IL-4在Th2分化中的作用，一些研究小组证实，IL-4通过与其受体相互作用，可导致一种转录因子称作STAT6或IL-4 STAT磷酸化[229,230]，磷酸化的STAT6与IL-4启动子一个特定位点结合，直接转录IL-4启

动子控制下的报道基因,提供了 IL-4 介导 STAT6 活化与 Th2 分化的直接证据[230]。而且,在一些 STAT6 缺陷小鼠获得了 STAT6 调节 Th2 反应的肯定证据[114~116],在这些研究中,显示 T 细胞在体外或体内激活反应时,诱导分化为 IL-4 分泌细胞缺陷,因此这些结果与上述发现相一致,IL-4 通过 STAT6 信号传递途径在诱导 IL-4 分泌细胞产生时起关键作用[230]。

关于 IL-12 在诱导 Th1 发育的作用,已证实 IL-12 可选择性诱导 STAT4 活化,从而精确调节 IFN-γ 分泌[231]。而且,应用 STAT4 缺陷小鼠,在体外与体内实验中 IL-12 诱导 IFN-γ 分泌显著受损,显示,STAT4 在介导 IL-12 反应与 Th1 细胞分化中起重要作用[87,88]。 894

生物化学递质与转录因子在 Th 细胞分化中的作用

一些研究者致力于研究生化介质在调节 Th 细胞因子发生中的作用。基于这些研究,显示 Th1 与 Th2 克隆在激活时胞内游离 Ca^{2+} 增加[232~233]。然而,在这些研究中似乎 Th2 克隆产生 IL-4 信号传递不依赖于蛋白酪氨酸激酶(PTK),PIP_2 分解与 PKC 而 Th1 产生 IL-2 则更依赖于这些途径[232~234]。应该注意的是,许多实验均使用固相化的抗 CD3 抗体或其他药学试剂刺激已建立的 Th1 与 Th2 克隆。因此,将这些结果外推至在更符合生理刺激条件下 $CD4^+$ T 细胞前体的反应,仍需要实验证实。

另一研究热点是了解调节 T 细胞特异分泌 IL-4 或 IFN-γ 亚群的分子生物学机制。一些工作小组分析 IL-4 启动子区域,最初证实 NF-AT 与 AP-1 蛋白在调节 IL-4 转录中起潜在重要作用[235~239]。最近,另一转录因子调节蛋白如 NF-IL-6[240]、IκB 与 NF-κB[241]、C-maf[242]、NIP45[243] 与 GATA3[244] 也参与 IL-4 转录。应指出虽然 c-maf,NF-ATp 与 NIP45 在调节 Th2 克隆相对特异,且在 Th1 与 B 细胞转入这些调节因子可增强 IL-4 产生[237,242~246]。在体内生理条件下免疫反应组织特异性表达这些分子与 IL-4 分泌细胞的关系仍需进一步证实。因此如前述,最清楚的 IL-4 与 IL-12 调节 Th2 与 Th1 分化的分子机制,是其最初可诱导特异性 STAT 蛋白磷酸化从而直接或间接导致转录因子的调节反应。

细胞因子来源对 Th1 与 Th2 分化的影响

正如上述,主要影响 Th 前体细胞分化的是细胞因子,尤其是 IL-4、IFN-γ 与 IL-12。虽然 IL-4 与 IFN-γ 由 T 细胞产生,产生这些细胞因子的效应细胞在免疫反应初期数量却很少,因此在早期免疫反应中确定其他起重要作用的细胞因子来源细胞引起人们很大兴趣,有许多类细胞均可分泌细胞因子从而在 Th1 与 Th2 调节中起重要作用,且细胞因子之间的平衡作用与细胞类型在调节 T 细胞分化中似也有作用。

角质细胞(角质形成细胞)

角质细胞是一种数量较为丰富的通过皮肤感染的首次接触的细胞之一。在损伤后,人与小鼠角质细胞均可产生细胞因子,如对 UVB 照射后导致的 IL-10 分泌与 Th2 类反应[247~249]。IL-10 对 DTH 反应的抑制性负反馈有作用[247]。然而,角质化细胞亦可产生 IL-12[250~253] 与 IL-18[254],亦可诱导向 Th2 反应倾斜。因此,由角质细胞诱导的免疫反应可能依赖于 IL-10 与 IL-12 之间分泌的平衡作用,而后者反过来则有可能依赖于其他局域性细胞因子的作用。

经典 T 细胞

虽然经典初始 CD4 或 CD8T 细胞在急性刺激时不可诱生显著多量的 IFN-γ 或 IL-4[17,225~257],非限制性的多样化 TCR 特异性的 T 细胞时仍可在首次反应时通过两条途径引起强烈的分化反应。首先,有些已被前期的其他抗原诱导分化的记忆或效应细胞,与此次感染时的新抗原有交叉反应。这些 Th1 与 Th2 样记忆细胞可分泌细胞因子而影响初始 T 细胞的诱导分化方向。其次,对各种不同病原体可能有持续性的免疫反应,该反应可导致形成一种细胞因子环境从而强烈影响体外 T 细胞的初期分化。比如在蠕虫感染时产生的对抗原

或其他病原体的免疫反应，可导致对卵白蛋白特异反应的 IgE 产生增加[258]或病毒感染时 Th1 反应减弱[259]。这两种机制中 $CD4^+$、$CD8^+$ 与 γδT 细胞均参与，因这三种细胞均可与 Th1 或 Th2 样细胞因子模式发生协同作用[6, 43, 257, 260]。

表达限制性 TCR 的 T 细胞亚群

在大型杜氏利什曼原虫感染时已鉴定出一种限制性 TCR 表达亚群。$V_\beta 4$、$V_\alpha 8$TCR 均表达于 LACK 抗原特异性保护性 Th1 或趋向于恶化性 Th2 克隆[74]，细胞表达该限制性 TCR 在易感小鼠缺乏可诱导的迅速爆发的 IL-4 表达（高峰在 16 小时）[261]。$V_\beta 4$ 缺陷 BALB/c 小鼠缺乏对利什曼原虫早期 IL-4 反应与产生 Th1 的反应。是否 $V_\beta 4$、$V_\alpha 8$TCR 细胞如同 NK T 一样细胞来源于一种单独的分化途径，还是其代表一种经典 T 细胞群在交叉反应性抗原的环境刺激下发生了增生反应，尚不清楚。

自然杀伤性 T 细胞

一种具 NK1.1 标记 T 细胞亚群，在适当的小鼠品系中在刺激下可迅速产生细胞因子[262]。NK 细胞可以是 $CD4^+CD8^-$ 也可以是 $CD4^-CD8^+$，可表达一种高度限制性的 TCR 通常为 $V_\beta 4$ 与 $V_\alpha 14$[263]。这些细胞限制性表达非典型 MHCI 类蛋白 CD1[264]，而非 MHC II 类分子，因此在 CD1 或 MHC I 类分子如 β_2 微球蛋白(β_2m)或 CD1 缺陷小鼠，这些细胞缺陷。CD1 可能结合于诸如分枝杆菌的多糖类抗原[268]，因此该限制性 NKT 细胞库可能识别普通细菌脂类。NKT 细胞在多克隆激活剂如 CD3 抗体刺激下数小时可产生大量 IL-4。这种细胞在无明显刺激诱导下可分泌大量的 IL-4 提示，NK T 细胞为早期 IL-4 的重要来源之一，偏于诱导 Th2 免疫反应。抗 IgD 抗体的反应需 NK1.1α 细胞分泌 IL-4 与 IgE，与在 $V_\alpha 14$TCR 转基因小鼠 IL-4 与 IgE 表达增加证实这一点[270]。

然而，NKT 细胞似乎在一些 Th2 反应中不起重要作用，虽然体内 CD3 抗体多克隆激活诱导 NKT 细胞产生 IL-4 与继之 Th2 反应，其他 T 细胞反应则不依赖于 NKT 细胞，与上述结果相反，CD1 缺陷小鼠在抗 IgD 免疫诱导后可增强 Th2 反应[267]，正常 Th2 反应在 β_2m 缺陷或抗 NK1.1 敲除 BALB/c 小鼠感染利什曼原虫仍可发生[271,272]，在 β_2m 缺陷小鼠在蛋白抗原如血吸虫卵抗原或日圆线虫属诱导下仍可发生 Th2 反应[271]，因此这些细胞在感染诱导的 Th2 反应中的作用仍不了解。然而，基于其可迅速大量产生 IL-4，NKT 细胞在一些情况下启动 Th2 反应仍是较佳候选者，尤其在肝等 NKT 丰富的组织中。

NK 细胞

NK 细胞表达 NK1.1 标记(在适当的细胞系)但无 TCR 表达，可通过 F_C 受体或 IL-12 协同 IFN-γ 刺激反应[79,293]。由于 NK 细胞在早期免疫反应中较 T 细胞丰富得多，NK 细胞 IFN-γ 产生可早期推动免疫系统 Th1 反应。在 C3H/HeN 小鼠利什曼原虫感染时，去除 NK 细胞可导致更偏于 Th2 反应及增加易感性[274]。虽然在一些情况下 NK 细胞亦产生其他一些的细胞因子[275]，NK 细胞主要产生的细胞因子似对 Th1 分化起主要作用。

巨噬细胞

巨噬细胞在早期免疫反应中为细胞因子主要来源，其可被不同微生物产物、细胞因子、细胞信号激活。巨噬细胞为 Th1 反应的强刺激剂，因热灭活的 *L. monocytogenes*、CD40L 或 IFN-γ 可诱导 IL-12 产生[81,99,205,276,277]。然而，巨噬细胞亦可产生 IL-6 与 IL-10[278]，依 IL-10 与 IL-12 之间的平衡而定，从而所诱导的 Th1 反应强弱不一。PGE2 可协同[278]而 IFN-γ 可抑制[279] IL-10 合成。虽然 IL-10 不可直接增强 Th2 分化，其抑制 IFN-γ 与 IL-12 分泌可能减少 Th1 反应，因此反过来可促进 Th2 发育。

树突细胞

树突细胞合成的细胞因子与巨噬细胞相似。CD40L 刺激可导致 IL-12 产生[166,168]，纯化朗格汉斯细胞

PCR 反应可检出 IL-12mRNA[280,281]。然而，在 PGE2 存在条件下，培养骨髓细胞可导致向树突细胞分化并合成少量 IL-12，多量 IL-10，从而可导致 Th2 分化[282]。而且，IL-10 可抑制树突细胞 IL-12 产生[208]。因树突细胞被认为为激活初始 T 细胞的主要细胞，因此树突细胞无论在诱导 Th1 或 Th2 分化中均有重要作用，此作用依赖于抗原的类型与细胞因子局部微环境。

巨核细胞、嗜酸性粒细胞与嗜碱性粒细胞

小鼠与人巨核细胞在 IgE 交联刺激反应后均可产生 IL-4[283,284]。因此，过敏原可诱导高水平 IL-4 分泌以增强变态反应。因蠕虫感染经常伴随过量的黏膜巨核细胞浸润，巨核细胞产生 IL-4 偏于诱导抗蠕虫 Th2 反应。然而并非所有巨核细胞均偏于诱导 Th2 反应，骨髓前体细胞在 IL-3 存在条件下可导致黏膜样巨核细胞产生 IL-4，而在干细胞因子刺激下导致结缔组织样巨核细胞产生 IL-12[285]。第 35 章将详细讨论细胞因子分泌的相互调节作用。

人嗜碱性粒细胞亦产生 IL-4，IL-4 与 IL-13 均报道在粒细胞分泌颗粒中预先存在[286-288]，IL-4 在补体 C5a、IL-3 或 IgE 交联时可被释放[289,290]。虽然小鼠嗜碱性粒细胞通过组织化学技术很难识别，但它可能代表一种非 B、非 T、非 NK、非巨核细胞的细胞类型，在交联 IgE 受体时可释放较多量的 IL-4[291]。

嗜酸性粒细胞亦可合成 IL-4，IL-4 预存于分泌颗粒在血清包被小珠刺激下可被释放[292]，与其他细胞类型相似，嗜酸性粒细胞亦具合成细胞因子诱导 Th1 或 Th2 反应的能力，嗜酸性粒细胞已报道同时具 IL-4 与 IFN-γ 分泌能力[293]。

总之，一些细胞类型可合成促生 Th1 或 Th2 样细胞因子。在任一种特定反应体系，一种特定细胞因子来源可能是重要的，但总体上似乎所有这些细胞因子来源细胞在一种体系或其他体系在 T 细胞分化过程中均起作用。另一种总体观点是，这些细胞类型至少存在有两种极化的分泌方式，分别可诱导 Th1 或 Th2 分化。这意味着不仅 Th1 与 Th2 分化反应取决于附近不同细胞类型的激活反应，而且每种细胞类型反过来亦要受微环境其他信号影响。

非蛋白质分子对 T 细胞分化反应的影响

除了细胞因子的作用外，抗原剂量、辅因子与其他蛋白调节因子在 T 细胞亚群分化中亦有作用，其他非蛋白介质对此作用亦有影响，包括一些应激与生殖有关甾类化合物，二十烷类一些与 cAMP、β-肾上腺于受体、组胺受体有关的药物。在许多情况下，这些信号可使其他系统影响免疫系统选择的细胞因子分泌方式。

896

固醇类性激素

妊娠期间 Ⅰ 型反应通常被抑制[294]，至少部分抑制可能是由孕酮与雌二醇直接引起。孕酮可在体外诱导人 T 细胞向 Th2 型分化，且在已建立的 Th1 克隆可短暂诱导诱导 IL-4 表达[295]。

柯萨其病毒 B3 在雄性小鼠可诱导 Ⅰ 型炎症反应，雌性小鼠却为 Ⅱ 型反应[296]。雌性小鼠用睾酮处理或雄小鼠用雌二醇处理，可转变诱生型别与细胞因子分泌亚群间的平衡。提示这些激素在 T 细胞分化中亦起作用，睾酮处理雌性小鼠减少 IL-4 与 IL-5 分泌性克隆产生，而雌激素处理雄性小鼠增加分泌 IL-4 与 IL-5 的克隆，而减少 IL-2 与 IFN-γ 分泌克隆。然而脱氢睾酮（DHT，睾酮代谢产物）体内处理 NOD 小鼠可控制糖尿病，且伴随 IL-4 产生增加[297]。最后，睾酮或 DHT 在体外均抑制 IL-4 与 IFN-γ 产生[298]。因此，雄激素与雌激素均可明显影响 Th1 与 Th2 间选择反应，但仍不能简单归结为一对一的相互作用。

应激性类固醇激素

不同形式的应激可抑制 T 细胞 IFN-γ 产生，不可逃避性的尾部电击减少大鼠细胞对 KIH 作用的 IFN-γ 与 IgG2a 抗体产生，但 IgG1 抗体不受影响[299]。皮质类固醇拮抗剂 RU-486 阻断这种反应提示皮质类固醇介入该反应。在小鼠中，有限度的应激反应增加了病毒感染时循环皮质类固醇水平，减少 IL-2、IL-10 与 IFN-γ

合成[300]，且 RU-486 可阻断此效应。在人手术应激也伴有体外丝裂原刺激分泌 IFN-γ 的反应性下降，而 IL-4 水平却增加[301]。在肉瘤样病，肺灌注液中以 Th1 样细胞因子模式为主。皮质类固醇处理减少 IFN-γ 水平而增加 IL-4 水平[302]。

体外皮质类固醇处理可得到相似结果，虽然高剂量皮质醇处理抑制人 T 细胞 IFN-γ 与 IL-4 合成，低剂量却增加 IL-4 合成[303]。初始细胞对皮质类固醇的抑制效应十分敏感，在 Th 分化期间存在有低浓度皮质醇时抑制后续 IFN-γ 与 IL-4 的产生，但增加 IL-10 产生[304]，在分化后，T 细胞对皮质类固醇的敏感性则降低，合成 IFN-γ 受抑，而皮质类固醇对 IL-4 分泌细胞的作用则取决于效应细胞的来源。在大鼠 $CD4^+$ T 细胞分化期间用地塞米松处理可抑制后续 IFN-γ 产生，而增加 IL-4，IL-10 与 IL-13 合成[305]。总之，皮质类固醇似乎总是抑制 Th1 样反应，对 Th2 细胞因子的作用经常为刺激性，但有些时候为抑制性。

皮质类固醇亦影响在 APC 水平免疫反应的类别。皮质类固醇在人全血用脂多糖活化中可减少 IL-12 产生，但非 IL-10 产生[306]。单核细胞在皮质类固醇存在条件下减少 IL-12 产生，而增加分泌 IL-4 的 T 细胞分化[307]。因此在 APC 水平，皮质类固醇似乎在 T 细胞激活与分化中倾向于诱发 Th2 的免疫反应，与体内应激与皮质类固醇处理后的结果相一致。

其他类固醇激素

脱氧雄甾酮(DHEA)与其硫酸化产物(DHEAS)为性激素合成中介产物，其可在体外与体内激活的小鼠 T 细胞与体外激活的人细胞使 IL-2 但非 IL-4 合成增加[308,309]。DHEA 亦可反转由糖皮质激素产生的抑制 IL-2 合成的及增加 IL-4 合成的效应[308]，在小鼠存在对 DTH 反应耐受时，DHEA 可恢复其 DTH 反应，增加 IFN-γ 产生，降低 IL-4 与 IL-6 合成[310]。在小鼠反转录病毒感染模型 Th1 功能抑制 Th2 功能增强时，DHEAS 亦增加 IL-2 与 IFN-γ 分泌而减少 IL-6 与 IL-10 产生[311]。因此 DHEA 选择性增加 Th1 反应，尤其是在 Th1 反应已被抑制的体系中。新鲜 $CD4^+$ T 细胞 DHEA 可增加 IL-2 合成亦提示 DHEA 可增加未定型前体细胞细胞因子的分泌。

前列腺素 E2

PGE2 在炎症反应过程中由巨噬细胞产生，可在三种水平调节 Th1 与 Th2 分化。①PGE2 抑制人单核细胞 IL-12 合成增加 IL-10 合成[312]。该效应似乎由 cAMP 所介导，其他 cAMP 诱导剂也有相似效应。PGE2 对 IL-12 的抑制效应不通过 IL-10。②PGE2 亦可通过抑制脐带血管初始 T 细胞前体 IL-2 与 IFN-γ 分泌细胞的发育而促进向 Th2 细胞分化[313]。而且其他 cAMP 诱导剂有相似的效应。③Th1 与 Th2 细胞的效应亦对 PGE2 敏感性不同：合成 IL-2 与 IFN-γ 受抑，而 IL-4 与 IL-5 合成不变甚至增加[314,315]，持续性 IL-4 与 IL-5 合成需要 IL-2，因无 IL-2 存在条件下 PGE2 抑制所有细胞因子合成[316]。

由于所有这些效应均选择性抑制 Th1 反应，PGE2 似乎为一种有效转化为 Th2 反应的调节剂，麻风病[317]、利什曼原虫感染[318]、变应性皮炎[319]与高滴度抗体反应[320] PGE2 产生与Ⅱ型反应相关联支持这一点。

肾上腺受体激动剂

β2 肾上腺受体表达于 Th1 但非 Th2 克隆表面[321]，该受体激动剂体外选择性抑制 IFN-γ 合成[321]；体内增加小鼠脾细胞 IL-4，IL-5 与 IL-10 合成与 IgE 水平[322]。而且，肾上腺素与去甲肾上腺素抑制 IL-12 合成，但增加 IL-10 合成[306]。因此，激活 β2 肾上腺素受体似乎倾向于 Th2 反应。

897

维生素 A 与 D

大鼠与小鼠维生素 A 缺陷增加 IFN-γ 反应，提示维生素 A 直接或间接抑制 Th1 反应[323,324]。体内维生素 A 缺陷可转化正常情况下对毛线虫属的 Th2 反应为 Th1 反应[325]。该转化效应可被体外与体内经视黄酸处理后而逆转[324-326]，视黄酸处理可抑制 EAE 疾病与伴随的Ⅰ型免疫反应[327]。维生素 A 的作用可能不仅仅抑制 Th1 反应，因为维生素 A 缺乏亦可导致 DTH 反应受损[323]。

骨化三醇(1,25-二羟维生素 D_3,维生素 D 活化代谢产物)亦可选择性抑制由一些方式激活的人外周血 T 细胞 IL-2 与 IFN-γ 合成[328-330]。抑制 IFN-γ 合成亦可发生于牛皮癣病损所建立的 T 细胞克隆[331],这可以部分解释维生素 D 类似物对牛皮癣的辅助治疗作用。有趣的是,IFN-γ 可增加牙槽与骨髓巨噬细胞[332,333]与角质细胞[334]骨化三醇的合成,这提示存在有一种负调节反馈环路。

Th 表型的可逆性

Th1 与 Th2 细胞的稳定性

因为 IFN-γ 与 IL-4 分泌在正常状态下调节免疫与各种疾病时免疫调节功能紊乱中起重要作用。因此提出一个需要回答的问题,已建立的 Th 表型是否为不可逆转性的,还是可通过各种免疫调节机制而转变。对这一问题的回答有重要生物学价值与潜在的临床意义。可逆转性这一概念指的是已建立的 Th1 (IFN-γ)分泌或 Th2(IL-4 分泌)细胞分别可诱导产生 IL-4 或 IFN-γ。正如将在下面讨论的,细胞因子模式可短暂发生改变,但真正的逆转指的是稳定、长期获得一种新的细胞因子分泌模式。而且,重要的是在体外研究 Th1 与 Th2 型细胞分化,虽然初始 $CD4^+$ T 细胞群分化初始时为均一的细胞群,培养体系也为极限化了的,因此理论上所有细胞均有反应,但趋向于分化为 IFN-γ 或 IL-4 的细胞数在很大程度上仍有差异。实际上,经常存在有较大量的激活细胞群不产生 IL-4 与 IFN-γ。这种细胞群可能是非定型的前体细胞,可以以未分化状态进行复制[76]。因此,在研究可逆性时,确定 IL-4 或 IFN-γ 是否是由以前未定型 Thpp 前体细胞分化为相反的两型细胞群分泌,抑或由兼性分泌 Th0 细胞分泌,还是由已分化的 Th1 或 Th2 逆转而分泌就显得很重要。

人与小鼠体外 T 细胞刺激实验已深入研究了 Th1 与 Th2 细胞的逆转性,最初小鼠体外实验显示在群体水平,激活 1 周后产生的 Th2 细胞为非逆转性效应 IL-4 分泌细胞,而 Th1 群可诱导分泌 IL-4[29,335,336],提示 Th1 与 Th2 群的稳定性不同,或 Th2 完全分化状态更加早期地发生。第二种可能性为在至少一项实验中,很可能证实分泌的 IL-4 来自群体中持续存在的未定型的前体细胞,而非真正的 Th1 细胞再分化[337]。在另一实验中,采用胞内细胞因子标记技术确定体外诱导下 IL-4 与 IFN-γ 分泌细胞的比例,显示重复刺激细胞 3 周后 IFN-γ 与 IL-4 分泌细胞为定型化的且不可逆转[338]。

最近,在相似的小鼠体外模型使用不同品系 TCR 转基因小鼠提示完全分化的 Th1 细胞为定型化的与非逆转性的,而 Th2 群可在一些条件下(见下)诱导分泌 IFN-γ[339]。而且,同样结果亦见于研究由初始人 $CD4^+$ T 细胞分化的 IL-4 与 IFN-γ 分泌细胞的比例的实验中[29]。在这些研究中,刺激 1 周或 3 周后 IL-4 分泌细胞群较不稳定,在 IL-12 存在条件下可诱导产生 IFN-γ。相反,分化的 IFN-γ 分泌细胞不可在 IL-4 存在下再刺激诱导产生 IL-4。虽然这些细胞群体水平的数据如上述其反映真实性尚待商榷——产生相反的细胞因子可能是由于非定型前体细胞发生分化,但通过发现 IL-12 可暂时性诱导已建立人 Th0 与 Th2 克隆少量 IFN-γ 分泌[61,85,340,341]证实,已完全分化的 Th2 细胞可产生 IFN-γ。应指出,这是一种暂时效应,似乎不代表 Th2 细胞重新分化为 Th0 或 Th1 细胞。

Th2 细胞条件性产生 IFN-γ 的分子学基础

上述讨论中,似乎 Th2 细胞在一些体系而非在所有体系可被 IL-12 诱导产生 IFN-γ。通过发现在早期激活体系中存在 IL-4(需要 IL-4 激活)抑制 IL-12Rβ2 亚单位表达,后者为 IL-12 通过 STAT4 传递信号所必须[65,68],阐明了这些看起来似乎相互矛盾结果的分子学基础。重要的是与早期研究相符,即 IFN-γ 与 IL-12 可诱导大型利什曼原虫特异性 Th2 细胞 IFN-γ 产生[336],激活体系早期 Th2 发育时加入外源 IFN-γ,可诱导 IL-12Rβ2 表达,以维持 IL-12 诱导产生 IFN-γ。与体外研究相对应是在人 T 细胞发现 IL-12Rβ2 亚单位仍选择性表达于分化的 Th1 但非 Th2 细胞。与在小鼠中得到的数据相反,IFN-α 但非 IFN-γ 可诱导 IL-12Rβ2 表达,从而维持 IL-12 反应性提示 Ⅰ 型(IFN-α)与 Ⅱ 型(IFN-γ) 在维持 IL-12 反应性在人与小鼠 $CD4^+$ T 细胞有不同的效应。

总之,许多因素决定 Th1 与 Th2 细胞的稳定性与可逆性,亦许最重要决定稳定性 Th1 与 Th2 的因素是在初始激活时与再次激活反应时细胞因子微环境。因此,对小鼠 CD4⁺ T 细胞,在 IL-4 存在而 IFN-γ 与 IL-12 不存在条件下倾向于细胞向稳定性 Th2 细胞分化,然而,在 IFN-γ与 IL-12 存在条件下可能通过后续上调 IL-12Rβ2 亚单位表达,致使 Th2 细胞亦对 IL-12 有反应性,从而诱导 IFN-γ 产生。因此在小鼠与人,似乎短暂性 IFN-γ 合成可被 IL-4 分泌细胞所诱导。相反,完全分化的 Th1 细胞似乎较稳定,虽然黄体酮可诱导 Th1 细胞短暂 IL-4 合成[295],但即使在 IL-4 存在条件下,产生 IL-4 能力也很弱。短暂性细胞因子合成模式虽在 Th1 与 Th2 细胞均可改变(图 26.6),但亦不可能将已完全分化的 Th1 细胞转化为稳定性 Th2 细胞,反之亦然。

898

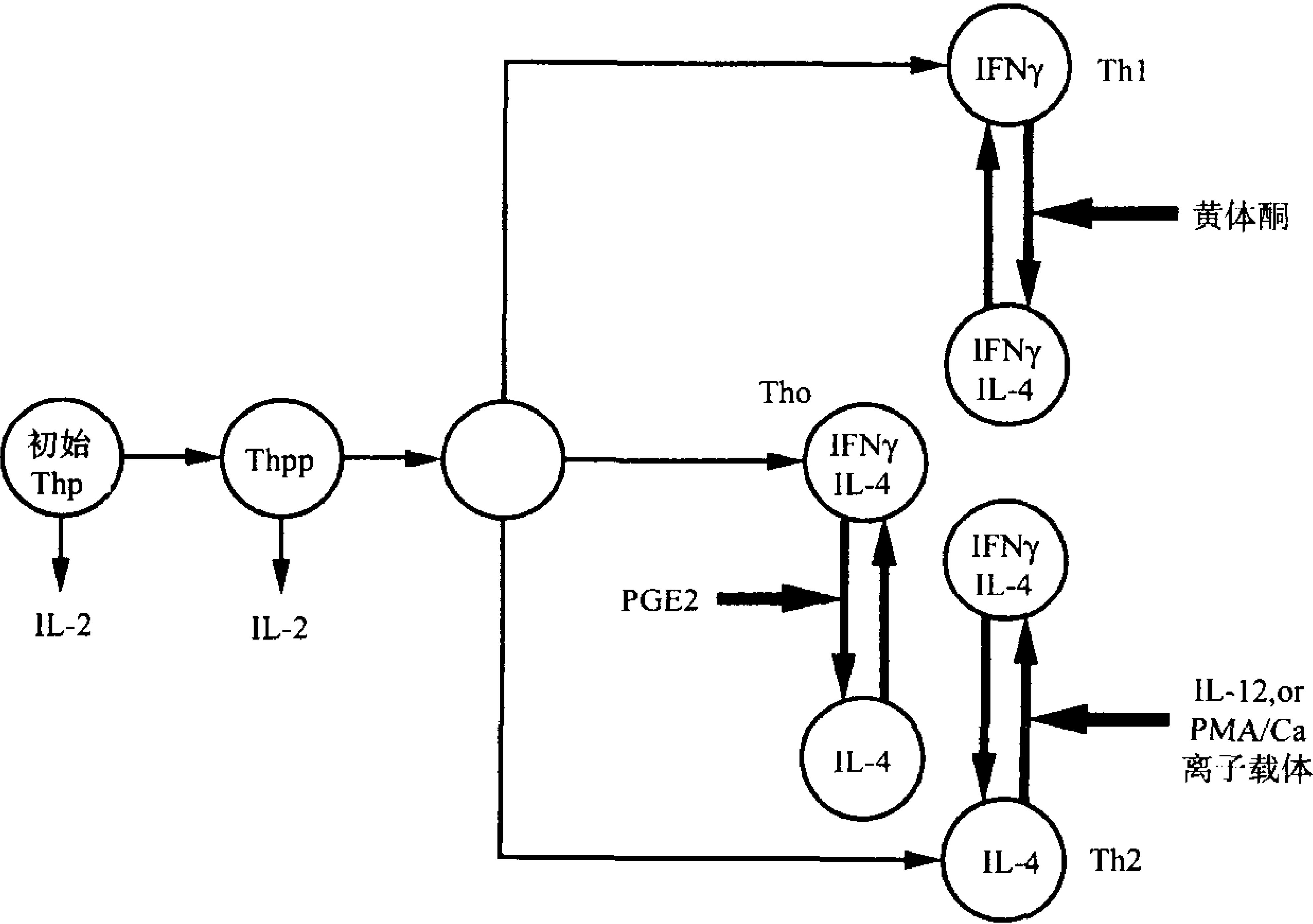


图 26.6 分化 T 细胞细胞因子合成的短暂改变。在分化至 Th1、Th2 与 Th0 细胞后,存在细胞因子合成的调节作用。例如,IL-12 处理 Th2 细胞可诱导短暂性 IFN-γ 的分泌,由于此效应为暂时性的,并不代表这些表型的逆转。

在免疫反应分化与效应阶段细胞因子相互作用调节 Th1 与 Th2 细胞

前述章节中指出,细胞因子如 IL-12 与 IL-4 对 IFN-γ (Th1 型) 分泌细胞与 IL-4(Th2 型)分泌细胞的分化有直接作用。除了 IL-12 外,IL-4 与其他一些附加细胞因子仍可负调控或交互调节 Th1 与 Th2 细胞分化。而且,细胞因子还可通过有效的交互作用以调节完全分化的效应细胞。在本节中,将讨论细胞因子交互作用调节分化与效应阶段的 Th1 与 Th2 反应。

IFN-γ 与 IL-4

在 T 细胞分化过程中,IL-4 在诱导 IL-4 分泌细胞中有直接作用[24]。而且,IL-4 似可在体外与体内抑制诱导产生 IFN-γ[23~25],在小鼠 IL-4 可抑制 IFN-γ 分泌的 Th1 细胞发育的一种可能机制是其可抑制 IL-12Rβ 链亚单位表达,导致细胞对 IL-12 刺激无反应性[65,342]。因此,IL-4 可间接抑制 IL-12 反应来调节 IFN-γ 的产生。

IFN-γ 选择性抑制 Th2 克隆从而导致 Th1 克隆优先增殖[343],提示 IFN-γ 可交互调节 IL-4 分泌细胞的诱导分化[91,92]。对 IFN-γ 的选择性生长抑制作用可能是由于 Th2 克隆保存有 IFN-γRβ 链[67~70]。因此,IFN-γ 在分化与效应阶段均有交互调节作用。最后,由于 IFN-γ 可诱导 IL-12 的产生与增强其反应性,因此很可能许多 IFN-γ 介导反应是通过 IL-12 为中介来介导的(见下文)。

IL-12 与 IL-4

在 Th 细胞分化过程中,已很明确 IL-12 无论是直接[344]还是间接通过诱导 IFN-γ 产生[345~347],均可抑制 IL-4mRNA 产生。除此以外,在 IFN-γ 不存在条件下,IL-12 亦可促进 Th2 反应[348]。因此,IL-12 交互调节 IL-4 产生在反应过程中分化与效应阶段可能依 IFN-γ 是否存在而分别有所不同。

IL-4 交互调节 IL-12 的作用较复杂。IL-4 可在鼠树突细胞[166]与人外周血单个核细胞[349]抑制 IL-12 产生。相反在人体外实验证明刺激前预先用 IL-4 处理细胞事实上可促进 IL-12 产生[349]。虽然后一发现似乎很有趣,但仍需确定体内这种调节方式是否存在。最后,有证据表明 IL-4 可通过下调 IL-12Rβ 链降低 IL-12 反应[65],提供了在免疫反应分化与效应阶段 IL-4 交互调节 IL-12 的另一附加机制。

IFN-α 与 IL-4

除了Ⅱ型干扰素(IFN-γ)交互调节 IL-4 外,有证据表明,Ⅰ型干扰素亦可下调 Th2 反应。最初证实是用 IFN-α 或用可诱生 IFN-α 的诱导剂作用于小鼠可导致 IL-4 分泌下调[104]。最近小鼠体外实验亦表明 IFN-α 可下调 IL-4 产生,但需 IL-12 亦存在于培养体系条件下[97]。在人培养体系中,IFN-α 有潜在诱生 IFN-γ 的能力,并可抑制抗原或过敏原特异 IL-4 分泌细胞分化[103~105,350]。而且,有报道提示 IFN-α 抑制 IL-4 产生并非依赖于 IL-12,因此提示 IFN-α 在负调节 IL-4 分泌细胞分化中起重要作用[66]。由于 IFN-γ 也可诱导 IFN-γ 分泌增加,因此 IFN-α 直接还是间接通过增加 IFN-γ 分泌而下调 IL-4 表达需要进一步研究。

IL-10 与 IFN-γ

IL-10 是一种有效的调节细胞因子,可抑制已分化效应 Th1 细胞或克隆 IFN-γ 分泌[4],IL-10 抑制 IFN-γ 分泌的主要机制已证实为间接性抑制 APC IL-12 的分泌[166,351]。减少 IFN-γ 合成可减少后续的 Th1 分化,因此,IL-10 在反应分化与效应阶段为有效的但为间接作用的交互调节因子。

因为 IL-10 在抑制 Th1 反应发育阶段中起到有效的作用,建立一种体系以下调 IL-10 表达以产生功能性 Th1 反应就很重要,尤其适用于对各种感染病原体的初次免疫时。鉴于此,IFN-γ 已被证实为有效的单核细胞 IL-10 分泌抑制因子[352,353],从而可提供发生 Th1 分化反应的有利条件。

IL-12 与 IL-10

IL-10 与 IL-12 调节 IFN-γ 分泌有明显拮抗作用,但体外实验有数家报道,IL-12 除了诱导人 T 细胞 IFN-γ 分泌外还诱导 IL-10 分泌[46~48],IL-12 可诱导 T 细胞 IL-10 分泌可能是一种发育中或已分化 Th1 反应转化的机制。确定这是否是一种有效调节机制需要进一步实验来检测 T 细胞 IL-10 在控制持续性反应的作用。

前述章节中讨论,IL-10 在许多实验模型可有效抑制 APCIL-12 的产生,提供了一种间接抑制 IFN-γ 产生的机制。转变 APC IL-10 与 IL-12 分泌比例,可能是 Th1/Th2 分化途径的主要的调控点。

TGF-β 作为 Th1 与 Th2 分化反应的调节因子

TGF-β 是一种多向性细胞因子,在各种人与小鼠自身免疫疾病模型抑制过量炎症反应中起重要作用[354]。TGF-β 在 Th1 与 Th2 发育中的作用仍不很清楚,最初小鼠体外抗原诱导实验表明 TGF-β 可诱导[76,335]或抑制 IFN-γ 分泌细胞产生,依赖于所使用的小鼠的品系不同或在抗原活化体系中 IL-2 的量不同而定[357],TGF-β 均可抑制人 T 细胞 IFN-γ 与 IL-4 分泌细胞的分化[72]。体内实验,TGF-β 有多重作用,在胞内感染实验模型,使用 TGF-β 明显抑制 Th1 反应发生[358,359],在这些实验中,有一项实验显示 TGF-β 抑制 IL-12 产生,更加支持 TGF-β 在产生 Th1 细胞中有交互调节作用[359]。诱导产生分泌 TGF-β 的细胞被证明是在抑制介导自身免疫疾病的非正常免疫反应中起重要作用[360,361]。许多对 Th1 的抑制作用可能是在效应阶段的抑制,因 TGF-β 可抑制速发与迟发超敏反应[362]。然而,内源 TGF-β 在白色念珠菌感染时似可抑制 IL-4 产生从而增加

保护性 Th1 反应[363]，因此，在这些体内模型中，TGF-β 主要抑制但有时也可增加 Th1 反应。总体上，TGF-β 有较复杂的作用：其可抑制 Th2 分化与功能效应，抑制 Th1 功能效应，抑制或增强 Th1 分化。因此 TGF-β 可能是免疫反应的总抑制剂，这与其可加速伤口愈合过程相符合[364]。

凋亡在选择性调节 Th1 与 Th2 效应细胞中的作用

免疫系统不仅需要启动对潜在的病原体的免疫反应，而且当其完成功能效应后，需要找到一种方式调节应答反应。调节 Th1 细胞反应的能力以降低 Th1 细胞因子的产生尤其重要，因为在许多体内感染与自身免疫性疾病实验模型，已显示过量的与持续的 Th1 细胞因子产生可促发有害的炎症前反应。一种在生物界最重要的调节过量细胞活化的机制是凋亡，对于细胞而言，已证实活化后诱发的凋亡是通过 Fas 配基(FasL)与其相应受体 Fas，Th1 克隆表达高水平 Fas-L，而 Th2 细胞表达水平低[351]，因此虽然 Th2 细胞在激活的 Th1 细胞存在条件下可被杀伤，Th1 细胞却有较高水平的激活诱导的凋亡反应。Th1 细胞表达 Fas-L 可能是阻止持续性 Th1 前炎症反应过度扩散的一种重要的方式。

CD8T 细胞亚群的分化

CD8 细胞因子亚群存在的证据

在一系列 T 细胞克隆中发现人 CD8T 细胞可产生低水平 IL-4[10]，而瘤型麻风患者抗体特异性 CD8T 细胞可分泌高水平 IL-4，与Ⅱ型细胞因子分泌模式相关联[43]，HIV 感染 Job 样综合征患者用丝裂剂活化可分离出 Th2 样细胞因子分泌 CD8 克隆，同时具有高水平 IgE[366]。

虽然许多小鼠 CD8T 细胞产生 IFN-γ[364]，一系列小鼠同种反应特异性细胞克隆产生 Th1 样细胞因子[368]，小鼠 CD8T 细胞亦可产生 IL-4。通过 IL-4 处理小鼠 CD8 细胞[369]可诱导 IL-4 产生，或者 PMA-ionomycin 处理小鼠 CD8T 细胞转化为非细胞毒性 $CD8^-$ 细胞从而分泌 IL-4[370]。分泌 IL-4 与 IL-5 的小鼠 CD8 细胞可通过 IL-4 刺激初始 CD8T 细胞获得[371]，而同种异体抗原刺激初始 CD8 细胞可分离出分泌 Th1 或 Th2 样细胞因子的 CD8T 细胞[257]。在本节中，Tc1 与 Tc2 被用于表示两种 CD8T 细胞亚类，也有人使用 T1 与 T2 或Ⅰ型或Ⅱ型 CD8T 细胞的表示方式。大鼠 CD8T 细胞亦可被诱导分化为 IL-4 或 IL-5 分泌细胞[372]。因此，三种种属 CD8 细胞均可分泌 Th1 样 Th2 样细胞因子，虽然 CD8 细胞通常更倾向于生成 Tc1 细胞。

除了在 AIDS 与瘤型麻风中鉴定出 IL-4 分泌细胞外，亦证实在其他情况下也存在 Tc 细胞。肺中抗多肽抗原 CD8T 细胞在附近存在有针对不同抗原的 CD4Th2 细胞强列诱导下可分泌 IL-5[373]。虽然 Tc2 型细胞在这些条件下的确可以产生，脾与淋巴结 CD8 细胞在许多反应下表现的却是 Tc1 亚群。相对应的，在正常人腹水中提取的 CD8 细胞 Tc 细胞较为丰富，鼠派尔节分离的 CD8T 细胞含有 Th1 与 Th2 样细胞因子 mRNA，提示可能不同部位存在不同 CD8 细胞亚群[374,375]。虽然 在体内许多不同的系统存在有许多 IL-4 分泌 CD8T 细胞，但这些细胞在体内的功能尚不清楚。

细胞因子在调节 Tc1 或 Tc2 分化中的作用

虽然在 CD8T 细胞分化时所需条件的细节尚不清楚，CD4 与 CD8T 细胞分化有许多相似之处[257,371,376]（图 26.7，26.8）。外周初始 CD8T 细胞初次活化不分泌 Th1 或 Th2 样细胞因子[255,368]，抗原活化后，细胞在数日内增殖分化，通常分化为 Tc1 型，与 CD4 细胞不同的是，CD8T 细胞似乎遗传上更倾向于分化为 Tc1 途径。IFN-γ 或 IL-12 也增强这一过程[257,371]。分化为 Tc2 样细胞需 IL-4 存在，通常亦需要强的 Th2 样环境或抑制 IFN-γ 的作用（图 26.7，图 26.8），因此，Tc2 细胞可能在体内仅在强倾向于Ⅱ型反应时出现，与其主要在该条件下被鉴定相附合[43,366,376]。

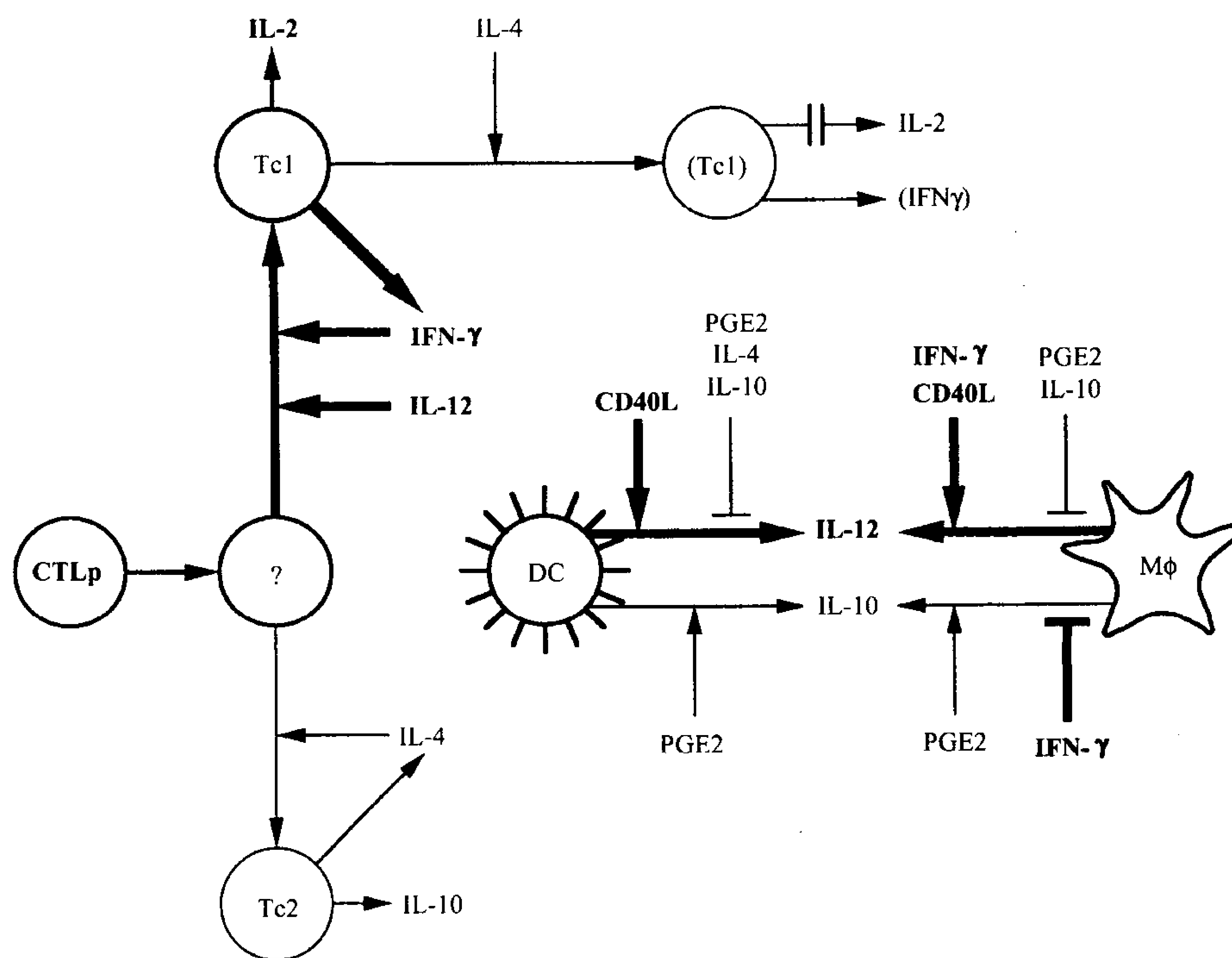


图 26.7　促进 CD8Tc1 细胞分化的可溶性细胞因子。粗箭头表示刺激效应,横线表示抑制或阻断效应。

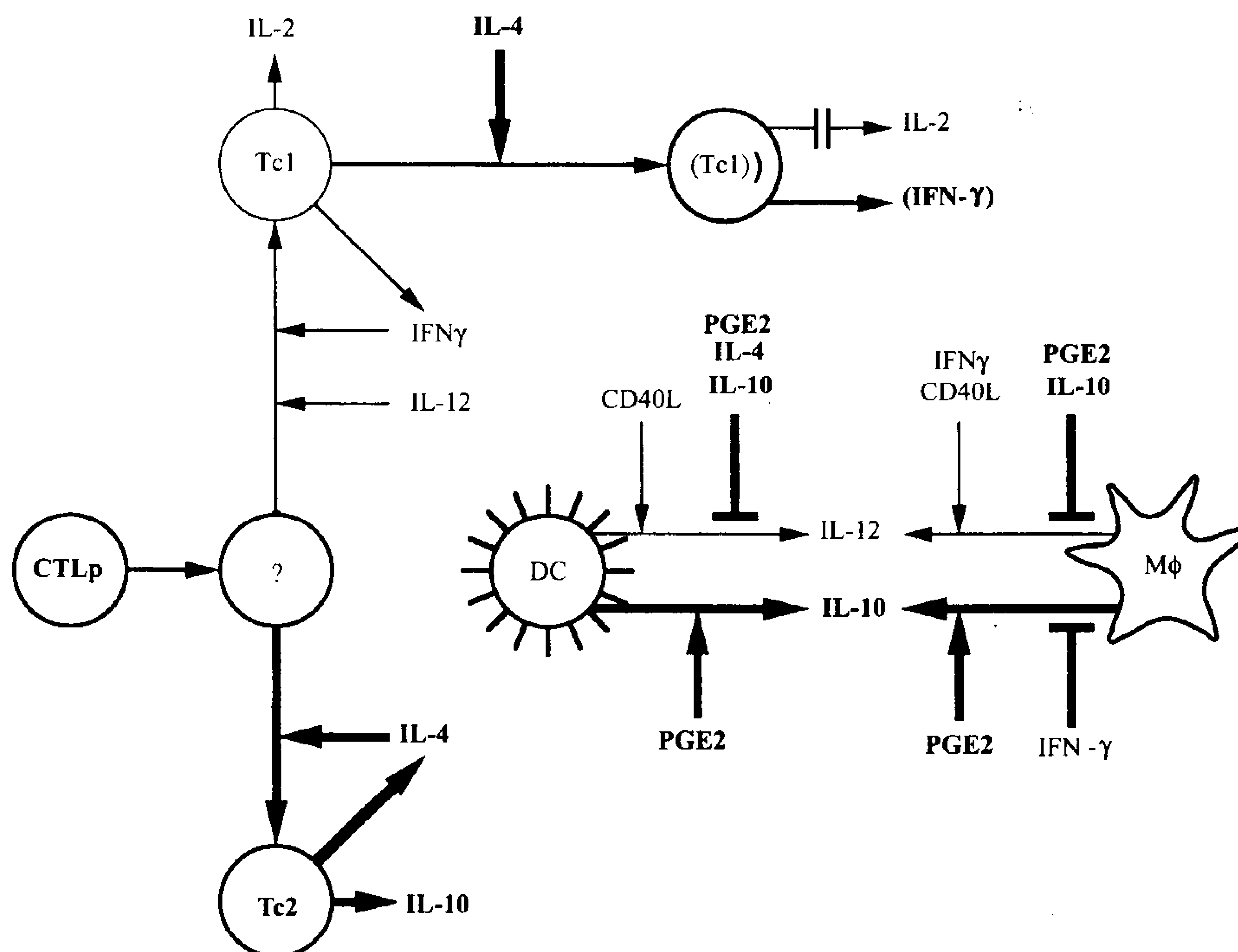


图 26.8　促进 CD8Th2 细胞分化的可溶性细胞因子。

其他影响 CD8T 细胞分化的因子

许多非细胞因子的因素也可影响 CD4T 细胞分化，如抗原剂量、辅刺激因子与不同的 APC 类别。但这些因素在 CD8T 细胞分化中的作用仍透彻探究。在体外，脾细胞、树突细胞、未成熟 B 细胞或 B 细胞瘤、M12 等均可触发分泌细胞因子的所有必需信号，从而诱导 CD8T细胞分化为 Tc1 或 Tc2 型[257,371]。

901

CD8T 细胞亚群的功能效应

Tc1 与 Tc2 细胞均具细胞毒性，且均采用穿孔素—颗粒酶杀伤途径。Ca^{2+} 螯合剂敏感的细胞毒性或穿孔素缺陷小鼠 Tc1 或 Tc2 细胞的细胞毒作用减弱，证实存在该效应[377,378]。虽然 Tc1 与 Tc2 细胞细胞毒杀伤能力依赖于细胞生长状态，且直接对比这两种细胞类型较困难，在许多研究中 Tc2 细胞杀伤效应较 Tc1 细胞弱[366,374,377]。虽已清楚 Tc1 亚群亦可通过 FasL 途径介导有效杀伤，该途径在 Tc2 细胞却有不存在[377]或存在[379]的相反报道，Tc1 与 Tc2 细胞均可以穿孔素非依赖途径有效杀伤活化的 B 细胞[379]。

当受 CD3 单抗激活时，Tc2 细胞可增强 B 细胞抗体的合成[257,366,371,376]。由于 Tc1 与 Tc2 细胞均可杀伤包括 B 细胞在内的抗原包被的靶细胞，该效应可能代表对 B 细胞的旁观辅助效应[379]。在一种同种异体来源的辅助体系中，Tc2 细胞可杀伤而并非具辅助 B 细胞的效应，加入抗 CD3 抗体后则可诱导抗体合成增加与杀伤效应下降。Tc2 细胞分泌的细胞因子模式包括许多 B 细胞激活细胞因子，在抗体刺激活化后 Tc2 细胞表达低水平 CD40L[376,379]。因此 Tc2 细胞可能对持续性的抗体反应有作用，但仅起到旁观活化的作用，因为同种识别将导致 B 细胞死亡。这与已知的 B 细胞抗原呈递途径相一致：B 细胞表面抗原受体识别捕捉抗原，通过 MHCⅡ类分子呈递 CD4 细胞，尤其是 Th2 细胞；而通过Ⅰ型 MHC 呈递 CD8 细胞则通常来源于胞内蛋白，诸如胞内感染。虽然已有报道外源抗原也可通过 MHCI 类途径呈递[380]，但主要由巨噬细胞行使该功能，在正常 B 细胞中尚未证实。

在 CD4T 细胞亚群，Th1 细胞诱导 DTH[5]，Th1 样细胞因子总与 DTH 反应部位相关联[8,43]。然而，同种异型特异性 CD8 细胞注射于小鼠足底 Tc1 与 Tc2 细胞均可诱导炎症反应[381]。两者细胞诱导的 DTH 反应在肿胀动力学、浸润细胞的数量和类型与水肿程度均相似。然而在体内此反应过程中分泌的细胞因子却截然不同：IFN-γ 仅在 Tc1 反应中分泌，IL-4 与 IL-5 仅在 Tc2 反应中存在。Th2 细胞诱导的 DTH 反应似乎不是杀伤靶细胞的副效应，因为穿孔素缺陷小鼠 Tc1 与 Tc2 细胞均可诱导炎症反应[381]，因此，Th2/Tc2 细胞因子模式可能与炎症反应有关，注射预先活化的 Th2 克隆[382]或在血吸虫卵抗原诱生的肉芽肿中 Th2 细胞因子的激活效应均证实这一点。

Tc1 CD8T 细胞的进一步分化

在初始前体 CD8T 细胞分化为产生 IFN-γ 的 Tc1 效应细胞后，可能还会发生进一步分化。在低刺激强度下，或用 IL-4 处理条件下，可使 Tc1 细胞转化为具细胞毒但不再分泌 IL-2 的细胞[384~386]。IL-4 在抗原刺激或 APC 存在与不存在条件下，均可诱导 Tc1 分化为 IL-2 非分泌细胞。IL-2 缺陷 Tc1 细胞仍保持穿孔素或 Fas 途径杀伤抗原包被的靶细胞的能力，但却不可维持通过自分泌 IL-2 而发生增殖反应的能力，虽然 IL-2 分泌丧失是最严重的，其合成其他细胞因子的能力也同时也受损。虽然在体内该细胞存在有细胞因子合成缺陷，但是正常与 IL-4 处理后的 Tc1 细胞均诱导相似的炎症反应。这种类型的 Tc1 细胞似不可逆转并可代表 Th2/Tc2 反应交互调节 Th1/Tc1 反应的另一方式。Tc1 细胞在 IL-4 存在条件下可抑制其非依赖性的细胞增殖能力，但仍具有短期的持续性的功能效应，而且在持续免疫反应中提供的生长因子的辅助条件下可刺激其发生增殖效应。

902

结论

总而言之，调节 T 细胞活化的机制很复杂，包括许多正调控与负调控信号，不同的辅助细胞类型在不同

条件下可具有相反的功能。令人奇怪的是，已确认的多数为正反馈环路，无论是可增加所希望的免疫效应还是抑制相对应的效应，这与在一些慢性感染条件下强极化状态相符合，但是附加的负反馈或自稳调节机制仍需要阐明，这将有助于解释许多包含有更加复杂的细胞因子模式的免疫反应。

（程晓刚　白　云 译）

参 考 文 献

1. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T-cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348–2357.
2. Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1987;166:1229–1244.
3. van Snick J, Goethals A, Renauld J-C, et al. Cloning and characterization of a cDNA for a new mouse T cell growth factor (P40). *J Exp Med* 1989;169: 363–368.
4. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081–2095.
5. Cher DJ, Mosmann TR. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol* 1987;138:3688–3694.
6. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989: 7:145–173.
7. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991;254:277–279.
8. Tsicopoulos A, Hamid Q, Varney V, et al. Preferential messenger RNA expression of Th1-type cells (IFN-gamma+, IL-2+) in classical delayed-type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin. *J Immunol* 1992;148: 2058-2061.
9. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994;12:635–673.
10. Paliard X, de Waal Malefijt R, Yssel H, et al. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J Immunol* 1988;141:849–855.
11. Maggi E, Del Prete G, Macchia D, et al. Profiles of lymphokine activities and helper function for IgE in human T cell clones. *Eur J Immunol* 1988;18: 1045–1050.
12. Umetsu DT, Jabara HH, DeKruyff RH, Abbas AK, Abrams JS, Geha RS. Functional heterogeneity among human inducer T cell clones. *J Immunol* 1988;140: 4211–4216.
13. Wierenga EA, Snoek M, de Groot C, et al. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2– T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* 1990;144:4651–4656.
14. Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, et al. Purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of Toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* 1991;88:346–350.
15. Haanen JB, de Waal Malefijt R, Res PC, et al. Selection of a human T helper type 1-like T cell subset by mycobacteria. *J Exp Med* 1991;174:583–592.
16. Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA, et al. A new murine $CD4^+$ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol* 1989;143:518–525.
17. Street NE, Schumacher JH, Fong TA, et al. Heterogeneity of mouse helper T cells: evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 1990;144:1629–1639.
18. Bucy RP, Panoskaltsis-Mortari A, Huang GQ, et al. Heterogeneity of single cell cytokine gene expression in clonal T cell populations. *J Exp Med* 1994;180: 1251–1262.
19. Kelso A, Groves P, Troutt AB, Francis K. Evidence for the stochastic acquisition of cytokine profile by CD4+ T cells activated in a T helper type 2-like response in vivo. *Eur J Immunol* 1995;25:1168–1175.
20. Kelso A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost?. *Immunol Today* 1995;16: 374–379.
21. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T cell subsets- Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138–146.
22. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 Directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 1990;145:3796–3806.
23. Hsieh C-S, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 6065–6069.
24. Le Gros G, Ben Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin-4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro—IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 1990;172: 921–929.
25. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St Groth B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992;176: 1091–1098.
26. Bucy RP, Karr L, Huang GQ, et al. Single cell analysis of cytokine gene coexpression during CD4+ T-cell phenotype development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7565–7569.
27. Assenmacher M, Schmitz J, Radbruch A. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells. *Eur J Immunol* 1994;24:1097–1101.
28. Openshaw P, Murphy EE, Hosken NA, et al. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *J Exp Med* 1995;182:1357–1367.
29. Sornasse T, Larenas PV, Davis KA, de Vries JE, Yssel H. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *J Exp Med* 1996;184:473–483.
30. Scott P, Pearce E, Cheever AW, Coffman RL, Sher A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev* 1989;112:161–182.
31. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to Leishmania major. *Annu Rev Immunol* 1995;13:151–177.
32. Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, et al. Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4538–4542.
33. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994;12:227–257.
34. Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 1995;16:34–38.
35. Lafaille JJ, Van de Keere F, Hsu AL, et al. Myelin basic protein specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. *J Exp Med* 1997;186: 307–312.
36. Pakala SV, Kurrer MO, Katz JD. T helper 2 (Th2) T cells induce acute pancreatitis and diabetes in immune-compromised nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 1997;186:299–306.
37. Kroemer G, Hirsch F, Gonzalez-Garcia A, Martinez C. Differential involvement of Th1 and Th2 cytokines in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 1996;24: 25–33.
38. Goldman M, Druet P, Gleichmann E. TH2 cells in systemic autoimmunity: insights from allogeneic diseases and chemically-induced autoimmunity. *Immunol Today* 1991;12:223–227.
39. Gillespie KM, Saoudi A, Kuhn J, et al. Th1/Th2 cytokine gene expression after mercuric chloride in susceptible and resistant rat strains. *Eur J Immunol* 1996; 26:2388–2392.
40. Richaud-Patin Y, Alcocer-Varela J, Llorente L. High levels of TH2 cytokine gene expression in systemic lupus erythematosus. *Rev Invest Clin* 1995;47:267–272.
41. Nakajima A, Hirose S, Yagita H, Okumura K. Roles of IL-4 and IL-12 in the development of lupus in NZB/W F1 mice. *J Immunol* 1997;158:1466–1472.
42. Takahashi S, Fossati L, Iwamoto M, et al. Imbalance towards Th1 predominance is associated with acceleration of lupus-like autoimmune syndrome in MRL mice. *J Clin Invest* 1996;97:1597–1604.
43. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991;254: 279–282.
44. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209–1220.
45. O'Garra A, Stapleton G, Dhar V, et al. Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int Immunol* 1990;2: 821–832.
46. Gerosa F, Paganin C, Peritt D, et al. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J Exp Med* 1996;183:2559–2569.
47. Jeannin P, Delneste Y, Seveso M, Life P, Bonnefoy JY. IL-12 synergizes with IL-2 and other stimuli in inducing IL-10 production by human T cells. *J Immunol* 1996;156:3159–3165.

48. Windhagen A, Anderson DE, Carrizosa A, Williams RE, Hafler DA. IL-12 induces human T cells secreting IL-10 with IFN-gamma. *J Immunol* 1996;157: 1127–1131.
49. Yssel H, Johnson KE, Schneider PV, et al. T cell activation-inducing epitopes of the house dust mite allergen Der p I. Proliferation and lymphokine production patterns by Der p I-specific CD4+ T cell clones. *J Immunol* 1992;148:738–745.
50. Li Y, Richards D, Noble A, Kemeny DM. Cytokine production by highly purified human CD8+ T cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:354–355.
51. Svetic A, Jian YC, Lu P, Finkelman FD, Gause WC. Brucella abortus induces a novel cytokine gene expression pattern characterized by elevated IL-10 and IFN-gamma in CD4+ T cells. *Int Immunol* 1993;5:877–883.
52. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;265:1237–1240.
53. Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1996;98:70–77.
54. Luqman M, Johnson P, Trowbridge I, Bottomly K. Differential expression of the alternatively spliced exons of murine CD45 in Th1 and Th2 cell clones. *Eur J Immunol* 1991;21:17–22.
55. Lee WT, Yin XM, Vitetta ES. Functional and ontogenetic analysis of murine CD45Rhi and CD45Rlo CD4+ T cells. *J Immunol* 1990;144:3288–3295.
56. Elson LH, Shaw S, Van Lier RA, Nutman TB. T cell subpopulation phenotypes in filarial infections: CD27 negativity defines a population greatly enriched for Th2 cells. *Int Immunol* 1994;6:1003–1009.
57. Elson LH, Nutman TB, Metcalfe DD, Prussin C. Flow cytometric analysis for cytokine production identifies T helper 1, T helper 2, and T helper 0 cells within the human CD4+CD27- lymphocyte subpopulation. *J Immunol* 1995;154: 4294–4301.
58. Chilosi M, Facchetti F, Notarangelo LD, et al. CD30 cell expression and abnormal soluble CD30 serum accumulation in Omenn's syndrome: evidence for a T helper 2-mediated condition. *Eur J Immunol* 1996;26:329–334.
59. Bengtsson A, Johansson C, Linder MT, Hallden G, van der Ploeg I, Scheynius A. Not only Th2 cells but also Th1 and Th0 cells express CD30 after activation. *J Leukoc Biol* 1995;58:683–689.
60. Del Prete G, De Carli M, D'Elios MM, et al. CD30-mediated signaling promotes the development of human T helper type 2-like T cells. *J Exp Med* 1995;182: 1655–1661.
61. Hamann D, Hilkens CM, Grogan JL, et al. CD30 expression does not discriminate between human Th1- and Th2-type T cells. *J Immunol* 1996;156: 1387–1391.
62. Demeure CE, Byun DG, Yang LP, Vezzio N, Delespesse G. CD31 (PECAM-1) is a differentiation antigen lost during human CD4 T-cell maturation into Th1 or Th2 effector cells. *Immunology* 1996;88:110–115.
63. Nakamura T, Lee RK, Nam SY, et al. Reciprocal regulation of CD30 expression on CD4+ T cells by IL-4 and IFN-gamma. *J Immunol* 1997;158:2090–2098.
64. Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 1995;376:260–263.
65. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997;185:817–824.
66. Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, et al. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 1997;185: 825–831.
67. Pernis A, Gupta S, Gollob KJ, et al. Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells. *Science* 1995;269:245–247.
68. Szabo SJ, Jacobson NG, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity* 1995;2: 665–675.
69. Groux H, Sornasse T, Cottrez F, et al. Induction of human T helper cell type 1 differentiation results in loss of IFN-gamma receptor beta-chain expression. *J Immunol* 1997;158:5627–5631.
70. Bach EA, Szabo SJ, Dighe AS, et al. Ligand-induced autoregulation of IFN-gamma receptor beta chain expression in T helper cell subsets. *Science* 1995; 270:1215–1218.
71. Guler ML, Jacobson NG, Gubler U, Murphy KM. T cell genetic background determines maintenance of IL-12 signaling: effects on BALB/c and B10.D2 T helper cell type 1 phenotype development. *J Immunol* 1997;159:1767–1774.
72. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the Eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 1997;277:2005–2007.
73. Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 6065–6069.
74. Reiner SL, Wang Z-E, Hatam F, Scott P, Locksley RM. T_H1 and T_H2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis. *Science* 1993;259:1457–1460.
75. Rocken M, Saurat JH, Hauser C. A common precursor for CD4+ T cells producing IL-2 or IL-4. *J Immunol* 1992;148:1031–1036.
76. Sad S, Mosmann TR. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J Immunol* 1994;153: 3514–3522.
77. Kamogawa Y, Minasi LA, Carding SR, Bottomly K, Flavell RA. The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell* 1993;75:985–995.
78. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:827–845.
79. Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, et al. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* 1991;146:3074–3081.
80. Chan SH, Perussia B, Gupta JW, et al. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 1991;173:869–879.
81. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993;260:547–549.
82. Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 10188–10192.
83. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 1993;177:1199–1204.
84. Schmitt E, Hoehn P, Germann T, Rude E. Differential effects of interleukin-12 on the development of naive mouse CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1994;24: 343–347.
85. Manetti R, Gerosa F, Giudizi MG, et al. Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones. *J Exp Med* 1994;179:1273–1283.
86. Magram J, Connaughton SE, Warrier RR, et al. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 1996;4: 471–481.
87. Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 1996;382: 174–177.
88. Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, et al. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 1996;382: 171–174.
89. Reiner SL, Seder RA. T helper cell differentiation in immune response. *Curr Opin Immunol* 1995;7:360–366.
90. Seder RA, Kelsall BL, Jankovic D. Differential roles for IL-12 in the maintenance of immune responses in infectious versus autoimmune disease. *J Immunol* 1996;157:2745–2748.
91. Fernandez-Botran R, Sanders VM, Mosmann TR, Vitetta ES. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 1988;168:543–558.
92. Gajewski TF, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 1988;140:4245–4252.
93. Maggi E, Parronchi P, Manetti R, et al. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL4 on the in vitro development of human TH1 and TH2 clones. *J Immunol* 1992;148:2142–2147.
94. Bradley LM, Dalton DK, Croft M. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J Immunol* 1996;157:1350–1358.
95. Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. Pathogen-induced Th1 phenotype development in CD4+ alpha beta-TCR transgenic T cells is macrophage dependent. *Int Immunol* 1993;5:371–382.
96. Macatonia SE, Hsieh C-S, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from αβ transgenic mice: IL12 substitution for macrophages to stimulate IFNγ production is IFNγ-dependent. *Int Immunol* 1993;5:1119–1128.
97. Wenner CA, Guler ML, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J Immunol* 1996;156:1442–1447.
98. Ma X, Chow JM, Gri G, et al. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med* 1996;183:147–157.
99. Hayes MP, Wang J, Norcross MA. Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood* 1995;86:646–650.
100. Swihart K, Fruth U, Messmer N, et al. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with Leishmania major but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. *J Exp Med* 1995;181:961–971.
101. Schijns VE, Haagmans BL, Rijke EO, Huang S, Aguet M, Horzinek MC. IFN-gamma receptor-deficient mice generate antiviral Th1-characteristic cytokine profiles but altered antibody responses. *J Immunol* 1994;153:2029–2037.
102. Szalay G, Ladel CH, Blum C, Kaufmann SH. IL-4 neutralization or TNF-alpha treatment ameliorate disease by an intracellular pathogen in IFN-gamma recep-

tor-deficient mice. *J Immunol* 1996;157:4746–4750.

103. Parronchi P, De Carli M, Manetti R, et al. IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Thl or Th2 human T cell clones. *J Immunol* 1992;149:2977–2983.
104. Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1993; 178:1655–1663.
105. Manetti R, Annunziato F, Tomasevic L, et al. Polyinosinic acid: polycytidylic acid promotes T helper type 1-specific immune responses by stimulating macrophage production of interferon-alpha and interleukin-12. *Eur J Immunol* 1995;25:2656–2660.
106. Cousens LP, Orange JS, Su HC, Biron CA. Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:634–639.
107. Finkelman FD, Svetic A, Gresser I, et al. Regulation by interferon alpha of immunoglobulin isotype selection and lymphokine production in mice. *J Exp Med* 1991;174:1179–1188.
108. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995;378:88–91.
109. Ahn HJ, Maruo S, Tomura M, et al. A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma. *J Immunol* 1997;159:2125–2131.
110. Swain SL, McKenzie DT, Weinberg AD, Hancock W. Characterization of T helper 1 and 2 cell subsets in normal mice. Helper T cells responsible for IL-4 and IL-5 production are present as precursors that require priming before they develop into lymphokine-secreting cells. *J Immunol* 1988;141:3445–3455.
111. Betz M, Fox BS. Regulation and development of cytochrome C-specific Il-4-producing T-cells. *J Immunol* 1990;145:1046–1052.
112. Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 1991;254:707–710.
113. Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Köhler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993; 362:245–248.
114. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 1996;4:313–319.
115. Takeda K, Tanaka T, Shi W, et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 1996;380:627–630.
116. Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, et al. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 1996;380:630–633.
117. Noben-Trauth N, Shultz LD, Brombacher F, Urban JF Jr, Paul WE. An Interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10838–10843.
118. Demeure CE, Wu CY, Shu U, et al. In vitro maturation of human neonatal CD4 T lymphocytes. II. Cytokines present at priming modulate the development of lymphokine production. *J Immunol* 1994;152:4775–4782.
119. Seder RA, Germain RN, Linsley PS, Paul WE. CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production. *J Exp Med* 1994;179:299–304.
120. Heinzel FP, Rerko RM, Hatam F, Locksley RM. IL-2 is necessary for the progression of leishmaniasis in susceptible murine hosts. *J Immunol* 1993;150: 3924–3931.
121. Kundig TM, Schorle H, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM, Horak I. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science* 1993;262:1059–1061.
122. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 1995;268: 1472–1476.
123. Ehrhardt RO, Ludviksson BR, Gray B, Neurath M, Strober W. Induction and prevention of colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J Immunol* 1997;158: 566–573.
124. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997;185:461–469.
125. Kurt-Jones EA, Hamberg S, Ohara J, Paul WE, Abbas AK. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. I. Lymphokine production and lymphokine responsiveness. *J Exp Med* 1987;166:1774–1787.
126. Greenbaum LA, Horowitz JB, Woods A, Pasqualini T, Reich EP, Bottomly K. Autocrine growth of CD4+ T cells. Differential effects of IL-1 on helper and inflammatory T cells. *J Immunol* 1988;140:1555–1560.
127. Abbas AK, Williams ME, Burstein HJ, Chang TL, Bossu P, Lichtman AH. Activation and functions of CD4+ T-cell subsets. *Immunol Rev* 1991;123:5–22.
128. Manetti R, Barak V, Piccinni MP, et al. Interleukin-1 favours the in vitro development of type 2 T helper (Th2) human T-cell clones. *Res Immunol* 1994;145: 93–100.
129. Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, et al. Functional maturation of human naive T helper cells in the absence of accessory cells. Generation of IL-4-producing T helper cells does not require exogenous IL-4. *J Immunol* 1995;154: 3753–3760.
130. Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993;11:191–212.
131. Chambers CA, Krummel MF, Boitel B, et al. The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses. *Immunol Rev* 1996;153:27–46.
132. Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* 1994; 180:631–640.
133. Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, et al. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 1994;180:1849–1860.
134. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Thl/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995;80:707–718.
135. Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, et al. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 1995;2:523–532.
136. Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, et al. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol* 1995;154:97–105.
137. Natesan M, Razi-Wolf Z, Reiser H. Costimulation of IL-4 production by murine B7-1 and B7-2 molecules. *J Immunol* 1996;156:2783–2791.
138. Levine BL, Ueda Y, Craighead N, Huang ML, June CH. CD28 ligands CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) induce long-term autocrine growth of CD4+ T cells and induce similar patterns of cytokine secretion in vitro. *Int Immunol* 1995;7: 891–904.
139. Schweitzer AN, Borriello F, Wong RC, Abbas AK, Sharpe AH. Role of costimulators in T cell differentiation: studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86. *J Immunol* 1997;158:2713–2722.
140. Greenwald RJ, Lu P, Halvorson MJ, et al. Effects of blocking B7-1 and B7-2 interactions during a type 2 in vivo immune response. *J Immunol* 1997;158: 4088–4096.
141. Ghiotto-Ragueneau M, Battifora M, Truneh A, Waterfield MD, Olive D. Comparison of CD28-B7.1 and B7.2 functional interaction in resting human T cells: phosphatidylinositol 3-kinase association to CD28 and cytokine production. *Eur J Immunol* 1996;26:34–41.
142. Subramanian G, Kazura JW, Pearlman E, Jia X, Malhotra I, King CL. B7-2 requirement for helminth-induced granuloma formation and CD4 type 2 T helper cell cytokine expression. *J Immunol* 1997;158:5914–5920.
143. Lu P, Zhou X, Chen SJ, et al. CTLA-4 ligands are required to induce an in vivo interleukin 4 response to a gastrointestinal nematode parasite. *J Exp Med* 1994; 180:693–698.
144. Corry DB, Reiner SL, Linsley PS, Locksley RM. Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1994;153:4142–4148.
145. Lu P, Zhou XD, Chen SJ, et al. Requirement of CTLA-4 counter receptors for IL-4 but not IL-10 elevations during a primary systemic in vivo immune response. *J Immunol* 1995;154:1078–1087.
146. McKnight AJ, Perez VL, Shea CM, Gray GS, Abbas AK. Costimulator dependence of lymphokine secretion by naive and activated CD4+ T lymphocytes from TCR transgenic mice. *J Immunol* 1994;152:5220–5225.
147. Murphy EE, Terres G, Macatonia SE, et al. B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J Exp Med* 1994;180:223–231.
148. Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, et al. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med* 1995; 181:1869–1874.
149. Thompson CB. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation? *Cell* 1995;81:979–982.
150. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233–258.
151. Brinkmann V, Kinzel B, Kristofic C. TCR-independent activation of human CD4+ 45RO- T cells by anti-CD28 plus IL-2: induction of clonal expansion and priming for a Th2 phenotype. *J Immunol* 1996;156:4100–4106.
152. King CL, Stupi RJ, Craighead N, June CH, Thyphronitis G. CD28 activation promotes Th2 subset differentiation by human CD4+ cells. *Eur J Immunol* 1995; 25:587–595.
153. Yang LP, Demeure CE, Byun DG, Vezzio N, Delespesse G. Maturation of neonatal human CD4 T cells: III. Role of B7 co-stimulation at priming. *Int Immunol* 1995;7:1987–1993.
154. Rulifson IC, Sperling AI, Fields PE, Fitch FW, Bluestone JA. CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J Immunol* 1997;158:658–665.
155. Lenschow DJ, Herold KC, Rhee L, et al. CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity* 1996;5:285–293.
156. Kuiper HM, De Jong R, Brouwer M, Lammers K, Wijdenes J, Van Lier RA. Influence of CD28 co-stimulation on cytokine production is mainly regulated via interleukin-2. *Immunology* 1994;83:38–44.
157. Harada Y, Watanabe S, Yssel H, Arai K. Factors affecting the cytokine production of human T cells stimulated by different modes of activation. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:S161–S173.
158. Brown DR, Green JM, Moskowitz NH, Davis M, Thompson CB, Reiner SL. Limited role of CD28-mediated signals in T helper subset differentiation. *J Exp Med* 1996;184:803–810.
159. Callard RE, Armitage RJ, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol Today* 1993;14:559–564.
160. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, et al. The CD40 antigen and its ligand.

Annu Rev Immunol 1994;12:881–922.
161. Roy M, Aruffo A, Ledbetter J, Linsley P, Kehry M, Noelle R. Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune responses. *Eur J Immunol* 1995;25:596–603.
162. Grewal IS, Xu J, Flavell RA. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* 1995;378:617–620.
163. van Essen D, Kikutani H, Gray D. CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function. *Nature* 1995;378:620–623.
164. Grewal IS, Foellmer HG, Grewal KD, et al. Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 1996;273:1864–1867.
165. Yang Y, Wilson JM. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 1996;273:1862–1864.
166. Koch F, Stanzl U, Jennewein P, et al. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* 1996;184:741–746.
167. Shu U, Kiniwa M, Wu CY, et al. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol* 1995;25: 1125–1128.
168. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996;184:747–752.
169. Campbell KA, Ovendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG, Maliszewski CR. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to Leishmania major. *Immunity* 1996;4:283–289.
170. Kamanaka M, Yu P, Yasui T, et al. Protective role of CD40 in Leishmania major infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. *Immunity* 1996;4: 275–281.
171. Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Samelson LE, Bolen JB. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Nature* 1989;338:257–259.
172. Doyle C, Strominger JL. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 1987;330:256–259.
173. Shen X, Hu B, McPhie P, et al. Peptides corresponding to CD4-interacting regions of murine MHC class II molecules modulate immune responses of CD4+ T lymphocytes in vitro and in vivo. *J Immunol* 1996;157:87–100.
174. Fowell DJ, Magram J, Turck CW, Killeen N, Locksley RM. Impaired Th2 subset development in the absence of CD4. *Immunity* 1997;6:559–569.
175. Brown DR, Moskowitz NH, Killeen N, Reiner SL. A role for CD4 in peripheral T cell differentiation. *J Exp Med* 1997;186:101–107.
176. Parish CR. The relationship between humoral and cell-mediated immunity. *Transplant Rev* 1972;13:35–66.
177. Murray JS, Pfeiffer C, Madri J, Bottomly K. Major histocompatibility complex (MHC) control of CD4 T cell subset activation. II. A single peptide induces either humoral or cell-mediated responses in mice of distinct MHC genotype. *Eur J Immunol* 1992;22:559–565.
178. Schountz T, Kasselman JP, Martinson FA, Brown L, Murray JS. MHC genotype controls the capacity of ligand density to switch T helper (Th)-1/Th-2 priming in vivo. *J Immunol* 1996;157:3893–3901.
179. Pfeiffer C, Stein J, Southwood S, Ketelaar H, Sette A, Bottomly K. Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. *J Exp Med* 1995;181:1569–1574.
180. Chaturvedi P, Yu Q, Southwood S, Sette A, Singh B. Peptide analogs with different affinites for MHC alter the cytokine profile of T helper cells. *Int Immunol* 1996;8:745–755.
181. Constant S, Pfeiffer C, Woodard A, Pasqualini T, Bottomly K. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4(+) T cells. *J Exp Med* 1995;182:1591–1596.
182. Hosken NA, Shibuya K, Heath AW, Murphy KM, O'Garra A. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J Exp Med* 1995;182:1579–1584.
183. Tao X, Grant C, Constant S, Bottomly K. Induction of IL-4-producing CD4+ T cells by antigenic peptides altered for TCR binding. *J Immunol* 1997;158: 4237–4244.
184. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997;15:297–322.
185. Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to Leishmania major. *Science* 1992;257:539–542.
186. Bancroft AJ, Else KJ, Grencis RK. Low-level infection with Trichuris muris significantly affects the polarization of the CD4 response. *Eur J Immunol* 1994;24: 3113–3118.
187. Sadick MD, Heinzel FP, Shigekane VM, Fisher WL, Locksley RM. Cellular and humoral immunity to Leishmania major in genetically susceptible mice after in vivo depletion of L3T4+ T cells. *J Immunol* 1987;139:1303–1309.
188. Murray JS, Kasselman JP, Schountz T. High-density presentation of an immunodominant minimal peptide on B cells is MHC-linked to Th1-like immunity. *Cell Immunol* 1995;166:9–15.
189. Fitch FW, McKisic MD, Lancki DW, Gajewski TF. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu Rev Immunol* 1993;11:29–48.
190. Rizzo LV, DeKruyff RH, Umetsu DT, Caspi RR. Regulation of the interaction between Th1 and Th2 T cell clones to provide help for antibody production in vivo. *Eur J Immunol* 1995;25:708–716.
191. Carballido JM, Faith A, Carballido-Perrig N, Blaser K. The intensity of T cell receptor engagement determines the cytokine pattern of human allergen-specific T helper cells. *Eur J Immunol* 1997;27:515–521.
192. Secrist H, DeKruyff RH, Umetsu DT. Interleukin 4 production by CD4+ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen-presenting cell type. *J Exp Med* 1995;181:1081–1089.
193. Evavold BD, Williams SG, Hsu BL, Buus S, Allen PM. Complete dissection of the Hb(64-76) determinant using T helper 1, T helper 2 clones, and T cell hybridomas. *J Immunol* 1992;148:347–353.
194. van der Veen RC, Chen PJ, McMillan M. Myelin proteolipid protein-induced Th1 and Th2 clones express TCR with similar fine specificity for peptide and CDR3 homology despite diverse V beta usage. *Cell Immunol* 1995;166:291–295.
195. Ogawa T, Uchida H, Yasuda K. Mapping of murine Th1 and Th2 helper T-cell epitopes on fimbriae from Porphyromonas gingivalis. *J Med Microbiol* 1995;42: 165–170.
196. Robinson JH, Case MC, Kehoe MA. Characterization of a conserved helper-T-cell epitope from group A Streptococcal M proteins. *Infect Immun* 1993;61: 1062–1068.
197. Spiegelberg HL, Beck L, Stevenson DD, Ishioka GY. Recognition of T cell epitopes and lymphokine secretion by rye grass allergen Lolium perenne I-specific human T cell clones. *J Immunol* 1994;152:4706–4711.
198. van Neerven RJ, van de Pol MM, Wierenga EA, Aalberse RC, Jansen HM, Kapsenberg ML. Peptide specificity and HLA restriction do not dictate lymphokine production by allergen-specific T-lymphocyte clones. *Immunology* 1994;82:351–356.
199. Kurup VP, Hari V, Guo J, et al. Aspergillus fumigatus peptides differentially express Th1 and Th2 cytokines. *Peptides* 1996;17:183–190.
200. Milich DR, Peterson DL, Schodel F, Jones JE, Hughes JL. Preferential recognition of hepatitis B nucleocapsid antigens by Th1 or Th2 cells is epitope and major histocompatibility complex dependent. *J Virol* 1995;69:2776–2785.
201. Ashbridge KR, Backstrom BT, Liu HX, et al. Mapping of T helper cell epitopes by using peptides spanning the 19-kDa protein of Mycobacterium tuberculosis. Evidence for unique and shared epitopes in the stimulation of antibody and delayed-type hypersensitivity responses. *J Immunol* 1992;148:2248–2255.
202. Metlay JP, Pure E, Steinman RM. Distinct features of dendritic cells and anti-Ig activated B cells as stimulators of the primary mixed leukocyte reaction. *J Exp Med* 1989;169:239–254.
203. Heufler C, Koch F, Stanzl U, et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996;26:659–668.
204. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995; 154:5071–5079.
205. Kennedy MK, Picha KS, Fanslow WC, et al. CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages. *Eur J Immunol* 1996;26:370–378.
206. Ronchese F, Hausmann B, Le Gros G. Interferon-gamma- and interleukin-4-producing T cells can be primed on dendritic cells in vivo and do not require the presence of B cells. *Eur J Immunol* 1994;24:1148–1154.
207. Macatonia SE, Doherty TM, Knight SC, O'Garra A. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol* 1993;150:3755–3765.
208. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 1997;27:1229–1235.
209. Kapsenberg M. PGE2 on DC, to Th2. *J Immunol* 1997;28–35.
210. Schmitz J, Assenmacher M, Radbruch A. Regulation of T helper cell cytokine expression: functional dichotomy of antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 1993;23:191–199.
211. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 1992;176:1387–1398.
212. Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6115–6119.
213. Zhou P, Sieve MC, Bennett J, et al. IL-12 prevents mortality in mice infected with Histoplasma capsulatum through induction of IFN-gamma. *J Immunol* 1995;155:785–795.
214. Cooper AM, Roberts AD, Rhoades ER, Callahan JE, Getzy DM, Orme IM. The role of interleukin-12 in acquired immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunology* 1995;84:423–432.
215. Puddu P, Fantuzzi L, Borghi P, et al. IL-12 induces IFN-gamma expression and secretion in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 1997;159:3490–3497.
216. O'Garra A, Chang R, Go N, Hastings R, Haughton G, Howard M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol* 1992; 22:711–717.
217. Constant S, Schweitzer N, West J, Ranney P, Bottomly K. *B lymphocytes can be*

competent APCs for priming CD4(−) T cells to protein antigens in vivo. *J Immunol* 1995;155:3734–3741.
218. Taylor-Robinson AW, Phillips RS. B cells are required for the switch from Th1- to Th2-regulated immune responses to Plasmodium chabaudi infection. *Infect Immun* 1994;62:2490–2498.
219. Stockinger B, Zal T, Zal A, Gray D. B cells solicit their own help from T cells. *J Exp Med* 1996;183:891–899.
220. Finkelman FD, Snapper CM, Mountz JD, Katona IM. Polyclonal activation of the murine immune system by a goat antibody to mouse IgD. IX. Induction of a polyclonal IgE response. *J Immunol* 1987;138:2826–2830.
221. Gause WC, Chen SJ, Greenwald RJ, et al. CD28 dependence of T cell differentiation to IL-4 production varies with the particular type 2 immune response. *J Immunol* 1997;158:4082–4087.
222. Malynn BA, Romeo DT, Wortis HH. Antigen-specific B cells efficiently present low doses of antigen for induction of T cell proliferation. *J Immunol* 1985;135: 980–988.
223. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 1985;314:537–539.
224. Abbas AK, Haber S, Rock KL. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. II. Specificity and properties of antigen-presenting B lymphocytes, and function of immunoglobulin receptors. *J Immunol* 1985;135:1661–1667.
225. Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J Exp Med* 1995; 181:713–721.
226. Beebe AM, Mauze S, Schork NJ, Coffman RL. Serial backcross mapping of multiple loci associated with resistance to Leishmania major in mice. *Immunity* 1997;6:551–557.
227. Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature* 1995;377:591–594.
228. Schindler C, Darnell JE Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 1995;64:621–651.
229. Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 1994;265:1701–1706.
230. Lederer JA, Perez VL, DesRoches L, Kim SM, Abbas AK, Lichtman AH. Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation. *J Exp Med* 1996;184:397–406.
231. Jacobson NG, Szabo SJ, Weber-Nordt RM, et al. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med* 1995;181:1755–1762.
232. Tamura T, Nakano H, Nagase H, et al. Early activation signal transduction pathways of Th1 and Th2 cell clones stimulated with anti-CD3. Roles of protein tyrosine kinases in the signal for IL-2 and IL-4 production. *J Immunol* 1995;155: 4692–4701.
233. Tamura T, Yanagida T, Nariuchi H. Difference in signal transduction pathway for IL-2 and IL-4 production in T helper 1 and T helper 2 cell clones in response to anti-CD3. *J Immunol* 1993;151:6051–6061.
234. Kawakami K, Parker DC. Differences between T helper cell type I (Th1) and Th2 cell lines in signalling pathways for induction of contact-dependent T cell help. *Eur J Immunol* 1992;22:85–93.
235. Bruhn KW, Nelms K, Boulay J-L, Paul WE, Lenardo MJ. Molecular dissection of the mouse interleukin-4 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9707–9711.
236. Szabo SJ, Gold JS, Murphy TL, Murphy KM. Identification of cis-acting regulatory elements controlling interleukin-4 gene expression in T cells: roles for NF-Y and NF-ATc. *Mol Cell Biol* 1993;13:4793–4805.
237. Rooney JW, Hoey T, Glimcher LH. Coordinate and cooperative roles for NF-AT and AP-1 in the regulation of the murine IL-4 gene. *Immunity* 1995;2:473–483.
238. Hodge MR, Rooney JW, Glimcher LH. The proximal promoter of the IL-4 gene is composed of multiple essential regulatory sites that bind at least two distinct factors. *J Immunol* 1995;154:6397–6405.
239. Song Z, Casolaro V, Chen R, Georas SN, Monos D, Ono SJ. Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene. *J Immunol* 1996;156:424–429.
240. Davydov IV, Krammer PH, Li-Weber M. Nuclear factor-IL6 activates the human IL-4 promoter in T cells. *J Immunol* 1995;155:5273–5279.
241. Lederer JA, Liou JS, Kim S, Rice N, Lichtman AH. Regulation of NF-kappa B activation in T helper 1 and T helper 2 cells. *J Immunol* 1996;156:56–63.
242. Ho IC, Hodge MR, Rooney JW, Glimcher LH. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 1996;85: 973–983.
243. Hodge MR, Chun HJ, Rengarajan J, Alt A, Lieberson R, Glimcher LH. NF-AT-driven interleukin-4 transcription potentiated by NIP45. *Science* 1996;274: 1903–1905.
244. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997;89:587–596.
245. Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 1996;4:397–405.
246. Rooney JW, Hodge MR, McCaffrey PG, Rao A, Glimcher LH. A common factor regulates both Th1- and Th2-specific cytokine gene expression. *EMBO J* 1994;13:625–633.
247. Enk CD, Sredni D, Blauvelt A, Katz SI. Induction of IL-10 gene expression in human keratinocytes by UVB exposure in vivo and in vitro. *J Immunol* 1995; 154:4851–4856.
248. Nickoloff BJ, Fivenson DP, Kunkel SL, Strieter RM, Turka LA. Keratinocyte interleukin-10 expression is upregulated in tape-stripped skin, poison ivy dermatitis, and Sezary syndrome, but not in psoriatic plaques. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;73:63–68.
249. Ullrich SE. Mechanism involved in the systemic suppression of antigen-presenting cell function by UV irradiation. Keratinocyte-derived IL-10 modulates antigen-presenting cell function of splenic adherent cells. *J Immunol* 1994;152: 3410–3416.
250. Enk CD, Mahanty S, Blauvelt A, Katz SI. UVB induces IL-12 transcription in human keratinocytes in vivo and in vitro. *Photochem Photobiol* 1996;63: 854–859.
251. Aragane Y, Riemann H, Bhardwaj RS, et al. IL-12 is expressed and released by human keratinocytes and epidermoid carcinoma cell lines. *J Immunol* 1994;153: 5366–5372.
252. Muller G, Saloga J, Germann T, et al. Identification and induction of human keratinocyte-derived IL-12. *J Clin Invest* 1994;94:1799–1805.
253. Yawalkar N, Limat A, Brand CU, Braathen LR. Constitutive expression of both subunits of interleukin-12 in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1996;106: 80–83.
254. Stoll S, Muller G, Kurimoto M, et al. Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. *J Immunol* 1997;159:298–302.
255. Budd RC, Cerottini JC, MacDonald HR. Selectively increased production of interferon-gamma by subsets of Lyt-2+ and L3T4+ T cells identified by expression of Pgp-1. *J Immunol* 1987;138:3583–3586.
256. Swain SL, Weinberg AD, English M. CD4+ T cell subsets: lymphokine secretion of memory cells and of effector cells which develop from precursors in vitro. *J Immunol* 1990;144:1788–1799.
257. Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 1995;2:271–279.
258. Kojima S, Ovary Z. Effect of Nippostrongylus brasiliensis infection on anti-hapten IgE antibody response in the mouse. II. Mechanism of potentiation of the IgE antibody response to a heterologous hapten-carrier conjugate. *Cell Immunol* 1975;17:383–391.
259. Actor JK, Marshall MA, Eltoum IA, Buller RM, Berzofsky JA, Sher A. Increased susceptibility of mice infected with Schistosoma mansoni to recombinant vaccinia virus: association of viral persistence with egg granuloma formation. *Eur J Immunol* 1994;24:3050–3056.
260. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* 1995;373: 255–257.
261. Launois P, Maillard I, Pingel S, et al. IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to Leishmania major in BALB/c mice. *Immunity* 1997;6:541–549.
262. Yoshimoto T, Paul WE. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med* 1994;179: 1285–1295.
263. Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med* 1994;180:1097–1106.
264. Bendelac A. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med* 1995;182:2091–2096.
265. Bendelac A, Killeen N, Littman DR, Schwartz RH. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* 1994;263:1774–1778.
266. Chen YH, Chiu NM, Mandal M, Wang N, Wang CR. Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity* 1997; 6:459–467.
267. Smiley ST, Kaplan MH, Grusby MJ. Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. *Science* 1997;275: 977–979.
268. Prigozy TI, Sieling PA, Clemens D, et al. The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity* 1997;6:187–197.
269. Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE. Role of NK1.1+ T cells in a Th2 response and in immunoglobulin E production. *Science* 1995;270: 1845–1847.
270. Bendelac A, Hunziker RD, Lantz O. Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells. *J Exp Med* 1996;184:1285–1293.
271. Brown DR, Fowell DJ, Corry DB, et al. Beta 2-microglobulin-dependent NK1.1+ T cells are not essential for T helper cell 2 immune responses. *J Exp Med* 1996;184:1295–1304.
272. von der Weid T, Beebe AM, Roopenian DC, Coffman RL. Early production of IL-4 and induction of Th2 responses in the lymph node originate from an MHC class I-independent CD4+NK1.1- T cell population. *J Immunol* 1996;157: 4421–4427.
273. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989;47:187–216.
274. Scharton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that

drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice. *J Exp Med* 1993;178:567–577.

275. Warren HS, Kinnear BF, Phillips JH, Lanier LL. Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *J Immunol* 1995;154:5144–5152.
276. Yoshida A, Koide Y, Uchijima M, Yoshida TO. IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:857–861.
277. Kato T, Hakamada R, Yamane H, Nariuchi H. Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. *J Immunol* 1996;156:3932–3938.
278. Berger S, Ballo H, Stutte HJ. Immune complex-induced interleukin-6, interleukin-10 and prostaglandin secretion by human monocytes: a network of pro- and anti-inflammatory cytokines dependent on the antigen:antibody ratio. *Eur J Immunol* 1996;26:1297–1301.
279. Donnelly RP, Freeman SL, Hayes MP. Inhibition of IL-10 expression by IFN-gamma up-regulates transcription of TNF-alpha in human monocytes. *J Immunol* 1995;155:1420–1427.
280. Kang K, Kubin M, Cooper KD, Lessin SR, Trinchieri G, Rook AH. IL-12 synthesis by human Langerhans cells. *J Immunol* 1996;156:1402–1407.
281. Yawalkar N, Brand CU, Braathen LR. IL-12 gene expression in human skin-derived CD1a+ dendritic lymph cells. *Arch Dermatol Res* 1996;288:79–84.
282. Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol* 1997;159:28–35.
283. Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, Hanley-Hyde J, Nordan RP, Paul WE. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc RI or to calcium ionophores. *Nature* 1989;339:64–67.
284. Bradding P, Feather IH, Howarth PH, et al. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J Exp Med* 1992;176:1381–1386.
285. Smith TJ, Ducharme LA, Weis JH. Preferential expression of interleukin-12 or interleukin-4 by murine bone marrow mast cells derived in mast cell growth factor or interleukin-3. *Eur J Immunol* 1994;24:822–826.
286. Gibbs BF, Haas H, Falcone FH, et al. Purified human peripheral blood basophils release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. *Eur J Immunol* 1996;26:2493–2498.
287. Li H, Sim TC, Alam R. IL-13 released by and localized in human basophils. *J Immunol* 1996;156:4833–4838.
288. Mueller R, Heusser CH, Rihs S, Brunner T, Bullock GR, Dahinden CA. Immunolocalization of intracellular interleukin-4 in normal human peripheral blood basophils. *Eur J Immunol* 1994;24:2935–2940.
289. Ochensberger B, Rihs S, Brunner T, Dahinden CA. IgE-independent interleukin-4 expression and induction of a late phase of leukotriene C4 formation in human blood basophils. *Blood* 1995;86:4039–4049.
290. Kasaian MT, Clay MJ, Happ MP, Garman RD, Hirani S, Luqman M. IL-4 production by allergen-stimulated primary cultures: identification of basophils as the major IL-4-producing cell type. *Int Immunol* 1996;8:1287–1297.
291. Ben-Sasson SZ, Le Gros G, Conrad DH, Finkelman FD, Paul WE. Cross-linking Fc receptors stimulate splenic non-B, non-T cells to secrete interleukin 4 and other lymphokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1421–1425.
292. Moqbel R, Ying S, Barkans J, et al. Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *J Immunol* 1995;155:4939–4947.
293. Lamkhioued B, Aldebert D, Gounni AS, et al. Synthesis of cytokines by eosinophils and their regulation. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:122–123.
294. Wegmann TG, Lin H, Guilbert LJ, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353–356.
295. Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 1995;155:128–133.
296. Huber SA, Pfaeffle B. Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus group B type 3. *J Virol* 1994; 68:5126–5132.
297. Toyoda H, Takei S, Formby B. Effect of 5-alpha dihydrotestosterone on T-cell proliferation of the female nonobese diabetic mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;213:287–293.
298. Araneo BA, Dowell T, Diegel M, Daynes RA. Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5, and gamma-interferon, but not IL-2 by activated murine T cells. *Blood* 1991;78:688–699.
299. Fleshner M, Brennan FX, Nguyen K, Watkins LR, Maier SF. RU-486 blocks differentially suppressive effect of stress on in vivo anti-KLH immunoglobulin response. *Am J Physiol* 1996;271:R1344–R1352.
300. Dobbs CM, Feng N, Beck FM, Sheridan JF. Neuroendocrine regulation of cytokine production during experimental influenza viral infection: effects of restraint stress-induced elevation in endogenous corticosterone. *J Immunol* 1996;157:1870–1877.
301. Decker D, Schondorf M, Bidlingmaier F, Hirner A, von Ruecker AA. Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 T-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell-mediated and up-regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma. *Surgery* 1996;119:316–325.
302. Milburn HJ, Poulter LW, Dilmec A, Cochrane GM, Kemeny DM. Corticosteroids restore the balance between locally produced Th1 and Th2 cytokines and immunoglobulin isotypes to normal in sarcoid lung. *Clin Exp Immunol* 1997; 108:105–113.
303. Snijdewint FG, Kapsenberg ML, Wauben-Penris PJ, Bos JD. Corticosteroids class-dependently inhibit in vitro Th1- and Th2-type cytokine production. *Immunopharmacology* 1995;29:93–101.
304. Brinkmann V, Kristofic C. Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4+ effector T cells generated from CD45RO- and CD45RO+ subsets. *J Immunol* 1995;155:3322–3328.
305. Ramierz F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason D. Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *J Immunol* 1996;156: 2406–2412.
306. Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians* 1996;108:374–381.
307. Blotta MH, DeKruyff RH, Umetsu DT. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 1997;158:5589–5595.
308. Daynes RA, Dudley DJ, Araneo BA. Regulation of murine lymphokine production in vivo. II. Dehydroepiandrosterone is a natural enhancer of interleukin 2 synthesis by helper T cells. *Eur J Immunol* 1990;20:793–802.
309. Suzuki T, Suzuki N, Daynes RA, Engleman EG. Dehydroepiandrosterone enhances IL2 production and cytotoxic effector function of human T cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;61:202–211.
310. Kim HR, Ryu SY, Kim HS, et al. Administration of dehydroepiandrosterone reverses the immune suppression induced by high dose antigen in mice. *Immunol Invest* 1995;24:583–593.
311. Araghi-Niknam M, Liang B, Zhang Z, Ardestani SK, Watson RR. Modulation of immune dysfunction during murine leukaemia retrovirus infection of old mice by dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS). *Immunology* 1997;90:344–349.
312. van der Pouw Kraan TC, Boeije LC, Smeenk RJ, Wijdenes J, Aarden LA. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995;181:775–779.
313. Katamura K, Shintaku N, Yamauchi Y, et al. Prostaglandin E2 at priming of naive CD4+ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN-gamma and IL-2, but not IL-4 and IL-5. *J Immunol* 1995;155:4604–4612.
314. Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol* 1991;146:108–113.
315. Snijdewint FG, Kalinski P, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol* 1993;150:5321–5329.
316. Hilkens CM, Vermeulen H, van Neerven RJ, Snijdewint FG, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Differential modulation of T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E2 critically depends on interleukin-2. *Eur J Immunol* 1995;25:59–63.
317. Misra N, Selvakumar M, Singh S, et al. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett* 1995;48:123–128.
318. Milano S, Arcoleo F, Dieli M, et al. Ex vivo evidence for PGE2 and LTB4 involvement in cutaneous leishmaniasis: relation with infection status and cytokine production. *Parasitology* 1996;112:13–19.
319. Chan S, Henderson WR Jr, Li SH, Hanifin JM. Prostaglandin E2 control of T cell cytokine production is functionally related to the reduced lymphocyte proliferation in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:85–94.
320. Phillips C. Prostaglandin E2 production is enhanced in mice genetically selected to produce high affinity antibody responses. *Cell Immunol* 1989;119:382–392.
321. Sanders VM, Baker RA, Ramer-Quinn DS, Kasprowicz DJ, Fuchs BA, Street NE. Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help. *J Immunol* 1997; 158:4200–4210.
322. Coqueret O, Petit-Frere C, Lagente V, Moumen M, Mencia-Huerta JM, Braquet P. Modulation of IgE production in the mouse by beta 2-adrenoceptor agonist. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;105:171–176.
323. Wiedermann U, Hanson LA, Kahu H, Dahlgren UI. Aberrant T-cell function in vitro and impaired T-cell dependent antibody response in vivo in vitamin A-deficient rats. *Immunology* 1993;80:581–586.
324. Cantorna MT, Nashold FE, Hayes CE. Vitamin A deficiency results in a priming environment conducive for Th1 cell development. *Eur J Immunol* 1995;25: 1673–1679.
325. Cantorna MT, Nashold FE, Hayes CE. In vitamin A deficiency multiple mechanisms establish a regulatory T helper cell imbalance with excess Th1 and insufficient Th2 function. *J Immunol* 1994;152:1515–1522.
326. Cantorna MT, Nashold FE, Chun TY, Hayes CE. Vitamin A down-regulation of IFN-gamma synthesis in cloned mouse Th1 lymphocytes depends on the CD28 costimulatory pathway. *J Immunol* 1996;156:2674–2679.
327. Racke MK, Burnett D, Pak SH, et al. Retinoid treatment of experimental allergic encephalomyelitis. IL-4 production correlates with improved disease course. *J Immunol* 1995;154:450–458.

328. Matsui T, Takahashi R, Nakao Y, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3-regulated expression of genes involved in human T-lymphocyte proliferation and differentiation. *Cancer Res* 1986;46:5827–5831.
329. Rigby WF, Denome S, Fanger MW. Regulation of lymphokine production and human T lymphocyte activation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Specific inhibition at the level of messenger RNA. *J Clin Invest* 1987;79:1659–1664.
330. Reichel H, Koeffler HP, Tobler A, Norman AW. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits gamma-interferon synthesis by normal human peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3385–3389.
331. Barna M, Bos JD, Kapsenberg ML, Snijdewint FG. Effect of calcitriol on the production of T-cell-derived cytokines in psoriasis. *Br J Dermatol* 1997;136: 536–541.
332. Koeffler HP, Reichel H, Bishop JE, Norman AW. gamma-Interferon stimulates production of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by normal human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;127:596–603.
333. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. Synthesis in vitro of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 24,25-dihydroxyvitamin D3 by interferon-gamma-stimulated normal human bone marrow and alveolar macrophages. *J Biol Chem* 1987;262: 10931–10937.
334. Bikle DD, Pillai S, Gee E, Hincenbergs M. Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D production in human keratinocytes by interferon-gamma. *Endocrinology* 1989;124:655–660.
335. Perez VL, Lederer JA, Lichtman AH, Abbas AK. Stability of Th1 and Th2 populations. *Int Immunol* 1995;7:869–875.
336. Mocci S, Coffman RL. Induction of a Th2 population from a polarized Leishmania-specific Th1 population by in vitro culture with IL-4. *J Immunol* 1995; 154:3779–3787.
337. Mocci S, Coffman RL. The mechanism of in vitro T helper cell type 1 to T helper cell type 2 switching in highly polarized Leishmania major-specific T cell populations. *J Immunol* 1997;158:1559–1564.
338. Murphy E, Shibuya K, Hosken N, et al. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J Exp Med* 1996;183:901–913.
339. Hu-Li J, Huang H, Ryan J, Paul WE. In differentiated CD4+ T cells, interleukin 4 production is cytokine-autonomous, whereas interferon gamma production is cytokine-dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3189–3194.
340. Yssel H, Fasler S, de Vries JE, de Waal Malefyt R. IL-12 transiently induces IFN-gamma transcription and protein synthesis in human CD4+ allergen-specific Th2 T cell clones. *Int Immunol* 1994;6:1091–1096.
341. Jeannin P, Delneste Y, Life P, Gauchat JF, Kaiserlian D, Bonnefoy JY. Interleukin-12 increases interleukin-4 production by established human Th0 and Th2-like T cell clones. *Eur J Immunol* 1995;25:2247–2252.
342. Launois P, Swihart KG, Milon G, Louis JA. Early production of IL-4 in susceptible mice infected with Leishmania major rapidly induces IL-12 unresponsiveness. *J Immunol* 1997;158:3317–3324.
343. Gajewski TF, Joyce J, Fitch FW. Antiproliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. III. Differential selection of Th1 and Th2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN-gamma. *J Immunol* 1989;143:15–22.
344. Wang ZE, Zheng S, Corry DB, et al. Interferon gamma-independent effects of interleukin 12 administered during acute or established infection due to Leishmania major. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12932–12936.
345. Via CS, Rus V, Gately MK, Finkelman FD. IL-12 stimulates the development of acute graft-versus-host disease in mice that normally would develop chronic, autoimmune graft-versus-host disease. *J Immunol* 1994;153:4040–4047.
346. Finkelman FD, Madden KB, Cheever AW, et al. Effects of interleukin 12 on immune responses and host protection in mice infected with intestinal nematode parasites. *J Exp Med* 1994;179:1563–1572.
347. Morris SC, Madden KB, Adamovicz JJ, et al. Effects of IL-12 on in vivo cytokine gene expression and Ig isotype selection. *J Immunol* 1994;152:1047–1056.
348. Germann T, Rude E, Schmitt E. The influence of IL12 on the development of Th1 and Th2 cells and its adjuvant effect for humoral immune responses. *Res Immunol* 1995;146:481–486.
349. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 1995;181:537–546.
350. Parronchi P, Mohapatra S, Sampognaro S, et al. Effects of interferon-alpha on cytokine profile, T cell receptor repertoire and peptide reactivity of human allergen-specific T cells. *Eur J Immunol* 1996;26:697–703.
351. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993;178:1041–1048.
352. Chomarat P, Rissoan M-C, Banchereau J, Miossec P. Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J Exp Med* 1993;177:523–527.
353. Libraty DH, Airan LE, Uyemura K, et al. Interferon-gamma differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. *J Clin Invest* 1997; 99:336–341.
354. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today* 1997;18:335–343.
355. Swain SL, Huston G, Tonkonogy S, Weinberg A. Transforming growth factor-beta and IL-4 cause helpor T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphokine secretion pattern and cell surface phenotype. *J Immunol* 1991;147:2991–3000.
356. Schmitt E, Hoehn P, Huels C, et al. T helper type 1 development of naive CD4+ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon-gamma and is inhibited by transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* 1994;24: 793–798.
357. Hoehn P, Goedert S, Germann T, et al. Opposing effects of TGF-beta 2 on the Th1 cell development of naive CD4+ T cells isolated from different mouse strains. *J Immunol* 1995;155:3788–3793.
358. Barral Netto M, Barral A, Brownell CE, et al. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 1992;257:545–548.
359. Hunter CA, Bermudez L, Beernink H, Waegell W, Remington JS. Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell-independent resistance to Toxoplasma gondii. *Eur J Immunol* 1995;25:994–1000.
360. Weiner HL, Friedman A, Miller A, et al. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol* 1994;12:809–837.
361. Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996;183: 2669–2674.
362. Meade R, Askenase PW, Geba GP, Neddermann K, Jacoby RO, Pasternak RD. Transforming growth factor β1 inhibits murine immediate and delayed type hypersensitivity. *J Immunol* 1992;149:521–528.
363. Spaccapelo R, Romani L, Tonnetti L, et al. TGF-beta is important in determining the in vivo patterns of susceptibility or resistance in mice infected with Candida albicans. *J Immunol* 1995;155:1349–1360.
364. Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-β (TGF-β). *Growth Factors* 1993;8:1–9.
365. Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Picha KS, Kennedy MK, Lynch DH. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. *Int Immunol* 1994;6:1545–1553.
366. Maggi E, Giudizi MG, Biagiotti R, et al. Th2-like CD8+ T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Exp Med* 1994;180:489–495.
367. Kelso A, Glasebrook AL. Secretion of interleukin 2, macrophage-activating factor, interferon, and colony-stimulating factor by alloreactive T lymphocyte clones. *J Immunol* 1984;132:2924–2931.
368. Fong TA, Mosmann TR. Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J Immunol* 1990;144:1744–1752.
369. Seder RA, Boulay JL, Finkelman F, et al. CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. *J Immunol* 1992;148:1652–1656.
370. Erard F, Wild MT, Garcia Sanz JA, Le Gros G. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make Th2 cytokines and help B cells. *Science* 1993; 260:1802–1805.
371. Croft M, Carter L, Swain SL, Dutton RW. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med* 1994;180: 1715–1728.
372. Noble A, Kemeny DM. Interleukin-4 and interferon-gamma regulate differentiation of CD8+ T cells into populations with divergent cytokine profiles. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:186–188.
373. Coyle AJ, Erard F, Bertrand C, Walti S, Pircher H, Le Gros G. Virus-specific CD8+ cells can switch to interleukin 5 production and induce airway eosinophilia. *J Exp Med* 1995;181:1229–1233.
374. Birkhofer A, Rehbock J, Fricke H. T lymphocytes from the normal human peritoneum contain high frequencies of Th2-type CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 1996;26:957–960.
375. Lagoo AS, Eldridge JH, Lagoo-Deenadaylan S, et al. Peyer's patch CD8+ memory T cells secrete T helper type 1 and type 2 cytokines and provide help for immunoglobulin secretion. *Eur J Immunol* 1994;24:3087–3092.
376. Cronin DC, Stack R, Fitch FW. IL-4-producing CD8+ T cell clones can provide B cell help. *J Immunol* 1995;154:3118–3127.
377. Carter LL, Dutton RW. Relative Perforin- and Fas-mediated lysis in T1 and T2 CD8 effector populations. *J Immunol* 1995;155:1028–1031.
378. Sad S, Kagi D, Mosmann TR. Perforin and Fas killing by CD8+ T cells limits their cytokine synthesis and proliferation. *J Exp Med* 1996;184:1543–1548.
379. Sad S, Krishnan L, Bleackley RC, Kagi D, Hengartner H, Mosmann TR. Cytotoxicity and weak CD40 ligand expression of CD8+ type 2 cytotoxic T cells restricts their potential B cell helper activity. *Eur J Immunol* 1997;27:914–922.
380. Rock KL. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* 1996;17:131–137.
381. Li L, Sad S, Kagi D, Hengartner H, Mosmann TR. CD8 Tc1 and Tc2 cells secrete distinct cytokine patterns in vitro and in vivo, but induce similar inflammatory reactions. *J Immunol* 1997;158:4152–4161.
382. Müller KM, Jaunin F, Masouyé I, Saurat J-H, Hauser C. Th2 cells mediate IL-4-dependent local tissue inflammation. *J Immunol* 1993;150:5576–5584.
383. Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, Lincoln P, Kunkel SL. Cytokine func-

tion during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Local and regional participation of IFN-gamma, IL-10, and TNF. *J Immunol* 1995;154:5969–5976.

384. Otten GR, Germain RN. Split anergy in a CD8+ T cell: receptor-dependent cytolysis in the absence of interleukin-2 production. *Science* 1991;251:1228–1231.
385. Sad S, Mosmann TR. IL-4, in the absence of antigen stimulation, induces an anergy-like state in differentiated CD8+ Tc1 cells: loss of IL-2 synthesis and autonomous proliferation but retention of cytotoxicity and synthesis of other cytokines. *J Exp Med* 1995;182:1505–1515.
386. Sad S, Li L, Mosmann TR. Cytokine-deficient CD8+ Tc1 cells induced by IL-4: retention of inflammation and perforin- and Fas-cytotoxicity but compromised long-term killing of tumor cells. *J Immunol* 1997;159:606–613.

第 27 章 黏膜免疫系统

Jerry R. McGhee and Hiroshi Kiyono[①]

一种高度完整和调节完善的黏膜免疫系统同时独立存在于外周系统之外,这一现象最初看来似乎是颇为多余和令人费解的。当外周系统看来似乎可以为宿主提供足够的免疫,为什么说这样一个独立和复杂的系统也是必需的呢?黏膜免疫系统的复杂性和完善性是无疑的,它提供了一种良好调节的双重防御,一部分是呈一定结构和局部分布,另一部分呈弥散分布[1]。一方面,外源性抗原进入后被选择性摄取到免疫反应启动的高度结构化区域;另一方面是分散的效应细胞聚集体,包括 B 和 T 淋巴细胞、未分化的浆细胞、巨噬细胞和其他的抗原呈递细胞(APC),以及嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞,特别是肥大细胞。它们或者产生黏膜和血清抗体应答和 T 细胞介导的免疫(CMI),或全身过敏性反应,一般称为黏膜诱导的耐受性。这样一个独立而复杂的系统可能作为宿主拮抗黏膜感染剂的一种主要防御机制进化的。但是,这种黏膜表面的保护作用需要满足特定的条件(有一些特别的要求)。成年人黏膜表面相当大,仅胃肠(GI)道表面积就超过 $300m^2$,因此需要大量的淋巴细胞和效应分子才可引起免疫。效应元件包括 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 表现型的 T 淋巴细胞以

① J.R. McGhee: Departmint of Microbiology, The University of Alabama at Birmingham, Alabama 35294-2170. H. Kiyono: Departmint of Mucosal Immunology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka 565, Japan.

及 APC,二者之和占细胞总数的 60%以上,此外还有分泌免疫球蛋白 A(IgA)的浆细胞。IgA 是主要的抗体同种型,是其他同种型包括 IgG 亚群的 2 倍以上。本章着重讨论淋巴网状细胞和效应分子包括 IgA 在黏膜免疫、耐受性和炎症中的多重作用。

黏膜免疫系统的组成

哺乳动物宿主的上行呼吸和 GI 道区域进化形成了次级淋巴组织,这有利于抗原的摄取、加工和呈递产生黏膜免疫应答。这些组织总称为感应部位,虽然肠相关淋巴网状组织(GALT),如派尔集合淋巴结(Peyer's patches)是哺乳动物最常见实验系统中主要的感应位点;气道中的支气管相关性淋巴网状组织(BALT)可防御鼻内的/吸入的抗原,其进化程度各种属间差异较大。家兔、大鼠和豚鼠 BALT 发育显著,而人和小鼠的却几乎见不到[2,3],除非发生慢性炎症如 panbron-cholitis 或风湿性关节炎时才出现[4,5]。相反,人和小鼠鼻内的/吸入的抗原主要的感应组织可能是腭扁桃体腺样增殖体和鼻咽扁桃体,它们共同形成淋巴组织沃尔德艾尔环(Waldeyerning),现一般称为鼻咽相关性淋巴网状组织(NALT)[6,7]。总之,人和小鼠的 NALT 和 GALT,其他实验性哺乳动物系统中的 NALT、BALT 和 GALT 一起构成黏膜相关性淋巴网状组织(MALT)网络[8,9],目前人们对该网络仅了解一二。

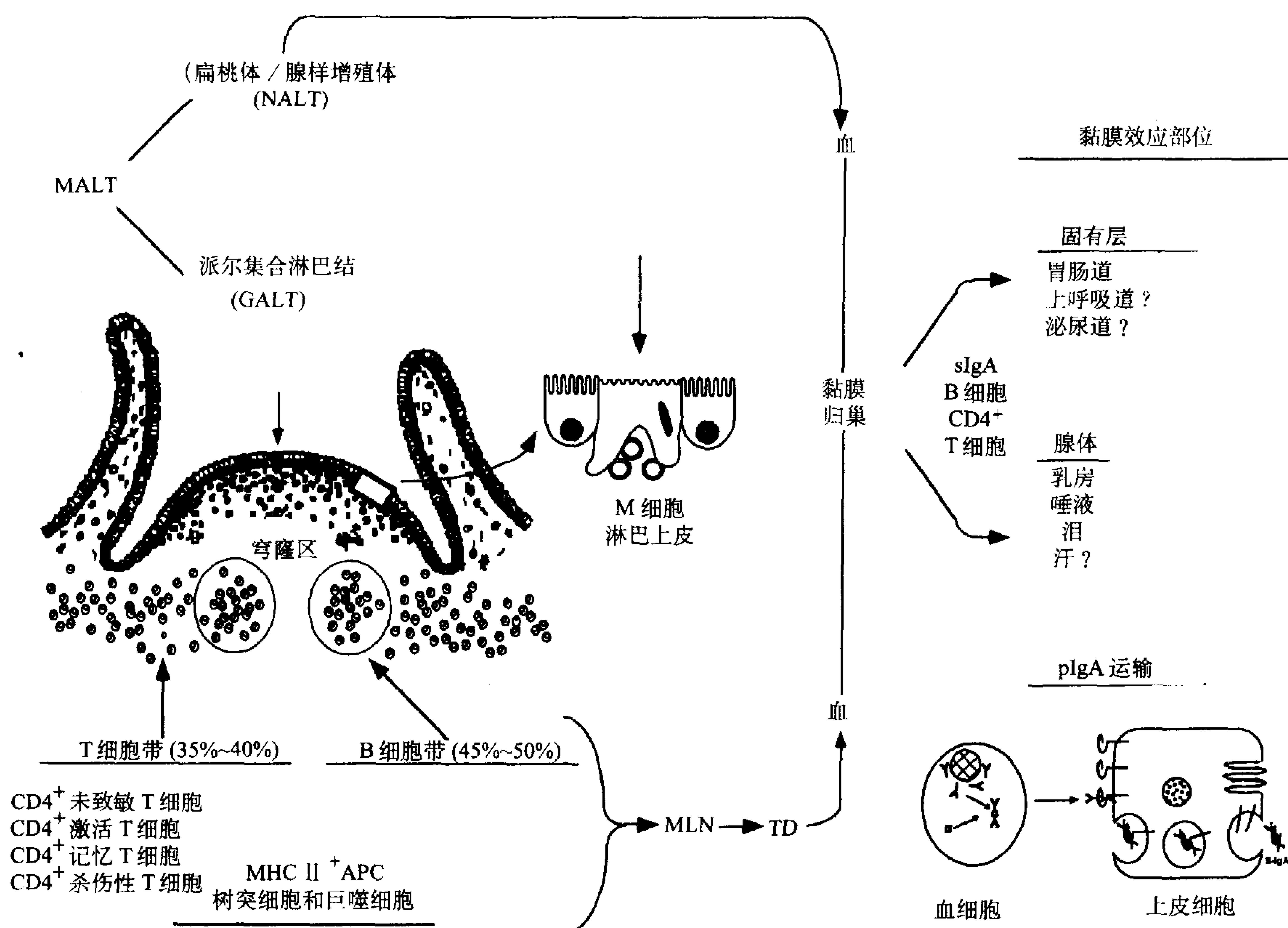


图 27.1 黏膜 IgA 应答感应和效应部位的作用。M 细胞对抗原的摄取发生在 MALT(GALT, BALT 和 NALT)中,导致免疫应答的初始诱导。GALT 内抗原致敏的前体 sIgA⁺ B 细胞、CD4⁺ Th 细胞和 CD8⁺ CTL 细胞通过输出淋巴管迁出,迁移至 MLN,然后进入胸导管(TD),到达血液。这些迁移细胞进入 IgA 效应部位,发生终端分化、合成和 S-IgA 的转运。MALT 内此感应作用和细胞大批迁移至效应部位被称为共同黏膜免疫系统(CMIS)。

MALT 与其他全身淋巴组织相比有两个主要特征。首先是将组织与内腔分隔开的上皮层中含有一种特化型的与淋巴网状细胞紧密相连细胞称为 M 细胞，此上皮细胞网络合称为滤泡相关性上皮（FAE)；其次，MALT 分为上皮下区域（穹窿）、含 IgA 分泌性 B 细胞[表面(s)IgA$^+$ Bxleq]生发中心的 B 细胞区域，相邻的由 APC 和毛细血管后微静脉（HEV）形成的 T 细胞区域几个部分构成。未致敏、循环性 B 和 T 淋巴细胞通过 HEV 进入 MALT，然后抗原激活和记忆 B 和 T 细胞群通过淋巴管系统从感应部位游出，随血流而循环，回到黏膜效应部位（图 27.1）。这些效应部位含有更为分散的组织，而抗原特异性 T 和 B 淋巴细胞最终留下来发挥各自的作用[即分别为 CMI，细胞毒 T 淋巴细胞（CTL），调节功能或抗体合成作用]，保护黏膜表面免受侵害。

黏膜感应部位

胃肠道的黏膜感应部位包括派尔集合淋巴结、盲肠（阑尾）和孤立淋巴结，它们一起构成 GALT[8,9]，而扁桃体和腺样增殖体，或者 NALT，可能作为上行呼吸道和鼻腔/口腔的黏膜感应部位[6,7]。研究最多的黏膜感应组织是鼠胃肠道的派尔集合淋巴结，虽然近年来一些研究小组也对 NALT 进行了专门的研究，但比起 GALT 要少得多，以下将对它们的显著特征作一介绍。

肠相关淋巴网状组织

鼠派尔集合淋巴结在滤泡（有生发中心的 B 细胞区）下含有一个穹窿，以及 T 细胞富集的滤泡旁区（图 27.1），穹窿区布满特化的 FAE，10% ~ 20% 由 M 细胞组成，它们在淋巴网状细胞周围形成一薄薄的伸展层[10~15]。这些伸展层几乎分布于 B 和 T 淋巴细胞周围，有时也出现在巨噬细胞周围，形成一明显的口袋状物[10,14,15]。M 细胞具有短的微绒毛，小型胞质膜载体，几乎不含溶酶体，它们可熟练摄取和转运腔内抗原，包括蛋白质和颗粒物如病毒、细菌、小的寄生虫以及微球体[13~16]。此领域的研究者对 M 细胞是否能够加工和呈递抗原存有争议，一些人认为 M 细胞摄入抗原和跨细胞通道导致完整抗原进入下面的淋巴组织[13,15]。其他人认为，主要组织相容性复合物（MHC）Ⅱ类分子和酸性内体（endosomal）-溶酶体隔室中的 M 细胞表达提示 M 细胞也可能参与抗原加工和呈递过程[17]。胞吞抗原的本质可能影响 M 细胞水利化以及它们表达 MHC Ⅱ类分子的能力。M 细胞的分离和体外培养成为可能时，关于此特殊类型细胞是否具有加工和呈递抗原能力的争议才会有定论。

除了作为腔内抗原转运的方式，M 细胞也可为病原体提供进入的通路。鼠伤寒沙门菌的侵入株（毒力株）通过侵犯派尔集合淋巴结的 M 细胞启动鼠感染[18]。虽然 M 细胞也可转运腔内抗原，但鼠伤寒沙门菌的非侵入株不能穿透 M 细胞，因此是无毒力的。呼肠孤病毒也可通过 M 细胞启动小鼠感染[19]，此能力与呼肠孤病毒的 δ 蛋白有关[20]。通过鉴定与侵入或感染 M 细胞有关的细菌和病毒因素，为构建更为有效的减毒细菌、病毒载体或靶向 MALT 感应环境的黏膜疫苗提供了工具。此外，M 细胞也可能参与黏膜耐受性的诱导（如口服耐受性）。如果通过 MALT 的抗原沉积是诱导系统不反应性的基本条件，那么指向 M 细胞的抗原呈递载体包括活载体的优化有可能改变黏膜耐受性，提高免疫模式。

派尔集合淋巴结的穹窿下区由稀疏的浆细胞、B 和 T 淋巴细胞组成[9,15]，这提示抗原摄入后穹窿区内可立即进行抗原呈递。穹窿区内 T 和 B 细胞的相互作用也可能为派尔集合淋巴结提供必要的保护。巨噬细胞的存在[21]，包括 tingible body type，提示显著细胞凋亡的出现，但这点尚未得到证实。最近一个免疫组化研究对穹窿巨噬细胞是否为主要细胞类型提出的质疑[22]。这个重要的研究描述了穹窿内一种具有树突细胞（DC）特征的主要 APC 细胞群[22]，有趣的是，穹隆 DC 是 N418$^+$（抗 CD11c)，可与滤泡间区（T 细胞区）存在的更经典 DC 区别开来，表明派尔集合淋巴结的主要抗原取样区域内存在两种 DC 亚群[22]。此研究也表明小鼠 GALT 的穹窿区内出现较少量的 B220$^+$ B 细胞。最近人 M 细胞袋状物相关淋巴细胞群及腔内抗原被 T 和 B 淋巴细胞最先识别区域的研究，为特征性 T 细胞分布提供了证据。例如，人派尔集合淋巴结中 M 细胞袋状

物所含 CD3⁺ T淋巴细胞和 CD19⁺/CD20⁺ B淋巴细胞数目几乎相等,而 CD68⁺巨噬细胞较少[10]。此部位 T细胞中,约有 75%为辅助性 T(Th)细胞。

位于派尔集合淋巴结穹窿下面是突出的滤泡(B细胞区),所含生发中心可见明显的 B细胞分裂。这些生发中心是 sIgA⁺ B细胞主要存在部位[23-27],也是 B细胞向 IgA 转换和亲和成熟的部位。但是,与系统免疫淋巴结和脾不同的是,并不出现浆细胞的发育。

滤泡附近的 T细胞依赖性区域可见所有主要的 T细胞亚群(表 27.1)。滤泡旁 T细胞是成熟型的,这些 T细胞中 97%以上的 T细胞受体(TCR)是 αβ 杂二聚体形式,约 2/3 的派尔集合淋巴结 αβTCR⁺ T细胞为 CD4⁺,CD8⁻,显示 Th 细胞特性,包括支持 IgA 应答[28]。GALT 中约 1/3 的 αβ T细胞为 CD4⁻,CD8⁺;此细胞亚群包括 CTL 前体细胞[29,30],而其他 CD8⁺ T细胞亚群可能引起黏膜诱导的耐受。

鼻咽相关淋巴网状组织

虽然小鼠是研究派尔集合淋巴结的主要动物模型,人扁桃腺却是研究 NALT 最常见的次级淋巴组织,因此对其细胞组成已有相当了解。虽然上颚和鼻咽扁桃体(腺样增殖体)大面积分布的是鳞状上皮,通常不被视为黏膜组织,上颚扁桃腺通常含 10~20 个隐窝(crypt),这使它们的表面积增加(图 27.2)。这些隐窝的深部区域可能含有摄入所遇抗原的 M细胞(图 27.2)[15,31]。虽然上颚扁桃体隐窝中含有 M细胞这一观点尚未

912

被普遍接受,但有研究表明,染料和蛋白可穿透家兔和猪[32,33]该区域及表达房肽素(vimentin)和组织蛋白酶 E(cathepsin E) M样细胞,这些均与 GALT 的 M细胞有关[34,35]。虽然有证据表明存在 II 类阳性(HLA-DR⁺)上皮细胞的抗原呈递,但它们的确切作用并未定论。扁桃体含有 APC 各种主要类型的细胞,包括树突和郎格汉斯细胞,巨噬细胞,II 类阳性 B细胞和 B细胞生发中心内递呈抗原的滤泡树突状细胞(图 27.2)。体外用合适的疫苗如破伤风、白喉类毒素和分枝杆菌纯化的蛋白衍生物(PPD)再刺激后,扁桃体 APC 可诱导 T细胞增殖和细胞因子应答。

约有一半的扁桃体细胞是 B淋巴细胞,主要出现在含有生发中心的滤泡中。绝大多数人的扁桃体 B细胞实际上是 sIgG⁺;但是,也存在相当数目的 sIgM⁺和 sIgA⁺ B细胞。此外,B细胞母细胞/浆细胞的原位染色表明生发中心主要为 IgG 母细胞,而滤泡旁区内主要为浆细胞。IgG 和 IgA 的 Ig⁺细胞总比例为 65:30[36]。由于存在 B细胞转换为其他同种型细胞,特别是 IgG 亚型的现象,因此认为扁桃体仅为黏膜 IgA 的一个感应部位是不准确的。扁桃体细胞中约 40%为 T细胞,98%以上表达 αβTCR。此外,与外周血或鼠 GALT 相比,扁桃体中 CD4:CD8 比值较高(3:1)。总之,扁桃体不仅清楚地展示了黏膜感应部位的性质,而且展示了大量浆细胞的效应部位。鼻内免疫后扁桃体在宿主黏膜免疫中的作用目前尚未完全研究清楚。

为了了解 NALT 在吸入抗原诱导的 IgA 应答中的确切作用,最近人们正尝试从小鼠和大鼠的 NALT 中分离和鉴定淋巴样细胞[6,37~39]。在这些动物中,NALT 包括后鼻腔的腹侧由上皮下的 2 条无包膜淋巴样组织,横切面呈一钟形[40]。虽然在正常小鼠中的 NALT 中可观察到淋巴细胞的密集分布,但是生发中心却未见,而经鼻应用抗原后可诱导产生[39]。因此,在 NALT 分离的单核细胞中发现高比例(80%~85%)非代偿 B细胞(uncommitted B cell)(sIgM⁺),而只发现较少数目的 sIgA⁺和 IgG⁺ B细胞(分别为 3%~4%和 0%~1%)。[38]与 GALT 中出现高频率的 sIgA⁺ B细胞(10%~15%)不同的是,NALT 几乎不含 IgA 型 B细胞(IgA-committed B cells)。对分离的 NALT 单核细胞研究结果显示,这些细胞中大约有 30%~40%为 CD3⁺ T细胞,CD4:CD8 之比约为 3[38,39]。大部分 NALT CD3⁺ T细胞同时表达 CD45RB,可见是一类未致敏、处于静止状态的 T细胞[38,39]。鉴于转录的单个细胞分析表明信使 RNA(mRNA)同时表达 Th1 和 Th2 细胞因子,可认为 CD4⁺ T细胞主要为 Th0 型[39]。此外,通过 TCR-CD3 复合物的刺激可导致 Th1 和 Th2 型细胞的分化。这些结果支持了这样一个观点,即 NALT 具备黏膜感应部位的特征。

表 27.1　黏膜免疫系统相关的主要小鼠淋巴细胞亚群

黏膜部位	举例	淋巴细胞亚群	分布/%	可能的功能
		$CD3^+$ T 细胞	35~40	
		$CD4^+$，$CD8^-$	65	黏膜免疫的主要辅助性 T 细胞
		$CD4^-$，$CD8^+$	30	CTL 前体，调节性/无应答性
		$CD4^-$，$CD8^-$	2~4	表达 γδ TCR
感应组织	派尔集合淋巴结	初始未致敏细胞	30~40	黏膜系统内循环
		效应性（活化的）细胞	30~35	通过 M 细胞途径刺激
		记忆性细胞	30~40	归巢至效应部位
		$B220^+$ B 细胞	45~47	包括生发中心，>60%为 $sIgA^+$ B 细胞
		$sIgA^+$	8~10	定向于 IgA
		$CD3^+$ T 细胞	40~50	
		$CD4^+$，$CD8^-$	60~65	很难通过 TCR 激活
	固有层淋巴细胞	$CD4^-$，$CD8^+$	30~35	成熟的 CTL；其他亚群功能？
		$CD4^-$，$CD8^-$	2~5	表达 γδ TCR
		记忆性细胞	>90	
		$sIgA^+$ B 细胞	30~50	
		IgA 浆细胞	10~15	在哺乳动物免疫系统中含浆细胞最多
效应组织		$CD3^+$ T 细胞	85~95	
		$CD4^+$，$CD8^-$	5~8	均表达 αβTCR
	内皮淋巴细胞	$CD4^-$，$CD8^+$	75~80	2/3 为 CD8αα；80%为 $γδ^+$；50%为 $αβ^+$
		$CD4^+$，$CD8^+$	7~10	均表达 αβTCR
		$CD4^-$，$CD8^-$	5~8	均表达 γδTCR
		非 B 细胞/浆细胞		

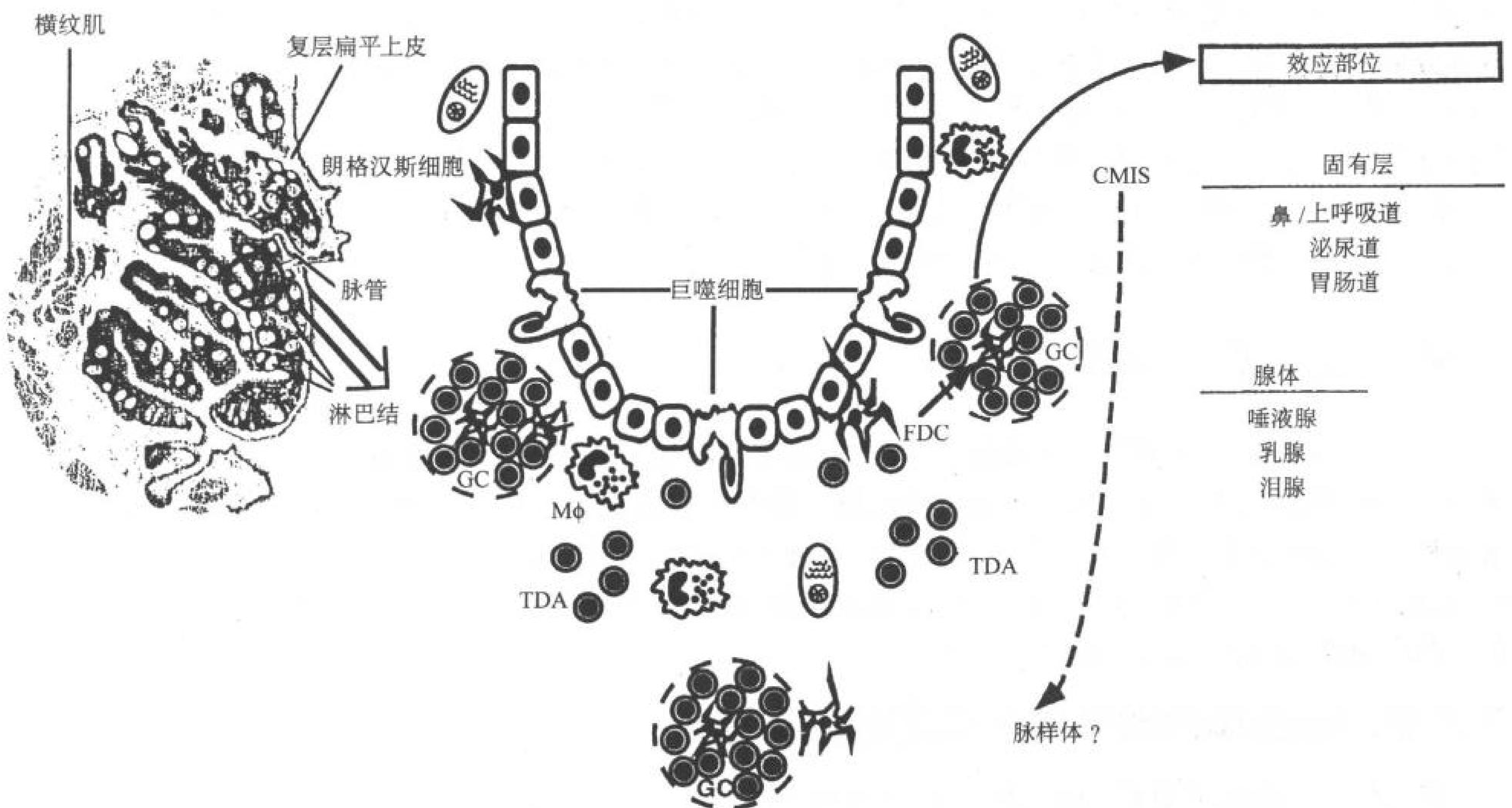


图 27.2　NALT 作为黏膜免疫发生的感应部位的潜在作用。腭扁桃体的深隐窝示意的是微解剖结构，所画部分显示了主要 APC（LC，朗格汉斯细胞，Mϕ，巨噬细胞），B 细胞生发中心和滤泡旁 T 细胞依赖区（TDA）。效应/记忆淋巴细胞通过 CMIS 出现归巢。

黏膜效应组织

在 MALT 中首次接触抗原后，黏膜淋巴细胞离开感应部位，回到黏膜效应组织。此途径，可同时诱导多

914

个黏膜部位的免疫，称为共同黏膜免疫系统（common mucosal limmune system，CMIS）（图 27.1）。黏膜免疫应答的效应部位包括 GI 固有层（LP）区域内的淋巴样细胞，上呼吸道和生殖道，以及分泌腺组织如乳腺、唾液腺和泪腺[9]。此外，绝大多数证据提示细胞驻留于上皮内［即内皮淋巴细胞（IEL）］，也作为效应细胞，但是，目前还很难精确定义 IEL 的功能[41]。抗原特异性黏膜效应细胞包括产生 IgA 的浆细胞以及 B 和 T 淋巴细胞。IgA 是参与保护黏膜表面的主要 Ig，在效应组织的局部生成[9]。并且，与抗原开始摄入的感应部位不同的是，在黏膜表面产生的抗原特异性分泌型（S）-IgA 抗体是 CMIS 的决定性证据。由此可见，NALT 或 GALT 免疫可诱导所有黏膜效应组织的黏膜免疫应答。

保护黏膜表面的效应机制包括 CTL，与 CMI 有关的 $CD4^+$ Th 细胞（Th1）以及与 S-IgA 抗体有关的 $CD4^+$ Th 细胞（Th2）应答[42~44]。的确，CTL 和 S-IgA 应答均与黏膜表面的抗感染保护作用有关，并且二者对于用病毒包括人免疫缺陷病毒（HIV）[45]感染黏膜的耐受性可能有更为重要的意义。虽然保护性 $CD4^+$ Th1-CMI 应答的有关情况尚未明了，但是黏膜 CMI 在耐受产生和细胞内病原体感染控制中可能起重要作用。

尽管如此，应当记住的是，作为阻挡无数环境外源性抗原和黏膜病原体屏障的效应部位，提供的保护机制与感应部位显著不同。高浓度 IgA 浆细胞（估计人小肠内分布的 IgA 浆细胞超过了 10^{10} 个/m[40]）一直被视为这些效应部位所提供免疫最为显著的特点，但是，可能同样重要，也许不重要的是大量 B 和 T 淋巴细胞的存在（如固有层淋巴细胞，LPL），其中 60％以上为 T 细胞。

当与环境抗原相遇时，上皮细胞将其吞入，某些情况下它们本身可表达Ⅱ类 MHC 分子，加工抗原，随后免疫原性肽与 MHC Ⅱ类分子结合[49]。研究已证明肠内腔上皮细胞间的上皮连接处朗格汉斯样细胞也可提供辅助功能[50]。当遇到可穿透上皮细胞间紧密连接的微生物及可溶性蛋白时，效应部位的 APC 可加工这些外来抗原，诱导 B 和 T 细胞应答。一些研究人员提出 MHC Ⅱ类阳性 $sIgA^+$ B 细胞可通过细胞内途径结合抗原，加工抗原并将肽呈递给 $CD4^+$ Th 细胞。LP 区域内的巨噬细胞也有此功能，加工和呈递更为复杂的抗原。新鲜分离的小鼠肠 LP $CD4^+$ T 细胞中除含分泌 γ 干扰素的 Th1 型细胞外，还含大量白细胞介素-5 分泌性 Th2 型细胞，提示黏膜免疫系统的效应区有些偏向生成 Th2 型细胞[51]。此外，最近鼠鼻腔来源 $CD4^+$ T 细胞的单细胞反转录酶聚合酶链式反应分析研究显示 $CD4^+$ T 细胞，高频率表达 Th2 细胞因子特异性 mRNA[39]。总之，黏膜效应组织包括所有必需的细胞成分，包括上皮细胞、Th1/Th2 型 $CD4^+$ T 细胞、CTL 和 IgA 生成细胞，共同组成防御无数环境外源性抗原和黏膜病原体的多层屏障。

黏膜免疫应答的调节

914

对蛋白类疫苗、病毒和细菌病原体、过敏原以及自身抗原的黏膜免疫、炎症或耐受的形成需要 T 细胞，包括 $CD4^+$ Th 细胞亚群、$CD8^+$ CTLs 以及诱导黏膜耐受的 T 细胞亚群。当然，B 细胞转换（$\mu \rightarrow \alpha$ 转换）和 B-/T-细胞相互作用导致浆细胞生成多聚 IgA（pIgA），这对于黏膜免疫来说是最重要的。由 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞亚群、经典 APC（如树突细胞，Mϕ 和 B 细胞）以及非经典 APC（如上皮细胞）产生的细胞因子参与免疫应答中的正常黏膜免疫、免疫耐受及炎症各个方面。

黏膜免疫系统中的调节性 T 细胞和细胞因子

调节性 T 细胞通常显示 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ 表现型，可划分为：①未致敏或未曾与抗原相遇的 T 细胞；② 活化（效应）T 细胞；③记忆 T 细胞。效应和记忆 T 细胞均参与免疫应答。这三种亚群细胞的黏膜迁移方式及 B 淋巴细胞的归巢一起形成了 CMIS 的细胞学基础。Th 的未致敏 $CD4^+$ 前体细胞（pTh）一般可识别 APC 上 MHC Ⅱ类相连的外源肽，表型为 $\alpha\beta$ TCR^+、$CD3^+$、$CD4^+$ 和 $CD8^-$。另一方面，前体 CTL（pCTL）表达 $\alpha\beta$ TCR，通

常可识别靶细胞上 MHC Ⅰ类结合的外源性肽,表型为 $CD3^+$,$CD4^-$,$CD8^+$。因此,遇到外源性抗原(肽)时效应 T 细胞发育成细胞介导或抗体应答的辅助(Th)型,或溶解所感染的靶细胞(CTL)。因此,MALT 可视作 pTh 和 pCTL 的重要贮库,细菌或病毒病原体的侵入将诱导 $CD4^+$ Th 细胞和 $CD8^+$ CTL 应答。

黏膜 $CD4^+$ T 辅助性细胞

Th1 和 Th2 亚群

由于 $CD4^+$ Th 细胞是在外源性抗原应答中成熟的细胞,它们具有一些特性,如不同细胞因子簇的生成。pTh 细胞激活后首先生成 IL-2,然后发育为 T 细胞,产生多种细胞因子(包括 IFN-γ 和 IL-4),此阶段通常定义为为 Th0 细胞[53,54]。环境和细胞因子谱对这些 Th0 细胞的进一步分化有很大影响(图 27.3),例如,特定病原体如细胞内细菌刺激将导致向 Th1 细胞的分化,产生 INF-γ,IL-2 以及肿瘤坏死因子-β(TNF-β)。这些细胞通常在摄取的细胞内病原体激活巨噬细胞,后者生成 IL-12 之后发育[55,56](图 27.3)。有足够证据表明分泌的 IL-12 可诱导自然杀伤(NK)细胞产生的 IFN-γ,与 IL-12 一起可刺激 Th0 沿 Th1 途径的分化(图 27.3)。此外,迟发型过敏反应(DTH)以及特征型 B 细胞应答方式均表明,鼠 Th1 型应答与 CMI 的发生有关,例如,IFN-γ 诱导 $\mu \rightarrow \gamma 2a$ 转换[59]以及 IgG2α 型抗体的生成。

915

另一方面,黏膜部位的外源性抗原可刺激 $CD4^+$,NK1.1$^+$ T 细胞[60-62]以及其他可产生 IL-4 的前体细胞启动 Th2 型应答(从 Th0 细胞)。$CD4^+$ Th2 型细胞也可生成 IL-4 以扩增此亚群细胞,以及 IL-5、IL-6、IL-9、IL-10 及 IL-13[63~65](图 27.3),其中可能还包括其他 Th2 细胞因子诱导产生的 IL-4,但是由于各细胞因子受不同信号转导途径的调节,因此并不是所有 Th1 或 Th2 细胞产生完全相同的细胞因子谱。Th2 细胞产生的 IL-4 有助于 B 细胞从 sIgM 表达向 IgG1 和 IgE 的转换[66~68]。此外,Th2 细胞亚群被认为是小鼠系统中支持 IgG1、IgG2b、IgE 以及 IgA 同种型产生的主要辅助表型细胞[44]。

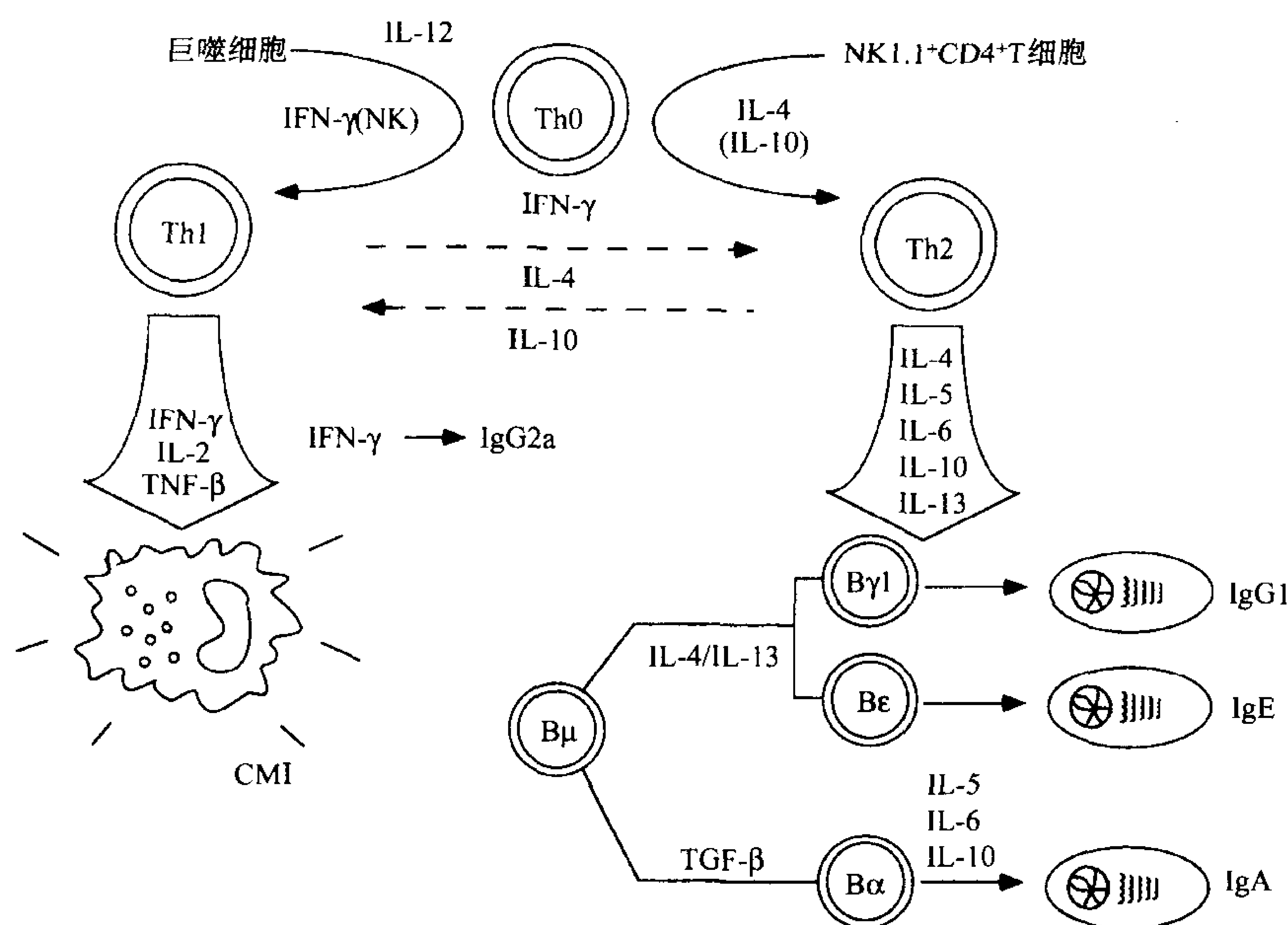


图 27.3 黏膜免疫系统中辅助性 T 细胞功能性亚群的概念。pTh(未致敏 T 细胞)在疫苗作用下所产生的 IL-2 可支持自分泌生长。抗原侵入后诱导 Th 细胞产生多种细胞因子,如 IFN-γ 和 IL-4(Th0 型细胞)。疫苗/微生物所处环境决定免疫的结果,如细胞内微生物被巨噬细胞摄取后,生成 IL-2,诱导 Th 细胞通过产生 IFN-γ、TNF-β 和 IL-2 引起有效 CMI 应答(Th1 细胞),其他疫苗/APC 途径可诱导 Th2 型应答,它们的细胞因子谱决定了 B 细胞辅助的性质,如 IL-4 有助于 IG1 和 IgE 应答,而 IL-5、IL-6 和 IL-10 诱导黏膜 IgA 应答。实线表示上调,点状虚线代表负向信号。

黏膜 Th 细胞克隆

抗原特异性派尔集合淋巴结 Th 细胞的克隆显示可辅助 $sIgA^+$ B 细胞增殖和分化为 IgA 分泌性浆细胞[69,70]。这些 Th 细胞克隆来自饲以绵羊红血球(SRBC)小鼠的派尔集合淋巴结,SRBC 特异性 Th 细胞克隆按所诱导的抗体应答类型进行分类。第一类支持 IgM,IgG1 和高水平抗 SRBC 应答 IgA,虽然这些研究早于 Th1 和 Th2 亚群的发现,但人们后来发现这些克隆具有 Th2 型细胞的特性;第二类克隆仅支持抗 SRBC 应答 IgA[70],可视为二级水平 Th2 型细胞(level 2 Th2-type cells)。对此最近有研究表明,重组鼠伤寒沙门菌口服免疫后,$CD4^+$ Th 细胞优先产生可提高 IgA 水平的细胞因子(如 IL-6 和 IL-10)[71]。与可产生全部 Th2 型细胞因子(IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10)的一级水平 $CD4^+$ T 细胞相对照。此 Th2 细胞亚群可被称为二级水平 Th2 型细胞。此外,一些研究显示派尔集合淋巴结 $CD4^+$ T 细胞可产生 IL-5、IL-6 以及 IFN-γ[52,72],这些细胞因子也可诱导 $sIgA^+$ B 细胞向 IgA 分泌型浆细胞的分化。最近研究已证实,小鼠口服免疫 SRBC 后所诱导的绝大多数派尔集合淋巴结 $CD4^+$ Th 克隆为 Th2 表型[73]。

IgA 生成的细胞因子调节

较早研究显示将树突细胞(DC)-T 细胞簇、T 细胞克隆或 T 细胞杂交瘤的培养上清加至派尔集合淋巴结或脾 B 细胞培养液中可导致 IgA 分泌水平的增高[74~77]。不久发现,导致此活性变化的原因之一是 IL-5 的作用[78~84]。从派尔集合淋巴结 B 细胞培养液中除去 $sIgA^+$ B 细胞可使 IgA 的合成中止,说明此细胞因子影响转换后 IgA 相关的 B 细胞[82]。非体外刺激是派尔集合淋巴结 B 细胞所必需的,IL-4 并不能进一步加强 IL-5 的作用[78]。如果采用脾 B 细胞,要提高 IgA 分泌水平需要先用 LPS 对这些细胞进行刺激。利用 LPS 刺激的脾 B 细胞,IL-2 或 IL-4 均可进一步提高 IL-5 对 IgA 分泌的促进作用。总之,这些结果提示 IL-5 可诱导 $sIgA^+$ B 细胞,后者可分化为 IgA 生成细胞。有趣的是,另一 B 细胞群,研究还表明,腹腔 B-1 细胞中含有 LP IgA 浆细胞的前体细胞[85],并含有可受 IL-5 刺激分泌 IgA 的细胞[86]。人 IL-5 被认为主要作为一种嗜酸性粒细胞分化因子起作用,因此对 B 细胞同种型的转换和分化作用甚微。但有报道指出,人 B 细胞当受到黏膜炎布兰汉氏球菌刺激后也可在 IL-5 诱导下分泌 IgA,可能进行向 IgA 的同种型转换[87]。采用其他更常规的 B 细胞丝分裂原不能证明这一作用,这一结果表明最初体外活化信号对于 B 细胞转换的重要性。

916

白细胞介素-6 在无体外刺激的情况下加至派尔集合淋巴结 B 细胞中,可引起 IgA 分泌的显著增加,而对 IgM 或 IgG 合成影响甚微[88]。在这些研究,IL-6 诱导的 IgA 分泌比 IL-5 要多 2~3 倍[88]。除去 $sIgA^+$ B 细胞,IL-6 的这一作用消除,说明与 IL-5 一样,此细胞因子也是作用于转换后的 B 细胞(postswitched B cells)。IL-6 基因失活 (IL-6 基因敲除,$IL\text{-}6^{-/-}$)小鼠黏膜用卵白蛋白或疫苗刺激所诱导的抗体应答水平显著降低,LP 中 IgA^+ B 细胞数目明显减少。虽然这些研究结果表明 IL-6 在体内对黏膜 IgA 应答的重要性[89],另有研究显示,$IL\text{-}6^{-/-}$ 小鼠 IgA 浆细胞呈正常的 LP 分布,对霍乱毒素(CT) 作为黏膜佐剂的蛋白抗原产生应答[90]。这些有争议的结果很难解释,但 $IL\text{-}6^{-/-}$ 小鼠可能诱导补体途径的激活 IgA 应答。与此有关的证据是人阑尾 $sIgA^+$ B 细胞表达 IL-6 受体,而其他 B 细胞群无此表达。此外,IL-6 诱导的阑尾 B 细胞在无任何体外激活条件时可分泌 IgA1 和 IgA2[91],此作用在 IgA 相关 B 细胞中也有表现,再一次说明 IL-6 在诱导 $sIgA^+$ B 细胞最终分化为 IgA 浆细胞中起重要作用。

另一 Th2 细胞因子 IL-10,也在诱导人 IgA 的合成中起重要作用[92~94],用抗 CD40 和金黄色葡萄球菌中性蛋白酶(SAC)刺激人 B 细胞可导致 IgA 缺陷患者的 B 细胞分化,引起 IgM 和 IgG 合成。在抗 CD40 和 SAC 刺激的 B 细胞培养液中加入 IL-10 可诱导 IgA 的生成[92]。来自其他免疫缺陷患者的 B 细胞培养在抗 CD40 和 IL-10 存在时也可诱导产生 IgM、IgG 及 IgA[93]。此外,未致敏 $sIgD^+$ B 细胞与 IL-10 和转化生长因子(TGF)-β 和抗 CD40 共培养后也可诱导生成 IgA[94]。总之,这些研究结果表明 Th2 细胞因子如 IL-5、IL-6 及 IL-10 均在 IgA 应答效应的诱导中发挥主要作用。

鉴于 pTh 或 Th1 型细胞产生的 IL-2 可提高 LPS 刺激的 B 细胞培养液中 IgA 的合成,因此很难得出以下结论,即 Th2 型细胞及它们衍生的细胞因子是 IgA 应答产生中惟一重要的细胞因子[79]。LPS 和 TGF-β 存在条件下,IL-2 也可协同增强 B 细胞培养液中 IgA 的合成[95]。虽然 IFN-γ 不直接参与 IgA B 细胞应答效应的增

强，此细胞因子可促进多聚 Ig 受体(pIgR)或分泌性成分(SC)的表达，后者为 S-IgA 转运所必需的分子[96]。IFN-γ 存在条件下，B 细胞通过表面 Ig 的活化成为 T 细胞有效的 APC[97]。此外，IFN-γ 也可提高 B7-2 分子的表达，后者是 Th2 型细胞诱导的一种重要共刺激分子[98]。总而言之，Th1 和 Th2 派生的细胞因子之间的最佳关系是黏膜相关组织中适当 IgA 应答诱导、调节和维持的基本条件。

Th 细胞亚型黏膜免疫的调节

如上所述，已有明显证据表明黏膜感应部位 $CD4^+$ Th 细胞及衍生克隆可支持 IgA 应答[69,70,94~101]。但是，还需要弄清楚的是黏膜呈递的抗原是否分为显著不同的 Th1 和 Th2 型应答。尽管如此，Th1 和 Th2 细胞对相反类型细胞的交叉调节敏感，例如，Th1 细胞产生的 IFN-γ 对 Th2 细胞增殖的抑制作用，是 IgM 向 IgG2a 发生同种型转换的原因[102]，而抑制 IL-4 诱导的同型转换[103,104]。Th2 细胞通过分泌 IL-10 对 Th1 细胞的作用进行调节，从而抑制 Th1 细胞分泌细胞因子(如抑制 IFN-γ 的分泌)，进而降低 IFN-γ 对 Th2 细胞的抑制作用。所以，确定抗原特异性细胞因子分泌的类型以及抗原特异性 IgG 亚类与 IgE 和 IgA 应答，对于弄清楚黏膜抗原诱导的免疫应答有重大意义。

最新研究表明，蛋白抗原疫苗(如破伤风类毒素，tefanus toxoid，TT)与黏膜佐剂霍乱毒素(choleratoxin，CT)联合口服免疫，导致 GALT 和脾中蛋白特异性 $CD4^+$ T 细胞的诱导，优先生成 IL-4 和 IL-5，而无 IFN-γ 或 IL-2 的生成[105]。此免疫方案也可诱导血清 IgG 应答，特点为高 IgG1 滴度，低水平或检测不到的 IgG2a 抗体[106]，而抗原特异性 IgE 应答水平的增高。同时给予其他抗原如卵白蛋白(avalbumin，OVA)或鸡卵白溶菌酶(hen egg white lysoiyme，HEL)与 CT，用相似的黏膜免疫程序得到相似的实验结果。可溶性蛋白与佐剂 CT 一起口服免疫可能诱导的是 Th2 型应答。其他研究者也发现，C3H/He、SWR/J 及 DBA/1 小鼠 3 周内口服免疫两次，剂量为 200μg 可溶性蛋白 HEL 和 5～10mg CT，可诱导抗原特异性 IgG(主要为 IgG1)、IgA 和 IgE 应答[107]。此外，小鼠口服免疫全身给予 HEL 由于高水平抗原特异性 IgE，可导致致死性过敏反应[107]。C57BL/6 小鼠间隔 10 天 3 次用钥孔血蓝素(keyhole limpet hemocyanin，KLH)和 CT(0.5μg)、B 亚单位的 CT(CT-B)(10μg)进行口服免疫，导致派尔集合淋巴结和 LPL 群产生低水平 IL-2，IFN-γ 和高水平的 IL-4 和 IL-5[108]。此研究结果支持以下结论，即口服免疫可溶性抗原和佐剂 CT 可诱导 Th2 型免疫应答。

除了 CT，来自产肠毒素的大肠杆菌热不稳定毒素(heat-labile toxin，LT)也是一种有效免疫原和佐剂，可诱导和调节抗原特异性 IgA 应答[109,110]。LT 口服免疫可诱导抗原特异性血清 IgG 以及黏膜 IgA 应答的诱导[111]，LT 特异性 IgG 亚型应答显示为高水平 IgG1、IgG2a 和 IgG2b，与 CT 诱导的 IgG 亚型(主要为 IgG1，无 IgG2a)相反，此外，LT 口服免疫后与 CT 相比，显示较低水平的 IgE 应答[111]。口服给予 LT 或 CT 所诱导的抗原特异性应答的同种型和亚型类型，虽然 LT 和 CT 表现为对血清 IgG 亚型和 IgE 应答诱导的不同，但 2 种细菌肠毒素均诱导黏膜 IgA 应答。黏膜免疫小鼠的派尔集合淋巴结和脾的 LT 特异性 $CD4^+$ T 细胞中检测到大量 IFN-γ 和 IL-5，而 IL-4 很少。与 CT 显著不同的是，LT 可诱导 Th1 和 Th2 型应答。LT 特异性 Th1 型细胞诱导的黏膜免疫生成的 IFN-γ 可导致二级水平 Th2 型细胞的诱导，包括提高 IgA 的细胞因子 IL-5 的产生，而无 IL-4 的生成。由此可见，LT 可作为黏膜免疫中 Th1 和 Th2 型应答的黏膜佐剂，而 CT 可视为鼠 Th2 诱导的选择性佐剂。这些研究结果提示，黏膜免疫中可通过肠毒素如 CT 和 LT 的使用，控制 Th1 或 Th2 型应答。

参与 IgA 同型转换的 T 细胞和细胞因子

$CD4^+$ T 细胞和某些细胞因子对于 IgA 生成细胞的产生是必需的。例如，通过单克隆抗体(mAb)耗竭(排除)$CD4^+$ T 细胞亚群，或者通过基因敲除 CD4 共受体基因可显著影响黏膜免疫应答[99~101]。$CD4^+$ T 细胞缺失与 IgA 浆细胞水平的降低[100]及 Th 细胞调节的 IgA 应答缺陷[99]有关。B 细胞同型转换和基因重排将在本书其他章节讨论(参见第 5 和第 6 章)。本章重点说明 T 细胞及其特异性细胞因子在 IgA 转换中的作用。细胞因子对 B 细胞的 sIgM 和 sIgD 表达向下游转换中具有重要作用，包括 IgG 亚型、IgE 和 IgA。IL-6 和其他细胞因子对于 B 细胞的最终分化(terminal differentiation)，浆细胞继续高速率分泌 IgA 抗体可能是必需的[86,88]。许多人假设 IgA 同型转换(即从 μ→α)发生在黏膜感应部位如 GALT，而且 B 细胞最终分化成浆细胞并产生

917

IgA 是效应部位的主要事件,但是目前只有间接证据能够支持这些假设。就这一点而言,绝大多数 $\mu\rightarrow\alpha$ 转换的研究是用非黏膜淋巴样细胞如脾 B 细胞进行的,而体外研究 B 细胞分化和 IgA 合成通常是用派尔集合淋巴结 B 细胞(黏膜感应部位),都是为了要说明此转换也出现在效应黏膜部位如 LP 和外分泌腺。此外,细胞因子敲除小鼠已用于确定特定细胞因子与黏膜免疫的相关性,这正是以下要讨论的方法。

T 细胞 $\mu\rightarrow\alpha$ 转换

研究表明,来自鼠 GALT 的 T 细胞克隆与非定型 $sIgM^+$ B 细胞混合可诱导 B 细胞表达 sIgA 的同型转换[112,113]。最初研究鼠 T 细胞开关(T switch, Tsw)细胞使用的 T 细胞克隆来源于丝裂原的刺激和 IL-2 的维持增殖,当 Tsw 细胞加至 $sIgM^+$ 中,导致 $sIgA^-$ B 培养液中 $sIgA^+$ 细胞的显著增多[112]。派尔集合淋巴结与富含 $sIgA^+$ B 细胞培养液一起孵育,Tsw 细胞也不会诱导 IgA 的合成,但是加入 B 细胞生长和分化因子则可诱导 IgA 分泌[113]。其他实验表明,Tsw 具有自身反应活性,提示派尔集合淋巴结内肠腔抗原的继续摄入将导致 T/B 细胞相互作用的特殊微环境,以及随后出现的 IgA 应答[114]。此结果表明,Tsw 和 B 细胞之间的协同作用是 IgA 型转换诱导的基本条件。

最近研究显示,T/B 细胞相互作用有助于 B 细胞转换,推测生发中心 B 细胞上的 CD40 受体与活化 T 细胞上的 CD40L 可能起主要作用[115~117]。抗原存在条件下,B 细胞可通过可变区基因的体细胞突变改变抗体受体的亲和力和功能,伴随细胞因子如 IL-4(IgG1 和 IgE)和 TGF-β(IgA)引导的重链(同型)转换。此外,B 细胞所处环境可能与此转换有关[118]。与此有密切关系的是有效 APC,DC 的研究,它驻留于穹窿区以及派尔集合淋巴结的 T 细胞区,也可影响 IgA 的转换。例如,活化 T 细胞和派尔集合淋巴结 DC 与纯化的 $sIgM^+$、$sIgA^-$ B 细胞一起培养引起大量 IgA 的合成,而脾源性 DC-T 细胞混合物显然没有这么有效[74]。另有研究表明,来自派尔集合淋巴结的 DC-T 细胞混合物也可诱导前 B 细胞系向 IgA 的同型转换,而脾源性 DC-T 细胞混合物则无效[119]。虽然这些研究提示 DC 是促进 B 细胞向 IgA 转换的主要细胞类型,但仍存在这样的可能性,即派尔集合淋巴结 DC-T 细胞混合物可能并不利于感染 B 细胞生成 IgA,因此仍需要更确凿证据说明 DC 直接参与 B 细胞向 IgA 的转换。

Tsw 细胞在人 IgA 应答中的证据来自对一个 RAC 患者恶性 T 细胞(T_{RAC}细胞)的早期研究,此患者患有蕈样肉芽肿病/Sezary 样综合征。T_{RAC}细胞可诱导扁桃体 $sIgM^+$ B 细胞转换和分泌 IgG 和 IgA[120]。另外,T_{RAC}细胞加入 IgM 高度免疫缺陷患者的 B 细胞培养液中,可诱导 8/9 的培养物分泌 IgG,3/9 产生 IgA[75]。来自人阑尾(盲肠)的 T 细胞克隆及其培养上清显示其优先辅助 IgA 的合成[76]。直接的证据包括 $CD3^+$、$CD4^+$ 和 $CD8^-$ T 细胞克隆所诱导的 $\mu\rightarrow\alpha$ B 细胞转换以及 $sIgA^+$ B 细胞最终分化为生成 IgA 的浆细胞[76]。

细胞因子诱导的 IgA 转换

同型转换与各自 C_H 基因 5′端回文(tandem)重复 DNA 序列(开关或 S 区)之间的重组有关(第 6 章)。转换是不可逆的 DNA 敲除过程,上游和下游 S 区之间的重组形成一个含有删除间隔 C_H 基因的 DNA 环。除了由 Tsw 细胞诱导的 IgA 同型转换,同型转换也可由细胞因子与丝裂原如 LPS 或以上提及的生理性 T 细胞-CD40L 与 B 细胞-CD40 相互作用所提供的激活信号的共同诱导。两个研究最多的转换细胞因子一个是 IL-4,可诱导 LPS 刺激的小鼠脾 B 细胞 IgG1 和 IgE 的转换[121,122],另一个是 TGF-β,可诱导以下将详细讨论的 $\mu\rightarrow\alpha$ 转换。①在细胞因子诱导的转换前存在一些确切的事件包括 5′侧翼区 DNA 的联甲基化,DNA 酶的高敏性及非重排重链基因的转录。②胚系转录子与 B 细胞将发生的免疫球蛋白同种型转变相对应。在 LPS 刺激脾 B 细胞表达 IgG1 或 IgE 之前,IL-4 将诱导 $C_\gamma1$ 和 C_ε 胚系转录子的产生。IFN-γ 也显示出能诱导胚系 $C_{\gamma2a}$转录子的产生和培养的小鼠脾 B 细胞中发生的 IgG2a 同型转换[102]。胚系转录从目标 C_H 基因上游所谓 I 区外显子的 5′端开始,包括所有翻译可读框中的终止密码子。因此,得到的转录子是不育的。③已确定外显子Ⅰ表达所有的同种型和亚类,而且它的删除,例如,在外显子Ⅰ敲除小鼠中,通常导致所有同种型或亚类的转换受损[123~126]。在 IgA 的转换中观察到一个明显的例外。④用一不相关的人类基因取代外显子 Iα 组成基因转录的方向并不损害 B 细胞向 IgA 的转换[127]。这些研究排除了外显子在控制转换重组中的直接作用,但是,研

究发现，I_α 基因靶向敲除小鼠中组成型进行 C_α 基因座的转录，与其他Ⅰ区基因敲除小鼠不同[123~126]。看来，细胞因子诱导的胚系转录子本身的转录可能指导细胞因子调节的同型转换[128]。

迄今为止的绝大多数研究提示，TGF-β 是 B 细胞向 IgA 转换的主要细胞因子[129-134]，最初的研究显示，TGF-β 加至 LPS 刺激的小鼠脾 B 细胞培养液中导致 IgA 的转换，IL-2[129] 或 IL-5[84] 可显著提高 IgA 的合成。TGF-β 对 $sIgM^+$，$sIgA^-$ B 细胞的作用并不是来自终端 B 细胞分化的选择性诱导。有研究表明，TGF-β 可诱导不育性 C_α 胚系转录子的产生[130,131]，这过程明显早于 B 细胞 IgA 的真正转换。有趣的是，TNF-β 显然无法诱导 Iα 缺陷小鼠进行 IgA 的同型转换，但由于 C_α 基因座的组成型活化，而 LPS 单独已足以诱导 $\mu \to \alpha$ 的 B 细胞转换[127]。随后的研究显示，TGF-β 诱导的人类 B 细胞转换为 IgA1 或 IgA2，这显然早于 $C_\alpha1$ 和 $C_\alpha2$ 胚系转录子的形成[132,133]。因此可以假定 TGF-β 可诱导正常生理条件下的 $\mu \to \alpha$ 转换，这是因为通过 CD40 $sIgM^+$，$sIgD^+$ B 细胞激发的在 TGF-β 诱导下转换为 IgA，IL-10 存在条件下分泌 IgA[94,135]。

要强调的是至今为止的所有有关 TGF-β 诱导转换的研究均是在 B 细胞培养液中用有丝分裂原或通过共受体信号刺激的[129-135]。这些研究显示，仅有 2% ~ 5% 的 B 细胞真正转换为 IgA，这很难解释派尔集合淋巴结生发中心通常出现的高概率转换（> 60%）。在最近的一个研究系统中提到，用抗 CD40 和抗葡聚糖激发的 B 细胞，均可分别模拟 T 细胞依赖和非 T 细胞依赖性刺激。研究还显示，TGF-β、IL-4 与 IL-5 一起可诱导 $sIgA^+$ B 细胞群达 15% ~ 20%[136]。虽然人们可预测 TGF-β 基因敲除将导致对 IgA 免疫系统的负面影响，但是 TGF-β 基因敲除小鼠出生后 3 ~ 5 周后不幸死于广泛性淋巴增殖性疾病，因此很难利用此模型研究 TGF-β 在体内对 IgA 的调节作用。最近 TGF-敲除小鼠用 rapamycin 处理可防止肺病和死亡的发生，这可能使得用此独特小鼠品系分析 B 细胞转换成为现实[137]。

共同受体在黏膜免疫的淋巴细胞活化中的重要作用

B 和 T 细胞抗原受体决定了免疫应答的特异性，B 细胞抗原受体为膜性 Ig，与抗原表位结合后发生交联，进而将抗原内在化。此信号可导致激活、过敏或死亡（通过细胞凋亡）。目前认为 sIg（抗体）受体与 Igα 和 Igβ 蛋白形成的蛋白复合物有关。这些蛋白所含的胞质结构域与激酶结合，引起信号转导[138]。同样，T 淋巴细胞表达异二聚体受体，αβ 或 γδ，并与 CD3 蛋白复合物相连。对于 αβT 细胞，MHC II 类或 I 类外源肽复合物分别与 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T 细胞特异性相互作用，导致部分由 CD3 相关肽的胞质区域介导的信号转导途径[139-140]。两种情形下，B 细胞 Ig 受体或 T 细胞 αβ TCR 的作用不足以诱导细胞激活、分裂（增殖）或最终分化。仅有第一信号（抗原特异性）的传递将导致 T 或 B 细胞无反应性，而共刺激分子和相应配体提供的第二信号可导致细胞的激活。因此，B 和 T 淋巴细胞活化的双信号模型提示抗原特异性和共刺激信号均是必需的条件[141]。

T 淋巴细胞的共刺激作用

研究最多的 T 细胞生长共激活信号是由未致敏 T 细胞上表达的一种共刺激受体 CD28 传递的[142~145]。此受体可识别 APC 上两种相似共配体之一，B7-1（CD80）或 B7-2（CD86）[146~151]。通过 CD28 受体与 αβTCR-CD3 信号的协同作用的刺激和信号转导，可导致 pTh 细胞生成 IL-2 和随即发生的细胞分裂。相关共刺激分子 CTLA-4 也可与 B7-1 结合。最初认为它是活化 $CD8^+$ CTL 所特有的分子，虽然 CTLA-4 与 B7-1 的亲和力大于 CD28，但它的表达水平要比 CD28 低得多[152]。例如，与 CD28 不同的是，CTLA-4 不表达于未致敏 $CD4^+$ Th 细胞上，在活化 T 细胞上的表达水平仅为 CD28 的 2% ~ 3%[152]。已有证据表明，CTLA-4 的表达与衰减有关，此分子可能在下调 T 细胞应答中发挥重要作用[153]。

全身和黏膜感应部位 T 细胞滤泡旁区内的树突细胞被认为是诱导未致敏 T 细胞成为抗体应答效应性或记忆性 T 细胞的初始 APC[154,155]。虽然 DC 组成型表达 B7-1 并表达少量 B7-2，细胞因子如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF），却可放大两类受体的表达[156]。IFN-γ 能激活表达 B7-2 的人单核细胞并导致 B7-1 分子表达的上调[147,157]，而小鼠 IFN-γ 可增强 B7-2 的表达，降低 B7-1 分子的表达[158]。最后要指出的是，B 细

胞也是有效的 APC，IL-4 处理显著上调 B 细胞表面 B7-1 和 B7-2 的表达[159]，而 IFN-γ 通过 Ig 受体提高 B 细胞上 B7-2 分子的表达[97]。

919

不少研究表明，T 细胞分化为 Th1 和 Th2 亚群可能来自 APC 所表达的 B7-1 或 B7-2 共同受体第二信号的差异，不同类型 APC 可选择性刺激 Th1 或 Th2 应答[160~164]。但是，另有研究显示，相同 APC 可同等程度影响两类应答[165]。显然，CD28 与 T 细胞活化及表达 IL-2 和 IL-4 有关[166,167]，虽然抗 CD28 可抑制 IL-2 和 IFN-γ(Th1)的产生，但对 IL-4(Th2)生成无影响[168]。最近研究也表明，B7-1 和 B7-2 在 Th1 或 Th2 型细胞分化中所发挥的作用不同[98]。利用蛋白脂质诱导的小鼠实验性自身免疫性脑膜炎(EAE)模型进行的研究显示，用抗 B7-1 抗体预处理可诱导 Th2 型细胞的产生，防止 EAE；另一方面，用抗 B7-2 可诱导 Th1 型细胞的产生，加重 EAE 自身免疫的程度[98]，因此，下结论说 B7-1 和 B7-2 在 Th1 和 Th2 型亚群共刺激作用中功能相同还为时过早。直接确定黏膜感应部位 APC 上 B7-1 和 B7-2 的是否有差异对黏膜抗原 Th1 和 Th2 型应答的调节非常重要。

也有研究直接评价 B7-1 和 B7-2 表达对转染 APC 的影响，以确定其在 T 细胞活化和细胞因子生成中的可能作用[169]。有趣的是，B7-1 和 B7-2 在 $CD4^+$ Th1 和 Th2 型应答以及 $CD8^+$ T 细胞生成细胞因子中均提供第二信号[169]。利用 B7-1 缺陷小鼠的研究表明，B7-1 和 B7-2 均可通过 CD28 激发 T 细胞活化，但显示正常的免疫功能，可能由 CD28-B7-2 的相互作用介导[148,149]。

当将这些信息应用到黏膜免疫系统时，人们可以看到由细胞因子和相应受体，以及共刺激分子及其配体构成的一个动态的、复杂调节的黏膜细胞相互作用。黏膜相关组织中存在(驻留)IFN-γ 生成性 Th1 型和 IL-5、IL-6 生成性 Th2 型 $CD4^+$ T 细胞，但是，后一 T 细胞亚群直接参与 IgA B 细胞应答的诱导。Th1 型细胞生成的 IFN-γ 可能是 APC 活化黏膜 DC、M 细胞和 $sIgA^+$ B 细胞，诱导 B7-1 或 B7-2 及其他共刺激分子的表达所必需的细胞因子。CD28-B7-2 相互作用若偏向 Th2 型应答的诱导[98]，黏膜 Th1 型细胞分泌 IFN-γ 的作用也参与其中。例如，IFN-γ 可诱导 APC B7-2 表达，从而导致 Th2 型应答的一系列信号转导途径。因此，黏膜 $CD4^+$ T 细胞和 APC 之间通过 TCR-CD3 复合物和 MHC Ⅱ类限制的肽抗原以及 CD28 和 B7-1－B7-2 信号相互识别所引起的信号传导，可能导致 IgA 增强型 Th2 细胞因子如 IL-5、IL-6 和 IL-10 的诱导。此情形可导致黏膜效应组织中 IgA 生成细胞的优先产生。

最近研究开始转向黏膜免疫应答中 APC-T 细胞共刺激的有关问题，例如，研究显示 CTLA4-Ig 的一突变株选择性与 B7-1 结合，可改变鼻内递送卵白蛋白(OVA)所诱导的气管嗜酸性粒细胞增多症的结局[170]。用突变的 CTLA-4 阻断 B7-1－CD28 可显著减轻气管炎症，这可能是由于对炎性 Th1 型应答的抑制作用，但并不影响全身性嗜酸性粒细胞增多 eosinophilia 和 IgE 应答，后者受 IL-4 和 IL-5(Th2 细胞)调节[170]。可能 B7-1－B7-2 和 CD28 的表达水平决定着应答的结果[171~173]。因此，低信号表达可选择性提高 Th1 型炎症反应，而“强”信号表达，例如 CT，优先诱导 Th2 型应答[171,173]。可见，黏膜给予 CT 和 LT 可提供提高 APC 上 B7-1 或 B7-2 表达增高的刺激信号，导致以上所述的黏膜 $CD4^+$ Th 细胞所诱导的选择性 Th1 或 Th2 细胞因子的表达。

B 淋巴细胞的共刺激作用

B 细胞活化的另一重要受体 CD40，是 TNF 受体超家族的一种含 277 个氨基酸的糖蛋白[174]。CD40 的受体称为 CD40 配体(CD40L)，它是一种含 261 个氨基酸的糖蛋白，表达于活化的 T 细胞(以及其他类型的细胞)上，被认为是指导 T/B 细胞相互作用的主要决定因素[174]。最有趣的是，CD40 通过表达 CD40L 细胞的交联，或通过与 Fc 受体结合抗 CD40 抗体可诱导 B 细胞分裂，在其他细胞因子如 IL-4 的作用下，导致长期 B 细胞克隆的生成[175~178]。此模型已被用于连续 B 细胞克隆生长的分析，因为以前惟一可得到的人 B 细胞株为肿瘤或 EB 病毒(Epstein-Barr virus)转化的细胞[175]。此新进展推动了抗原应答可能导致生发中心形成的有关事件的研究[175]。例如，静息 B 细胞通过 CD40 激活，进入细胞周期和表达 CD23、MHC Ⅱ类分子和 B7-1[175]。向此系统中加入 IL-4 可导致具有记忆性表型 B 细胞的生成，以及持续的 B 细胞分裂[175]。此克隆性 B 细胞生长的新型系统自然导致 B 细胞同型转换的研究，包括上述的向 IgA 的转换。虽然目前尚不知 Tsw 细胞是否为 Th1 或 Th2 型细胞的一个家族，但黏膜 T 细胞和 $sIgM^+$ B 细胞通过 CD40L 和 CD40，以及通过包括 TGF-β

(以及 IL-10?)在内细胞因子构成的 2 个信号的交换,可能是 IgA 同型转换诱导的基本条件。

黏膜 CTL 的诱导与调节

黏膜体系中,天然感染是由侵入肠道(如轮状病毒或呼肠孤病毒)或呼吸道(如流感呼吸道合胞体病毒,RSV) 病毒性病原体所致内源性病毒肽的加工,从而诱导 pCTL 变成效应性(激活)和记忆性 CTL。绝大多数病毒特异性 CTL 为 $CD8^+$、αβ TCR^+、病毒肽的识别与被感染细胞的 MHC I 类分子呈递有关[179,180]。就此而言,大量 $CD8^+$ IEL 作为 IEL 的一个亚群驻留在黏膜上皮中[41,181]。这些 $CD8^+$ IEL 代表了一个重要的细胞毒群体,它们可清除病毒感染的上皮细胞。当新鲜分离的 IEL 用直接细胞毒性试验检测时发现这些 T 淋巴细胞具有溶细胞活性[182~184]。

有关 APC 在 pCTL 诱导中的作用及穿孔素[185,186]介导或 Fas-FasL 配基[187]杀伤靶细胞的机制的研究领域都取得了重要进展,仍有许多问题待解决包括 MHC II 类限制性 $CD4^+$ Th1 型(和 Th2 型)细胞在 pCTL 分化为效应性和记忆性 CTL 调节中的重要性[180]。本节简要综述黏膜 CTL 诱导和调节领域的重要进展,因为它与病毒感染有关。应当指出的是,对细胞内细菌、肿瘤相关抗原和某些黏膜寄生虫感染的宿主应答具有相同的过程。虽然此节着重讨论 $CD8^+$ CTL,细胞介导和抗体介导的细胞毒性和 NK 细胞活性是与 IEL 有关的主要应答[181,188~193]。

920

显然存在的问题的是,当包含 PCTL 的黏膜感应部位与效应部位完全分开如激活 $CD8^+$ CTL 的受感染的上皮细胞,其免疫应答如何启动。免疫应答如何启动,部分解释是 M 细胞具有黏膜病毒的特异性受体,最好的例子是呼肠孤病毒(reovirus)。通过生成 δ 蛋白[194],呼肠孤病毒进入 NALT 和 GALT 的 M 细胞[196,197]。虽然还不很清楚,但很有可能其他肠病毒如轮状病毒(rotavirus)和呼吸道病原体如流感和 RSV,也可通过 M 细胞进入黏膜感应途径[194,195]。此外,已得到公认的是,病毒进入 GI 道导致派尔集合淋巴结中 pCTL 被诱导的频率增高[198,199]。例如,呼肠孤病毒位于 T 细胞区域,显然与 $CD8^+$ pCTL 和记忆 B 细胞应答增加有关[200]。大鼠口服痘苗病毒导致派尔集合淋巴结和肠系膜淋巴结(mesenteric lymph nodes, MLN)中病毒特异性 CTL 的诱导[201],这些结果提示,肠感染或免疫接种后,抗原刺激的 CTL 通过淋巴管从派尔集合淋巴结散播至肠系膜淋巴结[201]。此外,病毒特异性 CTL 也分别在呼肠孤病毒或轮状病毒黏膜免疫小鼠的 LPL、IEL 和脾细胞中发现[198,199,202]。虽然黏膜效应组织如肠上皮除了含 αβ T 细胞外,还含大量 γδ T 细胞,IEL 中病毒特异性 CTL 与后一 T 细胞亚群有关[203]。这些研究提示,口服活病毒可诱导黏膜感应和效应组织以及系统淋巴组织的抗原特异性 CTL。鼠系统对于分析黏膜病毒所用途径以及抗感染免疫效应 CTL 的重要性均是非常重要的。值得注意的是,CTL 并不是单独起作用的,黏膜抗体应答在免疫中也具有重要作用,但是,这里主要讨论的是黏膜 CTL 的诱导和功能。

肠病毒和黏膜 CTL

动力学研究显示,GALT 内呼肠孤病毒诱导的 pCTL 会迁移到全身腔室中[204,205]。此类归巢出现于特定的效应腔室中,包括小肠的上皮内。因此,呼肠孤病毒特异性 $CD8^+$ CTL 存在于 IEL 间,与 αβ T 细胞群有关[205]。明确证据还显示,口服给予呼肠孤病毒可使 GALT 内诱导的 pCTL 增加,然后在 3 周分布于鼠的整个淋巴系统内[199],此外,研究还表明,效应 CTL 可提供 suckling 小鼠模型中抗胃炎的保护性作用[206]。在一系列旨在确定呼肠孤病毒免疫中宿主决定因素的实验显示,$CD8^+$ T 细胞介导 SCID 小鼠体内呼肠孤病毒感染的清除[207~209]。进一步证实 S-IgA 抗体和 $CD8^+$ CTL 在呼肠孤病毒免疫中至关重要的作用[210]。证据还表明,上皮细胞 pIgA 诱导的细胞内中和作用是免疫效应的重要因素[210],以下将讨论 pIgA 的功能[210]。

呼吸道病毒和黏膜 CTL

流感病毒经鼻感染后免疫应答的详尽研究表明,病毒的清除涉及多种免疫途径。在此模型中,用 $CD4^-$ 共受体敲除或去除此细胞亚群,结果并不影响 pCTL 的诱导或显著改变感染的清除[211]。研究还显示,采用缺

乏 $CD8^+$ T细胞的小鼠[β_2 微球蛋白(β_2m)敲除小鼠]或给予抗 CD8 mAb 并不会改变流感的清除。这些结果支持存在多种免疫途径的说法,提示 $CD4^+$ Th 细胞途径对于黏膜抗体应答和 $CD8^+$ CTLs 对于呼吸道免疫均非常重要[212]。在此模型中,因为出现清除作用,感染部位的 γδ T细胞和 V_δ 特异性增加,提示抗病毒免疫中 γδ T细胞的相关调节作用[213]。

一些研究证实,效应性 CTL 可保护小鼠促受 RSV 的感染。在其中一个实验中,RSV F 决定簇,一个22kDa 糖蛋白显示可诱导保护性 CTL[214,215]。一独立的系统研究中,鼠 RSV 模型被用于决定 $CD4^+$ T细胞包括 Th1 和 Th2 亚群在导致炎症或免疫方面的相对重要性。这些正在进行的研究显然表明,$CD4^+$ IFNγ 生成性 Th1 细胞以及 $CD8^+$ T细胞与康复有关,而 $CD4^+$ Th2 型细胞与此无关[216,217]。有趣的是,用灭活的 RSV 或 F 糖蛋白致敏可诱导 $CD4^+$ Th2 细胞,而活的 RSV 引起 Th1 途径[216,217]。在研发抗病毒感染的黏膜疫苗时,这些结果提示 Th1 型(包括 CTL 的诱导)和 Th2 型免疫应答的结果可能受所接种的病毒抗原的性质和形式所调节。

CTL 应答的黏膜 AIDS 模型

现已清楚 80%以上新 的 HIV-1 感染来自性传播途径,目前大量研究致力于泌尿生殖道的黏膜免疫。免疫缺陷病毒(SIV)的恒河猴(*Rhesus macaques*)阴道感染模型,在雌性生殖道对 SIV 免疫性的研究中极为有用[218~220]。此模型的最新研究提供了 pCTL 出现于雌性猴生殖组织及 SIV 感染诱导 CTL 应答的直接证据[221]。此重要发现最近扩展到含 HIV-1 89.6 env 基因 SIV/HIV-1 嵌合病毒(SHIV)所诱导的阴道感染[222]。有趣的是,在外周血中观察到所有感染此呼肠孤病毒致病性 SHIV 的猴子对毒力株 SIV 和功能性、gag 特异性 CTL 的激发具有抵制作用(resisted)[222]。虽然应指出此过程中也可诱导阴道抗体,但这些结果明显提示黏膜 CTL 应答在抗 HIV 感染中的重要作用。有关应用肽疫苗诱导抗病毒 CTL 应答不在本章讨论范畴之内,但是,最近研究显示,SIV/HIV 组分经鼻免疫,可诱导阴道分泌物中的抗体应答[223]。有趣的是,小鼠用 HIV-1 T细胞表位和黏膜佐剂 CT 一起经鼻免疫,可诱导脾和颈淋巴结内功能性 CTL 的生成[224]。此证据提示,SIV/HIV 组分可诱导黏膜 CTL,继而引起全身和黏膜免疫。

921

其他黏膜 CTL 系统

最近研究显示不仅病毒感染,重组沙门氏菌(*Salmonella*)[225]或鼠弓形虫(*Toxoplasma gondii*)[226,227]也可诱导 $CD8^+$ T细胞,包括对所表达蛋白的 CTL 应答。初始 $CD8^+$ T细胞如何被诱导增殖为 pCTL 的有关机制,以及显示感染的实际黏膜腔中效应性 CTL 的表达和记忆的规则等仍是未解决的重要问题。黏膜效应部位的 pCTL 虽然应当发生应答,但只有黏膜上皮细胞被感染才出现。在这种情形下,APC-$CD4^+$ T细胞对 pCTL 诱导的调节将是独立于黏膜效应 $CD8^+$ T细胞产生以外的事件。在这方面,pCTL 在免疫优势部位的聚积并不表现细胞毒功能,直到遇到感染的、呈递 MHC I类分子的靶细胞时才出现[228]。也许此机制保护共同黏膜免疫系统而不出现有害的细胞毒炎症反应。

黏膜 IgA 及其转运

黏膜 IgA1 和 IgA2 合成

人 IgA 分为 2 个亚型——IgA1 和 IgA2,它们在血清和各种外分泌物中的分布不同[9,42,44,46]。例如,90%~95%血清 IgA 为 IgA1 亚型,并且绝大多数以单体形式(monomeric)存在。另一方面,各种腺分泌物含 50%~70%IgA1 和 30%~50%IgA2,后一亚型在外分泌物中占较高比例。α1 和 α2 H 链大小均约为 60kDa,有 1 个 V_H 和 3 个 C_H 区,但功能差别显著(第 3 章)。例如,α2 的铰链区第 13 位氨基酸缺失,而在所有 360 个氨基酸序列中,α1 和 α2 的区别仅在第 20 位氨基酸的不同。有趣的是,IgA2 铰链的不寻常结构使该分子对蛋白水解酶具有高度的耐受性[9,42]。另一方面,一些细菌病原体产生的蛋白酶可选择性将 IgA1 切割为 Fab 和 Fc 片

段[9,42]。通常,IgA1蛋白酶的切割位点在IgA1铰链区的脯氨酸-苏氨酸或脯氨酸-丝氨酸之间的肽键,IgA1蛋白酶的潜在重要性已有综述[9,42]。

IgA1和IgA2浆细胞的特征性排列出现在黏膜效应部位,例如,呼吸道相关组织中富含IgA1生成细胞,例如鼻腔黏膜约含90%~95%IgA1,而泪腺含80%IgA1和20%IgA2浆细胞[46]。相反,GI的LP中IgA2浆细胞数目较多,大肠中60%以上为IgA2生成细胞[46]。

假定扁桃体为NALT的代表组织,人阑尾(appendix)为GALT的代表组织,那么感应组织即为IgA1或IgA2应答前体藏匿的部位。例如,扁桃体B细胞产生的IgA 95%以上为IgA1亚型,与扁桃腺为鼻咽内IgA1⁺ B细胞前体可能存在部位的观点相一致[91];同样地,GALT的代表人阑尾虽然含IgA1⁺和IgA2⁺ B细胞,但IL-6在培养的阑尾B细胞中诱导较高水平的IgA2[91],提示GALT是IgA前体B细胞的主要来源,也是小肠和大肠为IgA2亚型稍占优势的效应部位。

上呼吸道和胃肠道覆盖的上皮组织大多数由柱状上皮细胞构成,不断地由更低分化程度的隐窝(crypt)细胞更新而来,上皮细胞不仅提供了物理屏障,而且可生成多种糖蛋白、肽和受体,它们在黏膜免疫中具有重要意义[229~231]。与IEL、肥大细胞及其他类型细胞一起,它们形成一个保护黏膜的内部网络。邻近杯状细胞引起天然黏膜免疫,所生成的不同黏液素(黏蛋白)覆盖于上皮表面[130,224,229,230]。一个重要的例外是覆盖于MALT的淋巴上皮,稀疏的杯状上皮细胞和黏液素生成的缺乏被认为可易化M细胞的抗原摄取过程[231]。

多聚IgA和IgM转运

黏膜免疫应答中上皮细胞的主要功能是将黏膜和腺组织产生的多聚IgA(pIgA)主动转运至黏膜表面。负责将pIgA转运到黏膜分泌物中去的分子是多聚Ig受体(pIgR)[232~234]。黏膜免疫应答的主要证据是外分泌物中Ag特异性S-IgA抗体的存在,如上所述,S-IgA在人体中以S-IgA1和S-IgA2亚型两种形式存在,前者主要分布于上呼吸道和上GI道中,而后者主要分布于下回肠和大肠内[9,235]。外分泌腺LP和acrinar区内的浆细胞产生的pIgA与15.6kDa肽J链相连[9,236],最初认为J链与细胞内mIgA或mIgM的多聚化有关[237],但是,最新研究提示,缺乏J链时出现IgM的异常多聚体[238]。此外,J链敲除小鼠的外分泌物中显示有IgA,但是,在此小鼠中仅见单体IgA(mIgA)的转运[239,240]。总之,以上结果提示,J链为pIgA和IgM正确五聚体形成所必需[236-240]。

如上所述,胃肠(GI)道和上呼吸道(URT)腺体和基底外侧部隐窝内的上皮细胞可产生全长为100kDa的pIgR,后者与上皮细胞的非浆膜表面相连[241]。穿胞过程中,pIgR与pIgA之间形成二硫键,随着pIgR 20kDa组分的切割和胞吐作用,出现S-IgA的分泌,整个过程在不到1小时内完成[9,241](图27.1)。pIgR的二硫键结合部分称为分泌元件(secretory component,SC)可稳定S-IgA,提高该分子对蛋白水解消化作用的抵抗力[9,241]。此转运过程高效,一个正常成人仅GI道每天产生的S-IgA就可达2.8~3.0g。

922

特殊免疫房室——黏膜上皮

上皮细胞的附属作用

除了将pIgA从黏膜效应组织转运至黏膜分泌物中的作用外,黏膜上皮细胞在黏膜免疫应答和全身无应答(黏膜诱导耐受)的诱导中也起有效作用。一系列研究表明,肠上皮细胞系所产生的细胞因子,表达的细胞因子受体及黏附分子可能影响黏膜免疫应答的诱导[242,256]。大鼠肠上皮细胞系IEC-6可生成IL-6,后者为sIgA⁺ B细胞产生IgA浆细胞过程中的重要细胞因子,用TGF-β处理IEC-6细胞可提高IL-6的产量[88,91,242],而IGF-β可与IL-1β协同作用促进IL-6的分泌[243]。黏膜佐剂CT也可与TGF-β、IL-1β和TNF-α协同作用增高IL-6的生成量[245]。总之,这些结果提示,肠上皮细胞所产生的细胞因子可能在黏膜免疫应答和肠炎症的诱导和维持中起作用。

上皮细胞系在阐明致病菌黏膜感染后所致炎性细胞因子和趋化因子应答的机制中也非常有用,在对刺

激如大肠杆菌和沙门氏菌的应答中，上皮细胞产生 IL-6[246-248] 和 IL-8[249,250]。其他革兰氏阴性菌及胃上皮和细胞系的幽门螺旋杆菌感染也可引起 IL-8 的生成[251,252]。除了诱导 IL-6 和 IL-8 的产生，沙门氏菌还可在感染/刺激后导致上皮细胞典型的炎性细胞因子谱[253]。衣原体感染后可产生相似的细胞因子谱，但它生成较晚，且取决于培养细胞的感染[254]。总之，这些研究提示上皮细胞在炎症过程和免疫诱导中均扮演主要角色，它们可产生抗炎性和免疫调节细胞因子途径。

细胞因子、受体及 APC 对上皮细胞的影响

人肠上皮细胞产生细胞因子能力的研究表明，细胞系和新鲜分离的人肠上皮细胞均可生成 IL-8[255,256]，细胞系还表达 IL-1α、IL-1β、IL-10 和 TNF-α，但无 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6 或 IFN-γ 的表达[255]。其他实验显示，黏附于 T84 人结肠上皮细胞系的鼠伤寒沙门氏菌可诱导 IL-8 的生成[257]，与中性粒细胞经上皮迁移增加有关，尽管这一过程似乎并不受 IL-8 调控[257]。

除了生成细胞因子，肠上皮细胞系还表达 APC 与淋巴细胞相互作用所必需的黏附分子。细胞内粘附分子(ICAM)-1 和淋巴功能相关抗原(LFA)-3 在人肠上皮细胞系内均呈低水平表达，但细胞接触炎性细胞因子 IFN-γ、TNF-α、IL-1β 及 IL-6 后，ICAM-1 的表达增加[258]。此现象支持了以下结果：大鼠肠上皮细胞能够将加工过的抗原呈递给抗原特异性 CD4$^+$ T 细胞[259]。总之，肠上皮细胞产生细胞因子如 IL-1、IL-6 和 IL-8，表达黏附分子 ICAM-1 和 LFA-3，以及可呈递抗原给致敏 T 淋巴细胞的这些结果提示，肠上皮细胞可以在黏膜效应部位的黏膜免疫应答中发挥重要作用。此外，上皮细胞可能在黏膜诱导耐受中某些形式的 T 细胞变态反应中起到 APC 的作用。

内皮 T 淋巴细胞：上皮的主要细胞成分

作为宿主及其环境之间的重要界面，黏膜上皮除含有上皮细胞外，还含有大量的 IEL[41,181,260]。顾名思义(由 IEL 这一名词可见)，这些淋巴细胞驻留在覆盖 GI 道、鼻腔和生殖道的上皮细胞基底外侧的表面。据估计，每 4～6 个上皮细胞中可发现 1 个 IEL[261,262]，因此，大量淋巴细胞，绝大多数 T 细胞($>90\%$)，包括 αβ 和 γδ 两种类型的细胞，均位于黏膜上皮中，它们不断暴露于黏膜侵入性抗原。如上所述，IEL 的一个亚群(即 CD4$^-$、CD8$^+$ T 细胞)具有细胞毒功能，可能在细胞介导的抗病毒和抗细胞内细菌感染的免疫防御中起重要作用。此外，内皮 T 淋巴细胞可作为体液免疫应答的调节性 T 细胞(如 Th1/Th2 细胞因子的生成)，包括 IgA 的生成[52,263,264]。更新证据提示，内皮 T 细胞通过细胞因子和相应受体信号途径与内皮细胞的通讯，确保反调节以维持适当的免疫内环境稳定[265,266]。这些结果有力提示 IEL 对于黏膜免疫应答诱导和调节的重要性。

IEL 的起源与发育

内皮 T 淋巴细胞亚群的异质性及其发育过程的性质反映出胸腺 T 细胞的特性，胸腺上皮与 GI 道上皮具有相同的胚胎内胚层起源，它们均是 T 细胞选择的重要细胞元件，与驻留于次级淋巴组织 T 细胞(如脾和外周淋巴结)不同的是，IEL 基于 CD4 和 CD8 的表达可分为 4 个亚群：CD4$^+$、CD8$^-$ 和 CD4$^-$、CD8$^+$ 单阳性 T 细胞；CD4$^+$、CD8$^+$ 双阳性(DP)T 细胞和 CD4$^-$、CD8$^-$ 双阴性细胞(DN)T 细胞[52,267,268]。IEL 与胸腺中 T 细胞的平行关系的另一证据是 CD8$^+$ T 细胞发育过程中均形成同型二聚体(αα)和异型二聚体(αβ)链。根据这些结果推测，ααCD8$^+$ 和 αβCD8$^+$ T 细胞分别代表了胸腺外和胸腺内 IEL T 细胞的发育[270]。此外，胸腺在 IEL 生成中

923

的作用仍存有争议。尽是研究提示一些 IEL T 细胞可在局部发育而不受胸腺的影响，但其他研究提供的证据却表明，内皮 αβT 细胞，包括 ααCD8$^+$ T 细胞起源于胸腺[272,273]。用 MHC 匹配裸鼠的骨髓重建胸腺切除小鼠和胸腺未切除但 RAG-2 缺陷小鼠的骨髓。研究发现，胸腺正常的小鼠产生正常数目的 IEL，表型与普通小鼠中观察到的相似[271]，而胸腺切除小鼠 IEL 数目却减少。此外，胸腺切除小鼠的隔室中无 CD4$^+$ 和 αβCD8$^+$ T 细胞，而存在 ααCD8$^+$ T 细胞[271]。在似乎支持内皮 αβT 细胞，包括 CD8$^+$ T 细胞及 ααCD8$^+$ T 细胞起源于胸腺的研究中，胸腺切除嵌合体小鼠和胸腺正常小鼠一样，具有相似数目的 ααCD8$^+$ 和 αβCD8$^+$ T 细胞[273]。此外，

这些胸腺切除、辐照的嵌合体中所有 αβT 细胞亚群数目正常，有丝分裂原或 T 细胞衍生细胞因子激活后 ααCD8⁺ T 细胞可由胸腺内的前体细胞产生[276,277]。由于这些关于胸腺在 IEL 生成中作用的差异很难自圆其说(reconcile)，有人提出内皮 γδ T 细胞可能在原位生成[269,272]，在失天胸腺缺陷裸鼠和胸腺切除辐射嵌合小鼠中均发现了这些 γδ T 细胞[269,272]。需要指出的是，上皮中发现大量 γδ T 细胞(40% ~ 50%)[41,278,279]，而 LP 区下面仅发现少量的 γδ T 细胞。

内皮 T 淋巴细胞的特性

当初始和静息 T 细胞在黏膜组织的自然环境中首次遇到抗原时，可被刺激发展为效应细胞(如 Th1 和 Th2)，或记忆性 T 细胞。黏膜免疫系统自然环境中的 T 细胞持续接触大量吸入或经黏膜摄入的抗原，而淋巴组织中全身性 T 细胞在解剖学上与直接和持续负荷环境抗原隔离。这种持续的抗原接触可以帮助解释一些免疫学特殊类型内皮 T 细胞的发育。例如，内皮和脾 T 细胞对 T 细胞有丝分裂原及抗 TCR 和抗 CD3 抗体直接激活信号，表现出不同反应性[280,281]。可以预测，脾 T 细胞培养液对这些刺激的反应显示为 DNA 复制增加(增殖)显著，而 IEL 无反应。但是，从鼠肠上皮中高度纯化的 αβ 和 γδT 细胞可通过 TCR-CD3 复合物对这些刺激信号产生应答[282]。邻近上皮细胞可提供原位内皮 T 细胞下调信号，以避免黏膜上皮中 T 细胞高反应区的形成。细胞周期分析支持了这一观点，结果表明内皮 αβ 和 γδT 细胞多数处于 G_0 和 G_1 期[283]。这些结果揭示尽管持续暴露于黏膜摄入抗原，绝大多数 IEL 仍处于静止期。但是，RNA 水平包括 Th1 和 Th2 特异性 mRNA 检测时发现，αβ 和 γδT 细胞的一个亚群表达 mRNA 水平高于脾 T 细胞[283,284]。此外，IEL 比脾中 Th1 和 Th2 细胞因子生成性 T 细胞数目要多[52,283]。

TCR-CD3 复合体的形成可用来解释内皮 T 细胞的独特性，ζ 链基因缺陷小鼠的研究发现，内皮和系统性 T 细胞腔隙之间存在一些有趣的差别[285~288]，由于 ζ 链的表达需要适当的细胞内装配、转运和 TCR-CD3 复合体的膜表达，此基因的移除将导致 TCR-CD3 复合体的显著减少及外周 T 细胞池的缩减(为野生型、对照小鼠的 10%)[258,288]。形成鲜明对照的是，内皮 αβT 细胞及脾 T 细胞上的 TCR-CD3 复合体表达几乎未受 ζ 链缺失的影响[285,288]。内皮和外周 T 细胞上 TCR-CD3 复合体的大量生化特性研究显示，ζ 链缺失条件下，前一亚群可表达与 FcεRγ 同型二聚体有关的 TCR-CD3 复合体，而后一 T 细胞亚群中 TCR-CD3 复合体表达性细胞减少[258,287,289]。此外，内皮细胞，特别是 γδT 细胞优先选择 FcRγ 链作为其 CD3 复合体的一部分[289]。这些结果提示内皮 T 细胞与外周 T 细胞在 TCR-CD3 复合体装配上的不同，这些差别可能影响它们对激活信号的应答能力。

内皮 T 淋巴细胞的功能

IEL 可能为黏膜上皮自然环境中效应 T 细胞的主要来源，这些效应细胞形成抗黏膜微生物系转位和抵抗微生物病原体侵入的第一道防御屏障。这方面的研究显示，内皮 CD8⁺ T 细胞具有溶细胞活性，这是 MHC I 类分子限制性病毒特异性 CTL 生成的先决条件。除了 IEL 的抗病毒活性外，一些肠内皮 T 细胞亚群在抗细菌病原体肠内感染的局部宿主防御中起重要作用[290~292]。在单核细胞增生利斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)感染过程中，CD8⁺，αβT 细胞诱导的 IFNγ 和靶细胞溶解在病原体清除中起决定性作用[293]。研究还表明，CD4⁺ αβ 和 γδT 细胞也在利斯特氏菌全身激发后的最佳保护中起作用[293]。口服接种此胞内细菌，肠内利斯特氏菌可诱导上皮内 IFN-γ 生成性 T 细胞的产生[290]，另一研究显示，IFNγ 生成性 T 细胞的诱导与 $β_2$m 存在与否无关，后者为 MHC Ia 链及 MHC I 类样分子包括 CD1 和 TL 表达的必需基因[291]。在此研究中，口服李斯特氏菌的 β2m 缺陷小鼠中检测到 IFN-γ 生成性 T 细胞。此结果进一步提示除了传统 αβCD8⁺ T 细胞外，生物学功能性 ααCD8⁺ T 细胞包括 αβ 和 γδT 细胞均参与拮抗此菌的免疫防御反应。这些 T 细胞的发育不依赖于 $β_2$m[291]，因为 ααCD8⁺ T 细胞而不是 αβCD8⁺ T 细胞存在于 $β_2m^{-/-}$ 小鼠中[294]。总之，这些结果表明内皮 T 细胞可作为效应细胞，参与抗菌和抗病毒黏膜感染的应答。

内皮 T 淋巴细胞亚群可作为调节细胞，诱导和调节黏膜免疫应答。因此，来源于肠内 IEL 中的 αβ 和 γδT

 细胞能够产生 Th1 和 Th2 细胞因子[52,264,283,295]。除了 IFN-γ 外，αβT 细胞的 $CD4^+$，$CD8^-$ 和 $CD4^+$，$CD8^+$（DP）T 细胞亚群均可有效生成 Th2 型、IgA 增强性细胞因子，辅助 B 细胞应答[264,295]。这些辅助性细胞因子可由这两个 IEL 亚群的 T 细胞自动产生。IEL 亚群的纯化细胞均可诱导 Ig 生成性细胞，包括与派尔集合淋巴结 B 细胞共培养时生成的那些 IgA 同种型[295]。当口服免疫 T 细胞依赖性抗原（如绵羊红细胞）的小鼠中 IEL 中的 $CD4^+$、$CD8^-$ 和 DP T 细胞与 B 细胞和附属细胞一起孵育时，两种 T 细胞亚群均支持抗原特异性 IgM、IgG 和 IgA 抗体应答[264]。这些结果表明，内皮 αβT 细胞，特别是 $CD4^+$ T 细胞在黏膜免疫应答中可提供辅助功能。

IEL 的独特之处在于它们不仅由 αβT 细胞构成，而且包括大量的 γδT 细胞，它们可能是黏膜腔隙的 IgA 应答的诱导和调节中的重要调节性 T 细胞[284,296]。黏膜诱导耐受的存在（如口服耐受）条件下，这些黏膜 γδT 细胞为主要的调节性 T 细胞以维持黏膜效应部位 Th2 细胞因子依赖的、抗原特异性 IgA 应答，阻断全身性应答[296]。此外，γδT 细胞缺失的 $TCRδ^{-/-}$ 小鼠分析研究显示，黏膜相关组织比对照小鼠（$TCRδ^{+/+}$ 小鼠）的 IgA 生成性细胞数目减少更显著[297]。当一重组黏膜疫苗 TT 和佐剂 CT 一起经口腔免疫 $TCRδ^{-/-}$ 小鼠和 $TCRδ^{+/+}$ 小鼠时，γδT 细胞缺陷小鼠的抗原特异性 IgA 应答水平要低于对照组。

除了这些上调功能外，γδT 细胞在黏膜诱导的免疫应答中也提供下调信号，因此，γδT 细胞可降低反复经呼吸道给予 OVA 时所诱导的小鼠和大鼠抗原特异性 IgE 应答[298,299]。此外，半抗原特异性 γδT 细胞也可抑制 IFN-γ 生成性 $CD4^+$ αβT 细胞对接触过敏性形成的影响[300]。总之，这些 intriguing 结果提示，黏膜 γδT 细胞的双重调节功能所提供的 $CD4^+$ αβT 细胞的刺激和抑制信号取决于抗原特异性免疫应答的同种型。

黏膜内网络：黏膜免疫中的上皮细胞与 T 细胞的相互作用

黏膜组织中的上皮细胞和内皮 T 细胞形成交互的细胞和分子网络以诱导和形成免疫学屏障来对抗吸入和摄入的抗原（包括致敏原、食物产物和微生物）。T 细胞衍生的细胞因子，包括 IFN-γ、IL-4 和 TNF-α 可影响上皮细胞功能如 pIgR 的生成[301,302]。这些细胞因子可由黏膜上皮中的 αβ 和 γδ T 细胞产生[263,264,295]。研究表明，内皮 γδT 细胞可通过角质生长因子的生成抑制上皮细胞的生长[303]。对 γδT 细胞缺陷小鼠的 TCRδ 基因敲除的研究，表明内皮 T 细胞在上皮生长中的重要作用。γδT 细胞缺陷小鼠中，$TCRδ^{-/-}$ 小鼠的小肠绒毛上皮细胞逆转，MHC II 类分子表达水平均低于对照小鼠[304]。这些结果提示内皮 γδT 细胞为上皮细胞的生长和功能提供了必要的细胞因子。

调节作用是双向的，因为上皮细胞也可影响 γδT 细胞的发育及功能。干细胞因子（SCF）或其受体 *c-kit*（分别为 $S1/S1^d$ 和 w/w^v）缺陷小鼠的研究发现，两种突变鼠中外周 T 细胞表现正常，而 IEL 显著受影响[305]。例如，S1/S1d 和 w/wv 小鼠的内皮 γδT 细胞数目明显减少。由于 SCF 和 *c-kit* 分别为上皮细胞和 IEL 的产物，从上皮细胞到肠 γδT 细胞的这一细胞因子信号途径为黏膜 γδT 细胞生长的基本条件。此外，SCF 和 *c-kit* 网络对于霍乱弧菌诱导的肠液分泌也是非常重要的[306]。利用一个肠结扎物模型，与同窝对照相比，$S1/S1^d$ 和 w/w^v 小鼠均显示对 CTL 激发的肠液生成显著减少，进一步研究表明，SCF 与其受体相互作用在沙门氏菌感染中具有重要意义[307]，人和鼠肠上皮细胞系在接触沙门氏菌后均显示高水平 SCF mRNA 的表达，而 *c-kit* 突变株与对照小鼠经口服鼠伤寒沙门氏菌激发时，w/w^v 小鼠比同窝对照鼠对感染的敏感性增高，这些结果说明，SCF 和 *c-kit* 之间的相互作用在黏膜上皮的第一道防御中发挥不可缺少的作用。

除了 SCF-c-kit 级联反应外，IL-7 及其受体（IL-7R）之间相互作用的细胞因子信号途径，也在内皮 γδT 细胞的发育和活化中起重要作用，人和鼠肠上皮细胞均表达 IL-7 特异的 mRNA[266,308]。肠 γδT 细胞的分析显示相应受体表达于 γδT 的一个亚群细胞上[266]，因此，肠 γδT 细胞与重组 IL-7 共孵育导致 T 细胞活化和增殖应答[266]，通过 IL-7 及 IL-7R 途径提供的刺激信号（上皮细胞和 γδT 细胞）也可诱导 IL-2R 在 γδT 细胞上的表达。此外，IL-2 提供的协同激活信号可进一步活化 γδT 细胞，IL-7 和 IL-7R 基因敲除小鼠（$IL\text{-}7^{-/-}$ 和 $IL\text{-}7R^{-/-}$）提供一种独特的直接证明此途径在 γδT 细胞发育中重要性的有力手段，IL-7 基因敲除导致肠 γδT 细胞的减少[309~311]，而 IL-7R 删除可完全去除这些细胞[309,311]，这些结果支持以下观点，即上皮细胞衍生的 IL-7 是邻近 $IL\text{-}7R^+$ γδT 细胞发育和活化所必需的细胞因子。因此，上皮细胞和内皮 T 细胞在黏膜网络的形成中扮演主

要角色,可通过细胞因子与相应受体相互作用进行交互调节。

黏膜归巢与常见的黏膜免疫系统

对淋巴细胞迁移研究兴趣始于对 CMIS 细胞学基础的早期实验[8,315,316],由此掀起对淋巴细胞归巢的研究热潮。早期研究显示从派尔集合淋巴结和 draining mesenteric 淋巴结开始迁移的 B 淋巴细胞 predisposition,最终进入胃肠道的 LP 区[312~314]。这些研究清楚地表明,GALT B 细胞具有向黏膜效应部位迁移的 propensity,包括 GI 道的 LP 及乳腺、唾液腺和 lacrimal glands[8,315-319],此节简要总结了对 CMIS 的 GLAT 部分的重要研究进展,但除了对重要 NALT 淋巴细胞至黏膜效应组织的迁移外,目前已知的仍很少。淋巴细胞归巢可分为以下几步:淋巴细胞黏附至 HEV,次级黏附(捕获),细胞迁移至 HEV endothelial 细胞连接处,穿越 HEV,趋化游至淋巴样组织隔室内。这些步骤中涉及介导这些事件的受体和配体的表达,详细情况不在本章讨论范畴内[320~324]。本章仅讨论黏膜感应和效应部位,特别是 GI 道内,HEV 和 HEV 样结构上所展示的黏膜淋巴细胞归巢受体及其配体对象独特表达谱。

925

胃肠道内的淋巴细胞归巢

黏膜免疫系统和外周免疫系统一样,对环境的应答能力也经历了一个进化的过程,其中便是对病原体的防御应答。此应答主要取决于抗原刺激后功能性淋巴细胞源源不断由感应部位转移至效应部位即器官化的淋巴样组织(如 GALT 和 NALT)。重要的是,所有天然淋巴细胞保持对黏膜抗原的应答,活化的细胞及记忆性细胞迁移至抗原接触/病原体损伤出现的效应区域。为了能够行使这些功能,淋巴细胞表达一系列归巢受体,HEV 内皮细胞表达交互配体(称为地址素)[320~324]。黏附分子为淋巴细胞归巢受体及内皮细胞定址素的主要成分。黏附分子/归巢受体或黏附分子/地址素表达的特定排列,决定它们发挥作用的免疫学定位(隔室)。此节着重阐述 GI 道内黏膜免疫隔室及其与外周免疫隔室的不同。此领域的研究讨论 GI 道中淋巴细胞归巢时似乎它与黏膜归巢同义,其实显然它不过是黏膜免疫的一个元件。

925

内皮细胞上选择性表达的地址素包括 P 和 L 选择素(分别称为 CD62P 和 CD62L),以及糖脂配体,简称为外周淋巴结和黏膜血管地址素,或分别为花生凝集素地址素(addressin)(PNAd)和黏膜地址素细胞黏附分子-1(Mad-CAM-1)[325~329](图 27.4B)。此外,ICAM-1 和 ICAM-2 地址素通过与淋巴细胞上 LFA 的相互作用而起效,后者也是归巢受体(图 27.4B)。虽然淋巴细胞表达一系列归巢受体,其中某些受体,包括选择素 β1 和 β7 整合素(integrin,整联蛋白),在黏膜与外周淋巴细胞上表达的不同。例如,虽然 L 选择素是 PNAd 主要的一种归巢受体,因此在外周淋巴结(PLN)归巢起重要作用(图 27.4B),但它在黏膜归巢中也起作用[325,326]。

整合素代表一大类分子,特征表现为 α 和 β 链异二聚体结构。两条链是黏膜淋巴细胞归巢中必要的决定子,例如,α4 链可与 β1 和 β7 配对[324,330]。α4β1 的配体为 VCAM-1(和纤维粘连蛋白),表达于炎症部位(炎性病灶)[331,332]。α4 与 β7 的配对为淋巴细胞归巢至派尔集合淋巴结 HEV 上和 GI 道 LP 内表达的 MAdCAM-1 过程中存在的主要整合素形式[333]。一些研究现已确立 α4β7 MAdCAM-1 为主要的黏膜归巢受体配体。例如,抗 α4 单克隆抗体可防止淋巴细胞与派尔集合淋巴结 HEV 在体外[333]、大鼠[334]和小鼠[335]体内的结合。此外,体内结合也被 β7 的单克隆抗体和 α4β7 联合表位同等程度地抑制,但不受 β1 的单克隆抗体的影响[335]。这些结果清楚地说明 α4β7 为主要的黏膜归巢受体,派尔集合淋巴结和 LP HEV 上的 MAdCAM-1 为它们的地址素(配体)。

淋巴细胞归巢是 CMIS 的基础

研究表明胃肠外接种导致对疫苗抗体应答的外周血 B 细胞的短暂增加,口服免疫诱导相似的抗原特异性抗体形成细胞(antibody-forming cell,AFC)的短暂增多[337,338]。原认为外周血 B 细胞归巢至系统淋巴样组织以发育为浆细胞[336],但最新研究对它们也转移至 GI 道黏膜效应部位提供了有力证据。在此研究中,口服霍

乱疫苗引起血中短暂 IgA AFC,随后十二指肠组织中出现 IgA 抗霍乱毒素 AFC[339]。其他研究直接评定了黏膜(α4β7)和外周(α4β1)归巢受体在正常人外周血 T 和 B 细胞亚群上的急性表达[340]。有趣的是,αEβ7⁺ T 细胞表达大量 α4β7 并与 MAdCAM-1 结合良好,清楚地表明它们存在于外周单核细胞中,此外,B 细胞可分为 α4β7 和 α4β1 两个亚群,分别与 MAdCAM-1 和 PNAd 亲和结合,提示 B 和 T 细胞亚群均存在于血循环,迁移至黏膜感应或效应部位[340]。

最近一项研究中,无毒力活疫苗伤寒沙门氏菌 Ty21A 通过胃肠外和口服途径进行免疫,比较了循环性 B 细胞中 AFC 的水平[341]。外周白细胞被分离为 $\alpha4\beta7^+/\alpha4\beta7^-$ 或 L 选择素$^+$/L 选择素$^-$ 亚类以分析抗 T_{y21}A 的 AFC。有趣的是,口服途径免疫小鼠的 99%AFC 表达有 α4β7,40%的 AFC 表达 L 选择素;而经胃肠外途径免疫小鼠只有 58%的 AFC 表达 α4β7,80%的 AFC 表达 L 选择素[341]。这些结果表示黏膜免疫可激活 $\alpha4\beta7^+$ B 细胞,后者迁移到血液中。这些细胞可能移行到胃肠道,进入 MAdCAM-1$^+$ HEV,引发随后的 IgA 浆细胞应答。总之,归巢受体和地址素是 CMIS 的主要决定因素,归巢途径将在实验模型和人中逐渐明朗化。

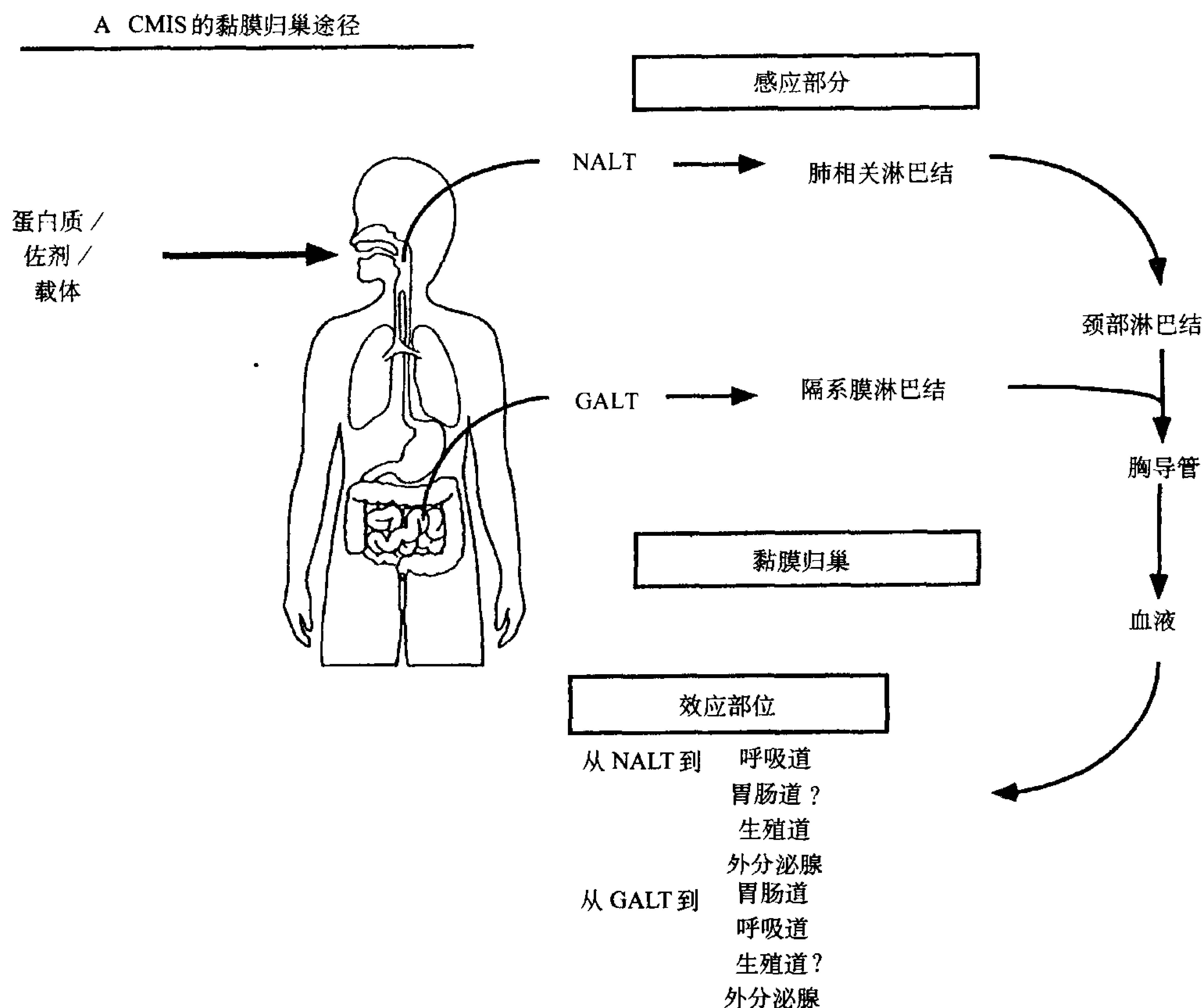


图 27.4A　CMIS 淋巴细胞归巢的途径由 IgA 感应和效应组织构成。NALT 和 GALT 中抗原的摄取和呈递导致 Th1 或 Th2 细胞和 sIgA$^+$ B 细胞的致敏。这些抗原刺激的淋巴细胞离开感应组织,通过黏膜归巢途径(或 CMIS)迁移至远端效应部位。

CD4$^+$调节性 T 细胞的归巢

调节性 T 细胞在 CD4$^+$ 亚群中可分为初始(未致敏)、激活(效应)和记忆细胞,如上所述,这些 T 细胞亚群也表达归巢受体(图 27.4B)。例如,具有初始表型($CD44^{lo}$, $CD45RB^{hi}$, IL-2R$^-$)的 CD4$^+$ T 细胞约占小鼠派尔集合淋巴结中所有细胞群的 65%。现认为这些细胞在外周和黏膜免疫系统之间循环(图 27.4B),通过 PLN 或 MLN 表达的地址素展示归巢受体。GALT 中初始 T 细胞的一个亚群可能表达黏膜归巢受体,如 α4β7,然后循环至其他黏膜感应组织。约有 1/4～1/3 的 GALT CD4$^+$ T 细胞亚群处于激活状态,很可能是最近接触

926

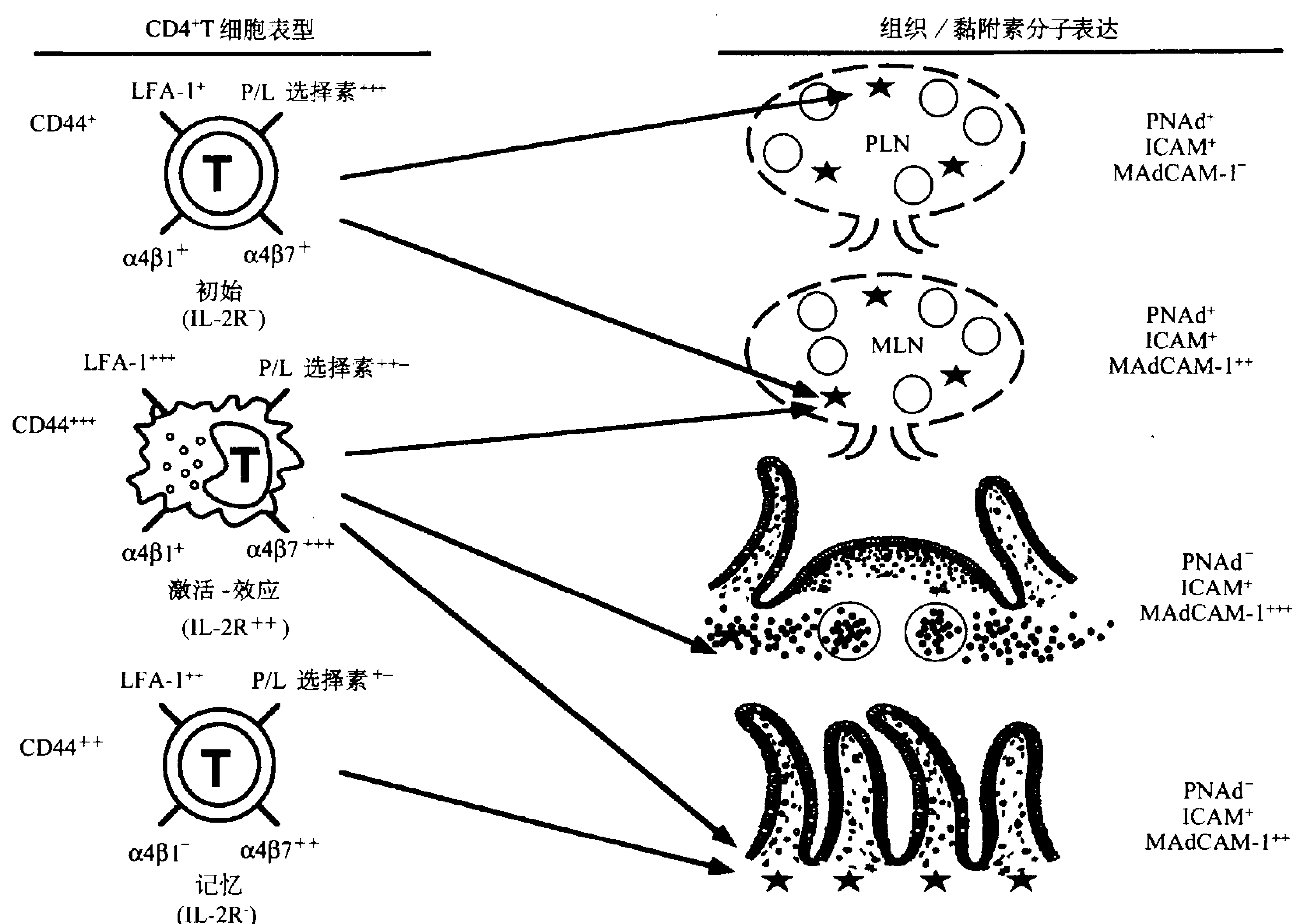


图 27.4B　抗原刺激后，黏膜淋巴细胞迁移至 GALT/NALT 和效应组织表达不同的归巢分子。

抗原的结果。这些细胞表达 α4β7，在黏膜免疫系统中循环，至少在 GI 道相关部分是这样的。记忆性 $CD4^+$ T 细胞（$CD44^{hi}$，$CD45RB^{lo}$，$IL\text{-}2R^+$）也在 GALT 中发现。虽然对它们出现的概率尚无定论，但可能在 30%以上。此外，这些 T 细胞也表达黏膜归巢受体，与 GI 道内效应部位细胞群有关（图 27.4B）。估计鼠源[342]或人源[343,344] LP 区分离的 $CD4^+$ T 细胞 90%以上表现记忆性 T 细胞特征。活化态（$CD44^{hi}$，$CD45RB^{lo}$，$IL\text{-}2R^+$）与记忆性 $CD4^+$ T 细胞 LP 重构群之间的准确关系尚未解决，此外，最近迁移的效应细胞是否立即参与调节局部免疫应答仍是未知数。一个主要的未解决问题是效应部位记忆性 T 细胞活化所必需的条件，这一问题的研究很难开展，因为 LP T 细胞是无反应的。尽管如此，证据提示 LP T 细胞不进行再循环，无疑它们均在效应部位出现的 Th1 和 Th2 型应答的调节中起主要作用。

αEβ7 在内皮 T 淋巴细胞对上皮细胞黏附中的作用

整合素成员之一，αEβ7（现称为 CD103），最初分别定义为人和小鼠的 HML-1 和 M290 单克隆抗体[345,346]。研究显示，这些单克隆抗体可与黏膜上皮中的 IEL 及体外活化的外周血 $CD8^+$ T 细胞发生强烈反应[345~347]。此外，大鼠和鸡 T 细胞也高度表达 αEβ7 分子[348,349]。最近证据表明 αEβ7 介导内皮 T 淋巴细胞向上皮细胞的黏附作用[350~352]。例如，培养的肠 IEL 似乎可通过 αEβ7 与来自人肠和乳腺组织的上皮细胞结合，因为此结合作用也被 CD103 特异的单克隆抗体所阻断[350]。此外，由于 TGF-β 可诱导 αεβ7 而不是 αEβ7 的表达[350,353,354]，此细胞因子可下调 α4 的表达，诱导 αε 链与 β7 一起形成 αεβ7。由于上皮细胞可产生 TGF-β[355]，新到达黏膜感应组织表达的 α4β7T 细胞亚群在上皮细胞衍生的 TGF-β 影响下，可能成为 $αεβ7^+$ T 细胞，因此使 T 细胞粘附于上皮细胞。研究已表明，上皮细胞可产生趋化因子如 IL-8，MIP1α 和 MIPβ[356,357] CD103 的上皮细胞配体已被鉴定为 E 钙黏着素，以前称为上皮细胞膜蛋白，因为它在上皮细胞、黏附接点的形成及上皮细胞形态发生学中具有相似作用[358]。因此，αεβ7 和 E 钙黏着素或内皮 T 细胞与内皮细胞之间的相互作用在黏膜上皮的细

927

胞-细胞相互作用中是很重要的。虽然仍需要直接证据来验证这一点,此分子相互作用可能介导淋巴细胞归巢进入内皮细胞层,可能参与内皮T细胞和内皮细胞之间调节信号的交换。这些假说为以下事实所支持:IEL与抗CD103单克隆抗体共孵育导致内皮T细胞的激活[359]。此外,有研究表明,E钙黏着素与内皮细胞的生长有关[360]。

黏膜免疫疫苗

200年前,Jenner引入接种概念,利用牛痘病毒防止天花。但是,从auspicous开端以来,不到50种人用疫苗被批准,某些时候这些疫苗只是早期疫苗的改进形式。现有疫苗中除了3种胃肠外给药,其他疫苗均不会诱导显著的黏膜免疫,不过,几乎所有病毒和细菌病原体可通过侵入黏膜组织,有效诱导细胞介导和抗体介导免疫。疫苗发展过程中认识黏膜免疫系统的重要性的例子主要是目前HIV感染80%以上是通过性传播引起这一事实。抗呼吸感染从流感(需要每年接种)到细菌性肺炎以及肠道感染从腹泻诱导的细菌性肠病(霍乱志贺氏菌和大肠杆菌)到婴儿轮状病毒感染所取得的进展较为显著些,黏膜免疫成为世界性的研究课题。此外,黏膜接种的优点在于此方式给药可同时引起黏膜和全身性免疫应答,这就为宿主抗感染性疾病提供了双重保护作用。

黏膜疫苗发展过程中,合适免疫途径的选择至关重要,目前,绝大多数黏膜疫苗递送是模仿天然黏膜感应部位与环境抗原和病原体相遇的方式。黏膜接种通常通过口服或鼻内(呼吸道)途径给予的。实际上,许多新疫苗通过这两种途径进行试验以确定哪一种途径通过CMIS诱导的免疫应答最有效。许多时候鼻内免疫是最有效的,通常需要较小剂量的疫苗和较少的佐剂。口服免疫偶而出现的无效部分可能因为酸性胃pH值的降解作用和蛋白酶解作用,也可能是免疫诱导耐受的诱导。

过去25年里大量研究显示,MALT中前体IgA B细胞和Th细胞的诱导将导致B和Th细胞传播到远端效应部位,包括GI、上呼吸道和泌尿生殖道和外分泌腺的LP区(图27.1),从而诱导S-IgA抗体应答。就此而言,来自NALT、BALT或GALT的IgA前体B细胞聚集于远端分泌部位,包括乳腺、唾液腺、泪腺和子宫颈腺。用各种口服疫苗进一步研究显示,口服给予抗原导致以上远端部位分泌物中S-IgA抗体的出现,提示抗原特异性IgA前体来源于GALT,通过一个归巢循环,最终到达效应部位[361]。从肠系膜淋巴结(可能来自派尔集合淋巴结)的抗原特异性细胞重聚于宿主GI道和乳腺组织的LP,它们被转变为抗原特异性浆细胞[317]。也有研究表明,各动物的S-IgA应答相同,提示MALT中的克隆起源[362]。派尔集合淋巴结最早被视为主要的IgA感应(诱导)部位始于以下发现,即含派尔集合淋巴结的肠内分离片段免疫可诱导S-IgA即使是在邻近未免疫的片段,而不含派尔集合淋巴结的免疫部分不具此作用[363]。MALT,特别是派尔集合淋巴结,以及NALT是主要的IgA诱导部位,通过CMIS引起远端外分泌物中的S-IgA应答[315]。

黏膜免疫中S-IgA抗体的特化作用

目前研究致力于利用pIgR(SC)转运系统发展新策略在适当效应器组织提供S-IgA抗体虽然小鼠模型很有用(如下所述),尚不知IgG或IgA同种型的单体(monomeric)抗体在外分泌物中的存在形式,水平也可能不同,并且在哺乳动物体内可能存在其他转运机制。设计抗黏膜表面感染的疫苗时应考虑S-IgA通过上皮表面进入外分泌物转运的重要性。用抗原特异性单克隆IgA研究小鼠体内的被动转移,结果显示,IgA抗体单独应用可对流感鼻内感染[364],霍乱弧菌[365,366]或*S. trphimurium*[367]的肠内感染,*Helicobacter felis*的胃内感染[368]的保护作用。特异性S-IgA抗体可能与colonizing病原体结合,从而抑制它与宿主上皮细胞的相互作用。此外,IgA抗*S. typhimurium*抗体的被动转移可提供拮抗*S. typhimurium*毒力株的经口侵入的保护作用。但是,它不能防止腹腔注射生物体所引起的感染,提示黏膜表面保护作用机制与全身性激发引起的保护反应不同[367]。此模型也显示IgA被动转移所导致的高滴度血清IgA,说明黏膜表面表达高水平的IgA。此外,具有高滴度血清IgA的小鼠可免受*S. typhimurium*感染的侵害,而具有低水平IgA滴度的小鼠被感染[367]。因

此,特异性 S-IgA 抗体应答可提供一种完全防止细菌或病毒感染的手段,至少可降低黏膜感染接种体的大小,这里是绝大多数感染原最初到达的地方。

一系列有关多聚 IgA(pIgA)和 $pIgR^+$ 上皮细胞的体外研究提示,pIgA 介导着细胞内病毒中和作用以及免疫复合物的跨膜转运[369~372]。这些功能有助于防止或抑制黏膜表面的感染。病毒特异性 pIgA 可中和 $pIgR^+$ 细胞内的仙台病毒[371];这些中和作用需要感染细胞表达的 pIgR(IgA 细胞内转运所必需)以及抗原特异性 pIgA。因为 IgG 不由 pIgR 转运,此同种型抗体不能中和细胞内病毒[371],$pIgR^+$ 上皮细胞内 pIgA 可介导有害抗原及免疫复合物的胞质转运作用,并将其释放到外分泌物中[369,370,372]。在一研究中,抗原和 pIgA 形成的免疫复合物跨 $pIgR^+$ 上皮细胞转运后释放方式与多聚 IgA 跨 $pIgR^+$ 上皮细胞转运后的相同[369]。其他实验表明,免疫复合物含多聚 IgA 条件下,含抗原,抗原特异性单体 IgA 或 IgG 的免疫复合物也可以 pIgR 依赖性跨上皮细胞转运[370]。最近报道了 S-IgA 在细胞内的中和作用[373],此项研究中,利用肿瘤 backpack 模型导致抗轮状 VP4 和 VP6 单克隆 IgA 抗体的生成。有趣的是,VP6 是一个内壳蛋白,不易被单克隆抗体中和,通过 backpack 递送时可产生保护作用,但在 GI 道的黏膜表面出现时无此效应[373]。尚需实验提供细胞内区室参与病毒通过 pIgR 的 pIgA 跨细胞转运。

黏膜佐剂

蛋白质包括疫苗到达黏膜诱导部位是一种诱导全身无应答性(黏膜诱导耐受性)的有效途径。虽然黏膜诱导耐受是防止自身免疫疾病的有效途径,此特征可导致宿主对感染应答能力的丧失,因此,要求黏膜佐剂不仅能够增强黏膜和全身性免疫,而且要能防止黏膜诱导耐受性的诱导。由霍乱弧菌和大肠杆菌所产生的主要肠毒素分别为霍乱毒素(CT)和热不稳定毒素(LT),是由 2 个结构、功能和免疫性不同的 A 和 B 亚单位组成的大分子[374~376]。两种毒素的 B 亚单位均由 5 个相同的 11.6kDa 肽构成,不同在于 CT 的 B 亚单位(CT-B)仅与 GM1 神经节苷脂结合[377],而 LT 的 B 亚单位(LT-B)较杂乱,不仅与 GM1 结合,还与 asialo GM1 和 GM2 结合[378]。B 亚单位与上皮细胞 GM1 结合或 GM2 受体结合后,A 亚单位到达胞质内,激活后与 NAD 结合,催化 Gsα 的 ADP-核糖基化[379]。此 GTP 结合蛋白可激活腺嘌呤环化酶,继而 cAMP 增多,导致上皮细胞分泌水和氯离子进入小肠[380]。

黏膜接触 CT 和 LT,二者均具免疫原性,可导致 S-IgA 和血清抗体生成,几乎完全是 CT-B 或 LT-B 限制性的[381]。更重要的是,两种毒素与无关蛋白口服、经鼻或非胃肠途径同时给予时是有效的黏膜佐剂[105,381,382]。最近研究显示,蛋白抗原和 CT 佐剂一起口服免疫小鼠时,最强黏膜 S-IgA 和血清 IgG 抗体应答的诱导与抗原特异性 $CD4^+$ Th 细胞分泌的 IL-4 和 IL-5 直接相关[105],进一步分析表明,CT 通过诱导抗原特异性 $CD4^+$ Th2 型细胞,产生高水平 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10,从而引起佐剂应答。这些支持随后产生的全身性 IgG1 和 Ig2b 亚类、IgE 和黏膜 S-IgA 抗体应答[106]。另一方面,LT 口服免疫导致 IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 S-IgA 抗体应答,同时伴随混合的 $CD4^+$ Th1 和 Th2 型应答,生成 IFN-、IL-5、IL-6 和 IL-10[111]。此外,比较了 $CD4^+$ Th 细胞产生的 IL-4 水平,作为佐剂,LT 所诱导的抗原特异性 IL-4 生成明显低于 CT[106,111]。

众所周知,CT 和 LT 可导致严重的腹泻,临床表现为霍乱和产毒素性大肠杆菌肠炎,因此,均不宜作为黏膜佐剂用于临床。早期研究尝试将这两种分子的致腹泻作用与佐剂活性分开,但是,结果表明,LT 突变株,称为 E112K[383],ADP 核糖转移酶活性中心含有单个氨基酸替代基团[384],无毒性,亦失去佐剂活性[385]。更近的报道指出,在 LT 腺苷酸二磷酸(ADP)核糖转移酶切口(cleft)处以外发生单个氨基酸替代的突变株 R7K[386] 和 R192G[387] 与蛋白质,分别经鼻或口服途径同时给予时无毒性,仍保留佐剂特性[386,387]。此外,另一 LT 突变株 S63K 未显示毒性[388]。此突变株经鼻给予时显示较低黏膜佐剂特性[389];另一方面,CT 的 2 个突变株(mCT)命名为 S61F 和 E112K,ADP 核糖转移酶活性中心发生单氨基酸替换,完全丧失 ADP 核糖转移酶活性和致腹泻作用[390]。与天然 CT(nCT)相比,非胃肠[390]或经鼻[391]给予时 mCT 均是有效的佐剂。

建立基因产生融合蛋白时也涉及 CT-B 佐剂活性的问题,用融合蛋白而不用化学偶联物的优点在于它们不含海参毒素(holotoxin),且结构一致。分别用酶活性或 GM1 结合测定结果表明,葡糖转移酶(GftB)的一部

分与碱性磷酸酶(PhoA)或 CT-B 融合,不影响 PhoA 或 CT-B 的功能性活性[392,393]。CT-B 结合物诱导血清 IgG 和 IgA 抗 CT-B 抗体,而抗 GtfB 抗体仅当给予高剂量 GtfB-CT-B 结合物时可检测到。此外,IgG 滴度很低,检测不到 IgA 抗 Gtf-B。蛋白质与其他突变株如无毒性 A1 亚单位的 CT-B-CT-A2 融合[394]也已建立。有趣的是,此嵌合疫苗口服给予可诱导血清 IgG 抗体,而最大黏膜 IgA 应答需要另加佐剂。因此,CT-B 可与 GM1 结合,因而可能是一极好的载体分子,显示低佐剂特性,完全佐剂性需要海参毒素的 A 和 B 亚单位两部分的参与。

口服与经鼻接种方案

最近有关口服或鼻内疫苗的详尽情况不是本章讨论的范畴,详见文献[395]~[397],不过,要弄清楚的是,递送系统的性质以及免疫途径均可影响所诱导的 Th 细胞亚群的性质,显著影响全身和黏膜免疫的结果。例如,天然 CT 或突变 CT 与疫苗同时口服给予偏向诱导 CD4⁺ Th2 型细胞及特征性血清 IgG1、IgG2b、IgE 和 IgA,以及黏膜 S-IgA 应答[105,106]。另一方面,口服免疫重组细菌,如沙门氏菌表达的蛋白质不但诱导 CD4⁺ Th1 型细胞和 CMI,也诱导特征性 CD4⁺ Th2 型细胞。这些 CD4⁺ Th 型细胞可产生细胞因子如 IL-6 和 IL-10,它们似乎支持黏膜 S-IgA 应答[71,398]。本节我们利用一些研究来说明黏膜佐剂或活载体用于口服和经鼻免疫策略的进展,以下章节我们对目前正在研究的黏膜疫苗开发的多血症(plethora)载体策略作一概述。

口服疫苗

930

我们特意选择了一些研究来阐述口服微生物疫苗所致疫苗鼠免疫应答的性质(表 27.2)。要强调的是,免疫应答随所用抗原的性质以及研究所选择的鼠品系而变化。然而蛋白质如 TT 或 HEL 与黏膜佐剂合用 CT 主要诱导血清 IgG1 和 IgE 抗体[106,107]。此外,某一研究显示 HEL 和 CT 口服免疫小鼠导致致命性过敏反应[107]。因此,所有利用 CT 或其衍生物的研究应考虑可能由 IgE 抗体应答的诱导所致的不良反应。

KLH 或 TT 与佐剂 CT 口服免疫小鼠可诱导抗原特异性 CD4⁺ Th 细胞,表现为 Th2 表型[105,106,108]。例如,KLH 再次刺激时,派尔集合淋巴结和 LP 淋巴细胞可生成显著量的 IL-4 和 IL-5,而 IFN-γ 和 IL-2 的分泌水平极低(表 27.2)[108]。因此,一些研究支持这样一个观点,即佐剂 CT 和可溶性蛋白口服免疫可诱导 Th2 型应答,以辅助特征性血清 IgG1 和 IgE 及黏膜 S-IgA 抗体应答(表 27.2)。

表 27.2 蛋白联合疫苗口服免疫后鼠免疫应答的一般特点

疫苗递送系统	抗原特异性抗体应答的类型				Th1 和 Th2 应答		注解
	血清			分泌液	Th1	Th2	
	IgG1	IgG2a	IgE	s-IgA			
蛋白抗原 + CT	+ + +	+	+	+ +	+	+ + +	一般地,CT 支持 Th2 为主的免疫应答,但是,某些情形如寄生虫抗原可支持 Th1 的诱导
蛋白抗原 + LT	+ +	+ +	±	+ +	+ +	+ +	LT 可激活 Th1 和 Th2 途径
重组沙门氏菌	+	+ + +	-	+ +	+ + +	+	可产生 IgA 选择性细胞因子的第二水平 Th2 细胞存在条件下,rSalmonella 可诱导 Th1 为主的应答

a 抗原 + 黏膜佐剂或重组细菌载体。(原文未标注 a 的位置。——译者注)

有证据表明,口服同时给予 CT 也可诱导抗原特异性 CD4⁺ Th1 型应答,例如,小鼠 10 天给予 3 次可溶性鼠弓浆虫制剂可诱导(harbored)脾鼠弓形虫特异性 T 细胞[399]。进一步体外再刺激导致 IFN-γ 和 IL-2 水平的增高,而 IL-4 和 IL-5 水平与仅用鼠弓形虫口服免疫小鼠的结果相似[399]。更有说服力的研究是用小鼠寄生虫鼠毛首线虫和 CT 的可溶性形式,分别评价作为 Th1 和 Th2 型应答的指标的 IFN-γ 和 IL-5 水平[400]。有趣的是,寄生虫激发前,口服鼠毛首线虫加 CT 可诱导 IL-5 生成性 T 细胞,而用鼠毛首线虫感染后转换为 IFN-γ。此转换提示感染本身可导致 CD4⁺ Th1 型应答,即使是 Th2 型应答为主的情况下。另一研究显示,寄生虫抗原和 CT 口服免疫能同时激起血清 IgG 和黏膜 IgA 应答[401],在此研究中,也评价了胆汁中抗寄生虫抗体(胆汁中以 IgA 同种型为主),显示正常情况下口服免疫诱导血清 IgA,在实验组动物如:小鼠、大鼠和兔子的血清 IgA 主要为多聚体,pIgA 转运至 GI 道中。因此,所有评估肠 IgA 应答的研究应当对 GI 道的 LP 区中 IgA

生成性浆细胞进行检测。

作为毒力相关重组蛋白的黏膜疫苗递送载体,减毒无毒力沙门氏菌株颇受重视[402~405]。经口给予后,沙门氏菌在黏膜相关组织(如派尔集合淋巴结)内直接复制,然后通过 MALT 散播到系统免疫系统(如脾)。这种在黏膜和全身部位的特征性播散生长方式使得沙门氏菌可诱导广谱(全面)的免疫应答,包括细胞介导的应答,以及血清 IgG 和黏膜 S-IgA 抗体应答。虽然有多种来自细菌、病毒、寄生虫和哺乳类的基因在减毒沙门氏菌内表达[402,403],很少完全研究了 T 和 B 细胞对所表达蛋白抗原的应答。特别值得一提的是,这些系统中,抗原特异性 $CD4^+$ Th1 和 Th2 细胞之间的平衡,以及它们对亚型特异性 IgG 和黏膜 IgA 应答的影响尚未引起关注,这对于特定病原体适当免疫应答递送系统的设计相当重要。

此领域先前的研究显示小鼠口服给予减毒 *S. typhimurium* 表达的利什曼原虫表面蛋白(gp63)可引起 $CD4^+$ T 细胞,产生 IFN-γ 和 IL-2,但无 IL-4[406]。最初结果看起来很让人费解,因为似乎黏膜 S-IgA 应答取决于 Th2 细胞和细胞因子如 IL-5,IL-6 和 IL-10,但这些减毒重组沙门氏菌(重组沙门氏菌)表达的外源蛋白抗原是究竟通过什么机制诱导 S-IgA 应答?就此问题最近通过利用重组沙门氏菌表达 TT 的的 Tox C 基因进行了研究,口服重组沙门氏菌 Tox C 导致血清 IgG2a 和 IgG2b 为主的抗 TT 应答,以及黏膜 S-IgA 抗 TT 抗体应答[71]。脾和派尔集合淋巴结 $CD4^+$ T 细胞选择性生成 IFN-γ 和 IL-2 以及 Th2 细胞因子 IL-10[71]。此外,这些小鼠的巨噬细胞产生高水平的 IL-6[71]。口服免疫 IL-4 敲除($IL\text{-}4^{-/-}$)小鼠清楚显示 IL-4 不参与过程,生成的是血清 IgG2a 和黏膜 s-IgA 抗体。有趣的是,这些小鼠体内的 $CD4^+$ T 细胞显示两种细胞因子:一种 Th1 表型和生成 IL-6 和 IL-10,而非 IL-5 的 T 细胞[398];后一种 Th2 细胞亚群仅生成 IgA 增强性细胞因子,被称为第二水平的 Th2 型细胞,与产生 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10 所谓第一水平的 Th2 型细胞相区别。

鼻内接种疫苗

鼻内免疫可能已成为外周和黏膜免疫应答诱导的最有效途径,绝大多数研究可归为使用可溶性疫苗与黏膜佐剂如 CT(即蛋白-CT-B 结合物),或减毒载体。大量利用流感(flu)模型的研究表明,流感疫苗经鼻免疫提供的保护性免疫比口服免疫更有效[397,407]。含微量 A 亚单位的 CT-B 三价疫苗经鼻免疫产生广谱抗病毒的交叉保护作用[408]。此外还显示流感疫苗与 LT-B(含微量 LT)一起经鼻免疫可诱导(对人类的)抗原特异性免疫应答[409]。这些结果表明,理想鼻内接种疫苗可提供有效的抗感染免疫。

931

至于载体,绝大多数研究限于对呼吸道病毒病原体,通常是减毒突变或基因组敲除。有趣的是,目前用于基因治疗的重组腺病毒(r-Ad)也是疫苗蛋白质的黏膜递送候选对象,最新疫苗通过滴注法进行鼻内接种(通常 10mg/人)和吸入,导致疫苗有效递送到 NALT。大量随即咽入,产生口服免疫,因此任何胃内免疫不能完全避免口服递送,而绝大多数口服免疫研究利用胃插管术以避免可能的鼻内免疫。还应指出的是,肺免疫有两种途径:气管内和鼻内递送。一般地,气管内免疫偏向于诱导下部肺和相关淋巴结的应答,包括 BALT,而鼻内免疫致敏 NALT 和相关颈部淋巴结。

一些研究可用来阐明鼻内免疫相关的原理。如:灭活的呼吸道合胞体病毒(RSV)与 CT 一起鼻内免疫导致鼻 IgA 和血清 IgG 抗 RSV 应答[410]。分析 IgG 亚型显示包括 IgG1 和 IgG2a[410]。有趣的是,RSV 感染和随后的 Th1 型应答结果良好,但 Th2 型应答与显著病理学有关[216,411]。破伤风类毒素 C 片段(片段 C)与佐剂 CT 一起经鼻免疫导致血清抗体应答,特征性表现为可比较的 IgG1、IgG2a 和 IgG2b 抗片段 C 滴度,提示 CT 作为佐剂和片段 C 可诱导 Th1 及 Th2 型应答[412]。但是,片段 C 与黏膜佐剂百日咳毒素(PT)或 PT 的突变形式 PT-9K/129G 一起经鼻给予时,抗片段 C 的 IgG1 为主,提示所诱导的免疫应答偏向 Th2 型。在此研究中直接比较 CT 和 PT 或 PT-9K/129G 很困难,因为使用 CT 与更有效的抗 Frg C IgG 应答有关。尚需进一步研究以确定佐剂、疫苗抗原及免疫途径在 $CD4^+$ Th1 和 Th2 应答诱导中的作用。

研究已证实,重组腺病毒(Recombinant adenoviruses, r-Ad)可成功将外源性基因呈递至黏膜组织,以治疗遗传性疾病如囊性纤维化,也是某些感染性疾病表达基因免疫的良好载体。有趣的是,这两种情形下,宿主对 r-Ad 及转基因的免疫应答均存在。在基因治疗中,基因表达是短暂的,而接种时抗 r-Ad 免疫应答预先排

除了外源性基因特异性免疫的再次刺激(增强免疫)。因此,两种情形下所提供的宿主免疫应答并非是最佳的(r-Ad 次最优)。虽然有这些不足,r-Ad 的使用仍是这两个领域颇有希望的途径。迄今为止,绝大多数研究用 r-Ad 时将 E1 和 E3 基因敲除,使病毒复制缺陷。但是,病毒颗粒保留对呼吸道黏膜上皮细胞完全的感染能力[413]。最近研究显示,r-Ad 表达的单纯性疱疹病毒糖蛋白 B 经鼻途径免疫小鼠时是最有效的疫苗[414],引起血清 IgG 以及肺 IgA 抗糖蛋白 B 应答,与激发引起的保护性应答相关。此外,此疫苗可诱导有效的 CTL 应答[414]。此免疫的黏膜途径也可能是安全有效的,因为黑猩猩经鼻呈递 r-Ad 表达 HIV 包膜和 gag 蛋白可产生显著的血清抗体应答[415]。这些抗体应答是广谱性的,用一 gp160 亚单位疫苗增强免疫可引起血清中和抗体[415]。目前 r-Ad 载体的主要优点在于它们可以容纳大量外源互补 DNA(7~8kb)。当然,此特性已被用于表达一些病毒病原体的毒力基因。例如,人 r-Ad 载体用于表达水泡性口炎病毒,口服递送后可有效诱导全身性抗体应答[416]。r-Ad 也被用作狂犬病病毒的载体以经口免疫狐狸[417]。此外,r-Ad 表达的呼吸道合胞体病毒和乙肝蛋白口服给予狗和黑猩猩,可成功诱导循环性抗体应答[418,419]。

AIDS 疫苗研制的主要目标之一是能够引起对 HIV 的黏膜免疫,就此而言,考虑泌尿生殖道内诱导有效免疫的黏膜呈递就显得颇为重要。通过 SIV 建立的猕猴泌尿生殖道感染模型常用作研究 HIV 黏膜免疫[218,420]。一项重要研究中,各组猕猴通过口服、气管内或肌肉内途径给予 SIV 的生物可降解微球体进行免疫[220],实验结果显示,与口服途径相比,气管内途径可更有效诱导血清 IgA 应答。虽然三种免疫途径均导致阴道抗 SIV 抗体,仅气管内途径诱导长效应答。免疫的猕猴用 SIV^{mac251} 的 2 倍阴道内 ID^{50}(50%感染剂量),4 只未致敏猕猴中的 3 只及所有仅通过口服途径免疫的猕猴被感染。而所有通过肌肉内途径致敏的动物中,3 只中的 2 只经气管内途径增强免疫,和 3 只中的 1 只经口服增强免疫的猕猴被感染。虽然在此实验中未观察到 CMI 应答,尚需进一步研究以确定阴道抗 SIV 抗体所起的保护作用,此模型为黏膜表面可能诱导抗 SIV(甚至 HIV)保护作用提供证据[220],此观点最近也得到鼻内免疫猕猴 S2V P55 和 CT 的实验得到证实,血清和黏膜分泌物中可分别检测到 SIV p55 和 CT 诱导的抗原特异性 IgG 和 IgA 抗体[421],此外,联合疫苗(p55 和 CT)口服免疫导致 Th1/Th2 型应答,以及抗原特异性 IgG 和 IgA 抗体的生成[422]。

最近利用 V3 环中含辅助性 T、CTL 和 B 细胞表位的 HIV 肽和 CT 作为黏膜佐剂进行一项鼠的研究表明,鼻内免疫诱导的血清中和 IgG 抗体主要为 IgG1 亚型[423],并诱导阴道显著的抗 HIV IgA 应答,这些抗体与分泌成分相关联,说明来自黏膜[423]。此研究还观察到强烈的 CMI 或 DTH 应答。另一研究评价了 CT 诱导 CTL 应答的效力,HIV-1 肽和 CT 一起鼻内免疫导致颈淋巴结和脾内肽特异性 CTL[424],因此,黏膜佐剂如 CT 及其突变衍生物可能使 HIV 肽等疫苗产生抗体介导的应答,并可诱导 CTL 应答。

932

黏膜诱导的耐受

黏膜免疫除了诱导抗原特异性 S-IgA 和血清 IgG 应答外,此免疫途径也可诱导相反类型的免疫应答,即可诱导全身无应答性(如口服耐受)。因此,黏膜免疫可上调或下调全身性免疫应答。如上所述,为了研究抗感染性疾病的黏膜疫苗,需要考虑黏膜和全身性免疫以提供双重保护作用。相反,黏膜免疫对全身性房室中抗原特异性免疫应答的抑制作用,对于防止对食物和过敏原的过敏反应是非常重要的。此外,此系统可用于通过口服自身抗原以预防和治疗自身免疫性疾病。

一次服用高剂量或重复口服低剂量的蛋白,显示在黏膜 IgA 应答存在时诱导全身性无应答[425~427]。黏膜相关与全身相关淋巴组织中这些独特的免疫应答称为口服耐受[425]。更新研究显示,鼻内免疫蛋白质也可诱导全身性无应答性[428~433],引出更常用的术语"黏膜诱导的耐受性"。不过,即使抗原特异性全身性无应答可由口服或经鼻接种抗原诱导,此领域的主要研究是通过口服抗原进行的。因此,绝大多数有关口服耐受的资料也可能适于鼻内途径诱导的耐受。

黏膜诱导耐受的概念

黏膜的抗原给予诱导外周无应答性或耐受的方法早已为人们公认[434],通常是指口服耐受,因为最早报

道口服给予抗原使全身免疫力下降的作用。这是一种独特的免疫反应，表现为实验动物口服大量蛋白抗原后变得 refractory，或者通过全身途径（如通过注射途径）接触相同抗原时产生免疫应答的能力降低[425,435]。这种独特的应答是一种重要的天然生理学机制，宿主通过此机制避免对消化的食物蛋白或其他抗原产生 DTH 反应[426]。此外，所形成的抗花粉和灰尘抗原黏膜诱导性耐受可能也是抑制过敏反应，包括 IgE 介导的超敏反应所必需的。虽然对黏膜诱导耐受也提出了一些可能机制，但是主要机制可能是通过 T 细胞参与的有效抑制或克隆不应答或清除[436]。例如，口服途径给予高剂量的抗原所诱导的克隆清除或不应答[437-439]，特征表现为无 T 细胞增殖以及 IL-2 生成和 IL-2R 表达的减少。不过，经常给予低剂量抗原则 $CD4^+$ 或 $CD8^+$。T 细胞分泌细胞因子如 TGF-β、IL-4 或 IL-10，诱导活化抑制[440-441]。有趣的是，后一过程与上调 IgA 生成的细胞因子有关[442]，因此与观察到的可能同时发生的分泌型免疫应答和全身耐受相一致[424,443]。由于耐受性可经耐受动物的血清和细胞转移那么，体液抗体（IgG 和 IgA？抗独特型抗体？免疫复合物？）、循环未降解的抗原或引起耐受的抗原片段和细胞因子可能协同作用导致 T 细胞无应答性[435]。因为口服耐受性对最初摄入的或吸入的抗原来说具有特异性，因此并不影响对其他抗原的全身性免疫应答，黏膜耐受的相关研究已日益成为预防甚至治疗特异抗原或非黏膜组织内表达的抗原（自身抗原）不良免疫反应所致疾病的引人关注的策略。

黏膜诱导耐受的机制：αβ 和 γδ T 细胞的作用

20 世纪 70 年代后期和 80 年代初，免疫系统细胞和分子水平尚不清楚时，黏膜免疫学家已对口服耐受的可能机制展开了研究，虽然一些可能机制（如 B 细胞耐受、抗独特型抗体、耐学原和 APC 的肠抗原加工过程）已被证实参与口服耐受的诱导，绝大多数确凿的证据提示 T 细胞是黏膜诱导耐受性的诱导过程中主要的细胞类型。早期研究显示全身无应答性可由获得性过继口服牛血清白蛋白大鼠的 T 细胞所诱导[444]。随后的大量研究表明，蛋白抗原口服免疫可诱导支持 IgA 应答的黏膜相关组织中 $CD4^+$ Th 细胞，而抑制性 T 细胞在全身性部位如脾内诱导，下调抗原特异性 IgM、IgG、IgE 应答[445-451]。例如，小鼠口服 OVA 导致支持 IgA 应答的 Th 和与 GALT 内 IgG 和 IgE 应答有关的抑制性 T 细胞的生成[448,450,451]。此外，支持 IgA 应答的 T 细胞仍在派尔集合淋巴结中，而抑制性 T 细胞迁移至全身部位（如脾）。这些观察结果被认为是口服耐受细胞学机制的合理解释：派尔集合淋巴结衍生的 $CD4^+$ Th 细胞支持 IgA 应答，而脾抑制性 T 细胞诱导全身无应答性。现在一般认为存在下调全身免疫应答的功能性抑制机制，但是，这些抑制性 T 细胞的本质和特性仍有争议。

αβ T 细胞在黏膜诱导耐受中的作用

933

综观过去和最近有关口服耐受的细胞学和分子机制，αβ T 细胞看来与口服抗原全身免疫应答的下调有关（表 27.3）。目前也认为口服耐受的状态可由克隆无反应性（clonal anergy）或 T 细胞的删除以及 T 细胞通过抑制性细胞因子分泌的主动抑制来解释[436,437,439,452-456]。低剂量抗原口服有利于后一抑制形式，而更高剂量口服诱导免疫活性 T 细胞克隆的无反应性[436,452-454]。这两种形式的口服耐受并不相矛盾（mutually exclusive），抗原口服给予后可能同时出现。

T 细胞无反应性

无反应性在这里是指 T 细胞无应答的一种状态，表现为无增殖、无 IL-2 合成以及 IL-2R 表达减少[457]。T 细胞与 IL-2 预先培养可逆转此状态[458]。无反应性这最近被口服耐受的一种情形所证实，即大剂量蛋白抗原诱导的 OVA 特异性 T 细胞无反应性[439]，此外，髓磷脂碱蛋白（myelin basic protein，MBP）口服给予后使 IL-2 和 IFN-γ 合成减少[437]，这些结果提示，口服接种后 Th1 型 T 细胞可能对无反应性的诱导较敏感。有研究表明，Th1 型细胞对体外诱导耐受比 Th2 型细胞更为敏感[459]。体内证据显示，Th1 型细胞在口服耐受中可能更易发生无反应性[455]。为了确定优先介导口服耐受诱导的淋巴细胞（如 $CD4^+$/$CD8^+$ T 细胞），最近用 SCID 和 *nu/nu* 小鼠进行了细胞转移实验[454]。口服牛 α-酪蛋白致耐受小鼠的脾淋巴细胞获得过继可诱导免疫减弱小鼠的免疫耐受。结果显示，口服耐受由无反应性的 $CD4^+$ 而不是 $CD8^+$ T 细胞诱导。总之，一种形式的口服耐受可通过诱导全身部位无反应性 $CD4^+$ T 细胞的诱导来实现。

失衡的 Th1/Th2 细胞因子网络

有研究提示,耐受性的诱导也可由 Th1 和 Th2 细胞之间平衡的失调来解释,例如,Th2 细胞的优先激活释放细胞因子 IL-4 和 IL-10 可导致 Th1-CMI 应答的下调[460]。此外,如上所述,Th1 型细胞对口服蛋白抗原后诱导的不应答要敏感得多(表 27.3)。这些结果提示,口服耐受的诱导可能与 Th2 细胞通过它们在全身免疫部位各自的细胞因子对 Th1 细胞的选择性下调作用来实现,这种可能与口服耐受在 Th1 调节的 CMI 应答比 Th2 介导的抗体应答中更为复杂相一致。但是,最近研究显示,口服大剂量 OVA 可抑制 Th1(IL-2 和 IFN-γ)和 Th2 细胞因子(IL-4、IL-5 和 IL-10)的产生,分别导致 IFN-γ 和 IL-4 依赖的抗原特异性 IgG2a 和 IgG1 抗体应答的下降[452]。这些结果提示,Th 细胞的 2 个亚群均等的参与到口服耐受的诱导(表 27.3)。

表 27.3　黏膜诱导耐受机制及其潜在的临床应用

概念
口服或鼻内给予蛋白抗原后黏膜免疫应答存在条件下出现全身抗原特异性免疫应答的抑制
可能机制
全身免疫应答的下调作用
T 细胞无反应性
T 细胞克隆清除
Th1 和 Th2 细胞交叉调节的不平衡
Th3 细胞或 $CD8^+$ T 细胞所产生的 TGF-β 的抑制作用
黏膜免疫应答的维持
黏膜 γδ T 细胞的调节
GALT 衍生的 Th2 细胞
可能的临床应用
自身免疫性疾病的防治
多发性硬化症(multiple sclerosis)(bovine myelin)
风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)(chicken type II collagen)
Uveoretinitis(bovine S antigen)
Ⅰ类糖尿病
过敏的预防
食物过敏(牛奶蛋白质)
花粉过敏

最近研究提示大剂量蛋白抗原口服给予可诱导大量的 IFN-γ 生成,这可能是因为 IgG 增强性细胞因子如由 Th2 生成的 IL-4 抑制,最终导致 B 细胞应答水平下降[461]。因此,黏膜诱导耐受在 IFN-γ 基因破坏小鼠中不被诱导。最近研究进一步证实 IFN-γ 在黏膜诱导耐受中的作用,口服途径给予 OVA 的小鼠脾细胞,体外再刺激时显示抗原特异性 IFN-γ 的生成[462]。另一研究表明,重复口服给予 OVA 特异性 TCR 小鼠大剂量 OVA 导致派尔集合淋巴结中 IFN-γ 为主的免疫应答[463]。IFN-γ 对黏膜诱导性耐受的诱导和维持的调节作用机制尚不清楚,但是,IFN-γ 对生成 IL-4 的 Th2 型细胞的抑制作用已很肯定,这有利于 IgG B 细胞应答的产生[63~66]。总之,口服给予大剂量抗原所诱导的全身 B 细胞耐受的免疫学结果,可能来自 IFN-γ 介导的免疫调节,并对 Th2 型细胞具有显著抑制作用。

积极抑制在黏膜诱导耐受中的作用

如上总结,过去大量研究证实一种形式的抑制为口服耐受性的重要元件。最近研究提供的证据表明,口服耐受中可诱导 $CD8^+$ T 细胞生成抑制性细胞因子[427]。口服给予 MBP 诱导 $CD8^+$ T 细胞产生 TGF-β[456~464](表 27.3),在体内外抑制抗原特异性免疫应答。MBP 口服给予 24~48 小时内在派尔集合淋巴结中发现生成 TGF-β 的 $CD8^+$ T 细胞,提示它们最初在 GALT 中诱导产生[427]。这些 GALT 衍生的 T 细胞可能迁移至全身部位,介导有效旁路(bystander)抑制,因此,用口服抗原刺激时,喂以 MBP 的动物的 T 细胞可抑制 OVA 应答[465]。同样地,OVA 口服给予动物,用同样抗原再次刺激时,其 T 细胞可抑制 MBP 应答。主动抑制的诱导依赖于抗原的剂量和给予的频率(如低剂量口服耐受)[436]。近期,用每天口服 MBP 已达 2 年的多发性硬化

症患者的 MBP 特异性 T 细胞系的研究结果提供的证据提示,高频率诱导抗原特异性 TGF-β 生成性 T 细胞[461]。当检查同时产生的 Th1(IFN-γ)和 Th2(IL-4)细胞因子谱时发现,抗原特异性 TGF-β 生成性 T 细胞并不产生 IFN-γ 或 IL-4[466]。因此提示,MBP 口服给予诱导的 TGF-β 分泌性 Th3 细胞是口服耐受产生的原因。

黏膜 γδ T 细胞正向调节黏膜诱导耐受中的 IgA 应答

绝大多数研究人员认为黏膜相关组织中存在一种调节性 T 细胞亚群,全身非应答状态情况下,它在维持抗原特异性黏膜 IgA 应答中起重要作用(表 27.3)。已知黏膜免疫隔室如肠上皮除含 αβT 细胞外,还含大量 γδT 细胞[41],小肠内皮和 LP 区也是如此[467]。但 γδT 分布于黏膜相关组织中,可以假想口服给予抗原后出现全身无应答时,黏膜 γδT 细胞参与抗原特异性 IgA 应答的维持。

如上所述,口服接种 SRBC 的小鼠的 IEL T 细胞,分为 γδ 和 αβT 细胞。当纯化的 γδ 和 αβT 过继性转移给 SRBC 口服致耐受的小鼠时,接受 γδT 细胞的小鼠中出现系统无应答向 IgM、IgG 和 IgA 抗 SRBC 应答反转。而接受 αβT 细胞未见此现象[296]。更近的一项研究也表明,从口服免疫蛋白疫苗(LT-B)小鼠的黏膜相关组织中分离的 γδT 细胞显示相似的活性,即给予 LT-B 小鼠的 IEL γδT 细胞(耐受的)过继性转移给同种出现 LT-B 口服耐受的(syngeneic)小鼠可消除系统的无应答性[468]。因此,黏膜 γδT 细胞可能在维持局部 IgA 应答和口服耐受中系统无应答性之间的免疫内环境稳定(homeostasis)中发挥重要作用。

黏膜诱导耐受的临床应用

黏膜诱导的耐受早期被用来降低或抑制自身抗原所引起的免疫应答[469~473](表 27.3)。沉积在肠(喂服)或呼吸(气雾剂或鼻内滴注)道黏膜上的自身抗原,可延迟或减轻多种动物模型中所诱导的实验性自身免疫疾病的严重程度。最近在自身免疫性疾病的患者中进行口服耐受的指导性临床试验,并已有临床效用的报道[427]。尽管自身抗原口服在预防和治疗自身免疫性疾病中已有鼓舞人心的结果,但最新结果提出一种不幸的可能性,小鼠口服饲以自身抗原可导致抗原特异性 $CD8^+$ CTL 应答,这可能导致自身免疫疾病[474]。此外,胰岛素口服给予非肥胖性糖尿病小鼠可诱导 $CD8^+$ T 细胞,加重过继转移后疾病[475]。因此,必须记住的是自身抗原口服可能诱导不需要的 $CD8^+$ CTL,后者可能使疾病恶化而不是防止自身免疫性疾病的发展。

早期建议抗原通过口服给予来防止或治疗常见变态原如室尘或草花粉中存在的物质所诱导的变态反应[476,477]。虽然上述例子提示口服耐受可诱导抗原特异性免疫耐受,其治疗潜在性仍存在实际的问题。的确,在实验性动物或人身上口服给予时需要大量抗原(由毫克至千克)以诱导全身的非应答性。

黏膜炎症

本章着重阐述了许多临床疾病包括炎症对黏膜表面的影响。当然,绝大多数变态原是吸入的,因此最初的损伤部位在呼吸道。对黏膜炎症的详细论述不是本章范畴之内,但最近有关人炎症肠性疾病(IBD)鼠模型的发展可作为确定异常免疫应答在黏膜炎症中作用的很好模型,以下将加以介绍。

炎症性肠病的鼠模型

人 IBD 特征表现为痢疾、血便、体重丧失和肠道炎症。一般认为人 IBD 是多因素造成的,包括免疫、环境和遗传因素,因此系统研究起来极为困难。为了克服这些困难,用化学或经免疫修饰后半抗原免疫小鼠以诱导结肠炎症。在所有模型中,一些品系的小鼠表现更为敏感,提示 IBD 发生中遗传因素的重要作用。其中有一模型是基于结肠黏膜局部给予接触致敏剂三硝基苯磺酸(TNBS),首先在大鼠中获得成功[478],最近在小鼠也获成功[479,480]。结肠给予一次剂量的 TNBS(溶于 50%乙醇中)可诱导大鼠慢性末端结肠炎,可保持 2 个月以上[478],类似实验在小鼠也诱导了结肠炎[479,480]。接触致敏剂如 TNBS 是共价反应性化合物,可附于自身蛋白上,刺激对半抗原(TNP)修饰的自身抗原的 DTH 应答,此反应受多种功能性 $CD4^+$ T 细胞亚群复杂相互作

935 用的调节[481,482]。此模型用来比较 Th1 型细胞因子在刺激 IBD 发展或缓解疾病中的潜在作用。首次显示 TNBS 大肠炎小鼠的 T 细胞可产生 IL-2 和 IFN-γ(Th1 型细胞因子),IBD 损伤的原位分析表明 IFN-γ 生成增加[479]。用抗 IL-12 抗体免疫小鼠可显著降低 TNBS 诱导的大肠炎的严重程度[479]。

通过对 T 细胞的操作或基因靶向的细胞因子也可诱导小鼠慢性肠炎。TCR α 链敲除小鼠出现慢性肠炎,同时伴有肠相关细胞产生的 IFN-γ 增加[483,484]。研究表明,IL-2 敲除小鼠也可出现慢性肠炎,表现为异常 B 细胞应答,包括结肠自身抗体[485]。IL-10 敲除小鼠的小肠和大肠内均出现严重的灶性炎症,并且 Th1 细胞因子 IFN-γ 生成增加[486]。另一较完善的模型是将 $CD45RB_{Hi}$(未致敏)T 细胞过继性转移给 SCID 小鼠,随即出现大肠炎,表现为 IFN-γ 生成细胞——$CD4^+$ T 细胞扩增[487]。有趣的是,TGF-β 属于 $CD45RB_{Hi}$转移系统和 TNBS 大肠炎模型[488,489],提示 TGF-β 可下调黏膜炎症和诱导耐受。然而另一模型是将正常小鼠 T 细胞耗竭的骨髓过继性转移给 TCR 缺陷 CD3ε 转基因小鼠[490]。其他研究显示,$CD4^+$ $\alpha\beta^+$ 及可生成 IFN-γ 和 TNF-α 的 $\gamma\delta^+$ T 细胞均为这些 CD3ε 转基因小鼠结肠炎损害的特征[491]。因此,现有证据提示,T 细胞应答失调与鼠 IBD 有关,生成 IFN-γ 的 Th1 型细胞是主要的效应细胞群。这些效应 T 细胞可对自身抗原和肠内菌群产生应答,而通常情况下它们是耐受的[492]。各种 IBD 模型中 Th1 型失调的一个重要方面(因素)是耐受消除。

大肠炎的可遗传模型也成功在 C3H/HeJ 小鼠的 C3H/HeJBir 亚系中建立[493],这些小鼠生命早期可自动发生右侧为主并消退的大肠炎[493],这些小鼠对肠细菌抗原产生高滴度的 IgG 抗体,应答方式具有高度限制性。此外,C3H/HeJBir 小鼠的 $CD4^+$ T 细胞对肠细菌蛋白的细胞因子为 Th1 型。C3H/HeJBir 小鼠的细菌蛋白激活的 T 细胞继承性转移给 SCID 受体小鼠可诱导大肠炎,而经同样处理的 C3H/HeJ 小鼠转移时不会诱导大肠炎。目前正通过数量性状基因座作图(quantititative trait locu mapping)确定其相关基因。虽然对 IBD 的敏感性很可能是多基因的,此方法应能揭示引起疾病的基因。这些信息,与 T 细胞研究的资料综合起来揭示辅助性 Th1 型应答可用来开发治疗人 IBD 的治疗干预策略。

IgA 缺失

除了 AIDS,人 IgA 缺陷是最常见的免疫缺陷,欧洲人每 1000 人中就有 1.67 人会出现此缺陷。人免疫缺陷疾病在第 42 章有详述,在这里我们仅对此缺陷的突出特点和现有研究模型作一介绍。IgA 缺陷临床诊断依据是人血清中 IgA 少于 5mg%(50mg/ml),但几乎所有 IgA 缺陷患者显示他们的外分泌物中 S-IgA1 和 S-IgA2 缺失。因此,IgA 缺陷对黏膜和全身免疫均有影响,只有少数人仅表现为 IgA1 或 IgA2 亚型的缺陷。但是,约有 1/4 的 IgA 患者显示其他免疫异常,包括 T 细胞缺损和相关 IgG 亚型的缺陷[495]。

约有一半的 IgA 缺陷患者表现临床症状,包括黏膜部位和全身组织的感染。黏膜感染包括窦炎、中耳炎、支气管炎以及病毒性或细菌性肺炎[494,495]。IgA 缺陷中存在的其他呼吸性问题还有变态反应、窦炎、哮喘和湿疹[495],提示 S-IgA 抗体正常保护作用的丧失使得 IgE 型应答大为增强。IgA 缺陷时乳汁抗原产生的血清抗体频率更高[340],也提示正常 S-IgA 应答在保护机体免于环境抗原连续攻击中的作用。

虽然对 IgA 缺陷起因的可能机制有两种观点,但应强调的是此疾病的原因目前仍不清楚。简单地说,我们可以从 B 细胞水平、T 细胞水平或免疫调节异常(如 T 细胞或细胞因子)的观点来考虑 IgA 的缺失(图 27.5)。例如,$C_\alpha1/C_\alpha2$ 基因的缺失,不能转换成 IgA,或 IgA B 细胞末端分化缺乏均可能导致 IgA 缺陷(图 27.5)。基因水平,$C_\alpha1$ 和 $C_\alpha2$ 二者的缺失至少伴随 $C_\gamma2$、$C_\gamma3$ 和 C_ε 的缺失,尚未发现此串联缺陷的例子[496]。另一方面,$C_\alpha1$ 或 $C_\alpha2$ 基因很少出现的基因敲除已有报道[495],但这不是此疾病的原因。

较早研究提示 T 细胞可调节 IgA 型转换(Tsw),但最新研究显示 CD40L 或 CD40 分别与 T 和 B 细胞的相互作用早于生发中心同型转移启动的信号。当然,通过基因敲除出现 CD40L 或 CD40 的缺失可导致与 T/B 细胞相互作用的缺损,这些小鼠表现为抗原特异性 IgA 缺陷(图 27.5)。TGF-β 是 IgA 的主要转换因子,但是,在体内很难评价此细胞因子的作用,特别是 $TGF\text{-}\beta^{-/-}$ 小鼠在 3~5 周龄死亡,出现消耗性综合征和炎症性肺

病(肺炎)。对外部影响敏感的另一 B 细胞阶段为末端分化为浆细胞的过程(图 27.5)。显然,Th 细胞和细胞因子在此应答中具有中心重要性,重要的 Th 亚群和细胞因子如图 27.5 所示。

解释 IgA 缺陷的另一观点不包含 C_α 基因的缺失,$\mu \rightarrow \alpha$ 转换缺少或 IgA-定向 B 细胞没有发生最终分化,而是提出大量调节性细胞途径与正常黏膜 IgA 应答有关,中止多个位点可能导致 IgA 缺陷。通过基因敲除小鼠可对功能性黏膜 IgA 系统存在与否进行更系统的分析,结果显示黏膜 IgA 应答中的一些基因和产物,它们的缺失也会引起 IgA 缺陷。图 27.5 中,我们给出了共 12 种基因敲除情况所可能导致各种形式的 IgA 缺陷,从转换因子到 T 细胞缺陷,包括 T/B 细胞共同受体。此外,转换和 Th2 型细胞因子显示对 IgA 应答的显著影响。黏膜 IgA 缺陷的特异性质在原文中已有阐述,但是要指出的一般原则是黏膜 IgA 系统调节作用极为复杂,很多途径的破坏均可能导致 IgA 缺陷。

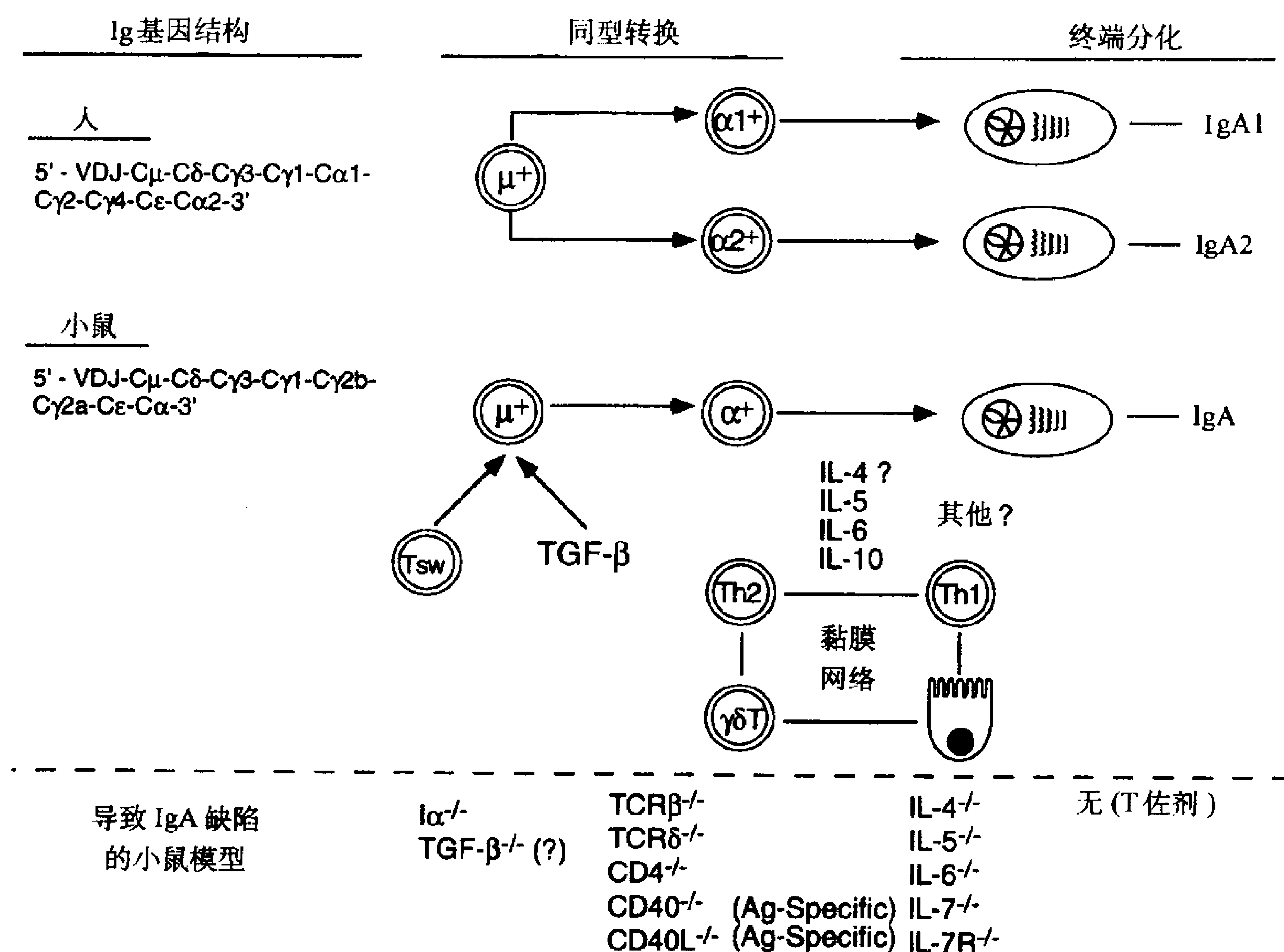


图 27.5 人和小鼠基因结构向 IgA 和 IgA 浆细胞形成的转换示意图。IgA 的生成可在多个步骤进行调节,包括 Tsw 细胞,开关细胞因子(TGF-β)和促进 IgA 合成的 Th 细胞亚群及细胞因子。在一组调查中,多种基因敲除小鼠显示黏膜 IgA 应答的损害或阻断。各基因敲除小鼠研究已在文中作了阐述。

摘要

高级哺乳动物的黏膜免疫系统以及其他脊椎动物相关形式由淋巴组织和黏膜相关细胞及效应分子组成的一个完整网络,共同完成对宿主的保护作用。主要效应分子有抗体(以 IgA 同型为主)、细胞因子、趋化因子及其受体,后者一般与内在的宿主因子如防卫素协同作用。此系统目的是发挥保护性免疫,但是,和全身性免疫系统一样,也易导致免疫性疾病,包括 IgA 缺陷、变态反应、过敏症和炎症。此外,免疫非应答性(免疫耐受)是黏膜免疫系统的主要特征之一,人为或天然免疫可有效引起黏膜诱导的耐受。黏膜免疫系统独特之处在于它可在黏膜接触抗原后,提供正向和负向信号以诱导和调节黏膜及全身部位的免疫应答。组织间通讯对黏膜免疫来说非常重要,淋巴细胞通过黏附分子识别毛细血管后微静脉细胞上表达的地址素发生归巢的模式,是黏膜免疫系统胃肠、泌尿生殖道和外分泌腺的各室腔相联系的主要途径之一。这些特点使黏膜与全身性免疫系统相区别。正如本章所述,胃肠外抗原诱导的外周免疫应答不会导致显著黏膜免疫,但是,黏膜免疫,如口服或经鼻给予抗原可诱导远处黏膜相关组织的抗原特异性 S-IgA 和 CTL 应答。此外,黏膜免疫

应答通常可同时引起全身淋巴组织内的细胞介导免疫和体液免疫。

致谢

我们感谢 D. Peter Burrows、Taeko Dohi、James Lillad、Mariarosaria Marinaro、Ichiro Takahashi、Shingo Yamamoto 及 John VanCott 提出宝贵的意见。我们同样要感谢 Wendy Jackson 在准备图片和编辑原稿中付出的努力。特别感谢 Kim Mcthee 对编辑工作的建议和帮助。作者实验室的研究得到了美国公共卫生服务基金 AI18958、DE09837、AI35344、AI35544、DE08228 和 DMID-NIAID、合约 AI65298 及 AI65299 的支持,同时还获得了日本教育、科学、体育、文化部和健康福利部基金的支持。

（管孝鞠 译）

参考文献

1. Conley ME, Delacroix DL, Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate systems of mucosal defense? *Ann Intern Med* 1987;106:892–899.
2. Pabst R. Is BALT a major component of the human lung immune system? *Immunol Today* 1992;13:119–122.
3. Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Massin N, Moulin JJ, Faure GC. Immunohistological analysis of macrophages, B-cells and T-cells in the mouse lung. *Anat Rec* 1994;239:150–157.
4. Sato A, Chida K, Iwata M, Hayakawa H. Study of bronchus-associated lymphoid tissues in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am Rev Res Dis* 1992;146: 473–478.
5. Sato A, Hayakawa H, Uchiyama H, Chida K. Cellular distribution of bronchus-associated lymphoid tissue in rheumatoid arthritis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1903–1907.
6. Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers, DM, et al. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today* 1992;13:219–224.
7. Bernstein JM. Mucosal immunology of the upper respiratory tract. *Respiration* 1992;59(suppl 3):3–13.
8. Bienenstock J, McDermott M, Befus D, O'Neill M. A common mucosal immunologic system involving the bronchus, breast and bowel. *Adv Exp Med Biol* 1978;107:53–59.
9. Mestecky J, McGhee JR. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol* 1987;40:153–245.
10. Farstad IN, Halstensen TS, Fausa O, Brandtzaeg P. Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches. *Immunology* 1994;83:457–464.
11. Bockman DE, Cooper MD. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Am J Anat* 1973;136:455–477.
12. Owen RL, Jones AL. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* 1974;66:189–203.
13. Wolf, JL, Bye WA. The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Annu Rev Med* 1984;35:95–112.
14. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl J-P. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 1996;86:345–348.
15. Gebert A, Rothkötter H-J, Pabst R. M cells in Peyer's patches of the intestine. *Intern Rev Cytol* 1996;167:91–159.
16. Ermak TH, Dougherty EP, Bhagat HR, Kabok Z, Pappo J. Uptake and transport of copolymer biodegradable microspheres by rabbit Peyer's patch M cells. *Cell Tissue Res* 1995;279:433–436.
17. Allan CH, Mendrick DL, Trier JS. Rat intestinal M cells contain acidic endosomal-lysosomal compartments and express class II major histocompatibility complex determinants. *Gastroenterology* 1993;104:698–708.
18. Jones BD, Ghori N, Falkow S. Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 1994;180:15–23.
19. Wolf JL, Rubin, DH, Finberg R, et al. Intestinal M cells: a pathway for entry of reovirus into the host. *Science* 1981;212:471–472.
20. Nibert ML. Furlong DB, Fields BN. Mechanisms of viral pathogenesis. Distinct forms of reoviruses and their roles during replication in cells and host. *J Clin Invest* 1991;88:727–734.
21. Sminia T, van der Ende MB. Macrophage subsets in the rat gut: an immunohistochemical and enzyme-histochemical study. *Acta Histochem* 1991;90:43–50.
22. Kelsall BL, Strober W. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med* 1996;183:237–247.
23. Lebman DA, Griffin PM, Cebra JJ. Relationship between expression of IgA by Peyer's patch cells and functional IgA memory cells. *J Exp Med* 1987;166: 1405–1418.
24. Butcher EC, Rouse RV, Coffman RL, Nottenburg CN, Hardy RR, Weissman IL. Surface phenotype of Peyer's patches germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B-cell differentiation. *J Immunol* 1982;129:2698–2707.
25. George A, Cebra, JJ. Responses of single germinal-center B cells in T-cell-dependent microculture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:11–15.
26. Weinstein PD, Cebra JJ. The preference for switching to IgA expression by Peyer's patch germinal center B cells is likely due to the intrinsic influence of their microenvironment. *J Immunol* 1991;147:4126–4135.
27. Weinstein PD, Schweitzer PA, Cebra-Thomas JA, Cebra JJ. Molecular genetic features reflecting the preference for isotype switching to IgA expression by Peyer's patch germinal center B cells. *Intern Immunol* 1991;3:1253–1263.
28. Kiyono H, McGhee JR, Wannemuehler MJ, et al. *In vitro* immune responses to a T cell-dependent antigen by cultures of disassociated murine Peyer's patch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:596–600.
29. London SD, Rubin DH, Cebra JJ. Gut mucosal immunization with reovirus serotype 1/L stimulates specific cytotoxic T-cell precursors as well as IgA memory cells in Peyer's patches. *J Exp Med* 1987;165:830–844.
30. London SD, Cebra-Thomas JA, Rubin DH, Cebra JJ. CD8 lymphocyte subpopulations in Peyer's patches induced by reovirus serotype 1 infection. *J Immunol* 1990;144:3187–3194.
31. Owen RL, Nemanic P. Antigen processing structures of the mammalian tract: an SEM study of lymphoepithelial organs. *Scanning Electron Microscopy* 1978;2: 367–378.
32. Oláh I, Surján L, Toro I. Electronmicroscopic observations on the antigen reception in the tonsillar tissue. *Acta Biol Acad Sci Hun* 1972;23:61–93.
33. Williams DM, Rowland AC. The palatine tonsil of the pig—an afferent route to the lymphoid tissue. *J Anat* 1972;113:131–137.
34. Finzi G, Cornaggia M, Capella C, et al. Cathepsin E in follicle associated epithelium of intestine and tonsils: localization to M cells and possible role in antigen processing. *Histochemistry* 1993;99:201–211.
35. Gebert A, Identification of M-cells in the rabbit tonsil by vimentin immunohistochemistry and *in vivo* protein transport. *Histochem Cell Biol* 1995;104:211–220.
36. Brandtzaeg P, Surjan L Jr, Berdal P. Immunoglobulin systems of human tonsils. I. Control subjects of various ages: quantification of Ig-producing cells, tonsillar morphometry and serum Ig concentrations. *Clin Exp Immunol* 1978;31:367–381.
37. Asanuma H, Inaba Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S. Characterization of mouse nasal lymphocytes isolated by enzymatic extraction with collagenase. *J Immunol Methods* 1995;187:41–51.
38. Wu HY, Nikolova EB, Beagley KW, Russell MW. Induction of antibody-secreting cells and T-helper and memory cells in murine nasal lymphoid tissue. *Immunology* 1996;88:493–500.
39. Hiroi T, Iwatani K, Ijima H, Kodama S, Yanagita M, Kiyono H. Nasal immune system: Distinctive Th0 and Th1/Th2-type environments in murine nasal-associated lymphoid tissues (NALT) and nasal passages, 1998 (*submitted for publication*).
40. Mair TS, Batten EH, Stokes CR, Bourne FJ. The histological features of the immune system of the equine respiratory tract. *J Comp Pathol* 1987;97:575–586.
41. Kiyono H, McGhee JR, eds. Mucosal immunology: intraepithelial lymphocytes. *Adv Host Defense Mechanisms* 1994;9:1–204.
42. Kilian M, Russell MW, Function of mucosal immunoglobulins. In: Ogra PL, et al., eds. *Handbook of mucosal immunology.* San Diego: Academic Press, 1994: 127–137.
43. London SD, Cytotoxic lymphocytes in mucosal effector sites. In: Ogra PL, et al., eds. *Handbook of mucosal immunology.* San Diego: Academic Press, 1994:

325–332.

44. McGhee JR, Mestecky J, Elson CO, Kiyono H. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J Clin Immunol* 1989;9:175–199.
45. Staats HF, Jackson RJ, Marinaro M, Takahashi I, Kiyono H, McGhee JR. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Curr Opin Immunol* 1994;6:572–583.
46. Brandtzaeg P, Distribution and characterization of mucosal immunoglobulin-producing cells. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, et al., eds. *Handbook of mucosal immunology.* San Diego: Academic Press, 1994:251–262.
47. James SP, Fiocchi C, Graeff AS, Strober W, Phenotypic analysis of lamina propria lymphocytes. Predominance of helper-inducer and cytolytic T-cell phenotypes and deficiency of suppressor-inducer phenotypes in Crohn's disease and control patients. *Gastroenterology* 1986;91:1483–1489.
48. Abreu-Martin, MT, Targan SR. Lamina propria lymphocytes: a unique population of mucosal lymphocytes. In: Kagnoff MF, Kiyono H, eds. *Essentials of mucosal immunology.* San Diego: Academic Press, 1996:227–245.
49. Mayer L, Shlien R, Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J Exp Med* 1987;166:1471–1483.
50. Miller CJ, McChesney JM, Moore PF. Langerhans cells, macrophages and lymphocyte subsets in the cervix and vagina of rhesus macaques. *Lab Invest* 1992;67:628–634.
51. Edwards JNT, Morris HB. Langerhans cells and lymphocyte subsets in the female genital tract. *Br J Obstet Gynecol* 1985;92:974–980.
52. Taguchi T, McGhee JR, Coffman RL, et al. Analysis of Th1 and Th2 cells in murine gut-associated tissues. Frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ T cells that secrete IFN-γ and IL-5. *J Immunol* 1990;145:68–77.
53. Weinberg AD, English M, Swain SL. Distinct regulation of lymphokine production is found in fresh versus *in vitro* primed murine helper T cells. *J Immunol* 1990;144:1800–1807.
54. Powers GD, Abbas AK, Miller RA. Frequencies of IL-2 and IL-4–secreting T cells in naive and antigen-stimulated lymphocyte populations. *J Immunol* 1988;140:3352–3357.
55. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of Th1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 1993;260:547–549.
56. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:251–276.
57. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:827–845.
58. Chan SH, Perussia B, Gupta JW, et al. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 1991;173:869–879.
59. Snapper CM, Paul WE. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987;236:944–947.
60. Yoshimoto T, Paul WE, CD4^{Pos} NK1.1^{Pos} T cells promptly produce interleukin-4 in response to *in vivo* challenge with anti-CD3. *J Exp Med* 1994;179:1285–1295.
61. Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE. Role of NK1.1⁺ T cells in a Th2 response and in immunoglobulin E production. *Science* 1995;270:1845–1847.
62. Arase H, Arase N, Nagawa K, Good RA, Onoe K. NK1.1⁺ CD4⁺ CD8⁺ thymocytes with specific lymphokine secretion. *Eur J Immunol* 1993;23:307–310.
63. Seder RA. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:1195–1202.
64. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145–173.
65. Coffman RL, Varkila K, Scott P, Chatelain R, Role of cytokines in the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets *in vivo. Immunol Rev* 1991;123:189–207.
66. Coffman RL, Seymour BW, Lebman DA, et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 1988;102:5–28.
67. Esser C, Radbruch A. Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Annu Rev Immunol* 1990;8:717–735.
68. Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, et al. Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 1990;8:303–333.
69. Kiyono H, McGhee JR, Mosteller LM, et al. Murine Peyer's patch T-cell clones: characterization of antigen-specific helper T cells for immunoglobulin A responses. *J Exp Med* 1982;156:1115–1130.
70. Kiyono H, Cooper MD, Kearney JF, et al. Isotype-specificity of helper T cell clones: Peyer's patch Th cells preferentially collaborate with mature IgA B cells for IgA responses. *J Exp Med* 1984;159:798–811.
71. VanCott JL, Staats HF, Pascual PW, et al. Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T helper cell subsets, macrophages and derived cytokines following oral immunization with live recombinant *Salmonella. J Immunol* 1996;156:1504–1514.
72. Tonkonogy SL, Swain SL. Distinct lymphokine production by CD4⁻ T cells isolated from mucosal and systemic lymphoid organs. *Immunology* 1993;80:574–580.
73. Xu-Amano J, Aicher WK, Taguchi T, Kiyono H, McGhee JR. Selective induction of Th2 cells in murine Peyer's patches by oral immunization. *Intern Immunol* 1992;4:433–445.
74. Spalding DM, Williamson SI, Koopman WJ, McGhee JR. Preferential induction of polyclonal IgA secretion by murine Peyer's patch dendritic cell–T cell mixtures. *J Exp Med* 1984;160:941–946.
75. Mayer L, Kwan SP, Thompson C, et al. Evidence for a defect in "switch" T cell in patients with immunodeficiency and hyperimmunoglobulinemia, M. *N Engl J Med* 1986;314:409–413.
76. Benson EB, Strober W. Regulation of IgA secretion by T cell clones derived from the human gastrointestinal tract. *J Immunol* 1988;140:1874–1882.
77. Kiyono H, Mosteller-Barnum LM, Pitts AM, Williamson SI, Michalek SM, McGhee JR. Isotype-specific immunoregulation: IgA-binding factors produced by Fcα receptor⁺ T cell hybridomas regulate IgA responses. *J Exp Med* 1985;161:731–747.
78. Beagley KW, Eldridge JH, Kiyono H, McGhee JR. The identification of murine Peyer's patch T cell-derived factors which enhance IgA isotype-specific responses. *Adv Exp Med Biol* 1988;237:641–647.
79. Coffman RL, Shrader B, Carty J, Mosmann TR, Bond MW. A mouse T cell product that preferentially enhances IgA production. I. Biologic characterization. *J Immunol* 1987;139:3685–3690.
80. Harriman GR, Kunimoto DY, Elliot JF, Paetkau V, Strober W. The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *J Immunol* 1988;140:3033–3039.
81. Beagley KW, Eldridge JH, Kiyono H, et al. Recombinant murine IL-5 induces high rate IgA synthesis in cycling IgA-positive Peyer's patch B cells. *J Immunol* 1988;141:2035–2042.
82. Murray PD, McKenzie DT, Swain SL, Kagnoff MF. Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J Immunol* 1987;139:2669–2674.
83. Lebman DA, Coffman RL. The effects of IL-4 and IL-5 on the IgA response by murine Peyer's patch B cell subpopulations. *J Immunol* 1988;141:2050–2056.
84. Sonoda E, Matsumoto R, Hitoshi Y, et al. Transforming growth factor β induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J Exp Med* 1989;170:1415–1420.
85. Kroese FG, Butcher EC, Stall AM, Lalor PA, Adams S, Herzenberg LA. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Intern Immunol* 1989;1:75–84.
86. Beagley KW, Black CA, Dunkley ML, McGhee JR. Regulation of mucosal immunity. In: Snapper CM, ed. *Cytokine regulation of humoral immunity: basic and clinical aspects.* New York: John Wiley and Sons, 1996:391–408.
87. Benson EM, Bertolini JN, Brodtmann ME. T cell regulation of immunoglobulin isotypes in health and disease. *J Pediatr Infect Dis* 1990;9:525.
88. Beagley KW, Eldridge JH, Lee F, et al. Interleukins and IgA synthesis. Human and murine IL-6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *J Exp Med* 1989;169:2133–2148.
89. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, et al. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses *in vivo. Science* 1994;264:561–563.
90. Bromander AK, Ekman L, Kopf M, Nedrud JG, Lycke NY. IL-6–deficient mice exhibit normal mucosal IgA responses to local immunizations and *Helicobacter felis* infection. *J Immunol* 1996;156:4290–4297.
91. Fujihashi K, McGhee JR, Lue C, et al. Human appendix B cells naturally express receptors for and respond to interleukin 6 with selective IgA1 and IgA2 synthesis. *J Clin Invest* 1991;88:248–252.
92. Briere F, Bridon JM, Chevet D, et al., Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *J Clin Invest* 1994;94:97–104.
93. Nonoyama S, Farrington M, Ishida H, Howard M, Ochs HD. Activated B cells from patients with common variable immunodeficiency proliferate and synthesize immunoglobulin. *J Clin Invest* 1993;92:1282–1287.
94. DeFrance T, Vanbervliet B, Briere F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med* 1992;175:671–682.
95. Lebman DA, Lee FD, Coffman RL. Mechanism for transforming growth factor β and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures. *J Immunol* 1990;144:952–959.
96. Youngman KR, Fiocchi C, Kaetzel CS. Inhibition of IFN-γ activity in supernatants from stimulated human intestinal mononuclear cells prevents up-regulation of the polymeric Ig receptor in an intestinal epithelial cell line. *J Immunol* 1994;153:675–681.
97. Morokata T, Kato T, Igarashi O, Nariuchi H, Mechanism of enhanced antigen presentation by B cells activated with anti-μ plus interferon-γ: role of B7-2 in the activation of naive and memory CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 1995;25:1992–1998.
98. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activated differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995;80:707–718.
99. Hörnqvist E, Goldschmidt TJ, Holmdahl R, Lycke N. Host defense against cholera toxin is strongly CD4⁺ T cell dependent. *Infect Immun* 1991;59:3630–3638.
100. Mega J, Bruce MG, Beagley KW, et al. Regulation of mucosal responses by CD4⁺ T lymphocytes: effects of anti-L3T4 treatment on the gastrointestinal immune system. *Intern Immunol* 1991;3:793–805.
101. Hörnquist CE, Ekman L, Grdic KD, Schön K, Lycke NY. Paradoxical IgA immunity in CD4-deficient mice. Lack of cholera toxin-specific protective immunity despite normal gut mucosal IgA differentiation. *J Immunol 1995;155:*

2877–2887.
102. Snapper CM, Paul WE. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987;236:944–947.
103. Gajewski TF, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-γ in immune regulation. I. IFN-γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 1988;140:4245–4252.
104. Golding B. Cytokine regulation of humoral immune responses. *Top Vaccine Adjuvant Res* 1991;25:37.
105. Xu-Amano J, Kiyono H, Jackson RJ, et al. Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J Exp Med* 1993;178:1309–1320.
106. Marinaro M, Staats HF, Hiroi T, et al. Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4. *J Immunol* 1995;155:4621–4629.
107. Snider DP, Marshall JS, Perdue MH, Liang H. Production of IgE antibody and allergic sensitization of intestinal and peripheral tissues after oral immunization with protein Ag and cholera toxin. *J Immunol* 1994;153:647–657.
108. Wilson AD. Bailey M, Williams NA, Stokes CR. The *in vitro* production of cytokines by mucosal lymphocytes immunized by oral administration of keyhole limpet hemocyanin using cholera toxin as an adjuvant. *Eur J Immunol* 1991;21: 2333–2339.
109. Walker RI, Clements JD. Use of heat-labile toxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* to facilitate mucosal immunization. *Vaccine Res* 1993;2:1.
110. Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 1992;56:622–647.
111. Takahashi I, Marinaro M, Kiyono H, et al. Mechanisms for mucosal immunogenicity and adjuvant of *Escherichia coli* labile enterotoxin. *J Infect Dis* 1996: 173:627–635.
112. Kawanishi H, Saltzman L, Strober W. Mechanisms regulating IgA class-specific immunoglobulin production in murine gut-associated lymphoid tissues. I. T cells derived from Peyer's patches that switch sIgM B cells to SIgA B cells *in vitro*. *J Exp Med* 1983;157:433–450.
113. Kawanishi H, Saltzman L, Strober W. Mechanisms regulating IgA class-specific immunoglobulin production in murine gut-associated lymphoid tissues. II. Terminal differentiation of postswitch sIgA-bearing Peyer's patch B cells. *J Exp Med* 1983;158:649–669.
114. Kawanishi H, Ozato K, Strober W. The profilerative response of cloned Peyer's patch switch T cells to syngeneic and allogenic stimuli. *J Immunol* 1985;134: 3586–3591.
115. Fuleihan R, Ramesh N, Geha RS. Role of CD40-CD40-ligand interaction in Ig-isotype switching. *Curr Opin Immunol* 1993;5:963–967.
116. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 1994;12:881–922.
117. MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994;12:117–139.
118. Weinstein PD, Cebra JJ. The preference for switching to IgA expression by Peyer's patch germinal center B cells is likely due to the intrinsic influence of their microenvironment. *J Immunol* 1991;147:4126–4135.
119. Spalding DM, Griffin JA. Different pathways of differentiation of pre-B cell lines are induced by dendritic cells and T cells from different lymphoid tissues. *Cell* 1986;44:507–519.
120. Mayer L, Posnett DN, Kunkel HG. Human-malignant T cells capable of inducing an immunoglobulin class switch. *J Exp Med* 1985;161:134–144.
121. Isakson PC, Pure E, Vitetta ES, Krammer PH. T cell-derived B cell differentiation factor(s). Effect on the isotype switch of murine B cells. *J Exp Med* 1982; 155:734–748.
122. Coffman RL, Seymour BW, Lebman DA, et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 1988;102:5–28.
123. Jung S, Rajewsky K, Radbruch A. Shutdown of class switch recombinant by deletion of a switch region control element. *Science* 1993;259:984–989.
124. Xu L, Groham B, Li SC, Bottaro A, Alt FW, Rothman P. Replacement of germ-line E promoter by gene targeting alters control of immunoglobulin heavy chain class switching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3705–3709.
125. Zhang J, Bottaro A, Li S, Stewart V, Alt FW. A selective defect in IgG2b switching as a result of targeted mutation of the I gamma 2b promoter and exon. *EMBO J* 1993;12:3529–3537.
126. Bottaro A, Lansford R, Xu L, Zhang J, Rothman P, Alt FW. S region transcription per se promotes basal IgE class switch recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *EMBO J* 1994;13:665–674.
127. Harriman GR, Bradley A, Das S, Rogers-Fani P, Davis AC. IgA class switch in Ia exon-deficient mice. Role of germline transcription in class switch recombination. *J Clin Invest* 1996;97:477–485.
128. Snapper CM, McIntyre TM, Mandler R, et al. Induction of IgG3 secretion of interferon g: A model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *J Exp Med* 1992;175:1367–1371.
129. Coffman RL, Lebman DA, Schrader B. Transforming growth factor β specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:1039–1044.
130. Lebman DA, Nomura DY, Coffman RL, Lee FD. Molecular characterization of germ-line immunoglobulin A transcripts produced during transforming growth factor type β–induced isotype switching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87: 3962–3966.
131. Lebman DA, Lee FD, Coffman RL. Mechanism for transforming growth factor β and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures. *J Immunol* 1990;144:952–959.
132. Islam KB, Nilsson L, Sideras P, Hammarstrom L, Smith CI. TGF-β1 induces germ-line transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes. *Intern Immunol* 1991;3:1099–1106.
133. Nilsson L, Islam KB, Olafsson O, et al. Structure of TGF-β1-induced human *immunoglobulin Ca1 and Ca2 germ-line transcripts.* Intern Immunol 1991;3: 1107–1115.
134. Stavnezer J. Regulation of antibody production and class switching by TGF-β. *J Immunol* 1995;155:1647–1651.
135. Rousset F, Garcia E, Banchereau J. Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. *J Exp Med* 1991;173:705–710.
136. McIntyre TM, Kehry MR, Snapper CM. Novel *in vitro* model for high-rate IgA class switching. *J Immunol* 1995;154:3156–3161.
137. Borkowski TA, Letterio JJ, Farr AG, Udey MC. A role for endogenous transforming growth factor β1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor β1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1996;184:2417–2422.
138. Cambier JC, Pleimar CM, Clark MR. Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors. *Annu Rev Immunol* 1994;12:457–486.
139. Chan AC, Desai DM, Weiss A. The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1994;12:555–592.
140. Cantrell D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 1996;14:259–274.
141. Langman RE, Cohn M. Terra firma: a retreat from "danger." *J Immunol* 1996;157:4273–4276.
142. June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994;15:321–331.
143. Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993;11:191–212.
144. Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 1992;71:1065–1068.
145. Allison JP. CD28-B7 interaction in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:414–419.
146. Freeman GJ, Freedman AS, Segil JM, Lee G, Whitman JF, Nadler LM. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J Immunol* 1989;143:2714–2722.
147. Azuma M, Ito D, Yagita H, et al. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 1993;366:76–79.
148. Freeman GJ, Borriello F, Hodes RJ, et al. Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7-deficient mice. *Science* 1993;262:907–909.
149. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 1993;262: 909–911.
150. Reiser H, Freeman GJ, Razi-Wolf Z, Gimmi CD, Benacerraf B, Nadler LM. Murine B7 antigen provides an efficient costimulatory signal for activation of murine T lymphocytes via the T-cell receptor/CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:271–275.
151. Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, Daley J, Gray G, Nadler LM. Activated human B lymphocytes express three CTLA-4 counterreceptors that costimulate T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:11059–11063.
152. Linsley PS, Greene JL, Tan P, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1992;176: 1595–1604.
153. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233–258.
154. Metlay JP, Pure E, Steinman RM. Distinct features of dendritic cells and anti-Ig activated B cells as stimulators of the primary mixed leukocyte reaction. *J Exp Med* 1989;169:239–254.
155. Lassila O, Vainio O, Matzinger P. Can B cells turn on virgin T cells? *Nature* 1988;334:253–255.
156. Larsen CP, Ritchie SC, Hendrix R, et al. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J Immunol* 1994;152:5208–5219.
157. Freedman AS, Freeman GJ, Rhynhart K, Nadler LM. Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. *Cell Immunol* 1991;137: 429–437.
158. Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* 1994;180:631–640.
159. Stack RM, Lenschow DJ, Gray GS, Bluestone JA, Fitch FW. IL-4 treatment of small splenic B cells induces costimulatory molecules B7-1 and B7-2. *J Immunol* 1994;152:5723–5733.
160. Weaver CT, Hawrylowicz CM, Unanue ER. T helper subsets require the expression of distinct costimulatory signals by antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad*

Sci U S A 1988;85:8181–8185.
161. Magilavy DB, Fitch FW, Gajewski TF. Murine hepatic accessory cells support the proliferation of Th1 but not Th2 helper T lymphocyte clones. *J Exp Med* 1989;170:985–990.
162. Fabry Z, Sandor M, Gajewski TF, et al. Different activation of Th1 and Th2 CD4+ cells by murine brain microvessel endothelial cells and smooth muscle/pericytes. *J Immunol* 1993;151:38–47.
163. Fox BS. Antigen presenting cell-derived co-stimulatory signals can selectively regulate IL-2 and IL-4 production from a Th0 cell hybridoma. *Int Immunol* 1993;5:323–330.
164. Goodman RE, Nestle F, Naidu YM, et al. Keratinocyte-derived T cell costimulation induces preferential production of IL-2 and IL-4 but not IFN-gamma. *J Immunol* 1994;152:5189–5198.
165. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787–793.
166. Seder RA, Germain RN, Linsley PS, Paul WE. CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interleukin gamma production. *J Exp Med* 1994;179:299–304.
167. McKnight AJ, Perez VL, Shea CM, Gray GS, Abbas AK. Costimulator dependence of lymphokine secretion by naive and activated CD4+ lymphocytes from TCR transgenic mice. *J Immunol* 1994;152:5220–5225.
168. Tan P, Anasetti C, Hansen JA, et al. Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med* 1993;177:165–173.
169. Levine BL, Ueda Y, Craighead N, Huang ML, June CH. CD28 ligands CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) induce long-term autocrine growth of CD4+ T cells and induce similar patterns of cytokine secretion *in vitro*. *Int Immunol* 1995;7: 891–904.
170. Harris N, Peach R, Naemura J, Linsley PS, LeGros G, Ronchese F. CD80 costimulation is essential for the induction of airway eosinophilia. *J Exp Med* 1997; 185:177–182.
171. Corry DB, Reiner SL, Linsley PS, Locksley RM. Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1994;153:4142–4148.
172. Lu P, Zhou X, Chen SJ, et al. CTLA-4 ligands are required to induce an *in vivo* interleukin 4 response to a gastrointestinal nematode parasite. *J Exp Med* 1994;180:693 698.
173. Rulifson IC, Sperling AI, Fields PE, Fitch FW, Bluestone JA. CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J Immunol* 1997;158:658–665.
174. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 1994;12:881–922.
175. Kansas GS, Tedder TF. Transmembrane signals generated through MHC Class II, CD19, CD20, CD39, and CD40 antigens induce LFA-1-dependent and independent adhesion in human B cells through a tyrosine kinase-dependent pathway. *J Immunol* 1991;147:4094–4102.
176. Gordon J, Millsum MJ, Guy GR, Ledbetter JA. Synergistic interaction between interleukin 4 and anti-Bp50 (CDw40) revealed in a novel B cell restimulation assay. *Eur J Immunol* 1987;17:1535 1538.
177. Gordon J, Millsum MJ, Guy GR, Ledbetter JA. Resting B lymphocytes can be triggered directly through the CDw40 (Bp50) antigen. A comparison with IL-4 mediated signaling. *J Immunol* 1988;140:1425–1430.
178. Rousset F, Garcia E, Banchereau J. Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. *J Exp Med* 1991;173:705–710.
179. Marrack P, Kappler J. The T cell receptor. *Science* 1987;238:1073–1079.
180. Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis *in vivo*. *Annu Rev Immunol* 1996;14:207–232.
181. Ernst PB, Befus AD, Bienenstock J. Leukocytes in the intestinal epithelium: An unusual immunologic compartment. *Immunol Today* 1985;6:50.
182. Lefrancois L, Goodman T. *in vivo* modulation of cytolytic activity and Thy-1 expression in TCR-$\gamma\delta^+$ intraepithelial lymphocytes. *Science* 1989;243:1716–1718.
183. Guy-Grand D, Malassis-Seris M, Briottet C, Vassalli P. Cytotoxic differentiation of mouse gut thymodependent and independent intraepithelial T lymphocytes is induced locally. Correlation between functional assays, presence of perforin and granzyme transcripts and cytoplasmic granules. *J Exp Med* 1991;173:1549–1552.
184. Viney JL, Kilshaw PL, MacDonald TT. Cytotoxic $\alpha\beta^+$ and $\gamma\delta^-$ T cells in murine intestinal epithelium. *Eur J Immunol* 1990;20:1623–1626.
185. Kägi D, Ledermann B, Bürki K, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994;369: 31–37.
186. Walsh CM, Matloubian M, Liu C-C, Ueda R, Kurahara CG, Clark WR. Immune functions in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91: 10854–10858.
187. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993;74:845–853.
188. Croitoru K, Ernst PB. Intraepithelial lymphocyte lineage and function. The interactions between the intestinal epithelium and the intraepithelial lymphocyte. In: Kigono H, McGhee JR, eds. *Advances in host defense mechanisms* 1997;9: 79–88.
189. Davies MD, Parrott DM. Cytotoxic T cells in small intestine epithelial, lamina propria and lung lymphocytes. *Immunology* 1981;44:367–371.
190. Guy-Grand D, Griscelli C, Vassalli P. The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell: nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. *J Exp Med* 1978;148:1661–1677.
191. MacDermott RP, Franklin GO, Jenkins KM, Kodner IJ, Nash GS, Weinrieb IJ. Human intestinal mononuclear cells. 1. Investigation of antibody-dependent, lectin-induced and spontaneous cell-mediated cytotoxic capabilities. *Gastroenterology* 1980;78:47–56.
192. Nauss KM, Pavlina TM, Kumar V, Newberne PM. Functional characteristics of lymphocytes isolated from the rat large intestine. Responses to T-cell mitogen and natural killer cell activity. *Gastroenterology* 1984;86:468–475.
193. Tagliabue A, Luini W, Soldateschi D, Boraschi D. Natural killer activity of gut mucosal lymphoid cells in mice. *Eur J Immunol* 1981;11:919–922.
194. Neutra MR, Kraehenbuhl J-P. Cellular and molecular basis for antigen transportation in the intestinal epithelium. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, et al., eds. *Handbook of mucosal immunology*. San Diego: Academic Press, 1994:27–39.
195. Nibert ML, Furlong DB, Fields BN. Mechanisms for viral pathogenesis. Distant forms of reoviruses and their roles during replication in cells and host. *J Clin Invest* 1991;88:727–734.
196. Wolf JL, Rubin DH, Finberg R, et al. Intestinal M cells: a pathway for entry of reovirus into the host. *Science* 1981;212:471–472.
197. Morin MJ, Warner A, Fields BN. A pathway for entry of reoviruses into the host through M cells of the respiratory tract. *J Exp Med* 1994;180:1523–1527.
198. London SD, Rubin DH, Cebra JJ. Gut mucosal immunization with reovirus serotype 1/L stimulates virus-specific cytotoxic T cell precursors as well as IgA memory cells in Peyer's patches. *J Exp Med* 1987;165:830–847.
199. Offit PA, Cunningham SL, Dudzik KI. Memory and distribution of virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and CTL precursors after rotavirus infection. *J Virol* 1991;65:1318–1324.
200. London SD, Cebra-Thomas JA, Rubin DH, Cebra JJ. CD8 lymphocyte subpopulations in Peyer's patches induced by reovirus serotype 1 infection. *J Immunol* 1990;144:3187–3194.
201. Issekutz TB. The response of gut-associated T lymphocytes to intestinal viral immunization. *J Immunol* 1984;133:2955–2960.
202. Offit PA, Dudzik KI. Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes appear at the intestinal mucosal surface after rotavirus infection. *J Virol* 1989;63:3507–3512.
203. Cebra JJ, Cuff CF, Rubin DH. Relationship between alpha/beta T cell receptor/CD8+ precursors for cytotoxic T lymphocytes in the murine Peyer's patches and the intraepithelial compartment probed by oral infection with reovirus. *Immunol Res* 1991;10:321–323.
204. George A, Kost SI, Witzleben CL, Cebra JJ, Rubin DH. Reovirus-induced liver disease in severe combined immunodeficient (SCID) mice. A model for the study of viral infection, pathogenesis, and clearance. *J Exp Med* 1990;171:929–934.
205. Cuff CF, Cebra CK, Rubin DH, Cebra JJ, Developmental relationship between cytotoxic α/β T cell receptor-positive intraepithelial lymphocytes and Peyer's patch lymphocytes. *Eur J Immunol* 1993;23:1333–1339.
206. Offit PA, Dudzik KI, Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes passively protect against gastroenteritis in suckling mice. *J Virol* 1990;64:6325–6328.
207. Dharakul T, Labbe M, Cohen J, et al. Immunization with baculovirus-expressed recombinant rotavirus proteins VP1, VP4, VP6 and VP7 induces CD8− T lymphocytes that mediate clearance of chronic rotavirus infection in SCID mice. *J Virol* 1991;65:5928–5932.
208. Franco MA, Greenberg HB. Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *J Virol* 1995;69: 7800–7806.
209. Franco MA, Tin C, Rott LS, VanCott JL, McGhee JR, Greenberg HB. Evidence for CD8− T cell immunity to murine rotavirus in the absence of perofrin, fas and gamma interferon. *J Virol* 1997;71:479–486.
210. Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science* 1996;272:104–107.
211. Allan W, Tabi Z, Cleary A, Doherty PC. Cellular events in the lymph node and lung of mice with influenza. Consequences of depleting CD4+ T cell. *J Immunol* 1990;144:3980–3986.
212. Eichelberger M, Allan W, Zijlstra M, Jaenisch R, Doherty PC. Clearance of influenza virus respiratory infection in mice lacking class I major histocompatibility complex-restricted CD8− T cells. *J Exp Med* 1991;174:875–880.
213. Carding SR, Allan W, Kyes S, Hayday A, Bottomly K, Doherty PC. Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by γ/δ^- T cells. *J Exp Med* 1990;172:1225–1231.
214. Muñoz JL, McCarthy CA, Clark ME, Hall CB, Respiratory syncytial virus infection in C57BL/6 mice: clearance of virus from the lungs with virus-specific cytotoxic T cells. *J Virol* 1991;65:4494–4497.
215. Nicholas JA, Rubino KL, Levely ME, Meyer AL, Collins PL. Cytotoxic T cell activity against the 22-kDa protein of human respiratory syncytial virus (RSV) is associated with a significant reduction in pulmonary RSV replication. *Virology* 1991;182:664–672.
216. Graham BS, Bunton LA, Wright PF, Karzon DT. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J Clin Invest* 1991;88:1026–1033.
217. Graham BS, Henderson GS, Tang Y-W, Lu X, Neuzil KM, Colley DG. Priming

immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus. *J Immunol* 1993;151: 2032–2040.

218. Miller CJ, Alexander NJ, Sutjipto S, et al. Genital mucosal transmission of simian immunodeficiency virus: animal model for heterosexual transmission of human immunodeficiency virus. *J Virol* 1989;63:4277–4284.
219. Miller CJ, Alexander NJ, Sutjipto S, et al. Effect of virus dose and nonoxynol-9 on the genital transmission of SIV in rhesus macaques. *J Med Primatol* 1990;19: 401–409.
220. Marx PA, Compans RW, Gettie A, et al. Protection against vaginal SIV transmission with microencapsulated vaccine. *Science* 1993;260:1323–1327.
221. Lohman BL, Miller CJ, McChesney MB. Antiviral cytotoxic T lymphocytes in the vaginal mucosa of simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Immunol* 1995;155:5855–5860.
222. Miller CJ, McChesney MB, Lü X, et al. Rhesus macaques previously infected with simian/human immunodeficiency virus are protected from vaginal challenge with pathogenic SIV_{mac}239. *J Virol* 1997;71:1911–1921.
223. Miller CJ. Mucosal transmission of SIV. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 188:107–122.
224. Porgador A, Staats HF, Faiola B, Gilboa E, Palker TJ. Intranasal immunization with CTL epitope peptides from HIV-1 or ovalbumin and the mucosal adjuvant cholera toxin induces peptide-specific CTLs and protection against tumor development *in vivo*. *J Immunol* 1997;158:834–841.
225. Aggarwal A, Kumar S, Jaffe R, Hone D, Gross M, Sadoff J. Oral *Salmonella*: circumsporozoite recombinants induce specific CD8+ cytotoxic T cells. *J Exp Med* 1990;172:1083–1090.
226. Khan IA, Ely KH, Kasper LH. A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol* 1991;147:3501–3506.
227. Hakim FT, Gazzinelli RT, Denkers E, Hieny S, Shearer GM, Sher A. CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. *J Immunol* 1991;147:2310–2316.
228. Ksander BR, Streilein JW. Failure of infiltrating precursor cytotoxic T cells to acquire direct cytotoxic function in immunologically privileged sites. *J Immunol* 1990;145:2057–2063.
229. Podolsky DK. Oligosaccharide structure of isolated human colonic mucin species. *J Biol Chem* 1985;260:15510–15515.
230. Sanderson IR, Walker WA. Mucosal barrier. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, et al., eds. *Handbook of mucosal immunology*. San Diego: Academic Press, 1994:41–55.
231. Kato T, Owen RL. Structure and function of intestinal mucosal epithelium. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, et al., eds. *Handbook of mucosal immunology*. San Diego: Academic Press, 1994;11–26.
232. Mostov KE, Kraehenbuhl JP, Blobel G. Receptor-mediated transcellular transport of immunoglobulin: synthesis of secretory component as multiple and larger transmembrane forms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:7257–7261.
233. Mostov KE, Friedlander M, Blobel G. The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains. *Nature* 1984; 308:37–43.
234. Krajci P, Kvale D, Taskén K, Brandtzaeg P. Molecular cloning and exon-intron mapping of the gene encoding human transmembrane secretory component (the poly-Ig receptor). *Eur J Immunol* 1992;22:2309–2315.
235. Brandtzaeg P. Distribution and characteristics of mucosal immunoglobulin-producing cells. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, et al., eds. *Handbook of mucosal immunology*. San Diego: Academic Press, 1994:251–262.
236. Brandtzaeg P. Presence of J chain in human immunocytes containing various immunoglobulin classes. *Nature* 1974;252:418–420.
237. Brandtzaeg P, Prydz H. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature* 1984; 311:71–73.
238. Niles MJ, Matsuuchi L, Koshland ME. Polymeric IgM assembly and secretion in lymphoid and nonlymphoid cell lines: evidence that J chain is required for pentamer IgM synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2884–2888.
239. Hendrickson BA, Conner DA, Ladd DJ, et al. Altered hepatic transport of immunoglobulin A in mice lacking J chain. *J Exp Med* 1995;182:1905–1911.
240. Hendrickson BA, Rindisbacher L, Corthesy B, et al. Lack of association of secretory component with IgA in J chain-deficient mice. *J Immunol* 1996;157:750–754.
241. Mostov KE. Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 1994;12:63–84.
242. McGee DW, Beagley KW, Aicher WK, McGhee JR. Transforming growth factor-β enhances interleukin-6 secretion by intestinal epithelial cells. *Immunology* 1992;77:7–12.
243. McGee DW, Beagley KW, Aicher WK, McGhee JR. Transforming growth factor-β and IL-1β act in synergy to enhance IL-6 secretion by the intestinal epithelial cell line, IEC-6. *J Immunol* 1993;151:970–978.
244. McGee DW, Elson CO, McGhee JR. Enhancing effect of cholera toxin on interleukin-6 secretion by IEC-6 intestinal epithelial cells: mode of action and augmenting effect of inflammatory cytokines. *Infect Immun* 1993;61:4637–4644.
245. Bromander AK, Kjerrulf M, Holmgren J, Lycke N. Cholera toxin enhances alloantigen presentation by cultured intestinal epithelial cells. *Scand J Immunol* 1993;37:452–458.
246. Hedges S, Agace W, Svanborg C. Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine networks. *Trends Microbiol* 1995;3:266–270.
247. Hedges S, Svensson M, Svanborg C. Interleukin-6 response of epithelial cell lines to bacterial stimulation *in vitro*. *Infect Immun* 1992;60:1295–1301.
248. Agace U, Andersson J, Ceska M, Svanborg C. Selective cytokine production by epithelial cells following exposure to Escherichia coli. *Infect Immun* 1993;61: 602–609.
249. Agace WW, Hedges SR, Ceska M, Svanborg C. Interleukin-8 and the neutrophil response to mucosal gram-negative infection. *J Clin Invest* 1993;92:780–785.
250. Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 1993;61:4569–4574.
251. Crowe SE, Alvarez L, Dytoc M, et al. Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection *in vitro*. *Gastroenterology* 1995;108:65–74.
252. Sharma SA, Tummuru MK, Miller GG, Blaser MJ. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation *in vitro*. *Infect Immun* 1995;63:1681–1687.
253. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, et al. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacteria invasion. *J Clin Invest* 1995;95:55–65.
254. Rasmussen SJ, Eckmann L, Quayle AJ, et al. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest* 1997;99: 77–87.
255. Eckmann L, Jung HC, Schürer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska F, Kagnoff MF. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 1993;105: 1689–1697.
256. Schürer-Maly C-C, Eckmann L, Kagnoff MF, Falco MT, Maly F-E. Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology* 1994;81:85–91.
257. McCormick BA, Colgan SP, Delp-Archer C, Miller SI, Madara JL. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol* 1993;123:895–907.
258. Kvale D, Krajci P, Brandtzaeg P. Expression and regulation of adhesion molecules ICAM-1 (CD54) and LFA-3 (CD58) in human intestinal epithelial cell lines. *Scand J Immunol* 1992;35:669–676.
259. Brandeis JM, Sayegh MH, Gallon L, Blumberg RS, Carpenter CB. Rat intestinal epithelial cells present major histocompatibility complex allopeptides to primed T cells. *Gastroenterology* 1994;107:1537–1542.
260. LeFrancois L. Intraepithelial lymphocytes of the intestinal mucosa: Curiouser and couriouser. *Semin Immunol 1991;3:99–108.*
261. Ferguson A, Parrott DM, The effect of antigen deprivation on thymus-dependent and thymus-independent lymphocytes in the small intestine of mouse. *Clin Exp Immunol* 1972;12:477–488.
262. Crowe PT, Marsh MN. Morphometric analysis of intestinal mucosa. VI. Principals in enumerating intra-epithelial lymphocytes. *Virchows Arch* 1994;424:301–306.
263. Barrett TA, Gajewski TF, Danielpour D, Chang EB, Beagley KW, Bluestone JA. Differential function of intestinal intraepithelial lymphocyte subsets. *J Immunol* 1992;149:1124–1130.
264. Fujihashi K, Yamamoto M, McGhee JR, Kiyono H. αβ TCR+ IELs with CD4+, CD8- and CD4+, CD8+ phenotypes from orally-immunized mice provide Th2-like function for B cell responses. *J Immunol* 1993;151:6681–6691.
265. Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, et al. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial γδ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6147–6151.
266. Fujihashi K, Kawabata S, Hiroi T, et al. Interleukin 2 (IL-2) and interleukin 7 (IL-7) reciprocally induce IL-7 and IL-2 receptors on γδ T-cell receptor-positive intraepithelial lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3613–3618.
267. Lefrancois L. Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *J Immunol* 1991;147:1746–1751.
268. Mosley, RL, Styre D, Klein JR, CD4+, CD8+ murine intestinal intraepithelial lymphocytes. *Int Immunol* 1990;2:361–365.
269. Guy-Grand D, Cerf-Bensussan N, Malissen B, Malassis-Seris M, Briottet C, Vassalli P. Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med* 1991; 173:471–481.
270. Rocha B, Vassalli P, Guy-Grand D. The extrathymic T-cell development pathway. *Immunol Today* 1992;13:449–454.
271. Rocha B, Vassali P, Guy-Grand D. Thymic and extrathymic origins of gut intraepithelial lymphocyte population in mice. *J Exp Med* 1994;180:681–686.
272. Poussier P, Julius M. Intestinal intraepithelial lymphocytes: The plot thickens. *J Exp Med* 1994;180:1185–1189.
273. Klein JR, Mosley RL. Phenotypic and cytotoxic characteristics of intraepithelial lymphocytes. *Adv Host Def Mech* 1993;9:33.
274. Poussier P, Edouard P, Lee C, Binnie M, Julius M. Thymus-independent development and negative selection of T cells expressing T cell receptor αβ in the intestinal epithelium: evidence for distinct circulation patterns of gut and thymus-derived T lymphocytes. *J Exp Med* 1992;176:187–199.
275. Mosley RL, Styre D, Klein JR. Differentiation and functional maturation of bone marrow derived intestinal epithelial T cells expressing membrane T cell receptor in athymic radiation chimeras. *J Immunol. 1990;145:1369–1375.*

276. Hori T, Paliard X, de Waal, Malefijit R, Ranes M, Spits H, Comparative analysis of CD8-expressed on mature CD4⁻, CD8⁺ T cell clones cultured with IL-4 and that on CD8⁻ T cell clones: implication for functional significance of CD8b. *Int Immunol* 1991;3:737–741.
277. MacDonald HR, Schreyer M, Howe RC, Bron C. Selective expression of CD8a (Ly-2) subunit on activated thymic γδ cells. *Eur J Immunol* 1990;20:927–930.
278. Goodman T, Lefrancois L. Expression of the γδ T cell-receptor on intestinal CD8⁺ intraepithelial lymphocytes. *Nature* 1988;333:855–858.
279. Bonneville M, Janeway CA Jr, Ito K, et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of γδ T cells. *Nature* 1988;336:479–481.
280. Mosley RL, Whetsell M, Klein JR. Proliferative properties of murine intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL): IEL expressing TCR αβ or TCR tau delta are largely unresponsive to proliferative mediated signals via conventional stimulation of the CD3-TCR complex. *Int Immunol* 1991;3:563–569.
281. Mowat AM, MacKenzie S, Baca ME, Felstein MV, Parrott DM. Functional characteristics of intraepithelial lymphocytes from mouse small intestine. II. *in vivo* and *in vitro* responses of intraepithelial lymphocytes to mitogenic and allogenic stimuli. *Immunology* 1986;58:627–634.
282. Yamamoto M, Fujihashi K, Amano M, McGhee JR, Beagley KW, Kiyono K. Cytokine synthesis and apoptosis by intestinal intraepithelial lymphocytes: signaling of high density αβ TCR⁺ and γδ TCR⁺ T cells via TCR-CD3 complex result in IFN-γ and IL-5 production, while low density T cells undergo DNA fragmentation. *Eur J Immunol* 1994;24:1301–1306.
283. Yamamoto M, Fujihashi K, Beagley KW, McGhee JR, Kiyono H. Cytokine synthesis by intestinal intraepithelial lymphocytes. Both γδ TCR⁺ and αβ TCR⁻ T cells in the G1 phase of cell cycle produce IFN-γ and IL-5. *J Immunol* 1993;150:106–114.
284. Fujihashi H, Yamamoto Y, McGhee JR, Kiyono H. Intraepithelial lymphocytes. Immunoregulatory function and cytokine production by αβ TCR⁺ and γδ TCR⁺ T cells for mucosal immune responses. *Adv Host Def Mech* 1993;9:89.
285. Liu, CP, Ueda R, She J, et al. Abnormal T cell development in CD3-zeta⁻⁻ mutant mice and identification of a novel T cell population in the intestine. *EMBO J* 1993;12:4863–4875.
286. Love PE, Shores EW, Johnson MD, et al. T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex. *Science* 1993;261:918–921.
287. Malissen M, Gillet A, Rocha B, et al. T cell development in mice lacking the CD3-5 In gene. *EMBO J* 1993;12:4347–4355.
288. Ohno H, Aoe T, Taki S, et al. Developmental and functional impairment of T cells in mice lacking CD3 zeta chains. *EMBO J* 1993;12:4357–4366.
289. Ohno H, Ono S, Hirayama N, Shimada S, Saito T. Preferential usage of the Fc receptor δ chain in the T cell antigen receptor complex by γδ T cells localized in epithelia. *J Exp Med* 1994;179:365–369.
290. Yamamoto S, Russ F, Teixeira HC, Conradt P, Kaufmann SH. *Listeria monocytogenes*–induced gamma interferon secretion by intestinal intraepithelial γ/δ T lymphoyctes. *Infect Immun* 1993;61:2154–2161.
291. Emoto M, Neuhaus O, Emoto Y, Kaufmann SH. Influence of β2-microglobulin expression on gamma interferon secretion and target cell lysis by intraepithelial lymphocytes during intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 1996;64:569–575.
292. Roberts SJ, Smith AL, West AB, et al. T cell αβ (⁻) and γδ (⁺) deficient mice display abnormal but distinct phenotypes towards a natural, widespread infection of the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11774–11779.
293. Kaufmann SH, Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* 1993;11:129–163.
294. Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R. β2-microglobulin deficient mice lack CD4-8⁺ cytolytic T cells. *Nature* 1990;344:742–746.
295. Fujihashi K, Yamamoto M, McGhee JR, Beagley KW, Kiyono H. Function of αβ TCR⁻ intestinal intraepithelial lymphocytes: Th1- and Th2-type cytokine production by CD4⁻ CD8⁻ and CD4⁺ CD8⁺ T cell for helper activity. *Int Immunol* 1993;5:1473–1481.
296. Fujihashi K, Taguchi T, Aicher WK, et al. Immunoregulatory functions for murine intraepithelial lymphocytes: γ/δ T cell receptor-positive (TCR⁺) T cells abrogate oral tolerance, while α/β TCR⁻ T cells provide B cell help. *J Exp Med* 1992;175:695–707.
297. Fujihashi K, McGhee JR, Kweon M-N, et al. γ/δ T cell-deficient mice have impaired mucosal immunoglobulin A responses. *J Exp Med* 1996;183:1929–1935.
298. McMenamin C, Pimm C, McKersey M, Holt PG. Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific γδ T cells. *Science* 1994;265:1869–1871.
299. McMenamin C, McKersey M, Kuhnlein P, Hunig T, Holt PG. γδ T cells down-regulate primary IgE responses in rats to inhaled soluble protein antigens. *J Immunol* 1995;154:4390–4394.
300. Szczepanik M, Anderson LR, Ushio H, et al. γδ T cells from tolerized αβ T cell receptor (TCR)-deficient mice inhibit contact sensitivity-effector T cells in vivo, and their interferon-γ production *in vitro*. *J Exp Med* 1996;184:2129–2139.
301. Kvale D, Lovhaug D, Sollid LM, Brandtzaeg P. Tumor necrosis factor-α up-regulates expression of secretory component, the epithelial receptor for polymeric Ig. *J Immunol* 1988;140:3086–3089.
302. Phillips JO, Everson MP, Moldoveanu Z, Lue C, Mestecky J. Synergistic effect of IL-4 and IFN-γ on the expression of polymeric Ig receptor (secretory component) and IgA binding by human epithelial cells. *J Immunol* 1990;145:1740–1744.
303. Boismenu R, Havran WL. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial γδ T cells. *Science* 1994;266:1253–1255.
304. Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, et al. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial γδ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6147–6151.
305. Puddington L, Olson S, Lefrancois L. Interactions between stem cell factor and c-kit are required for intestinal immune system homeostasis. *Immunity* 1994;1:733–739.
306. Klimpel GR, Chopra AK, Langley KE, et al. A role for stem cell factor and c-kit in the murine intestinal tract secretory response to cholera toxin. *J Exp Med* 1995;182:1931–1942.
307. Klimpel GR, Langley AK, Wypych J, et al. A role for stem cell factor: c-kit interaction(s) in the intestinal tract response to *Salmonella typhimurium* infection. *J Exp Med* 1996;184:271–276.
308. Watanabe M, Veno Y, Yajima T, et al. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest* 1995;95:2945–2953.
309. Maki K, Sunaga S, Komagata Y, et al. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack γδ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7172–7177.
310. Moore TA, von Freeden-Jeffry U, Murray R, Zlotnik A. Inhibition of γδ T cell development and early thymocyte maturation in IL-7⁻/⁻ mice. *J Immunol* 1996;157:2366–2373.
311. Fujihashi K, McGhee JR, Yamamoto M, et al. An interleukin-7 internet for intestinal intraepithelial T cell development: knockout of ligand or receptor reveal differences in the immunodeficient state. *Eur J Immunol* 1997;27:2133–2138.
312. Gowans JL, Knight EJ. The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc R Soc Lond [Biol]* 1964;159:257–282.
313. Craig SW, Cebra JJ. Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J Exp Med* 1971;134:188–200.
314. Craig SW, Cebra JJ. Rabbit Peyer's patches, appendix and popliteal lymph node B lymphocytes: a comparative analysis of their membrane immunoglobulin components and plasma cell precursor potential. *J Immunol* 1975;114:492–502.
315. McDermott MR, Bienenstock J. Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory and genital tissues. *J Immunol* 1979;122:1892–1898.
316. McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME. Characteristics of mesenteric lymph node cells homing to gut-associated lymphoid tissue in syngeneic mice. *J Immunol* 1975;115:54–58.
317. McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME. Mestenteric lymph node B lymphoblasts which home to the small intestine are precommitted to IgA synthesis. *J Exp Med* 1977;145:866–875.
318. Husband A-J, Gowans JL. The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J Exp Med* 1978;148:1146–1160.
319. Roux ME, McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME, Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland. *J Exp Med* 1977;146:1311–1322.
320. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60–66.
321. Picker LJ. Control of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 1994;6:394–406.
322. Bradley LM, Watson SR, Lymphocyte migration into tissue: the paradigm derived from CD4 subsets. *Curr Opin Immunol* 1996;8:312–320.
323. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67:1033–1036.
324. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301–314.
325. Streeter PR, Rouse BT, Butcher EC. Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J Cell Biol* 1988;107:1853–1862.
326. Berg EL, Robinson MK, Warnock RA, Butcher EC. The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor. *J Cell Biol* 1991;114:343–349.
327. Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, et al. α4/β7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MadCAM-1. *Cell* 1993;74:185.
328. Briskin MJ, McEvoy LM, Butcher EC. MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. *Nature* 1993;363:461–464.
329. Streeter PR, Berg EL, Rouse BT, Bargatze RF, Butcher EC. A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* 1988;331:41–46.
330. Altevogt P, Hubbe M, Ruppert M, et al. The α integrin chain is a ligand for α4β7 and α4β1. *J Exp Med* 1995;182:345–355.
331. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993;11:767–804.
332. Osborn L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 1990;62:3–6.
333. Holzmann B, McIntyre BW, Weisman IL. Identification of a murine Peyer's patch-specific lymphocyte homing receptor as an integrin molecule with an α chain homologous to human VLA-4a. *Cell* 1989;56:37–46.
334. Bell RG, Issekutz T. Expression of a protective intestinal immune response can be inhibited at three distinct sites by treatment with anti-α4 integrin. *J Immunol* 1993;151:4790–4802.

335. Hamann A, Andrew DP, Jablonski-Westrich D, Holzmann B, Butcher EC. Role of α4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues *in vivo*. *J Immunol* 1994;152:3282–3293.
336. Rott LS, Briskin MJ, Andrew DP, Berg EL, Butcher EC. A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1. Comparison with vascular cell adhesion molecule-1 and correlation with β7 integrins and memory differentiation. *J Immunol* 1996;156: 3727–3736.
337. Kantele A, Arvilommi H, Jokinen I. Specific immunoglobulin-secreting human blood cells after peroral vaccination against *Salmonella typhi*. *J Infect Dis* 1986; 153:1126–1131.
338. Czerkinsky C, Prince SJ, Michalek SM, et al. IgA antibody-producing cells in peripheral blood after antigen ingesiton: evidence for a common mucosal immune system in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:2449–2453.
339. Quiding M, Nordstrom I, Kilander A, et al. Intestinal immune responses in humans. Oral cholera vaccination induces strong intestinal antibody responses and interferon-γ production and evokes local immunological memory. *J Clin Invest* 1991;88:143–148.
340. Buckley RH, Dees SC. Correlation of milk precipitins with IgA deficiency. *N Engl J Med* 1969;281:465–469.
341. Kantele A, Kantele JM, Savilahti E, et al. Homing potential of circulating lymphocytes in humans depend on the site of activation: oral, but nor parenteral, typhoid vaccination induces circulating antibody-secreting cells that all bear homing receptors directing them to the gut. *J Immunol* 1997;158:574–579.
342. Schieferdecker HL, Ullrich R, Weiss-Breckwoldt AN, et al. The HML-1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen. *J Immunol* 1990;144:2541–2549.
343. Schieferdecker HL, Ullrich R, Zeitz M, Phenotype of HML-1-positive T cells in the human intestinal lamina propria. *Immunol Res* 1991:10:207–210.
344. James SP, Zeitz M, Human gastrointestinal mucosal T cells. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, et al., eds. *Handbook of mucosal immunology*. San Diego: Academic Press, 1994:275–285.
345. Cerf-Bensussan N, Jarry A, Brousse N, et al. A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *Eur J Immunol* 1987;17:1279–1285.
346. Kilshaw PJ, Murant SJ. A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur J Immunol* 1990;20:2201–2207.
347. Schieferdecker HL, Ullrich R, Weiss-Breckwoldt AN, et al. The HML-1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen. *J Immunol* 1990;144:2541–2549.
348. Cerf-Bensussan N, Guy-Grand D, Lisowska-Grospierre B, et al. A monoclonal antibody specific for rat intestinal lymphocytes. *J Immunol* 1986;136:76–82.
349. Haury M, Kasahara Y, Schaal S, Bucy RP, Cooper MD. Intestinal lymphocytes in the chicken express an integrin-like antigen. *Eur J Immunol* 1993;23:313–319.
350. Cepek KL, Parker CM, Madara JL, Brenner MB. Integrin αEβ7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol*. 1993;150:3459–3470.
351. Benmerah A, Badrichani A, Ngohou K, et al. Homotypic aggregation of CD103 (αEβ7)+ lymphocytes by an anti-CD103 antibody, HML-4. *Eur J Immunol* 1994; 24:2243–2249.
352. Roberts K, Kilshaw DJ, The mucosal T cell integrin αM290β7 recognizes a ligand on mucosal epithelial cell lines. *Eur J Immunol* 1993;23:1630–1635.
353. Kilshaw DJ, Murant SJ. Expression and regulation of β7 (βP) integrins on mouse lymphocytes: Relevance to the mucosal immune system. *Eur J Immunol* 1991; 21:2591–2597.
354. Parker CM, Cepek KL, Russell GJ, et al. A family of β7 integrins on human mucosal lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1924–1928.
355. Barnard JA, Warwick GJ, Gold LI. Localization of transforming growth factor β isoforms in the normal murine small intestine and colon. *Gastroenterology* 1993; 105:67–73.
356. Tanaka Y, Adams DH, Shaw S. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today* 1993;14:111–115.
357. Yang SK, Eckmann L, Kagnoff M. Colon epithelial cells express a broad array of chemokines. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;76:520.
358. Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, et al. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the αEβ7 integrin. *Nature* 1994;372: 190–193.
359. Sarnacki S, Begue B, Buc H, et al. Enhancement of CD3-induced activation of human intestinal intraepithelial lymphocytes by stimulation of the β7-containing integrin defined by HML-1 antibody. *Eur J Immunol* 1992;22:2887–2892.
360. Peifer M, Cancer, catenins and cuticle pattern: a complex connection. *Science* 1993;262:1667–1668.
361. Mestecky J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* 1987;7: 265–276.
362. McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME. Mestentric lymph node lymphoblasts which home to the small intestine are precommitted to IgA synthesis. *J Exp Med* 1977;145:866–875.
363. Montgomery PC, Ayyildiz A, Lemaitre-Coelho IM, Vaerman J-P, Rockey JH. Induction and expression of antibodies in secretions: the ocular immune system. *Ann NY Acad Sci* 1983;409:428–440.
364. Robertson SM, Cebra JJ. A model for local immunity. *Ric Clin Lab* 1976;6(suppl 3):105.
365. Winner L III, Mack J, Weltzin R, Mekalanos JJ, Kraehenbuhl JP, Neutra MR. New model for analysis of mucosal immunity: intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against *Vibrio cholerae* infection. *Infect Immun* 1991;59:977–982.
366. Lee CK, Weltzin R, Soman G, Georgakopoulos KM, Houle DM, Monath TP. Oral administration of polymeric immunoglobulin A prevents colonization with *Vibrio cholerae* in neonatal mice. *Infect Immun* 1994;62:887–891.
367. Michetti P, Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ, Neutra MR. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1992;60:1786–1792.
368. Czinn SJ, Cai A, Nedrud JG. Protection of germ-free mice from infection by *Helicobacter felis* after active oral or passive IgA immunization. *Vaccine* 1993; 11:637–642.
369. Kaetzel CS, Robinson JK, Chintalacharuvu KR, Vaerman JP, Lamm ME. The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:8796–8800.
370. Kaetzel CS, Robinson JK, Lamm ME. Epithelial transcytosis of monomeric IgA and IgG cross-linked through antigen to polymeric IgA. A role for monomeric antibodies in the mucosal immune system. *J Immunol* 1994;152:72–76.
371. Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME, Fletcher D, Nedrud JG. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:6901–6905.
372. Mazanec MB, Nedrud JG, Kaetzel CS, Lamm ME. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol Today* 1993;14:430–435.
373. Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science* 1996;272:104–107.
374. Spangler BD, Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 1992;56:622–647.
375. Gill DM. The arrangement of subunits in cholera toxin. *Biochemistry* 1976;15: 1242–1248.
376. Gill DM, Clements JD, Robertson DC, Finkelstein RA. Subunit number and arrangement in *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect Immun* 1981;33: 677–682.
377. van Heyningen S. Cholera toxin: interaction of subunits with ganglioside GM1. *Science* 1974;183:656.
378. Fukuta S, Magnani JL, Twiddy EM, Holmes RK, Ginsburg V. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. *Infect Immun* 1988;56: 1748–1753.
379. Gill DM, King CA. The mechanisms of action of cholera toxin in pigeon erythrocyte lysates. *J Biol Chem* 1975;250:6424–6432.
380. Field M, Rao MC, Chang EB. Intestinal electrolyte transport and diarrheal disease I. *N Engl J Med* 1989;321:800–806.
381. Elson CO, Ealding W. Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. *J Immunol* 1984;132:2736–2741.
382. Clements JD, Hartzog NM, Lyon FL. Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* 1988;6:269–277.
383. Tsuji T, Inoue T, Miyama A, Okamoto K, Honda T, Miwatani T. A single amino acid substitution in the A subunit of *Escherichia coli* enterotoxin results in a loss of its toxic activity. *J Biol Chem* 1990;265:22520–22525.
384. Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, van Zanten BA, Berghuis AM, Hol WG. Lactose binding to heat labile enterotoxin revealed by X-ray crystallography. *Nature* 1992;355:561–564.
385. Lycke N, Tsuji T, Holmgren J. The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur J Immunol* 1992;22:2277–2281.
386. Douce G, Turcotte C, Cropley I, et al. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1644–1648.
387. Dickinson BL, Clements JD. Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect Immun* 1995;63: 1617–1623.
388. Pizza M, Domenighini M, Hol W, et al. Probing the structure-activity relationship of *Escherichia coli* LT-A by site-directed mutagenesis. *Mol Microbiol* 1994; 14:51–60.
389. Di Tommaso A, Saletti G, Pizza M, et al. Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant. *Infect Immun* 1996;64:974–979.
390. Yamamoto S, Takeda Y, Yamamoto M, et al. Mutants in the ADP-ribosyltransferase cleft of cholera toxin lack diarrhoeagenicity but retain adjuvanticity. *J Exp Med* 1997;185:1203–1210.
391. Yamamoto S, Kiyono H, Yamamoto M, et al. A nontoxic mutant of cholera toxin elicits Th2-type responses for enhanced mucosal immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5267–5272.
392. Dertzbaugh MT, Elson CO. Comparative effectiveness of the cholera toxin B subunit and alkaline phosphatase as carriers for oral vaccines. *Infect Immun* 1993;61:48–55.
393. Dertzbaugh MT, Peterson DL, Macrina FL. Cholera toxin B-subunit gene fusion: structural and functional analysis of the chimeric protein. *Infect Immun* 1990;58:

70–79.
394. Hajishengallis G, Hollingshead SK, Koga T, Russell MW. Mucosal immunization with a bacterial protein antigen genetically coupled to cholera toxin A2/B subunits. *J Immunol* 1995;154:4322–4332.
395. Holmgren J, Czerkinsky C, Lycke N, Svennerholm A-M. Mucosal immunity: implications for vaccine development. *Immunobiology* 1992;184:157–179.
396. Holmgren J, Czerkinsky C, Lycke N, Svennerholm A-M. Strategies for the induction of immune responses at mucosal surfaces making use of cholera toxin B subunit as immunogen, carrier and adjuvant. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:42–54.
397. Tamura S-I, Kurata T. Intranasal immunization with influenza vaccine. In: Kiyono H, Ogra PL, McGhee JR, eds. *Mucosal vaccines*. San Diego: Academic Press, 1996:425–436.
398. Okahashi N, Yamamoto M, VanCott JL, et al. Oral immunization of interleukin-4 (IL-4) knockout mice with a recombinant *Salmonella* strain or cholera toxin reveals that CD4⁺ Th2 cells producing IL-6 and IL-10 are associated with mucosal immunoglobulin A responses. *Infect Immun* 1996;64:1516–1525.
399. Bourguin I, Chardes T, Bout D. Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhanced protective and cell-mediated immunity in C57BL/6 mice. *Infect Immun* 1993;61:2082–2088.
400. Robinson K, Bellaby T, Wakelin D, Efficacy of oral vaccination against the murine intestinal parasite *Trichuris muris* is dependent upon host genetics. *Infect Immun* 1995;63:1762–1766.
401. Zhang T, Li E, Stanley SL Jr. Oral immunization with the dodecapeptide repeat of the serine-rich *Entamueba histolytica* protein (SREHP) fused to the cholera toxin B subunit induces a mucosal and systemic anti-SREHP antibody response. *Infect Immun* 1995;63:1349–1355.
402. Curtiss R III, Kelley SM, Hassan JO. Live oral avirulent *Salmonella* vaccines. *Vet Microbiol* 1993;37:397–405.
403. Roberts M, Chatfield SN, Dougan G. Salmonella as carriers of heterologous antigens. In: O'Hagan DT, eds. Novel delivery systems for oral vaccines. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994:27–35.
404. Chatfield S, Roberts M, Londono P, Cropley I, Douce G, Dougan G. The development of oral vaccines based on live attenuated *Salmonella* strains. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993;7:1–7.
405. Doggett TA, Brown PK. Attenuated *Salmonella* as vectors for oral immunization. In: Kiyono H, et al. Mucosal vaccines. San Diego: Academic Press, 1996: 105–108.
406. Yang DM, Fairweather N, Button LL, McMaster WR, Kahl LP, Liew FY. Oral *Salmonella typhimurium* (AroA⁻) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp 63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *J Immunol* 1990;145:2281–2285.
407. Hirabayashi Y, Kurata H, Funato H, et al. Comparison of intranasal inoculation of influenza HA vaccine combined with cholera toxin B subunit with oral or parenteral vaccination. *Vaccine* 1990;8:243–248.
408. Tamura S, Ito Y, Asanuma H, et al. Cross-protection against influenza virus infection afforded by trivalent inactivated vaccines inoculated intranasally with cholera toxin B subunit. *J Immunol* 1992:149:981–988.
409. Hashigucci K, Ogawa H, Ishidate T, et al. Antibody responses in volunteers induced by nasal influenza vaccine combined with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit containing a trace amount of the holotoxin. *Vaccine* 1996:14:113–119.
410. Reuman PD, Keely SP, Schiff GM. Similar subclass antibody responses after intranasal immunization with UV-inactivated RSV mixed with cholera toxin or live RSV. *J Med Virol* 1991;35:192–197.
411. Graham BS, Bunton LA, Rowland J, Wright PF, Karzon DT. Respiratory syncytial virus infection in anti-μ treated mice. *J Virol* 1991;65:4936–4942.
412. Roberts M, Bacon A, Rappuoli R, et al. A mutant pertussis toxin molecule that lacks ADP-ribosyltransferase activity, PT-9K/129G, is an effective mucosal adjuvant for intranasally delivered proteins. *Infect Immun* 1995;63:2100–2108.
413. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characterization of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36: 59–74.
414. Gallichan WS, Johnson DC, Graham FL, Rosenthal KL. Mucosal immunity and protection after intranasal immunization with recombinant adenovirus expressing herpes simplex glycoprotein B. *J Infect Dis* 1993;168:622–629.
415. Lubeck MD, Natuk RJ, Chengalvala M, et al. Immunogenicity of recombinant adenovirus-human immunodeficiency virus vaccines in chimpanzees following intranasal administration. *AIDS Res Hum Retrovir* 1994;10:1443–1449.
416. Prevec K, Schneider M, Rosenthal KL, Belbeck LW, Derbyshire JB, Graham FL. Use of human adenovirus-based vectors for antigen expression in animals. *J Gen Virol* 1989;70:429–434.
417. Prevec L, Campbell JB, Christie BS, Belbeck L, Graham FL. A recombinant human adenovirus vaccine against rabies. *J Infect Dis* 1990;161:27–30.
418. Hsu KH, Lubeck MD, Davis AR, et al. Immunogenicity of recombinant adenovirus-respiratory syncytial virus vaccines with adenovirus types 4, 5 and 7 vectors in dogs and a chimpanzee. *J Infect Dis* 1992;166:769–775.
419. Lubeck MD, Davis AR, Chengalvala M, et al. Immunogenicty and efficacy testing in chimpanzees of an oral hepatitis B vaccine based on live recombinant adenovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:6763–6767.
420. Miller CJ, Vogel, P, Alexander NJ, Sutjipto S, Hendrickx AG, Marx PA. Localization of SIV in the genital tract of chronically infected female rhesus macaques. *Am J Pathol* 1992;141:655–660.
421. Imaoka, K, Miller C, Someya K, et al. Nasal immunization of non-human primates with simian immunodeficiency virus (SIV) p55 gag and cholera toxin (CT) adjuvants induces Th1/Th2 help for anti-viral immunity. (*Submitted for publication.*)
422. Kubota M, Miller C, Imaoka, K, et al. Oral immunization with simian immunodeficiency virus (SIV) p55 gag and cholera toxin elicits both mucosal IgA and systemic IgG1 immune responses in non-human primates. *J Immunol* 1997;158: 5321–5329.
423. Staats HF, Nichols WG, Palker TJ. Mucosal immunity to HIV-1: Systemic and vaginal antibody responses after intranasal immunization with the HIV-1 C4/V3 peptide T1SP10 MN(A). *J Immunol* 1996;157:462–472.
424. Porgador A, Staats HF, Faiola B, Gilboa T, Palker TJ. Intranasal immunization with CTL epitope peptides from HIV-1 or ovalbumin and the mucosal adjuvant cholera toxin induces peptide-specific CTLs and protection against tumor development *in vivo*. *J Immunol* 1997;158:834–841.
425. Tomasi TB Jr. Oral tolerance. *Transplantation* 1980;29:353–356.
426. Mowat AM, The regulation of immune responses to dietary protein antigens. *Immunol Today* 1987;8:93.
427. Weiner HL, Friedman A, Miller A, et al. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol* 1994;12:809–837.
428. McMenamin C, Holt PG. The natural immune response to inhaled soluble protein antigens involves major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted CD8⁺ T cell-mediated but MHC class II-restricted CD4⁺ T cell-dependent immune deviation resulting in selective suppression of immunoglobulin E production. *J Exp Med* 1993;178:889–899.
429. Hoyne GF, O'Hehir RE, Wraith DC, Thomas WR, Lamb JR. Inhibition of T cell and antibody responses to house dust mite allergens by inhalation of the dominant T cell epitope in naive and sensitized mice. *J Exp Med* 1993;178: 1783–1788.
430. Dick, AD, Cheng YF, McKinnon A, Liversidge J, Forrester JV. Nasal administration of retinal antigens suppresses the inflammatory response in experimental allergic uveoretinitis. A preliminary report of intranasal induction of tolerance with retinal antigens. *Br J Ophthalmol* 1993;77:171–175.
431. Metzler B, Wraith DC. Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhalation but not oral administration of the encephalitogenic peptide: influence of MHC binding affinity. *Int Immunol* 1993;5:1159–1165.
432. Ma CG, Zhang GX, Xiao BG, Link J, Olsson T, Link H. Suppression of experimental autoimmune myasthenia gravis by nasal administration of acetylcholine receptor. *J Neuroimmunol* 1995;58:51–60.
433. Tian J, Atkinson MA, Clare-Salzler M, et al. Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med* 1996;183:1561–1567.
434. Wells H, Studies on the chemistry of anaphylaxis III. Experiments with isolated proteins, especially those of hen's egg. *J Infect Dis* 1911;9:147.
435. Mowat AM. Oral tolerance and regulation of immunity to dietary antigens. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, et al., eds. *Handbook of mucosal immunology*. San Diego: Academic Press, 1994:185:201.
436. Friedman A Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91: 6688–6692.
437. Whitacre CC, Gienapp, IE, Orosz CG, Bitar DM. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. *J Immunol* 1991;147:2155–2163.
438. Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 1995;376:177–180.
439. Melamed D, Friedman A. Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. *Eur J Immunol* 1993;23:935–942.
440. Chen Y, Inobe J, Weiner HL. Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depletion mice: both CD4⁺ and CD8⁺ cells mediate active suppression. *J Immunol* 1995;155:910–916.
441. Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recover from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor β, interleukin 4, and prostagladin E expression in the brain. *J Exp Med* 1992;176:1355–1364.
442. Czerkinsky C, Holmgren J. The mucosal immune system and prospects for anti-infectious and anti-inflammatory vaccines. *Immunologists* 1995;3:97.
443. Challacombe SJ, Tomasi TB Jr. Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. *J Exp Med* 1980;152:1459–1472.
444. Thomas HC, Parrott MV. The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration. *Immunology* 1974;27:631–639.
445. Kagnoff MF. Effects of antigen-feeding on intestinal and systemic immune responses. IV. Similarity between the suppressor factor in mice after erythrocyte-lysate injection and erythrocyte feeding. *Gastroenterology* 1980;79:54–61.
446. Kiyono H, Babb JL, Michalek SM, McGhee JR. Cellular basis for elevated IgA responses in C3H/HeJ mice. *J Immunol* 1980;125:732–737.
447. Kiyono H, McGhee JR, Wannemuehler MJ, Michalek SM. Lack of oral tolerance in C3H/HeJ mice. *J Exp Med* 1982;155:605–610.
448. Mattingly JA Waksman BH. *Immunologic suppression after oral administration*

of antigen. I. Specific suppressor cells formed in rat Peyer's patches after oral administration of sheep erythrocytes and their systemic migration. *J Immunol* 1978;121:1878–1883.
449. Mowat AM, Lamont AG, Parrott DM. Suppressor T cells, antigen-presenting cells and the role of I-J restriction in oral tolerance to ovalbumin. *Immunology* 1988;64:141–145.
450. Richman LK, Graeff AS, Yarchoan R, Strober W. Simultaneous induction of antigen-specific IgA helper T cells and IgG suppressor T cells in the murine Peyer's patch after protein feeding. *J Immunol* 1981;126:2079–2083.
451. Ngan J, Kind LS, Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J Immunol* 1978;120: 861–865.
452. Garside P, Steel M, Worthey EA, et al. T helper 2 cells are subject to high dose oral tolerance and are not essential for its induction. *J Immunol* 1995;154: 5649–5655.
453. Gregerson DS, Obritsch WF, Donoso LA. Oral tolerance in experimental autoimmune uveoretinitis. Distinct mechanisms of resistance are induced by low dose vs. high dose feeding protocols. *J Immunol* 1993;151:5751–5761.
454. Hirahara K, Hisatsune T, Nishijima K, Kato H, Shiho O, Kaminogawa S. CD4$^+$ T cells anergized by high dose feeding establish oral tolerance to antibody responses when transferred in SCID and nude mice. *J Immunol* 1995;154: 6238–6245.
455. Melamed D Friedman A. *In vivo* tolerization of Th1 lymphocyte following a single feeding with ovalbumin: anergy in the absence of suppression. *Eur J Immunol* 1994;24:1974–1981.
456. Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both *in vitro* and *in vivo* immune responses by the release of transforming growth factor β after antigen-specific triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:421–425.
457. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990;248:1349–1356.
458. DeSilva DR, Urdahl KB, Jenkins MK. Clonal anergy is induced *in vitro* by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation. *J Immunol* 1991;147: 3261–3267.
459. Williams ME, Lichtman AH, Abbas AK. Anti-CD3 antibody induces unresponsiveness to IL-2 in Th1 clones but not in Th2 clones. *J Immunol* 1990;144: 1208–1214.
460. Burstein HJ, Abbas AK. *In vivo* role of interleukin 4 in T cell tolerance induced by aqueous protein antigen. *J Exp Med* 1993;177:457–463.
461. Kweon M-N, Fujihashi K, VanCott JL, et al. Lack of orally-induced systemic unresponsiveness in interferon-gamma knockout mice. *J Immunol* 1998;160: 1687–1693.
462. Mowat AM, Steel M, Worthey EA, Kewin PJ, Garside P. Inactivation of Th1 and Th2 cells by feeding ovalbumin. In: Weiner HL, Mayer LF, eds. *Oral tolerance: mechanisms and applications.* New York: New York Academy of Science, 1996: 122–132.
463. Marth T, Strober W, Kelsall BL. High dose oral tolerance in ovalbumin TCR-transgenic mice: systemic neutralization of IL-12 augments TGF-β secretion and T cell apoptosis. *J Immunol* 1996;157:2348–2357.
464. Lider O, Santos LM, Lee CS, Higgins PJ, Weiner HL. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein II. Suppression of disease and *in vitro* immune responses is mediated by antigen-specific CD8$^+$ T lymphocytes. *J Immunol* 1989:142:748–752.
465. Miller A, Lider O, Weiner HL. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med* 1991;174:791–798.
466. Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, et al. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-β1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1996;98:70–77.
467. Aicher WK, Fujihashi K, Yamamoto M, Kiyono H, Pitts AM, McGhee JR. Effects of the lpr/lpr mutation on T and B cell populations in the lamina propria of the small intestine, a mucosal effector site. *Intern Immunol* 1992;4:959–968.
468. Takahashi I, Nakagawa I, Kiyono H, McGhee JR, Clements JD, Hamada S. Mucosal T cells induce systemic anergy for oral tolerance. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;206:414–420.
469. Chase MW. Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitilizing agent. *Proc Soc Exp Biol* 1946;61:257.
470. Bitar DM, Whitacre CC. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by the oral administration of myelin basic protein. *Cell Immunol* 1988;112:364–370.
471. Higgins PJ, Weiner HL. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. *J Immunol* 1988;140:440–445.
472. Thompson HS, Staines NA. Gastric administration of type II collagen delays the onset and severity of collagen-induced arthritis in rats. *Clin Exp Immunol* 1986;64:581–586.
473. Nagler-Anderson C, Bober LA, Robinson ME, Siskind GW, Thorbecke GJ. Suppression of type II collagen-induced arthritis by intragastric administration of soluble type II collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:7443–7446.
474. Blanas E, Carbone FR, Allison J, Miller JF, Heath WR. Induction of autoimmune diabetes by oral administration of autoantigen. *Science* 1996;274:1707–1709.
475. Bergerot I, Fabien N, Maguer V, et al. Oral administration of human insulin to NOD mice generates CD4$^+$ T cells that suppress adoptive transfer of diabetes. *Autoimmunity* 1994;7:65.
476. Wortmann F. Oral hyposensitization of children with pollinosis or house-dust asthma. *Allergol Immunopathol* 1977;5:15–26.
477. Rebien W, Puttonen E, Maasch HJ, Stix E, Wahn U. Clinical and immunological response to oral and subcutaneous immunotherapy with grass pollen extracts. A prospective study. *Eur J Pediatry* 1982;138:341–344.
478. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795–803.
479. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995;182:1281–1290.
480. Elson CO, Beagley KW, Sharmanov AT, et al. Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease. Mucosa immune responses and protection by tolerance. *J Immunol* 1996;157:2174–2185.
481. Miller SD, Butler LD. T cell responses induced by the parenteral injection of antigen-modified syngeneic cells. I. Induction, characterization, and regulation of antigen-specific T helper cells involved in delayed-type hypersensitivity responses. *J Immunol* 1983;131:77–85.
482. Greene MI, Ginsburg CH, Benacerraf B. The regulation of hapten-specific granuloma formation. *Clin Immunol Immunopathol* 1982;23:275–285.
483. Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 1993;75:274–282.
484. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Chiba C, et al. Cytokine imbalance and autoantibody production in T cell receptor-α mutant mice with inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 1996;183:847–856.
485. Sadlack B, Merz H, Schorle A, Schimpl A, Feller A, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993;75:253–261.
486. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10–deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263–274.
487. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in SCID mice reconstituted with CD45RB^{hi} CD4$^+$ T cells. *Immunity* 1994;1:553–562.
488. Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. A critical role for transforming growth factor-b but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB^{low} CD4$^+$ T cells. *J Exp Med* 1996;183:2669–2674.
489. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Presky DH, Waegell W, Stober W. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-β-mediated oral tolerance. *J Exp Med* 1996;183:2605–2616.
490. Hollander GA, Simpson SJ, Mizoguchi E, et al. Severe colitis in mice with aberrant thymic selection. *Immunity* 1995;3:27–38.
491. Simpson SJ, Hollander GA, Mizoguchi E, et al. Expression of pro-inflammatory cytokines by TCR αβ$^+$ and TCR γδ$^+$ T cells in an experimental model of colitis. *Eur J Immunol* 1997;27:17–25.
492. Duchmann, R, Schmitt E, Knolle P, Meyer Zum Buschenfelde KH, Neurath M. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies in interleukin-12. *Eur J Immunol* 1996;26:934–938.
493. Sundberg JP, Elson CO, Bedegian H, Birkenmeier EH. Spontaneous heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* 1994;107: 1726–1735.
494. Koskinen S, Long-term follow-up of health in blood donors with primary selective IgA deficiency. *J Clin Immunol* 1996;16:165–170.
495. Burrows PD, Cooper MD. IgA deficiency. *Adv Immunol* 1997;65:245–276.
496. Hammarström L, Carlsson B, Smith CI, Wallin J, Wieslander L. Detection of IgA heavy chain constant region genes in IgA deficient donors: evidence against gene deletions. *Clin Exp Immunol* 1985;60:661–664.

第28章　衰老与免疫功能

Richard A. Miller[①]

947

进化促使动物个体衰老[1]。选择性压力造就10岁儿童的免疫系统就具有对付威胁性感染不断冲击的能力。有免疫力的青少年比其免疫缺陷的同类更具再生的能力。但是对于一个100岁的免疫系统,其选择性压力则很小:当然有偶尔幸存到一个特别年龄的个体(即使生物的年龄不是一个因素),所以说自然选择的压力与衰老相关。遗传因素促使人类中中青年人适应性好,即使有一些其他的因素影响他们以致在成长过程中不幸衰老。老年时遗传机制仍在起清除废物和协调的作用。老年免疫系统的成功归功于惯性及幸运。

老年病学家对免疫系统感兴趣是有远见的,因为现代分子及细胞免疫学的发展揭示了这些复杂的、多细胞的、防御系统的内在机制。有了更详尽的了解免疫细胞对年轻人及小鼠产生保护的工具及模型。老年病免疫学家的挑战是利用这些丰富的知识遗产和试剂去识别这种模型,即那些几乎无懈可击的青年人他们的祖父却患许多奇特的感染或肿瘤,备受带状疱疹、癌及潜在的致命性流行性感冒,或容易被忽视的、60年前已使其丧失工作能力的肺结核的折磨。

复杂的自我平衡系统就是以逐渐衰竭为代表的衰老病理生物学,但是许多这样的系统还原分析是困难的。分离脑、肾、四肢及分泌腺或进入组织培养不可想像,但分离的免疫系统在体外可清楚可靠地模拟免疫反应,部分原因是多数生理免疫需动态的分子相互作用为基础。许多工作描述了在体外杠杆式的影响免疫

① R.A. Miller: Department of Pathology, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109-0946.

力的技术的开发,因困惑不能解释细微不同生物系统所获结果之间的矛盾,动物整体的反复验证的关键性结论形成较慢。

948 有兴趣的读者可以总结其他综述文章以详细的讨论有关T细胞和细胞因子产品[2],B淋巴细胞的衰老[3],或T细胞功能抑制[4],可以寻找早期有关免疫衰老的全面的评论,交错的进行深刻的讨论。

实验性老年免疫病学:入门读物

在此首先描述什么是免疫反应的衰老,这将有助于概括现代衰老实验研究的一些有用的事实和主要思想。

"多大年龄的老鼠算老?"这一问题当然不会有一个简单的回答。但是普通实验室的自交系,如SPF级小鼠典型的平均存活时间在22-26月龄,而 F_1 杂种系一般存活时间仅几个月。实验室大鼠的生命粗约或稍长于小鼠。因此,随机分组的大鼠或小鼠到30月龄都将濒临死亡,有的甚至死于24月龄,当然随机样本中包括许多外形退化或患肿瘤的个体。

只将年轻的个体用于研究,如将2月龄的小鼠与6月龄的小鼠比较,年老组的死亡率高将是显而易见的,从发展生物学的角度讲这也许会有新的意义,但从本质上讲对衰老研究没有多大作用。虽然衰老是一种发展的假设很诱人,但随后将觉得这种设想显得轻率和有失公允。支配这样一个复杂结构的原则就如轿车装配,由玻璃,金属,橡胶和设计蓝图,完全不同于由破轿车翻新而成的新车。进化的压力竭力精致地控制装配年轻人成熟,但它们已间接地影响衰老退化的进程。类似汽车老化取决于防朽层的厚度和刹车垫所用材料。衰老的进程归咎于进化压力在老年期影响力失灵,如此已不奇怪为何新法则及新模型对老龄动物不灵。

大多数衰老研究对象选择只分两个年龄组,特别年轻的成年组和非常老的成年组。这种分类设计是诱

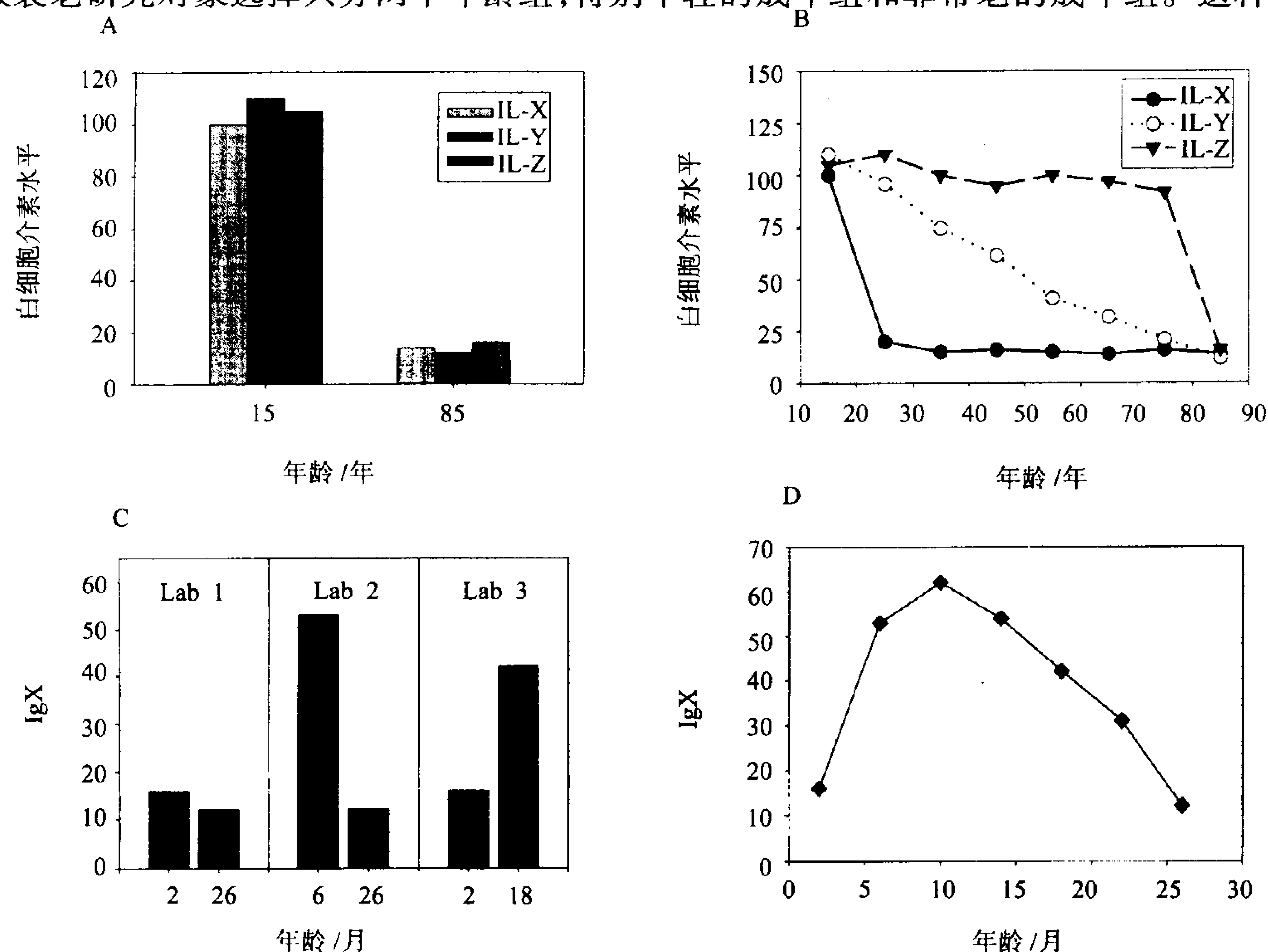


图28.1 老年免疫学实验设计:适当地选择年龄组。A:假设的15岁与85岁两组女性白细胞介素X、Y及的年龄相关性变化。所有三种因子随年龄而下降。B:同样数据更详细的假设,白细胞介素X在15至25岁快速降低,其后变化很小;这种变化本质上反映成熟效应大于衰老。白细胞介素Z只在很衰老时降低;这种降低反映了疾病或别的选择性影响。C:3个不同的实验室有关小鼠IgX产生年龄效应的假设。每个实验室产生出不同的结论。D:同样的IgX数据组,但更适当的年龄组样本;也显示成年早期IgX增加而后下降,C图显示的3个实验室的数据遗漏了一组。

人的;希望大的年龄差距将产生好的效果及提高统计学意义;但这却是极其错误的。首先这种观察遗漏了中间年龄组,它们能提供老年晚期前的信息,图 28.1 是这种类型的假想例子;第二非常老的动物或人更容易生病,疾病的范围可能包括即便尸检或详细的体检也检测不出的综合病症,老年期相对壮年期变化日益增多;相反老年和青年受检人群的差异可以通过人工选择加以描述,换句话说,能生存到特别老的个体其对疾病的抵抗能力非同寻常,多半是因其有非常强的免疫反应力。使用非常年轻的个体(如 6 月龄的小鼠或少年组)作为对照组也是个普遍的错误,这将很难将衰老的作用和成熟的作用区分开。

从经济的角度考虑也应减少使用很老的动物。因为其死亡率的风险随时间呈指数级上升,实验室啮齿动物生产费用也呈指数上升,而非线性。按每只小鼠日消耗 0.15 美元计,1 年龄鼠约消耗 50 美元。然而生产 3 年龄的小鼠耗费不止是 150 美元,而是超过 1500 美元,90% ~ 95%的费用耗费在未到 3 年龄而死亡的小鼠。显然结果是只使用无病的动物将增加成本,使用老年鼠花费更大。

研究衰老对人类免疫的作用通常或多或少使用严厉的排除标准[9],说明和这些报告紧密相关的数据。例如,一些组使用了欧洲研究联盟推荐的标准[9],所谓的 Senieur 筛选,它排除了 90%的老年个体。这决不是说 10%的健康人群的免疫状态一定能代表衰老对人类的影响。另一方面研究的老年人群(包括患慢性或急性肿瘤或炎性疾病,或接受药物治疗后免疫状态有改变的个体)也有一些值的限制。排除那些明显的干扰(如急性感染、化疗、类固醇治疗和其他记录的共变治疗的因素)的中间过程,比两种中任一种极端的方法更有代表性,但需要数据采集和分析阶段更费力。

不幸的是啮齿动物老化的研究除肿瘤的发生率、皮肤损害或脾肿大外很少有能够具体表现清楚的排除标准。啮齿实验动物不像人类志愿者可因病而被彻底的隔离,不能表述它们的症状。因每个动物详细的尸检研究费用共计 50 美元之多,大多数实验室愿意临时检查,当然他们也可彻底地进行任何尸检分析。需要采集一些小鼠或大鼠来源的组织的协议是特别冒人工因素的风险,因为采样会增加研究的细胞可能来源于一些病原组的可能性。传统上使用近交系或 F1 杂交系动物,其基因型相同,因此表现出相似的病理变化和生理特性,形成它自身的问题而重要的发现更确实。研究照旧使用家养啮齿动物(也就是那些不知道是否有传染病原体的动物)仍时有发生。变异的地方病能导致不同的实验室研究差异很大,甚至差异表现在同一个实验室的不同时间的研究。实验前将从 SPF 级动物供应商获得的实验动物按传统的家养方式饲养几周后再行实验,是一种很不好的习惯,因这期间将显著增加研究动物急性感染的机会。老龄啮齿动物的研究因感染趋向而起的并发症非常棘手。

衰老引起的 T 淋巴细胞亚群的变化

在 20 世纪 60 和 70 年代,少数实验室着手检查衰老对免疫反应的影响。通过体外如迟发型变态反应、移植片对抗宿主反应、抗体产生实验及体内基于有丝分裂原介导的增殖和免疫球蛋白分泌的生物学方法,除极少数例外,这些研究证实不管在人或啮齿动物其细胞介导的体液免疫反应都呈下降趋势。表 28.1 列举了一些典型的与年龄相关的免疫反应变化。影响是惊人的,但表 28.1 因缺少重现性或有许多争议将在本章后面详细讨论。更详细的现象摘要可从一系列的综述文章中找到[5~8]。

949

表 28.1　与年龄相关的免疫功能变化:几个选择的例子

免疫反应	年龄的影响	参考文献
体外 T 细胞 PHA 有丝分离增殖反应	30 月龄比 6 月龄小鼠下降 20 倍	[288]
体外 T 细胞 ConA 和 PHA 有丝分离增殖反应	80 岁比 20 岁人下降四倍	[289]
经 DNP-BGG 免疫后 IgG 血小板形成细胞	25 月龄比 2 月龄小鼠下降 7 倍	[290]
体内抗红血球抗体产生	19 月龄比 2 月龄小鼠下降 9 倍	[291]
体外经异种抗原免疫后产生 CTL	19 月龄比 2 月龄小鼠下降大于 16 倍	[292]
脾 NK 细胞活性	22 月龄比 3 月龄小鼠下降大于 4 倍	[223]
皮移植排斥反应(MHC 限制)	28 月龄比 3 月龄大鼠增加 3 倍	[293]
皮肤对对氯二硝基苯的初次致敏	20 ~ 40 岁有 23%没反应,> 65 岁 77%没反应(人)	[294]

由基础免疫学的两方面的发展来分析保护性免疫反应下降的细胞及分子机理是很容易的:能够实现按抗原表面标记来功能性区分T和B细胞的亚类,发现T细胞产生一种抗原非特异的细胞因子白细胞介素－2,它可以使抗原反应时其他淋巴细胞克隆扩增。

后来被称为CD4和CD8抗原的早期研究强调它们有区分不同功能特性的T细胞的能力,随即连续有报告CD4和CD8细胞数目随年龄的相关变化,参考文献[10]将其制成表格。发现在人的外周血或小鼠或大鼠脾近一半与CD4和CD8细胞数目没有间接或直接的关系,而CD4/CD8则都以相同的比率有少许的增加或减少。衰老好像明显地导致鼠血液中CD4细胞下降(占总的T细胞比率)[11~13],但不管在人PBL还是鼠脾和淋巴组织却没有显示类似的程度[10]。尽管特殊的近交系或特殊的人群在老龄期可能显示CD4和CD8亚群有进一步的改变,但最保险的结论是这种改变是不一致的,以至不能用这种似是而非的改变去解释T细胞反应的大改变。

950

然而衰老导致的其他T细胞亚群的分布变化是一致的,特别是CD4及CD8池从初始细胞向记忆型细胞的迁移。在鼠的血液中,脾和外周淋巴结的CD4和CD8池的T细胞表达记忆T细胞标志CD44的比例随衰老而增加[12,14,15];衰老的小鼠CD4池中CD45RB^{hi}T细胞下降[15,16],与CD44的表达的水平协调;CD4表达的另一种标志3G11也下降,一种在初始CD4和CD8共有的标志CD62L(Mel-14)也是如此[18]。对衰老人群的T细胞亚群的研究已证明,表达记忆标志CD45R0和CD29的细胞增加,自然人群的CD45RA标志下降[19~23]。因一些学者争论CD45RA(或小鼠CD45RB)的丢失和CD45R0的获得应认为比记忆型细胞的状态更应作为T细胞活化的信号,故衰老不能导致T细胞表达IL-2受体链CD25和MHCⅡ类分子的比率增加显得没有意义[22,24]。

小鼠衰老的研究也证实表达P糖蛋白的T细胞比率增加[25],已知它有协助肿瘤细胞多重抗药的作用。衰老的CB6F1小鼠其CD4和CD8池由初始细胞到记忆型细胞表达P糖蛋白都增加[25],通过荧光染料R123标记发现,异种基因[23]和TCR转基因小鼠[26]也显示P-糖蛋白表达呈年龄依赖性增加。在衰老的人群表达P-糖蛋白的T细胞比率也增加[27],尽管这种变化好像在成年早期已经完成。

这种在初始细胞下降及伴行的记忆型细胞增加,或细胞表达的P糖蛋白堆积的程度可能与T细胞的功能相关。这些变化可通过胸腺或胸腺后的变化而得以解释,都将在本章随后讨论。

T细胞的功能

白细胞介素-2(IL-2)

首先报道IL-2的产生[28]下降与衰老相关是在其作为T细胞生长因子的生物检测发展后仅3年。随后又许多报道了小鼠或人类[10,29]在因致有丝分裂外源凝集素或抗T细胞受体(TCR)/CD3复合物抗体成分引发T细胞免疫反应时IL-2减少。这就明显异于常理。①老老少少的小鼠T细胞由抗CD3抗体介导产生高水平的IL-2[30],也许其是能克服激活衰老T细胞的屏障的特别的刺激物。有趣的是这种强力的由抗CD3抗体引发的老年小鼠的T细胞反应可被抗IL-4抗体抑制,提示这种IL-4依赖的活化对老的T细胞培养产生IL-2是非常有效的[31]。②老老少少的大鼠在某些方面也显示出相似的IL-2水平[32~33],但不是全部。年龄依赖的IL-2分泌水平的下降伴行IL-2 mRNA的下降[37~39]。有限稀释和原位杂交实验显示,T细胞通过IL-2与植物外源凝集素[40,41]或超抗原[16]反应的比例随衰老而下降。

老年人体外T细胞表达IL-2的水平众所周知是可变的[42],有的人群IL-2的水平介于年轻对照组的正常范围,有的即便同一个体在不同时间获取的样本也缺乏一致性[43]。老年人的T细胞体外植物外源凝集素诱导IL-2水平低,与高水平的血清IL-2和对流感疫苗的低反应有关联,同时疫苗本身诱导细胞IL-2产生的能力短暂的下降(即2周)[44]。这些体外实验数据提示,老年人中普遍存在抗感染免疫反应受到次要抑制因子的可能潜在的抑制的模式。观察IL-2随老年而下降的水平提示了一种有趣的想法,即通过对老年相关免疫缺陷者补充IL-2以矫正其水平。虽然在体外对老年供体细胞施加大剂量IL-2的确能显著增加T细胞的反应

性[45,46],但有丝分离原介导T细胞受体下降与年龄相关的报告显示[47~49],老年T细胞的不足不能简单地归咎于单一的生物化学损害,确实有许多研究发现,在体外外源的IL-2对重建T细胞功能几乎是无效的[10]。衰老将导致能 表达高亲和力IL-2复合体的被刺激细胞比例的变化[50,51],使T细胞暴露在用于有丝分裂扩增的含IL-2的有限稀释培养基中的比例下降。另外,也有对IL-2反应的年龄依赖性下降,即便这些细胞都表达IL-2受体,其分子作用机制还不清楚。

因此,体外多克隆刺激T细胞增殖似乎达不到的理想效果:IL-2及其受体的低表达,导致IL-2与其受体的低反应。这些改变能通过普遍存在于年轻个体的初始T细胞与在老年占优势作用的记忆细胞内的不同而得到解释吗? 与此观点一致的有限稀释试验提示鼠初始T细胞被ConA或超抗原SEB刺激后,培养基中初始T细胞产生的IL-2明显多于记忆T细胞产生的,与先由有丝分裂原或同种抗原激活后再由IL-2增殖的反应类似[46,53]。事实上,使用老年老鼠T细胞进行的有限稀释实验得到的非线性曲线可以通过幼鼠来源的初始和记忆细胞模拟老年鼠细胞的比率混合而实现[53]。另一方面,使用转基因鼠研究初始细胞功能时发现,大多数的T细胞表达特异性的鸽细胞色素c受体,提示衰老可能削弱初始细胞对同类抗原的反应能力[26]。还有一些(以下讨论)说明老年来源T细胞特别是记忆细胞分泌细胞因子水平降低的实例,其初始及记忆细胞信号传导途径好像都受到影响。转基因鼠大多数CD4 T细胞都表达对鸽细胞色素C片段的特异性TCR,衰老导致转基因阳性初始细胞产生IL-2的能力下降[26]。尽管这种改变不能归因于从初始细胞亚群到记忆细胞亚群的抗原依赖性改变,但值得注意的是,随年龄转基因阳性细胞的磷酸化糖蛋白表达上升,磷酸化糖蛋白阳性细胞自身的亚功能值得去测试。衰老也降低了纯粹的人初始细胞及记忆细胞对有丝分裂原的反应性,记忆细胞对记忆性抗原的增殖反应也一样,如台湾流感病毒株。从初始细胞到记忆细胞优势的转变,好像其贡献在降低了IL-2的产生及对IL-2反应性;但这本身不能完整的解释免疫反应力下降与年龄的相关性。

白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-5(IL-5)及白细胞介素-10(IL-10)

因IL-4是记忆T细胞的主要产物,可通过IL-4产物的增加来预测随老化而至的记忆T细胞的增加。然而,衰老也将导致T细胞活化途径的下降(见后文),包括需要激活的记忆细胞。因此,老年T细胞产生的IL-4的值可以由这两种相反的趋势清楚明白地显示出来。遗憾的是公开发表的数据有些不一致。如鼠细胞短期体外培养证实大多数产生IL-4的值与年龄正相关[15,56~58];作为对照组,当抗CD28与抗CD3共刺激T细胞时[59],衰老对IL-4的产生好像没有影响,并在伴有IL-2的抗CD3培养液中IL-4分泌下降[60]。人T细胞产生IL-4水平也随年龄而降低[61,62],IgE的产生也是这样,其分泌很大程度上是IL-4依赖性的。人病毒依赖性T细胞有限稀释实验显示IL-4产生细胞系的比例没有随年龄而下降[63],小鼠细胞在体外经有丝分裂原活化后含IL-4的T细胞的流式细胞分析显示随年龄而大大降低[64]。

IL-5和IL-10产生的实验数据很有限,同样有矛盾。短期无血清培养报道小鼠T细胞IL-5的产生随年龄而增加[57],小鼠细胞用固定的抗CD3刺激后能引起IL-5及IL-5 mRNA的聚积[30]。然而抗CD3刺激的培养物伴有一些共刺激物(抗CD28,佛波醇肉豆蔻酸盐乙酸,或IL-4)时,IL-5产生显示下降[65]。有报道说当抗CD3作为共刺激物时,老年鼠来源的T细胞IL-10产生增加[66,67],但当加入包括IL-2和/或IL-4共刺激物时却下降[65]。有在抗CD3的培养物中,纯净的记忆性T细胞产生的IL-10随年龄而增加的报道,但由抗原诱导的早期KLH小鼠来源的记忆T细胞产生的IL-10却随年龄而下降;后者的过失表现在CD4记忆细胞亚类糖蛋白磷酸化表达,其IL-10的产生能力小于老年小鼠中占主导的未磷酸化的阴性细胞。

有关记忆T细胞的聚积,记忆细胞功能中年龄相关性下降的平衡,是否会导致在老年期IL-4、IL-5和IL-10的增加还不清楚,因产生这些影响衰老的细胞因子似乎还取决于种属、刺激物、选择的培养条件。

γ 干扰素

多数报道γ干扰素(IFN-γ由人T细胞产生)是随年龄而下降,包括使用ConA[62,68]、PHA[69]及CD3抗

体[70]。特异性抗原刺激的实验也是相同结果:体外将人T细胞暴露于流感病毒,年轻人群分泌的γ3干扰素多于老年组3倍[71];有限稀释细胞实验显示人T细胞在与带状疱疹、水痘病毒作用时分泌的IFN-γ的频率随年龄而下降[63]。

多克隆刺激鼠T细胞分泌IFN-γ的水平与人不一样:几乎所有的实验室都报告经ConA或CD3抗体[59]的刺激后,IFN-γ及其IFN-γmRNA水平随年龄而增加。INF-γmRNA的经IL-12诱导的同种抗原反应性也未因衰老而削弱[72]。有趣的是,老鼠CD4记忆型细胞磷酸化糖蛋白阳性亚群虽已不能产生IL-4、IL-5或IL-10,却保持了分泌与CD3抗体和IL-12反应的IFN-γ的能力,其IFN-γ分泌能力超过了年轻小鼠[65];其IFN-γ特殊地作用在老年期的保护。老年小鼠CD8记忆型细胞分泌IFN-γ能力也未削弱,CD8记忆型细胞堆积的作用使小鼠IFN-γ分泌水平随年龄而增加[18]。

952

用特异性抗原刺激小鼠T细胞的研究结果与人类结果一致,与多数鼠科多克隆刺激的研究相矛盾[73]:流行性感冒早期T细胞产生IFN-γ水平随年龄而下降[74],与被刺激的小鼠T细胞系IFN-γ的分泌相同。有丝分裂原刺激与抗原刺激细胞的差异的原理值得更深入的研究,对单独有效的利用多克隆刺激的不够合理的阐释有借鉴。

总之,记忆T细胞随年龄而增加是否导致其IFN-γ、IL-4、IL-5及IL-10产物的增加的问题,是否随着年龄增长,Th1和Th2相关细胞因子存在平衡的问题不能以一种简单的方式来回答。一些实验,包括多克隆短期激活小鼠T细胞,明显的显示随年龄增长IFN-γ及IL-4都增加,但使用共刺激或抗原依赖的活化显示出更为复杂的情况,小鼠的反应与使用人外周血进行类似研究的结果并不完全相符。

对IFN-γ及IL-4的应答

随年龄IFN-γ对巨噬细胞活化作用似乎降低。例如,经IFN-γ加LPS活化后腹膜巨噬细胞试验,老年鼠来源的抗肿瘤的细胞毒试验有效力很低[75]。小鼠通过IFN-γ活化后的巨噬细胞产生的过氧化氢和氮氧化物也随年龄而下降[76]。经LPS刺激的人单核细胞抗肿瘤的细胞毒性伴随环磷酸腺苷水平的增加及蛋白激酶C的减少而降低[77],但这是否明确的归结于IFN-γ响应的改变还不清楚。

不是所有的IL-4应答试验都显示年龄依赖性。小鼠B细胞对Ⅱ类抗原的IL-4表达反应、抗IgM共刺激增殖反应及LPS刺激后IgE表达反应3个实验都随年龄而降低[78],但PMA加IL-4对T细胞的增殖却未受影响。IL-4在体外抑制了人对破伤风类毒素的抗体反应也因衰老而减弱[62];相反,人IL-4刺激外周血淋巴细胞而导致的IgE产生并未因年老减少[63]。

T细胞的细胞毒性功能

体外T细胞细胞毒性随衰老而下降有可能与辅助T细胞产生的IL-2减少有关[79~81],虽然静止CD8细胞缺乏产生细胞毒性克隆效应能力,但暴露于激活剂加IL-2后可填补这种缺陷。问题是是否细胞毒性一旦发生就表现出细胞溶解酶功能的年龄依赖性下降,还存在两方面的争议[83,84]。排斥皮移植耐受的II类同种抗原,主要依赖在CD4细胞系上,随年龄比I类抗原减少更严重[85]。衰老小鼠的这种对流感病毒低的保护反应与T细胞细胞毒性产生少及异型的(如交叉反应)免疫性显著下降有关,但提供的数据没有排除该系统特异病毒辅助功能。有关T细胞对抗体产生的促进作用在衰老与B细胞功能一章讨论。

T淋巴细胞活化

抗原的加工(或许多实验方法中的多克隆活化剂)导致静止的T细胞增殖扩增,细胞钙离子通透性改变,蛋白激酶介导磷酸化和新的基因转录。虽然许多实验室都在对该过程进行详细的研究,但就衰老对活化过程的影响了解甚少。这种发展部分的被异种天然T细胞群妨碍,年轻的和老年供体的差异可以反映衰老对细胞内加工的影响;或仅仅是因年轻供体以初始细胞为主,而老年供体以记忆细胞为主而导致的差异;或两

者兼而有之。典型的酶活性试验需要足够数量纯化的T细胞,所需的高费用是另一个严重的障碍:就是说,产生10^9的Jurkat细胞费用近50美元,从小鼠购买至2年龄的小鼠产生,10^9CD8记忆型T细胞费用大约为1500~6000美元,产生的细胞蛋白量更低。尽管有这些困难,但有关早期T细胞活化:钙信号传导、蛋白激酶功能和基因调节表达的DNA组装蛋白三方面的信息在不断积累。这些资料综合表明T细胞活化的异常可以在受致有丝分裂的刺激后的起初几分钟得以证明。

钙信号

在20~60秒内外源致有丝分裂凝集素和CD3/TCR复合物的抗体诱导自由钙离子浓度从静止的仅100nmol/L水平到300nmol/L与1μmol/L之间,然后钙离子维持在基线上一稳定的水平数小时。虽然这个过程高度取决于传统的用作检测钙信号发展的淋巴细胞中IP_3的活性,但释放胞内IP_3引发而堆积的钙离子在数量上对正常淋巴细胞并不重要[88],关键取决于反应发生后的30~60秒时间的跨质膜的钙离子梯度。T细胞激活后这种调控钙的机制还不是很清楚,但大致表现为钙由三磷酸腺苷(ATP)泵通过膜离子通道向胞内外运输钙离子时流入与流出的平衡。

衰老导致人[62,89~91]、鼠[92~94]及猴T[95]细胞在受到多克隆激活剂刺激后钙离子增加的能力下降。不同鼠系的脾及血中CD4、CD8细胞都受到影响[12,92,96]。老年鼠T细胞产生的钙离子的平均水平的下降导致能产生的信号细胞比例降低,随后反映到初始记忆细胞时,不管是通过ConA、抗CD3或离子酶素诱导[96~98],记忆细胞对钙离子信号会更耐受。随着年龄,这种在经多克隆激活后却不能产生钙信号的细胞堆积的主要原因是,能产生IL-2或由ConA加IL-2后起增殖的T细胞的比例下降;从任何年龄鼠分离、富集这种钙离子非反应性细胞作功能试验都不会有反应[99,100]。是否这样的细胞结抗钙信号的传导是因为其他特别的原因(如IL-4或IFN-γ),仍是个未解决的问题。

这种来源于老年鼠T细胞或任何年龄鼠的记忆型T细胞对钙信号传导阻抗的分子基础仍未明确。由ConA刺激的钙离子跨质膜流入速率是小范围的,这种刺激随年龄而降低,但刺激产生的流入非常短暂,不能解释长时间持久的有丝分裂原介导的钙离子浓度的改变,即表现为一种流入与流出的平衡。有研究报道IP_3产生随年龄而下降[93,103],有的发现年龄对T细胞IP_3或IP_4的产生没有影响。尽管IP_3释放胞内储存钙对正常淋巴细胞的作用非常小,但这种对IP_3反应的年龄依赖的变化或IP_3释放池从胞外的再储存不能排除。非常少量的离子酶素便可诱导T细胞钙离子稳定水平的改变而高于静止水平,好像其改变了钙离子流入(离子酶素促进),与质膜ATP酶泵依赖性的钙离子从细胞质流出之间的平衡。老年鼠较年轻鼠更阻抗由离子酶素介导的钙离子的增加,这种阻抗不能归咎于细胞中离子酶素钙复合物浓度的减少,而是因衰老引起的膜钙泵钙敏感性及活性增加[104~106]。在小鼠,阻抗离子酶素的主要是记忆T细胞亚类,CD4及CD8亚群发现都有,有限稀释试验的IL-2及其反应呈弱反应[96,99,100]。基于钙离子信号传导不同的原理来研究分离的人T细胞功能属性还未见报道,但间接的证据显示老年人CD8 T细胞的低增殖与钙信号产生的异常没有关系[89]。

蛋白激酶的功能

早期的研究使用抗磷酸化免疫印迹方法或电泳分离^{32}P标记的磷蛋白来证明,经ConA或抗CD3抗体暴露后的1~10分钟内蛋白质磷酸化与年龄的相关性[107,108]。虽然这些研究没有提供有关明确的酶或蛋白质底物改变方面的作用的信息,但证实了:①衰老改变了蛋白质磷酸化模式,在少量其他的磷酸化水平增加的同时大多数底物的磷酸化程度下降;②CD4和CD8细胞都受到影响;③11月龄的小鼠即可看到少量的改变,随年龄而日益增多;④当通过旁路链使用了PMA(一种PKC的激活剂)和或离子酶素,可以看到许多缺陷。当使用^{32}P特异检测这种变化时,异性酪氨酸磷酸化的一些改变可能是因初始和记忆型细胞的差异所致——后者更多见于老年和任何年龄的弱反应类,推测在初始和CD4细胞中包括丝氨酸及苏氨酸残基的磷酸化都受到同样的影响。虽然年龄影响的相关数据仍很零碎,但近来集中于有关激酶和底物在T细胞活化中的作用有了较好的解释。MEK/ERK在MAP激酶途径的活化的顺序已经显示随年龄人[9]及鼠[110]的T细胞CD3

953

刺激性降低。ConA 刺激鼠 T 细胞后胞液到胞质膜的 PKC 转运随年龄而下降[93,103]，并且小鼠 PMA 介导的大多数磷酸化也下降[107]，虽然不是所有的底物都如此。在此，特别感兴趣的是静止及活化的人 T 细胞随年龄其 PKC 同工酶分布改变较大[111]。年轻个体的静止 T 细胞中 PKCα 和 PKCε 几乎全部都胞质化的，但却在老年人的 T 细胞相关膜上时常发现。年轻个体 T 细胞抗 CD3 刺激诱导膜上的酶 PKC(α、β、d、δ 和 ε)的转运[112]，老年个体却只能诱导 PKCα 转运。这种不同的可能是选择的底物异构或胞内不同的激活剂对 PKC 依赖的信号的敏感度随年龄发生了改变。然而有个别的研究表明，人 T 细胞中的 PKCα 或 β 活性及转运与年龄没有依赖性改变。这种差异尚需别的实验来解释。

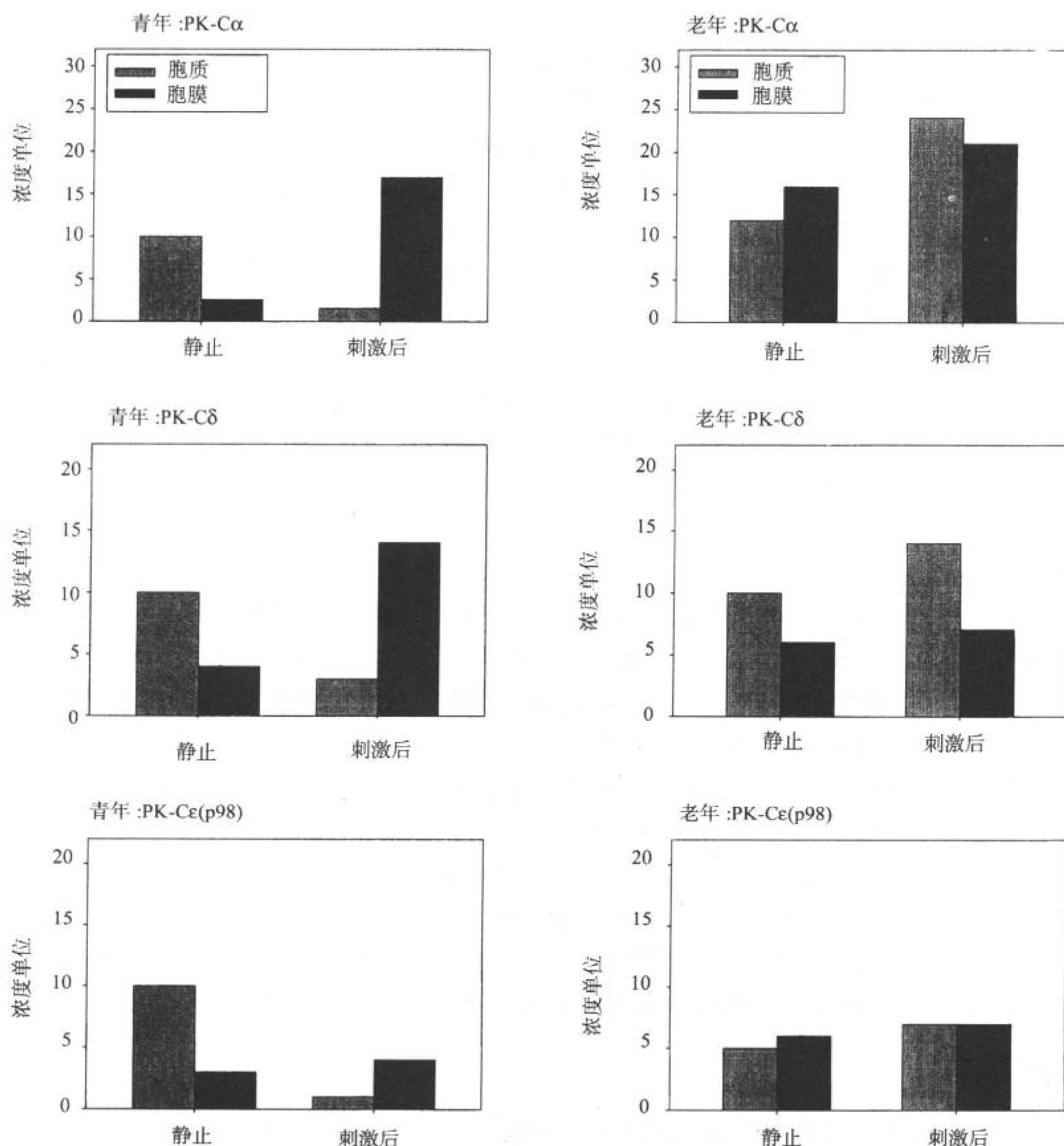


图 28.2 青年及老年人静止和刺激后的外周血 T 细胞 PKC 分布的年龄效应。图(从上至下)显示三种独特的同工酶：PKCα、PKCβ 及来源于 PKCε 的 p98；值为 Western blots 测定的平均值，年轻细胞的细胞质片段中每种同工酶的任意 10 单位值为静止值。用鼠抗 CD3 10 分钟刺激后再用抗鼠 IgG 刺激 5 分钟为激活值[111]。

鼠 CD3 复合物 ζ 链特别的酪氨酸磷酸化研究已显示，静止和激活的细胞都有年龄依赖性改变。用常作为激活途径研究的淋巴瘤细胞为对照，正常静止 T 细胞在酪氨酸磷酸化状态有实在的 ζ 链片段。静止状态的 T 细胞的 ζ 链磷酸化水平较衰老小鼠下降 3 倍[113]。至少 4 种 ζζ 二聚体异构形态可通过非还原胶电泳来区分，小鼠 CD4 细胞的这种 ζ 链的 3 种异构形态磷酸化后与抗 CD3、抗 CD4 交联体有反应；这 3 种异构体可诱导的磷酸化水平也比衰老小鼠降低 3 倍。有关 TCR/CD3 下游的信号传导的信息仍然了解很少。经抗 CD3

刺激的鼠 T 细胞 $C_\gamma1$ 磷脂酶的酪氨酸磷酸化随年龄而下降，一种 35 ~ 36kDa 的蛋白质的磷酸化与该酶有关，这两种磷蛋白质与一种 ras-GTP 酶激活蛋白的 SH2 功能区有关[114]。Shc 的磷酸化水平(认为是将 TCR 信号与 ras 激活蛋白 mSOS 结合)在 CD3 刺激鼠的 T 细胞也随年龄而下降[115]。有趣的是，经抗 CD4 刺激后 Shc 的磷酸化水平呈三倍年龄相关性增加。这同 CD4 与 scr 家族酪氨酸蛋白激酶 $p56^{lck}$ 复合体在衰老小鼠和年轻小鼠 T 细胞中的分布不同一致。研究 T 细胞活化过程中其他组分的年龄相关性改变非常必要，它可以定性或定量的揭示其结合机制。

954

DNA 黏附因子导致的基因活化

该领域的研究仍较零散。年轻个体与老年个体 T 细胞依赖有丝分裂原活化差异的满意的说明现还没有。有些几种基因的表达与年龄呈相关性下降的报道，它们被激活后早期表达的产物包括 c-myc、c-myb、c-fos、c-jun 及包括 fos/jun 复合物的 AP-1 DNA 黏附蛋白的构造[116~120]。这些报告显示的图片不是完全一致。不是所有的老年个体都与年轻个体对照有明显的差别，衰老好像影响了有丝分裂原而不是别的。一些例子(如 c-myc 表达的研究)，是否在基因转录或翻译发生了改变还不清楚[116,117]。系统描述仍需要决定这些早期的基因表达的变化是否一致和对促有丝分裂过程的下一步是否有大的影响，以此来确定何种年龄影响程度能表现出衰老个体和年轻个体的不同 T 细胞亚类间发生来了比例的改变，并与蛋白激酶及钙介导的上游信号相关的基因转录的改变相联系。

955

T 细胞发育

就胸腺而言，幼时的胸腺体积和迁移率明显低下被认为与 T 细胞功能年龄相关性降低有关，此时可能胸腺后期的变化引起免疫功能的衰退的作用被完全忽视了。胸腺细胞数量与细胞结构丢失，被实质的脂肪和结缔组织所替换[121]，伴随 $CD4^+$，$CD8^+$(双阳性)细胞亚类的丢失[122,123]，到 6 月龄的小鼠时，随日夜的胸腺细胞的迁移，至少下降了 90%[124]。胸腺移植耐受从骨髓来源的前体胸腺细胞到成熟细胞的能力实验显示，在小鼠生命的前 3 个月非常低，虽然这种改变的程度及速度通过该实验室的进一步的结果显示有疑问[126]。结合放射、骨髓移植及同源幼年胸腺培植，可以较好地恢复老龄小鼠的 T 细胞功能，甚至反复运用这种方式可以一直维持小鼠整个免疫活性的生命源泉[127]。

胸腺细胞功能的年龄相关性变化，能通过因初始的 T 细胞到达胸腺时活化即前体胸腺细胞功能的分化而被解释吗？原始实验记录显示，骨髓捐献者的年龄似乎对接受者的功能重建没有影响[128,129]。虽然有一些证据表明老年小鼠骨髓的 T 细胞再生不如年轻骨髓供者的持久[130,131]。骨髓中前体 T 细胞的数量没有随年龄而改变[132]，但是老年来源的前体胸腺细胞，在与年轻供者的前体 T 细胞的竞争性胸腺原基器官细胞试验比较时显劣势[133]。生长激素对增加老年小鼠胸腺体积的能力提示，作用于胸腺循环的激素环境可能有这样或那样的改变，但必须注意胸腺细胞数量的增加并不伴随治疗动物的外周 T 细胞功能的提高[134,135]，而且 dw/dw 突变种小鼠对 T 细胞有丝分裂原反应比它们同窝出生者对照组高 2 ~ 3 倍，尽管 dw/dw 突变种实际上缺失循环生长激素[136]。

两种研究已显示，随年龄胸腺细胞池中带 CD4 及 CD8 标志亚群比例的改变，其以序列的区别来指导所有后来的分类。有研究报告认为这两种双阴性池里最早期只表达 CD44 却不表达 CD25 的亚群，并未随衰老而发生改变[137,138]，但其后裔($CD44^+/CD25^+$，$CD44^-/CD25^+$ 及 $CD44^-/CD25^-$ 细胞)却随衰老而下降。这些数据提示老年期的胸腺的成熟可能在很早阶段被阻塞，正好发生在细胞株组成的 V_β 重组基因之前。不管这种阻塞是否属 T 细胞系固有的，或表现为一种年龄相关性环境信号提供的缺乏，都需要进一步的研究。

胸腺退化缺失或显现胸腺增生的 Buffalo 大鼠[139]和由 CD2 启动的 T 细胞表达 Fas 的转基因小鼠系[67]，这两种动物模型都显示 T 细胞功能与年龄呈相关性下降的延迟。大鼠模型增生的分子机制还不清楚，通过引导凋亡的 Fas 蛋白的过度表达可以延迟转基因小鼠的胸腺退化。由 CD2 启动的完全表达重组 V_α 和 V_β 链

转基因老龄鼠也未表现出胸腺退化[137]，虽然衰老对外周T细胞功能的影响在该动物模型上还没有被测试。这些研究和其他改变的胸腺退化线索可以表露出该过程另外的方法，及它对T细胞功能下降的含义。

尽管简单的归咎于老年T细胞功能紊乱而导致胸腺退化是很诱惑人的，但显得过于简单化，需要对衰老时T细胞外周更新的机制做很多研究。一个年轻成年小鼠每天通过胸腺输出的细胞数量只占需要更新细胞的很少的比例[140,141]，外周T细胞可以通过胸腺依赖方式以10^4或以上指数扩增，使耗尽的免疫系统再生[142,143]。被切除胸腺的成年鼠T细胞免疫性也与老年小鼠一样出色[144,146]。初始与记忆细胞间的平衡不只是简单的通过胸腺来补充[147]，而且通过抗原驱动及或许是抗原依赖性加工来精确的平衡细胞扩增与细胞死亡。

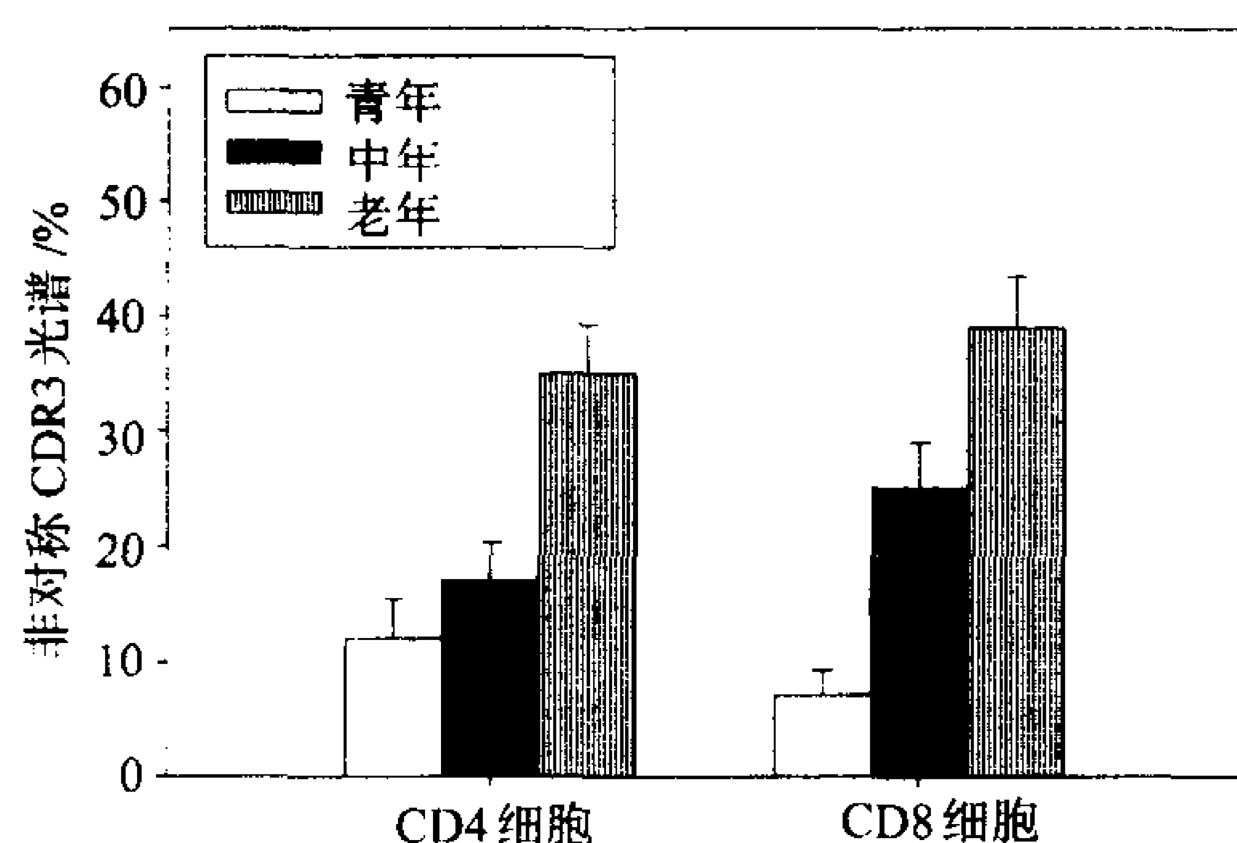


图28.3 年轻(8月龄)、中年(16月龄)及老年(24月龄)SPF CB6F1小鼠的TCR-$V_β$ CDR3(补体决定区3)体积分布棒状比例图。棒状图显示每组6只小鼠N = 93~132光谱型的比例和标准误差。CD4及CD8细胞系随年龄呈线性衰退(引自RL Mosley、MM Koker和RA Miller，未发表的资料)。

目前，衰老对胸腺后加工的影响几乎完全是神秘的，但也不断有一些T细胞指令的年龄相关性证据。衰老的鼠[148]与衰老的人[149]显示表达特异性TCR $V_β$链的CD8细胞系的不平衡；特异的是$V_β$的分布模式每个个体小鼠或人都特别不同。在小鼠，这种异常在SPF级动物普遍较少，通常的发现是被人为怀疑有问题[150]，一部分是因原始报告使用了冷血动物作对照组[149]，更不说用年轻成年组作样本了。在人为研究对象时，这些聚积看来也表现为克隆繁殖的产物，占支配地位的CD28阴性亚群克隆扩增被发现。人类CD28阴性亚群随年龄而增加和端粒酶平均长度缩短，调和了广泛的增殖史[151]。每个衰老的小鼠都有其自身的TCR $V_β$特异模式，意味着随年龄$V_β$链平均分布没有改变，从而解释了将小鼠RNA样本交叉汇集后$V_β$ mRNA研究的阴性研究结果[122]。用光谱法，显示15月龄以上小鼠的CD4和CD8的单个TCR-$V_β$互补决定区3(CDR3)分布大小，揭示其呈特异的曲线(RL Mosley、MM Koker和RA Miller，未发表的数据；图28.3)。这些异常很可能表明罕见的T细胞克隆的扩增，其在抗原刺激增长后期失去了终止增殖或克隆清除的能力。类似的方法也揭示人的CD4和CD8 T细胞系克隆扩增[152]。这些功能暗示，即使有的话，这些T细胞指令的变化还不清楚。尽管有个别研究报道Fas的表达和凋亡的易感性随年龄而下降[67]，另三个研究显示鼠[153]及人[154,155]的细胞被活化后凋亡和(或)Fas表达与随年龄而增加，T细胞变化的分子基础及其暗示的免疫保护性仍是个未决的问题。

956

B淋巴细胞的年龄相关性变化

B细胞功能的内在改变

难点在设计B细胞年龄相关性变化的实验，代表性的是增殖或抗体分泌试验，确保这种改变不是仅仅是T细胞伴随的活性的变化。研究运用了强的B细胞有丝分裂原或辅助T细胞，显示出B细胞的数量约一半呈年龄相关性下降，另一半没有发现年青供者与老年供者的差异[10]。以下将详细讨论B细胞对含T细胞的脾碎片培养物中合成半抗原的应答的问题，其频率随着衰老大约降低2倍[156]，而对磷酸胆碱的应答却是显著的例外[157]。用有限稀释培养法研究B细胞的应答频率是矛盾的，一个报道显示老鼠的B细胞对LPS反应的频率下降20倍[158]，另一个发现B细胞功能指数上没有变化[159]，第三个使用滤纸克隆试验的报告说随衰老而下降2~3倍[160]。在一些而不是所有的老年人群用PKC值的变化[161]，或MAP激酶的活化研究[162] B细胞初期的信号转导缺失。随年龄、功能独特的成熟B细胞亚类可能变化的证据仍是粗约的。用表面IgM和IgD水平显示B细胞的多样性，注意到有一组老年鼠个体常常有不同的B细胞亚类，它们或高或低于年轻对照组，但就亚群的平均分布随年龄没有改变[163]。有报道说一些雌性小鼠系B细胞表达CD5标志的增

加[164]，而雄性没有这种变化[165,166]，因而 B 细胞功能的大多数变化是不可靠的，因其对雌性动物无限制性。表达高水平的热稳定抗原的 B 细胞的数量和功能属性是前体记忆性 B 细胞的标志，不随衰老而改变[167]。

抗体水平、指令、自动反应性

不同的报告间惊人的一致是，血清免疫球蛋白同型浓度的改变可能呈年龄相关性。对先天几种小鼠系两个组的研究都报告血清 IgM，IgA，及四种 IgG 亚类的浓度随年龄大大增加（高达 5 倍）[168,169]。然而第三组发现除 IgG2b（2 倍）和 IgG1（3 倍）外[170]，其余无年龄相关变化，第四组除 IgG2a 有小的增加外没有变化的证据[171]。在人也存在矛盾的结果，一些研究报告免疫球蛋白同型没有变化[172,173]，而另一些发现 IgA 水平增加 4 倍及其他型有少量增加[174]。

年龄对免疫球蛋白 V_H 和 V_L 基因家族利用效应的研究都类似的缺乏一致性。一个研究组发现，使用 J558，S107，和 7183 VH B 细胞克隆刺激分裂基因的老年 BALB/c 鼠没有变化[175]。另一个研究室发现，除老龄 BALB/c 鼠的 V_H-S107 增加外，BALB/c 及 C57BL/6 鼠的 8 V_H和 8 V_L家族不受年龄的影响[160]。然而第三方报道提示，老年 C57BL/6 鼠的 J558 基因增加，每个三年龄的 BALB/c 都过表达（不包括 S107）不同的 V_H 基因家族[176]。即便通过克隆表达方法产生大量的细胞用于研究，也很难判定这些结果中谁能代表在体外不经扩增便产生大量克隆的大多数 B 细胞。老年鼠的 D 和 J 片段鉴别法的信息使 15 月龄 BALB/c 小鼠产生的杂交瘤细胞的分析受到限制[177]。比较年轻小鼠和老年小鼠的序列显示，其利用特异的 D 和 J 片段的频率有差异，成熟 mRNA 使用的 D 序列来源的平均量增加。序列复制一般老年小鼠多于年轻对照鼠；这种特定序列的过表达是记忆 TCR 的早期呈现。需要许多工作（人及更多的不同系的鼠）去试验这些结论的可靠性和它们的功能含义。

对 PC 半抗原独特型限制反应的 BALB/c 鼠的研究，对肺炎球菌的保护性反应起评价作用，已产出许多引起争论的观察资料。尽管年轻鼠对 PC 的应答几乎完全取决于 B 细胞表达的 V_H-S107 和一个特定的 D 和 J 结合片段，老龄 BALB/c 小鼠在抗 PC 反应中显示出的运用其他的 V 基因的趋势引人注目[178,179]。几个品系年轻小鼠选择性使用 V_K22 也随衰老而丢失[180]。尽管这种基因选择性改变的分子基础还不清楚，老龄小鼠信赖不经典的 V_H 序列导致产生低亲和性的抗体库，以至用被动免疫方式削弱了对肺炎球菌感染的保护性[181]。T 细胞在 B 细胞指令中可能的调变作用将在以下讨论。

957

衰老导致人和鼠血清中的抗自身抗体的浓度增加。因这些抗体的低亲合力及在 80%以上的衰老人[182]和小鼠[183]都有发现，似乎没有大的病理意义。发现于年轻或成年人的典型的自身免疫综合征可以通过热量限制方案而延缓，也延缓大多数的年龄相关性免疫功能改变[184]，并可能改变不同细胞因子相对数量或衰老早期特殊的 T 或 B 细胞克隆，对自身免疫性疾病和非病理性自身抗体形成都有利。细胞介导的自身免疫的动物模型已经发现老年动物易感性增加[185]、减少[186]、或未变化的证据，有关紧张（或基因型）、抗原以及免疫途径很可能以复杂的相互作用方式来影响衰老对自身免疫反应的详细的资料已经清楚。

B 细胞发育：内在的及 T 细胞依赖性变化

前体 B 细胞的分析（可通过流式细胞仪检测骨髓发现）发现小鼠 B 细胞的数量呈年龄依赖性下降，另外，这些细胞产生成熟 B 细胞的能力即体外培养模型的数量上随年龄而下降[188,189]。B 细胞通过骨髓细胞转移到小鼠宿主而再生的能力也随衰老而削弱[190]。这些数据支持这样一个观点，衰老可导致 B 细胞产生途径的故障，即便如此，但它们没能洞察如此一个故障的重要性。

有一些证据表明，老鼠的 T 细胞能影响 B 细胞发育过程和铸造具有年老动物代表特性 B 细胞池。采用转移的方案，即骨髓起源的成熟 B 细胞加老年供体的 T 细胞，繁殖 B 细胞频率的下降，产生对 B 细胞免疫球蛋白独特型的特异性自身抗体[190]，表达 B 细胞其他抗体指令的特别年龄特征[193]。

体液免疫中 T 细胞和 B 细胞的相互作用

T 及 B 细胞功能在体液免疫对胸腺依赖性抗原的应答表现的变化呈年龄相关性下降[194,195]。这种下降

一部分归咎于T细胞产生的细胞因子和(或)B细胞对这些细胞因子应答的变化。如以上的讨论，一些体外研究提示衰老可能导致IL-4和IL-5产物的增加。事实上，如果这些细胞因子产物在体内时体液反应随年龄而增加，然后抗体产物下降，也许更真实的约束IL-2产物和/或相关联事件的变化。小鼠CD4 T细胞通过年轻B细胞促进IgM、IgA及4种IgG亚类产生的能力，至少因衰老而被减少了2～4倍，即培养物中包含最佳剂量的IL-2、IL-4、IL-5[194]，这些结果与T细胞到B细胞的依赖接触信号随衰老而削弱的观点一致。T细胞活化B细胞能力的下降，可能归功于伴随T细胞的抗CD3抗体激活后表达的CD40配基数量下降了5倍[196]。B细胞表面受体表达的变化也可能与以上有关。例如，衰老导致B细胞生发中心表达B7-2分子下降，其涉及T细胞CD28信号的相互作用[199]，对CD40的单克隆抗体未能纠正B细胞增生的缺陷[198]。衰老也导致T细胞对B细胞表面IgD表达受体活化能力的下降[199]。T细胞Fc受体在IgD阳性B细胞活化中可以起作用，并有趣的注意到老年对象的T细胞IgD受体的低表达与流行性接种疫苗的低反应有强的相关性[200]。

958

使用T及B细胞混合物的过继转移到重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠的研究，为T细胞在B细胞指令的塑造提供了重要的见证[201]。接受CD4 T细胞和年轻供体免疫NP半抗原利用典型的V_H基因V186.2和高的超突变早期产生的抗体B细胞。小鼠的抗NP半抗原应答接收来源于老鼠产生的T及B细胞的非常低的突变体。小鼠不管接受老年供体来源的T或B细胞都显示使用了需要年轻CD4 T细胞存在V186.2基因，高速体细胞突变的发育需要年轻供体来源的T细胞和B细胞[202]。

图28.4说明了这个系统的关键发现。亲和力成熟发生在老鼠的生发中心，但因体细胞突变缺失，这被可用的(如非突变体)指令所限制从而不能够引起新的高亲合力的B细胞克隆。

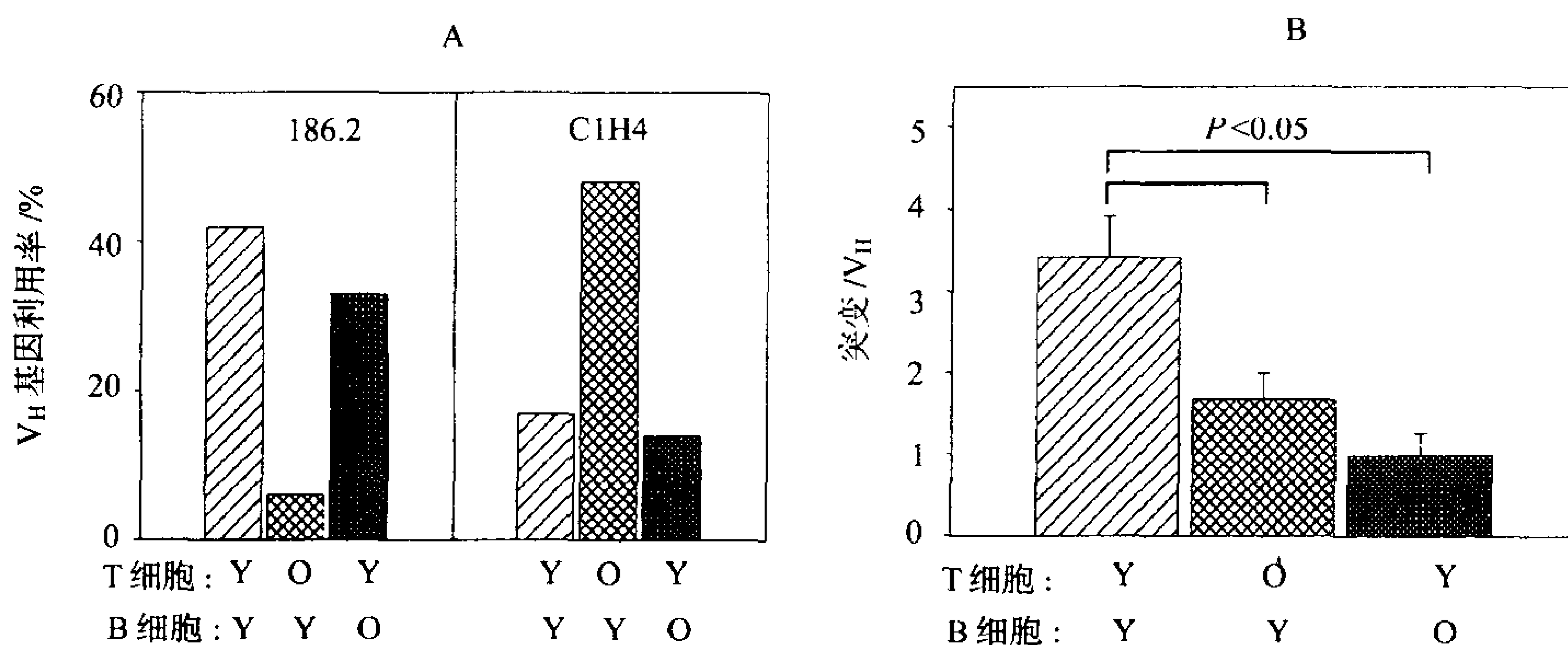


图28.4 抗NP应答中T细胞和B细胞间的协调。用CD4⁺ T细胞和特定年龄鼠的B细胞重建SCID/SCID小鼠(Y,年轻的2～3月龄)；O,老年的21～25月龄；然后用NP-KLH免疫。通过多聚酶链扩增反应和测序B细胞生发中心的DNA染色体组的重组V_H基因。图A:使用J558家族的186.2和C1H4 2个V_H基因供体年龄的影响。186.2基因的使用需要年轻供体的T细胞，但不需要B细胞。图B:体细胞每个V_H链的突变的平均数(N=6或7,生发中心均值和标准误差)。使用老的T或老的B细胞都可使体细胞每个基因的突变降低[201]。

辅助细胞的功能

巨噬细胞、树突细胞及其同源细胞在开始和支持从老年病学观点检测细胞抗特异性免疫反应中分两方面的功能：①维持T细胞的活化；②产生细胞因子和其他非特异效应分子。

从老年供者支持T细胞活化试验，进行了许多抗原呈递细胞(APC)的研究，大多数实验显示APC功能方面不受衰老的影响[10,29]。这些研究没有对抗原的摄取、呈递或表达进行系统的分析，几乎没有不怕麻烦去辨别不同细胞的种类，以及可能对T细胞活化的不同的方式；运用现代方法及试剂，许多工作显然应该去做。体外分析APC的功能已经被大量的运用。早期的对宿主注射放射性抗原被动免疫后的研究表明[203]，衰老动物能够转移免疫复合物至脾和淋巴结，然而衰老小鼠的免疫复合物进入淋巴结滤泡的运输被损害。树实

的滤泡细胞(FD),即年轻小鼠的淋巴结处理进入的免疫复合物的高免疫性的小囊泡,在衰老动物活性很低[204]。事实上,老年小鼠二次免疫应答靠年轻供体来源的初始 T 和 B 细胞去恢复是虚弱的,但它可以通过加免疫复合物到老年供体来源经超声处理的 FDC 人工产生的小囊泡而恢复[205]。在皮肤,朗格汉斯树突细胞有少量减少,似乎这不归咎于皮肤免疫反应的降低[206,207]。衰老大鼠的脾树突细胞体外伴白蛋白存在时,对 T 前体细胞相对无效;这种缺陷没有反映任何的 ICAM-1 或每个基底细胞 MHC II 抗原表达的变化[208]。

衰老对由巨噬细胞产生的 IL-1 和肿瘤坏死因子的影响是非常矛盾的。早期研究[29]依赖的生物测定现已知其不能区别前炎症递质因子,不能足够的注意到刺激、记时和老化测定方法之间的相互作用。然而更广泛的研究显示这些试验细节是非常有影响的。因此当念珠菌被用作刺激源时,被注射完全弗氏佐剂(CFA)后,小鼠腹膜收集到的巨噬细胞产生的 IL-1 随年龄增加,葡萄球菌刺激的培养基中却随年龄而减少,大肠杆菌刺激的显示无年龄影响[209],这些数据用图 28.5 说明。

除一些剂量的大肠杆菌导致这种单核因子呈年龄依赖性增加,年龄对 TFT-α 产生的影响也如同 IL-1 的产生。一个相关的报道提示在体外通过巯基乙酸盐引导[208],小鼠巨噬细胞衰老导致 IL-1、TNF、IL-6 产物的增加,但是经由腹膜或 CFA 刺激的常驻巨噬细胞产生的单核细胞因子下降。血浆中或初始细胞培养物[168,211]自发产生 IL-6 水平呈年龄相关性增加的报告,与下降或年龄效应无关的报告引发争议[213]。大鼠经 LPS 体内注射后,IL-6 和 TNF-α 的产生随年龄而增加[214],类似小鼠 LPS 注射后 TNF-α 的产生[215]。这方面进一步的进展取决于更多外在的细胞异源性及相互作用的考虑,更好的考虑刺激、剂量及时间测定。为实验的方便,几乎所有发表对单核因子产生的研究,都依赖于暴露于有效炎症因子的体内细胞的活性,因此对受抗原刺激产生的特异性免疫应答产生的单核因子的年龄相关性变化的问题还没有解决。因增加的 IL-1 不能恢复老年供体来源的 T 细胞的年轻水平[48,216],IL-1 产生不足似乎不太可能主要归咎于自身年龄相关性 T 细胞功能缺陷。

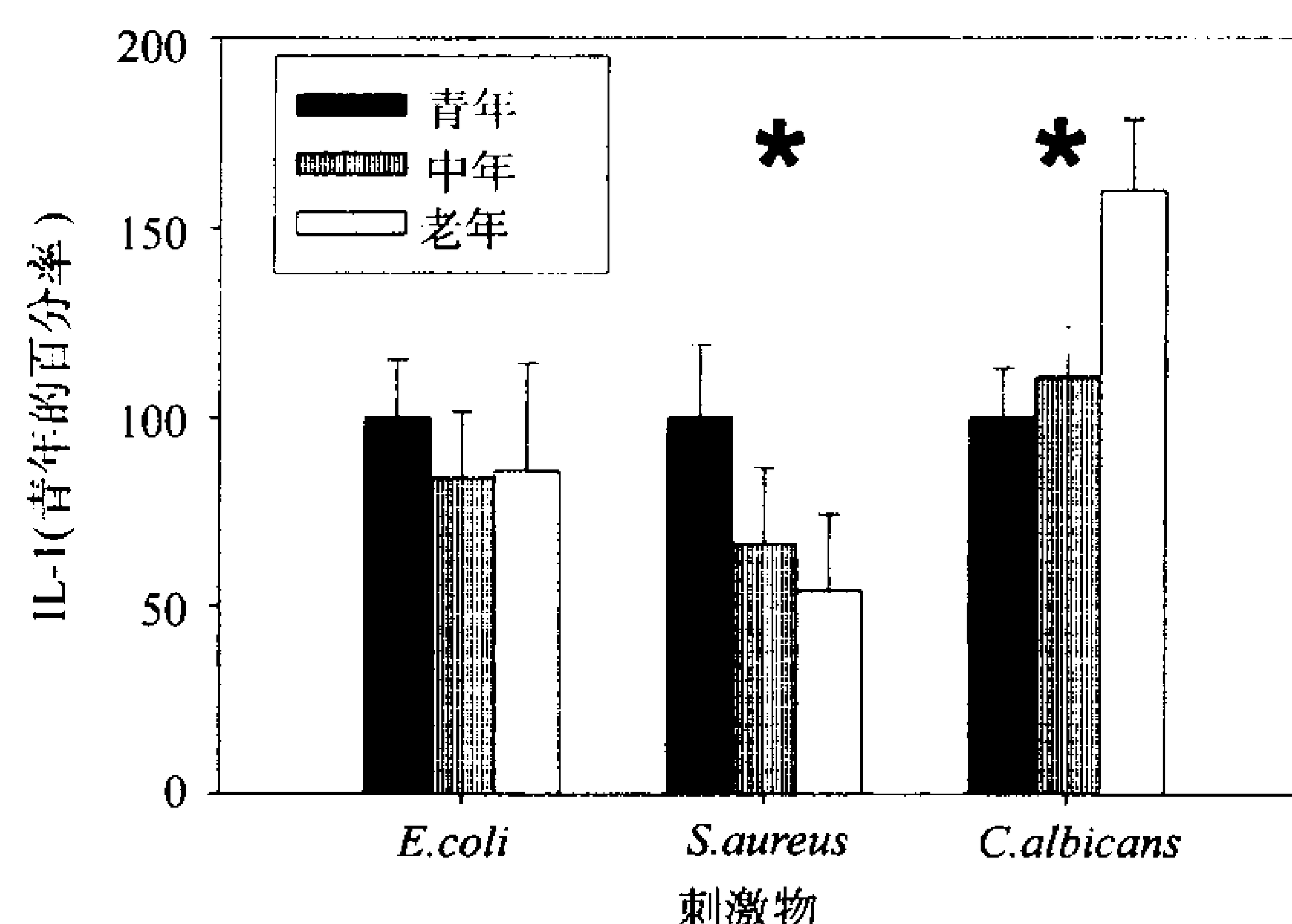


图 28.5　不同刺激物时年龄对小鼠腹膜细胞 IL-1 产生的影响。*E. coli*, *Staphylococcusaureus* 及 *Candida albicans* 分别以 4:1、20:1 及 10:1 的比例 24 小时培养后测上清中 IL-1 生物学活性。图显示均值 ± 标准误差, N = 8 ~ 12 次实验,年轻小鼠的 IL-1 产生水平比较平均。* 表示通过 t 检验随年龄显著增加或降低($P < 0.01$)。

959

一些证据显示巨噬细胞产生的前列腺素可能在老年期促进其低的免疫反应。有报道,合成的前列腺素抑制剂在老年供体可提高其抗体的产生和培养物中 T 细胞增殖分裂反应[217,218],尽管这种作用尚存争议[219]。饮食中的维生素 E 可减少巨噬细胞前列腺素的合成,也可增强小鼠 T 细胞的反应[220],体外用伴刀豆凝集素 A 刺激小鼠脾窦,地诺前列酮的生成随年龄增加。体外这些变化渐渐破坏自然免疫的限度仍不确定,值得注目的被抗 CD28 抗体联合刺激的游离巨噬细胞,在增殖反应中仍然显示出年龄依赖性下降[89]。

自然杀伤细胞

近来人类自然杀伤细胞(NK)的所有报道发现不受年龄的影响,至多只是少量的下降[29,222]。然而,这些数据来源于对外周血的研究;小鼠的资料主要来源于对脾的或淋巴结 NK 细胞的研究,明显显示中年或老年动物的 NK 细胞功能显著下降[29,68,223]。这两组研究的不一致可能归咎于血液和内部淋巴组织的不同,而不是人与小鼠的不同,因在小鼠血的 NK 细胞功能像人类一样,没有显示受年龄影响[224]。衰老人类脾及淋巴结组织的 NK 细胞功能数据将非常的有趣。如果发现衰老人类像衰老小鼠一样表现出内部 NK 细胞功能的极大的下降,这可以为药理学干预提供机会来预防及治疗老年期的病毒和肿瘤疾病,因为至少在小鼠老龄期,通过 IL-2 和 INF-γ 似乎可以增加 NK 细胞的功能[223,225,226]。

老年期免疫功能的修复

老年免疫学主要的目的是帮助制定提高中老年人群免疫功能的策略，以达到预防或治疗老年人群感染性或肿瘤性疾病的目的。因为我们了解的老年免疫衰退的细胞基本原理和分子基础仍很不完全，大多数尝试过的干预策略还完全依赖于经验或类似赌博。一系列因子的检查，包括脱氢异雄甾酮(DHEA)、褪黑激素、生长激素、胸腺激素，及一定数量的维生素和微量营养素。

DHEA 和 DHEA-S

DHEA 是由肾上腺皮质产生的、从 DHEA-S 硫酸化后富含于人血液的肾上腺类固醇，名词 DHEA(S)指该两物质。DHEA(S)作为免疫调节剂的有趣的证据是老年人群随年龄其水平显著降低[227]，中老年血浆中 DHEA(S)浓度降低与心脏病[228]和乳腺癌[229]增加的风险相关。

然而，随后的研究未能证实最初的对心血管疾病保护作用的意向[280]，并显示 DHEA(S)高于平均水平的更年期妇女实际上乳腺癌发病率更高。此外，DHEA(S)虽然在一些灵长类产生的水平高，事实上在大多数别的动物都缺乏，包括小鼠和大鼠；成年大鼠血清的 DHEA(S)水平比人至少低 300 倍[232]，没有证据表明年龄对啮齿类动物 DHEA(S)浓度有何影响。虽然如此，但对老年小鼠给予 DHEA(S)的报告显示对其免疫功能产生戏剧性的恢复。因此，例如，在给抗体前对老年小鼠单独注射 DHEA 可以完全恢复老年小鼠对外源蛋白抗原产生抗体的能力并在 DHEA 存在时产生强的再次抗体应答。这种出乎意料的改善在乙型肝炎抗原免疫后的小鼠也有报道[233]。该研究组还报道了单独的 DHEA 注射逆转了小鼠 IL-6 水平 6 倍年龄相关性增加和血清淀粉样蛋白 P 3 倍的增加，通过 2 个月口服 DHEA(S)逆转了自体抗体产生的年龄相关性增加和血清免疫球蛋白水平。这些给人深刻印象的结果在另一个实验室无一被重现，而且，DHEA 对培养基中 IL-2 产生的影响报告[234]与两个其他的组相矛盾[235,236]。给老年人 6~12 个月的口服 DHEA 不能明显地提高对流感及破伤风疫苗接种的应答[237]，口服 DHEA 20 周的治疗没能改变淋巴细胞培养物的 IL-6 自发的产生[238]。近来的研究显示，经过长期的监测发现，IL-6 及 IL-2 的产生在偶然的时间点有小的变化，它们几乎表现为多因素的人为假象。DHEA 作为后选的免疫刺激剂的兴趣可能有些减弱，除非有一些实验证实其有强的再生能力。

褪黑激素

褪黑激素是松果腺产生的主要激素，已被作为老年期潜在的免疫刺激剂，但其效果证据不足，像 DHEA，任何普通的实验室小鼠都不能产生[239]，因此褪黑激素的水平像小鼠年龄一样不能促进实验小鼠免疫功能的降低是清楚的。褪黑激素在体外对促细胞分裂反应或同源的或异源的混合淋巴细胞反应似乎没有影响[240]，体内对羟扎封的灵敏度没有影响[241]。有一些证据表明褪黑激素可以提高老年小鼠对绵羊红细胞的反应性[242]，尽管这种影响似乎很小并在一个非常小的剂量范围[243]，褪黑激素对其他的抗原更具代表性的证据还没有。

960

生长激素

对作为一种潜在的免疫恢复诱导剂的生长激素(GH)的兴趣来源于 GH 分泌垂体细胞能增加老年大鼠胸腺的体积[135]。然而不管在既往的研究[133]或随后使用纯化的激素[134]或垂体移植[244]的研究，都没能明显的提高外周的免疫功能。一个给予 GH 经 13 周治疗后其影响的阳性报告并发了对照组 61% 的动物死亡[245]；实际上，所有的对照组小鼠都因无法解释的原因死于 21 月龄前。这种有创意的对 GH 缺乏的 dw/dw 小鼠[246]的 GH 治疗已经显示了其可调的人为因素[247]。事实上，GH 缺乏的小鼠突变体显著的长寿[248]且比激素正常的对照组小鼠[136]失去 T 细胞的促细胞分裂反应慢。外科手术除去垂体也可改善老龄小鼠的免疫功能[249]。因此，总而言之，有很少原因支持 GH 缺失是引起免疫衰老的关键或认为 GH 治疗是免疫恢复有希望的途径。

胸腺激素

胸腺激素退化的观点是免疫衰老的一个关键要素，激励了大量的将胸腺作为潜在的可溶性免疫调节剂的研究，所谓的胸腺激素，尽管对这种胸腺激素影响强度及生长的证据有所保留，事实上由许多种组织产生的产物可疑是胸腺激素[250]。文献包含了许多的可信的来源于胸腺产物的序列的合成多肽报告[251]，当将其给予老年小鼠、猴、人后，它们可以导致免疫应答的改善[56,252~254]。然而这些初步研究报告的重复的实验很少，这些胸腺产物以不同的剂量使用后，短期和长期广泛的系统的测量都未能产生强的免疫增强作用[235,256]。在免疫治疗策略上，现行的T细胞在胸腺成熟模型强调包括T细胞系和胸腺基质细胞的接触依赖事件，观察到植入的胸腺上皮细胞可以恢复衰老小鼠的免疫功能[257]，同时也注意到非胸腺淋巴细胞或它们的非分泌产物。

营养的干预

不论是通过生理的矫正或药理学的方法，这里有一些给予维生素或稀有矿物质可提高老年小鼠或人免疫力的线索。至此，每日维生素或稀有矿物质的剂量或稍稍高于推荐最小剂量水平发现，在体外可提高IL-2的产生，NK细胞的功能及抗体的产生，并降低了严重感染疾病的发病率，同时以施与一年安慰剂的健康老年人实验组为对照[258]。维生素E对老年小鼠[220]或人[259]的免疫力有积极的影响，可能如以上讨论，通过影响前列腺素的分泌。一些研究也记录了补充锌的效果的研究[260,261]。微量营养物质法对免疫恢复的详细的研究还只是刚开始。

营养的方法对老年啮齿动物的免疫力有大的可再生的作用，延缓了许多生理性的[262,263]，包括各种不同的T细胞免疫的年龄依赖性改变[264,266]。在灵长类中是否存在类似还不清楚，的确，这方面，猴热量的限制的免疫功能初步的证据还没有鼓舞人心的结果[267]。然而，这种限制性模型将阐明环境处理可能阻止哺乳类动物免疫力的下降，更进一步地洞察食物限制作用机制可能暗示着预防人类免疫力下降的一种新的策略。

免疫力和生命晚期疾病

有一些方法已开始就免疫衰老对生命晚年疾病的可能的贡献得到信息。分析对传染性因子或瘤细胞的免疫应答洞察出了能改变对疾病免疫力的机制，但它们常常很少言及与重要相关免疫因素和其他发病机制的影响。香豆素的分析可以提供有关归咎于免疫因素的危险量，但是它们很少提供有关相关发现的基础，它们可能同时被影响疾病和免疫力的混淆不清的因素复杂化。

在大多数的成功研究例子中，小鼠的研究显示衰老伴随有机体宽范围的对感染抵抗力的下降或许归咎于T细胞功能的改变。从年轻或老年小鼠来源的T细胞移植到一组年轻宿主后测试抑制感染的能力的过继转移研究显示转移的年轻T细胞对脊髓灰质炎病毒[268]、结核杆菌[269]、利斯特氏菌[270]表现出良好的保护性应答。T细胞免疫力降低也削弱了衰老小鼠对流感病毒[86,87]、锥体虫感染的抵抗力[271]。

基于想克服老年人群致命性流行性感冒的感染的考虑，现已就衰老对流感病毒及接种流感疫苗后应答的影响进行了特别仔细的研究。在人类，衰老与在流行性感冒流行时被感染的风险并无关联，但与疾病的加重和高死亡率相关。随年龄，小鼠[86]及预防接种的人群感染流行性感冒后细胞毒性T细胞的能力下降[272]，异型的免疫力下降（亦即暴露于交叉反应病毒株的保护协议）明显与控制病毒从鼻面组织到肺组织的能力丧失相关[87]。T辅助细胞功能变化在宿主对流行性感冒应答中可能的作用缺乏深入的研究，但有一些提示既老年人产生的辅助T细胞的寿命可能比年轻个体产生的短[273]。8周龄的初次患流感的小鼠的辅助细胞及细胞毒性反应持续至少2年[274]，虽然记忆细胞功能的年龄相关性下降促进了受感染结核杆菌的年轻小鼠的复燃[275]。

对同源肿瘤产生特异性细胞毒性T细胞也随年龄而下降[276,277]，虽然还不清楚对转移性肿瘤应答的研究

是否与肿瘤发展早期免疫性保护有密切关系。老年免疫缺陷的问题是否促成老年期癌症发病率的增加还有争议,两方都缺少强有力的证据[278,279]。从异源基因血统挑选的小鼠,因生命早期高水平的体液免疫因而自发的瘤形成减少[280],老龄小鼠高水平的 CD4 记忆细胞的特征可预测年轻成年小鼠期瘤的早期发展[281]。在表象健康的稍老的人群中,皮肤对普通的记忆抗原无反应性与随后 9 年期间癌症死亡率风险要增加大致 2 倍,但这 229 个样本没有统计学意义,无反应性与癌症死亡率没有联系[282]。对转移性肿瘤易感性大(400 倍)的年龄依赖性增加可能与抗肿瘤效应产生的体外实验许多小的变化(2 倍)结果关联[283],它可能是后继免疫系统适度的缺陷(也许包括以上讨论的 NK 细胞功能变化)产生宿主更严重的抗肿瘤能力的缺陷。

有一些免疫学试验对所有的原因引起的死亡率有预测价值的报告,但一般而言不是非常满意。一些早期的研究显示衰老人群低免疫力和低存活率相关[284,285],但未能校正统计上潜在的影响因素(如年龄和性别),以及研究对象为极端老龄的(平均年龄 80 岁)和包括相当短的随访期(典型为 2 年),其先前存在的疾病可能改变了免疫学的试验结果同时也促进了死亡。在一个长的随访期间,分析较年轻的老年对象死亡的全部原因发现,无反应性的人群死亡率增加 2 倍,调整年龄组后却无法显示统计学上的显著性($\rho = 0.06$)影响。在家庭病房被护理的 225 个老年人中无反应性也预示着感染[286],特别是肺炎,与所有的引起死亡的原因一样。从许多免疫试验信息库的策略中,包括淋巴细胞亚类分布和体外有丝分裂反应,也显示出一些预测人死亡率的希望[287]。

小鼠类似的研究有可能用病理的结果来比较预测总的寿命的百分比,但一般而言,要获取足够的样品量而不伤害动物很困难。一个早期的研究报告显示[11],外周血 CD8 细胞的高比例和 CBA 小鼠的低存活率相关,但这是一个个别的克隆呈现的 CD8 细胞年龄相关性变化,不代表其他的实验动物都这样。20 月龄的异种基因小鼠外周血高比例的 CD4 记忆 T 细胞预示着短寿命,不管这种特异性死亡的原因,大多数死亡都归咎于不同种类的瘤形成,模型一致的是过早老化的免疫系统更偏向于自发恶性肿瘤及早的死亡。这些与人类疾病可能的相关性的基础需要进一步的研究才清楚。

摘要及内容说明

如今正常免疫系统知识的非常良好的进展为老年病学的研究提供了更大的机会,老年病学只是刚开始证实有启迪作用的、有趣的免疫现象的年轻学科,其研究才刚起步。免疫模型的开发为细胞活化、基因表达、细胞通讯及生理性衰老和晚年疾病的衰老效应提供了重要的线索。研究初始及记忆 T 细胞间的平衡,免疫球蛋白基因选择的改变和 T 细胞指令,并且不同功能记忆细胞间的异原性可能持续的吸引实验性老年病学家以及众多的免疫学研究者。

(周 伟 译)

参 考 文 献

1. Rose MR. *Evolutionary biology of aging.* New York: Oxford University Press, 1991.
2. Hobbs MH, Ernst DN. T cell differentiation and cytokine expression in late life. *Dev Comp Immunol* 1997;21:461–470.
3. Klinman NR. The basis for decreased B cell responsiveness with aging: the legacy and the challenge. *Ageing: Immunol Infect Dis* 1994;5:203–210.
4. Gottesman SRS, Thorbecke GJ, Walford RL. Specific and nonspecific suppressor cells in aged animals. In: Goidl E, ed. *Aging and the immune response.* New York: Marcel Dekker Inc, 1986:243–270.
5. Makinodan T, Kay MMB. Age influence on the immune system. *Adv Immunol* 1980;29:287–330.
6. Murasko DM, Goonewardene IM. T-cell function in aging: mechanisms of decline. *Annu Rev Gerontol Geriatr* 1990;10:71–96.
7. Hausman PB, Weksler ME. Changes in the immune response with age. In: Finch CE, Schneider EL, eds. *Handbook of the biology of aging.* New York: Van Nostrand Reinhold, 1985:414–432.
8. Thoman ML, Weigle WO. The cellular and subcellular bases of immunosenescence. *Adv Immunol* 1989;46:221–261.
9. Ligthart GJ, Corberand JX, Geertzen HG, Meinders AE, Knook DL, Hijmans W. Necessity of the assessment of health status in human immunogerontological studies: evaluation of the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev* 1990;55:89–105.
10. Miller RA. Immune system. In: Masoro E, ed. *Handbook of physiology. Section 11: physiology of aging.* New York: Oxford University Press, 1995:555–590.
11. Boersma WJA, Steinmeier FA, Haaijman JJ. Age-related changes in the relative numbers of Thy-1 and Lyt-2-bearing peripheral blood lymphocytes in mice: a longitudinal approach. *Cell Immunol* 1985;93:417–430.
12. Grossmann A, Maggio-Price L, Jinneman JC, Rabinovitch PS. Influence of aging on intracellular free calcium and proliferation of mouse T-cell subsets from various lymphoid organs. *Cell Immunol* 1991;135:118–131.
13. Miller RA. Age-related changes in T cell surface markers: a longitudinal analysis in genetically heterogeneous mice. *Mech Ageing Dev* 1997;96:181–196.

14. Lerner A, Yamada T, Miller RA. PGP-1^{hi} T lymphocytes accumulate with age in mice and respond poorly to Concanavalin A. *Eur J Immunol* 1989;19:977–982.
15. Ernst DN, Hobbs MV, Torbett BE, et al. Differences in the expression profiles of CD45RB, Pgp-1, and 3G11 membrane antigens and in the patterns of lymphokine secretion by splenic CD4$^+$ T cells from young and aged mice. *J Immunol* 1990;145:1295–1302.
16. Flurkey K, Stadecker M, Miller RA. Memory T lymphocyte hyporesponsiveness to non-cognate stimuli: a key factor in age-related immunodeficiency. *Eur J Immunol* 1992;22:931–935.
17. Hayakawa K, Hardy RR. Phenotypic and functional alteration of CD4+ T cells after antigenic stimulation. Resolution of two populations of memory T cells that both secrete Interleukin 4. *J Exp Med* 1989;169:2245–2250.
18. Ernst DN, Weigle WO, Noonan DJ, McQuitty DN, Hobbs MV. The age-associated increase in IFN-γ synthesis by mouse CD8+ T cells correlates with shifts in the frequencies of cell subsets defined by membrane CD44, CD45RB, 3G11, and MEL-14 expression. *J Immunol* 1993;151:575–587.
19. De Paoli P, Battistin S, Santini GF. Age-related changes in human lymphocyte subsets: progressive reduction of the CD4 CD45R (suppressor inducer) population. *Clin Immunol Immunopathol* 1988;48:290–296.
20. Pilarski LM, Yacyshyn BR, Jensen GS, Pruski E, Pabst HF. β1 integrin (CD29) expression on human postnatal T cell subsets defined by selective CD45 isoform expression. *J Immunol* 1991;147:830–837.
21. Serra HM, Krowka JF, Ledbetter JA, Pilarski LM. Loss of CD45R (Lp220) represents a post-thymic T cell differentiation event. *J Immunol* 1988;140:1435–1441.
22. Utsuyama M, Hirokawa K, Kurashima C, et al. Differential age-change in the numbers of CD4+CD45RA+ and CD4+CD29+ T cell subsets in human peripheral blood. *Mech Ageing Dev* 1992:63:57–68.
23. Walker D, Gauchat JF, De Weck AL, Stadler BM. Analysis of leukocyte markers in elderly individuals. *Aging: Immunol Infect Dis* 1990;2:31–43.
24. Kendig NE, Chrest FJ, Nagel JE, Chaisson RE, Saah AJ, Adler WH. Age-related changes in the immune function of HIV-1 seropositive adults. *Aging: Immunol Infect Dis* 1991;3:67–80.
25. Witkowski JM, Miller RA. Increased function of P-glycoprotein in T lymphocytes of aging mice. *J Immunol* 1993;150:1296–1306.
26. Linton PJ, Haynes L, Klinman NR, Swain SL. Antigen-independent changes in naive CD4 T cells with aging. *J Exp Med* 1996;184:1891–1900.
27. Pilarski LM, Paine D, McElhaney JE, Cass CE, Belch AR. Multidrug transporter P-glycoprotein 170 as a differentiation antigen on normal human lymphocytes and thymocytes: modulation with differentiation stage and during aging. *Am J Hematol* 1995;49:323–335.
28. Gillis S, Kozak R, Durante M, Weksler ME. Immunological studies of aging. Decreased production of and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans. *J Clin Invest* 1981;67:937–942.
29. Miller RA. Aging and the immune response. In: Schneider EL, Rowe JW, eds. *Handbook of the biology of aging.* San Diego: Academic Press, 1996:355–392.
30. Hobbs MV, Weigle WO, Noonan DJ, et al. Patterns of cytokine gene expression by CD4$^+$ T cells from young and old mice. *J Immunol* 1993;150:3602–3614.
31. Dobber R, Tielemans M, de Weerd H, Nagelkerken L. Mel14+ CD4+ T cells from aged mice display functional and phenotypic characteristics of memory cells. *Int Immunol* 1994;6:1227–1234.
32. Goya RG, Brooks K, Meites J. A comparison between hormone levels and T lymphocyte function in young and old rats. *Mech Ageing Dev* 1991;61:275–285.
33. Holbrook NJ, Chopra RK, McCoy MT, et al. Expression of interleukin 2 and the interleukin 2 receptor in aging rats. *Cell Immunol* 1989;120:1–9.
34. Davila DR, Kelley KW. Sex differences in lectin-induced interleukin-2 synthesis in aging rats. *Mech Ageing Dev* 1988;44:231–240.
35. Odio M, Brodish A, Ricardo MJ Jr. Effects on immune responses by chronic stress are modulated by aging. *Brain Behav Immun* 1987;1:204–215.
36. Wrabatz LG, Antel JP, Oger JJF, Arnason BGW, Goust JM, Hopper JE. Age-related changes in in vivo immunoglobulin secretion: comparison of responses to T-dependent and T-independent polyclonal activators. *Cell Immunol* 1982;74:398–403.
37. Thoman ML, Weigle WO. Partial restoration of Con A-induced proliferation, IL-2 receptor expression, and IL-2 synthesis in aged murine lymphocytes by phorbol myristate acetate and ionomycin. *Cell Immunol* 1988;114:1–11.
38. Nagel JE, Chopra RK, Chrest FJ, et al. Decreased proliferation, interleukin 2 synthesis, and interleukin 2 receptor expression are accompanied by decreased mRNA expression in phytohemagglutinin-stimulated cells from elderly donors. *J Clin Invest* 1988;81:1096–1102.
39. Wu WT, Pahlavani M, Cheung HT, Richardson A. The effect of aging on the expression of interleukin 2 messenger ribonucleic acid. *Cell Immunol* 1986;100:224–231.
40. Fong TC, Makinodan T. In situ hybridization analysis of the age-associated decline in IL-2 mRNA expressing murine T cells. *Cell Immunol* 1989;118:199–207.
41. Miller RA. Age-associated decline in precursor frequency for different T cell-mediated reactions, with preservation of helper or cytotoxic effect per precursor cell. *J Immunol* 1984;132:63–68.
42. Hessen MT, Kaye D, Murasko DM. Heterogeneous effects of exogenous lymphokines on lymphoproliferation of elderly subjects. *Mech Ageing Dev* 1991;58:61–73.
43. Brill S, Kukulansky T, Tal E, et al. Individual changes in T lymphocyte parameters of old human subjects. *Mech Ageing Dev* 1987;40:71–79.
44. Huang Y-P, Pechere J-C, Michel M, et al. In vivo T cell activation, in vitro defective IL-2 secretion, and response to influenza vaccination in elderly women. *J Immunol* 1992;148:715–722.
45. Thoman ML, Weigle WO. Reconstitution of in vivo cell-mediated lympholysis responses in aged mice with Interleukin 2. *J Immunol* 1985;134:949–952.
46. Beckman I, Dimopoulos K, Xu XN, Bradley J, Henschke P, Ahern M. T cell activation in the elderly: evidence for specific deficiencies in T cell/accessory cell interactions. *Mech Ageing Dev* 1990;51:265–276.
47. Ernst DN, Weigle WO, McQuitty DN, Rothermel AL, Hobbs MH. Stimulation of murine T cell subsets with anti-CD3 antibody. Age-related defects in the expression of early activation molecules. *J Immunol* 1989;142:1413–1421.
48. Negoro S, Hara H, Miyata S, et al. Mechanisms of age-related decline in antigen-specific T cell proliferative response: IL-2 receptor expression and recombinant IL-2 induced proliferative response of purified TAC-positive T cells. *Mech Ageing Dev* 1986;36:223–241.
49. Vie H, Miller RA. Decline, with age, in the proportion of mouse T cells that express IL-2 receptors after mitogen stimulation. *Mech Ageing Dev* 1986;33:313–322.
50. Nagel JE, Chopra RK, Powers DC, Adler WH. Effect of age on the human high affinity interleukin 2 receptor of phytohaemagglutinin stimulated peripheral blood lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1989;75:286–291.
51. Schwab R, Pfeffer LM, Szabo P, Gamble D, Schnurr CM, Weksler ME. Defective expression of high affinity IL-2 receptors on activated T cells from aged humans. *Int Immunol* 1990;2:239–246.
52. Thoman ML. Impaired responsiveness of IL-2 receptor-expressing T lymphocytes from aged mice. *Cell Immunol* 1991;135:410–417.
53. Nordin AA, Collins GD. Limiting dilution analysis of alloreactive cytotoxic precursor cells in aging mice. *J Immunol* 1983;131:2215–2218.
54. Dozmorov IM, Kalinichenko VV, Sidorov IA, Miller RA. Antagonistic interactions among T cell subsets of old mice revealed by limiting dilution analysis. *J Immunol* 1995;154:4283–4293.
55. Hallgren HM, Ambroziak J, O'Leary JJ, Degelau JJ. Changes with age in CD4+ memory and naive T lymphocyte proliferative responses to both mitogen and recall antigens in healthy humans. *Aging: Immunol Infect Dis* 1994;5:109–119.
56. Cillari E, Milano S, Dieli M, et al. Thymopentin reduces the susceptibility of aged mice to cutaneous leishmaniasis by modulating CD4 T cell subsets. *Immunology* 1992;76:362–366.
57. Daynes RA, Araneo BA. Prevention and reversal of some age-associated changes in immunologic responses by supplemental dehydroepiandrosterone sulfate therapy. *Aging: Immunol Infect Dis* 1992;3:135–154.
58. Nagelkerken L, Hertogh-Huijbregts A, Dobber R, Drager A. Age-related changes in lymphokine production related to a decreased number of CD45RB^{hi} CD4$^+$ T cells. *Eur J Immunol* 1991;21:273–281.
59. Engwerda CR, Fox BS, Handwerger BS. Cytokine production by T lymphocytes from young and aged mice. *J Immunol* 1996;156:3621–3630.
60. Li SP, Miller RA. Age-associated decline in IL-4 production by murine T lymphocytes in extended culture. *Cell Immunol* 1993;151:187–195.
61. Burns EA, L'Hommedieu GD, Cunning JL, Goodwin JS. Effects of interleukin-4 on antigen-specific antibody synthesis by lymphocytes from old and young adults. *Lymphokine Cytokine Res* 1994;13:227–231.
62. al-Rayes H, Pachas W, Mirza N, Ahern DJ, Geha RS, Vercelli D. IgE regulation and lymphokine patterns in aging humans. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:630–636.
63. Zhang Y, Cosyns M, Levin MJ, Hayward AR. Cytokine production in varicella zoster virus-stimulated limiting dilution lymphocyte cultures. *Clin Exp Immunol* 1994;98:128–133.
64. Green-Johnson JM, Haq JA, Szewczuk MR. Effects of aging on the production of cytoplasmic interleukin-4 and 5, and interferon-γ by mucosal and systemic lymphocyctes after activation with phytohemagglutinin. *Aging: Immunol Infect Dis* 1991;3:43–57.
65. Bining N, Miller RA. Cytokine production by subsets of CD4 memory T cells differing in P-glycoprotein expression: effects of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1997;52:B137–B145.
66. Hobbs MV, Weigle WO, Ernst DN. Interleukin-10 production by splenic CD4+ cells and cell subsets from young and old mice. *Cell Immunol* 1994;154:264–272.
67. Zhou T, Edwards CK, Mountz JD. Prevention of age-related T cell apoptosis defect in CD2-fas-transgenic mice. *J Exp Med* 1995;182:129–137.
68. Albright JW, Albright JF. Age-associated impairment of murine natural killer activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:6371–6375.
69. Abb J, Abb H, Deinhardt F. Age-related decline of human interferon alpha and interferon gamma production. *Blut* 1984;48:285–289.
70. Gauchat JF, DeWeck AL, Stadler BM. Decreased cytokine mRNA levels in the elderly. *Aging: Immunol Infect Dis* 1988;1:191–204.
71. Salkind AR. Influence of age on the production of Fos and Jun by influenza virus-exposed T cells. *J Leukoc Biol* 1994;56:817–820.
72. Bloom ET, Thompson WC, Horvath-Arcidiacono JA, Burd PR. Differential effects of interleukin-12 treatment on gene expression by allostimulated T cells

from young and aged mice. *Mech Ageing Dev* 1995;85:109–124.
73. Mbawuike IN, Acuna C, Caballero D, et al. Reversal of age-related deficient influenza virus-specific CTL responses and IFN-gamma production by monophosphoryl lipid A. *Cell Immunol* 1996;173:64–78.
74. Fujio H, Kawamura I, Miyamoto H, Mitsuyama M, Yoshida S. Decreased capacity of aged mice to produce interferon-gamma in Legionella pneumophila infection. *Mech Ageing Dev* 1995;81:97–106.
75. Wallace PK, Eisenstein TK, Meissler JJ Jr, Morahan PS. Decreases in macrophage mediated antitumor activity with aging. *Mech Ageing Dev* 1995;77:169–184.
76. Ding A, Hwang S, Schwab R. Effect of aging on murine macrophages. Diminished response to IFN-gamma for enhanced oxidative metabolism. *J Immunol* 1994;153:2146–2152.
77. McLachlan JA, Serkin CD, Morrey KM, Bakouche O. Antitumoral properties of aged human monocytes. *J Immunol* 1995;154:832–843.
78. Thoman ML, Keogh EA, Weigle WO. Response of aged T and B lymphocytes to IL-4. *Aging: Immunol Infect Dis* 1988;1:245–253.
79. Gottesman SRS, Walford RL, Thorbecke GJ. Proliferative and cytotoxic immune functions in aging mice. III. Exogenous interleukin-2 rich supernatant only partially restores alloreactivity in vitro. *Mech Ageing Dev* 1985;31:103–113.
80. Askonas BA, Mullbacher A, Ashman RB. Cytotoxic T-memory cells in virus infection and the specificity of helper T cells. *Immunology* 1982;45:79–84.
81. Miller RA, Stutman O. Decline, in aging mice, of the anti-TNP cytotoxic T cell response attributable to loss of Lyt-2⁻, IL-2 producing helper cell function. *Eur J Immunol* 1981;11:751–756.
82. Saxena RK, Saxena QB, Adler WH. Lectin-induced cytotoxic activity in spleen cells from young and old mice. Age-related changes in types of effector cells, lymphokine production and response. *Immunology* 1988;64:457–461.
83. Gottesman SRS, Edington J. Proliferative and cytotoxic immune functions in aging mice: V. Deficiency in generation of cytotoxic cells with normal lytic function per cell as demonstrated by the single cell conjugation assay. *Aging: Immunol Infect Dis* 1990;2:19–29.
84. Bloom ET, Kubota LF, Kawakami K. Age-related decline in the lethal hit but not the binding stage of cytotoxic T-cell activity in mice. *Cell Immunol* 1988;114:440–446.
85. Rosenberg AS, Sechler JM, Horvath JA, Maniero TG, Bloom ET. Assessment of alloreactive T cell subpopulations of aged mice in vivo. CD4+ but not CD8+ T cell-mediated rejection response declines with advanced age [published erratum appears in *Eur J Immunol* 1994 Oct;24(10):2571]. *Eur J Immunol* 1994;24:1312–1316.
86. Bender BS, Johnson MP, Small PA. Influenza in senescent mice: impaired cytotoxic T-lymphocyte activity is correlated with prolonged infection. *Immunology* 1991;72:514–519.
87. Bender BS, Small PA Jr. Heterotypic immune mice lose protection against influenza virus infection with senescence. *J Infect Dis* 1993;168:873–880.
88. Gelfand EW, Cheung RT, Mills GB, Grinstein S. Uptake of extracellular Ca^{2+} and not recruitment from internal stores is essential for T lymphocyte proliferation. *Eur J Immunol* 1988;18:917–922.
89. Grossmann A, Ledbetter JA, Rabinovitch PS. Reduced proliferation in T lymphocytes in aged humans is predominantly in the CD8+ subset, and is unrelated to defects in transmembrane signaling which are predominantly in the CD4+ subset. *Exp Cell Res* 1989;180:367–382.
90. Gupta S. Membrane signal transduction in T cells in aging humans. *Ann NY Acad Sci* 1989;568:277–282.
91. Whisler RL, Newhouse YG, Donnerberg RL, Tobin CM. Characterization of intracellular ionized calcium responsiveness and inositol phosphate production among resting and stimulated peripheral blood T cells from elderly humans. *Aging: Immunol Infect Dis* 1991;3:27–36.
92. Grossmann A, Ledbetter JA, Rabinovitch PS. Aging-related deficiency in intracellular calcium response to anti-CD3 or concanavalin A in murine T-cell subsets. *J Gerontol Biol Sci* 1990;45:B81–B86.
93. Proust JJ, Filburn CR, Harrison SA, Buchholz MA, Nordin AA. Age-related defect in signal transduction during lectin activation of murine T lymphocytes. *J Immunol* 1987;139:1472–1478.
94. Miller RA, Jacobson B, Weil G, Simons ER. Diminished calcium influx in lectin-stimulated T cells from old mice. *J Cell Physiol* 1987;132:337–342.
95. Grossmann A, Rabinovitch PS, Lane MA, et al. Influence of age, sex, and dietary restriction on intracellular free calcium responses of CD4⁻ lymphocytes in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Cell Physiol* 1995;162:298–303.
96. Philosophe B, Miller RA. Diminished calcium signal generation in subsets of T lymphocytes that predominate in old mice. *J Gerontol Biol Sci* 1990;45:B87–B93.
97. Rajasekar R, Augustin A. Antigen-dependent selection of T cells that are able to efficiently regulate free cytoplasmic calcium levels. *J Immunol* 1994;153:1037–1045.
98. Lohmiller JJ, Roellich KM, Toledano A, Rabinovitch PS, Wolf NS, Grossmann A. Aged murine T-lymphocytes are more resistant to oxidative damage due to the predominance of the cells possessing the memory phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1996;51:B132–B140.
99. Miller RA, Flurkey K, Molloy M, Luby T, Stadecker MJ. Differential sensitivity of virgin and memory T lymphocytes to calcium ionophores suggests a buoyant density separation method and a model for memory cell hyporesponsiveness to Con A. *J Immunol* 1991;147:3080–3086.
100. Philosophe B, Miller RA. T lymphocyte heterogeneity in old and young mice: functional defects in T cells selected for poor calcium signal generation. *Eur J Immunol* 1989;19:695–699.
101. Lerner A, Philosophe B, Miller RA. Defective calcium influx and preserved inositol phosphate generation in T cells from old mice. *Aging: Immunol Infect Dis* 1988;1:149–157.
102. Freedman MH, Raff MC, Gomperts B. Induction of increased calcium uptake in mouse T lymphocytes by concanavalin A and its modulation by cyclic nucleotides. *Nature* 1975;255:378–382.
103. Kawanishi H. Activation of calcium (Ca)-dependent protein kinase C in aged mesenteric lymph node T and B cells. *Immunol Lett* 1993;35:25–32.
104. Miller RA, Philosophe B, Ginis I, Weil G, Jacobson B. Defective control of cytoplasmic calcium concentration in T lymphocytes from old mice. *J Cell Physiol* 1989;138:175–182.
105. Negoro S, Hara H. The effect of taurine on the age-related decline of the immune response in mice: the restorative effect on the T cell proliferative response to costimulation with ionomycin and phorbol myristate acetate. *Adv Exp Med Biol* 1992;315:229–239.
106. Ran Q, Li D, Zhen Y. [Changes of proto-oncogene expression and cytosolic free calcium in activated T-lymphocytes of aged mice]. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih* 1995;75:466–9, 509–510.
107. Patel HR, Miller RA. Age-associated changes in mitogen-induced protein phosphorylation in murine T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1992;22:253–260.
108. Shi J, Miller RA. Tyrosine-specific protein phosphorylation in response to anti-CD3 antibody is diminished in old mice. *J Gerontol Biol Sci* 1992;47:B147–B153.
109. Whisler RL, Newhouse YG, Bagenstose SE. Age-related reductions in the activation of mitogen-activated protein kinases $p44^{mapk}$/ERK1 and $p42^{mapk}$/ERK2 in human T cells stimulated via ligation of the T cell receptor complex. *Cell Immunol* 1996;168:201–210.
110. Gorgas G, Butch ER, Guan KL, Miller RA. Diminished activation of the MAP kinase pathway in CD3-stimulated T lymphocytes from old mice. *Mech Ageing Dev* 1997;94:71–83.
111. Fulop T Jr, Leblanc C, Lacombe G, Dupuis G. Cellular distribution of protein kinase C isozymes in CD3-mediated stimulation of human T lymphocytes with aging. *FEBS Lett* 1995;375:69–74.
112. Whisler RL, Newhouse YG, Grants IS, Hackshaw KV. Differential expression of the alpha- and beta-isoforms of protein kinase C in peripheral blood T and B cells from young and elderly adults. *Mech Ageing Dev* 1995;77:197–211.
113. Garcia GG, Miller RA. Differential tyrosine phosphorylation of zeta chain dimers in mouse CD4 T lymphocytes: effect of age. *Cell Immunol* 1997;175:51–57.
114. Grossmann A, Rabinovitch PS, Kavanagh TJ, et al. Activation of murine T-cells via phospholipase-C gamma 1-associated protein tyrosine phosphorylation is reduced with aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995;50:B205–B212.
115. Ghosh J, Miller RA. Rapid tyrosine phosphorylation of Grb2 and Shc in T cells exposed to anti-CD3, anti-CD4, and anti-CD45 stimuli: differential effects of aging. *Mech Ageing Dev* 1995;80:171–187.
116. Buckler A, Vie H, Sonenshein G, Miller RA. Defective T lymphocytes in old mice: diminished production of mature c-myc mRNA after mitogen exposure not attributable to alterations in transcription or RNA stability. *J Immunol* 1988;140:2442–2446.
117. Gamble DA, Schwab R, Weksler ME, Szabo P. Decreased steady state c-myc mRNA in activated T cell cultures from old humans is caused by a smaller proportion of T cells that transcribe the c-myc gene. *J Immunol* 1990;144:3569–3573.
118. Pieri C, Recchioni R, Moroni F, Marcheselli F, Lipponi G. Phytohemagglutinin induced changes of membrane lipid packing, c-myc and c-myb encoded protein expression in human lymphocytes during aging. *Mech Ageing Dev* 1992;64:177–187.
119. Song L, Stephens JM, Kittur S, et al. Expression of c-fos, c-jun and jun B in peripheral blood lymphocytes from young and elderly adults. *Mech Ageing Dev* 1992;65:149–156.
120. Whisler RL, Liu B, Wu LC, Chen M. Reduced activation of transcriptional factor AP-1 among peripheral blood T cells from elderly humans after PHA stimulation: restorative effect of phorbol diesters. *Cell Immunol* 1993;152:96–109.
121. Nakahama M, Mohri N, Mori S, Shindo G, Yokoi Y, Machinami R. Immunohistochemical and histometrical studies of the human thymus with special emphasis on age-related changes in medullary epithelial and dendritic cells. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1990;58:245–251.
122. Gonzalez-Quintial R, Theofilopoulos AN. V beta gene repertoires in aging mice. *J Immunol* 1992;149:230–236.
123. el Demellawy M, el Ridi R. Age-associated decrease in proportion and antigen expression of CD8-/CD4+ thymocytes in BALB/c mice. *Mech Ageing Dev* 1992;62:307–318.
124. Scollay RG, Butcher EC, Weissman IL. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur J Immunol* 1980;10:210–218.
125. Hirokawa K, Makinodan T. Thymic involution: effect on T cell differentiation. *J Immunol* 1975;114:1659–1664.
126. Utsuyama M, Kasai M, Kurashima C, Hirokawa K. Age influence on the thymic capacity to promote differentiation of T cells: induction of different composition

of T cell subsets by aging thymus. *Mech Ageing Dev* 1991;58:267–277.
127. Hirokawa K, Utsuyama M. The effect of sequential multiple grafting of syngeneic newborn thymus on the immune functions and life expectancy of aging mice. *Mech Ageing Dev* 1984;28:111–121.
128. Gozes Y, Umiel T, Trainin N. Selective decline in differentiating capacity of immunohemopoietic stem cells with aging. *Mech Ageing Dev* 1982;18:251–259.
129. Harrison DE, Astle CM, Delaittre JA. Loss of proliferative capacity in immunohemopoietic stem cells caused by serial transplantation rather than aging. *J Exp Med* 1978;147:1526–1531.
130. Averill LE, Wolf NS. The decline in murine splenic PHA and LPS responsiveness with age is primarily due to an intrinsic mechanism. *J Immunol* 1985;134:3859–3863.
131. Hirokawa K, Kubo S, Utsuyama M, Kurashima C, Sado T. Age-related change in the potential of bone marrow cells to repopulate the thymus and splenic T cells in mice. *Cell Immunol* 1986;100:443–451.
132. Basch RS. Thymic repopulation after irradiation in aged mice. *Aging: Immunol Infect Dis* 1990;2:229–235.
133. Eren R, Zharhary D, Abel L, Globerson A. Age-related changes in the capacity of bone marrow cells to differentiate in thymic organ cultures. *Cell Immunol* 1988;112:449–455.
134. McCormick KR, Harr JL, Taubenberger JK, Krieg RJ. A murine model for regeneration of the senescent thymus using growth hormone therapy. *Aging: Immunol Infect Dis* 1991;3:19–26.
135. Kelley KW, Brief S, Westly HJ, et al. GH3 pituitary adenoma cells can reverse thymic aging in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5663–5667.
136. Flurkey K, Harrison DE. Use of genetic models to investigate the hypophyseal regulation of senescence. In: Harrison DE, ed. *Genetic effects on aging II.* Caldwell, NJ: The Telford Press, 1990:437–456.
137. Aspinall R. Age-associated thymic atrophy in the mouse is due to a deficiency affecting rearrangement of the TCR during intrathymic development. *J Immunol* 1997;158:3037–3045.
138. Thoman ML. The pattern of T lymphocyte differentiation is altered during thymic involution. *Mech Ageing Dev* 1995;82:155–170.
139. Paolini R, Jouvin M-H, Kinet J.-P. Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement. *Nature* 1991:353:855–858.
140. Rocha B, Penit C, Baron C, Vasseur F, Dautigny N, Freitas AA. Accumulation of bromodeoxyuridine-labeled cells in central and peripheral lymphoid organs: minimal estimates of production and turnover rates of mature lymphocytes. *Eur J Immunol* 1990;20:1697–1708.
141. Stutman O. Postthymic T cell development. *Immunol Rev* 1986;91:159–194.
142. Rocha B, Dautigny N, Pereira P. Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *Eur J Immunol* 1989;19:905–911.
143. Miller RA, Stutman O. T cell repopulation from functionally restricted splenic precursors: 10,000 fold expansion documented by using limiting dilution analyses. *J Immunol* 1984;133:2925–2932.
144. Kappler JW, Hunter PC, Jacobs D, Lord E. Functional heterogeneity among the T-derived lymphocytes of the mouse. I. Analysis by adult thymectomy. *J Immunol* 1974;113:27–38.
145. Metcalf D. Delayed effect of thymectomy in adult life on immunological competence. *Nature* 1965;208:1336.
146. Miller JFAP. Effect of thymectomy in adult mice on immunological responsiveness. *Nature* 1965;208:1337–1338.
147. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996;272:54–60.
148. Callahan JE, Kappler JW, Marrack P. Unexpected expansions of CD8-bearing cells in old mice. *J Immunol* 1993;151:6657–6669.
149. Posnett DN, Sinha R, Kabak S, Russo C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammapathy" [published erratum appears in *J Exp Med* 1994 Mar 1;179(3):1077]. *J Exp Med* 1994;179:609–618.
150. Ruiz M, Esparza B, Barranquero M, Sabino E, Merino F. T cell receptor V-segment frequencies in aged individuals. *Immunol Invest* 1996;25:111–114.
151. Effros RB. Insights on immunological aging derived from the T lymphocyte cellular senescence model. *Exp Gerontol* 1996;31:21–27.
152. Schwab R, Szabo P, Manavalan JS, et al. Expanded CD4+ and CD8+ T cell clones in elderly humans. *J Immunol* 1997;158:4493–4499.
153. Chrest FJ, Buchholz MA, Kim YH, Kwon TK, Nordin AA. Anti-CD3-induced apoptosis in T-cells from young and old mice. *Cytometry* 1995;20:33–42.
154. Phelouzat MA, Arbogast A, Laforge T, Quadri RA, Proust JJ. Excessive apoptosis of mature T lymphocytes is a characteristic feature of human immune senescence. *Mech Ageing Dev* 1996;88:25–38.
155. Lechner H, Amort M, Steger MM, Maczek C, Grubeck-Loebenstein B. Regulation of CD95 (APO-1) expression and the induction of apoptosis in human T cells: changes in old age. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;110:238–243.
156. Zharhary D, Klinman NR. Antigen responsiveness of the mature and generative B cell populations of aged mice. *J Exp Med* 1983;157:1300–1308.
157. Zharhary D, Klinman NR. A selective increase in the generation of phosphorylcholine-specific B cells associated with aging. *J Immunol* 1986;136:368–370.
158. Andersson J, Coutinho A, Melchers F. Frequencies of mitogen-reactive B cells in the mouse. I. Distribution in different lymphoid organs from different inbred strains of mice at different ages. *J Exp Med* 1977;145:1511–1530.
159. Hooijkaas H, Preesman AA, Van Oudenaren A, Benner R, Haaijman JJ. Frequency analysis of functional immunoglobulin C and V gene expression in murine B cells at various ages. *J Immunol* 1983;131:1629–1633.
160. Schulze DH, Mancillas P, Kaushik A, Bona C, Kelsoe G. Mitogen-induced V_H and V_K expression is similar in young adult and aged mice. *Aging: Immunol Infect Dis* 1992;3:127–134.
161. Whisler RL, Grants IS. Age-related alterations in the activation and expression of phosphotyrosine kinases and protein kinase C (PKC) among human B cells. *Mech Ageing Dev* 1993;71:31–46.
162. Whisler RL, Beiqing L, Newhouse YG, Walters JD, Breckenridge MB, Grants IS. Signal transduction in human B cells during aging: alterations in stimulus-induced phosphorylations of tyrosine and serine-threonine substrates and in cytosolic calcium responsiveness. *Lymphokine Cytokine Res* 1991;10:463–473.
163. Subbarao B, Morris J, Kryscio RJ. Phenotypic and functional properties of B lymphocytes from aged mice. *Mech Ageing Dev* 1990;51:223–241.
164. Weksler ME, Schwab R, Huetz F, Kim YT, Coutinho A. Cellular basis for the age-associated increase in autoimmune reactions. *Int Immunol* 1990;2:329–335.
165. Linton P-J, Klinman NR. Functionality of B-cell subsets in aged mice. *Aging: Immunol Infect Dis* 1993;4:135–137.
166. Gottesman SRS, Edington J, Tsiagbe VK, Thorbecke GJ. Influence of cytokines and the effect of aging on colony formation by B-cell subsets. *Aging: Immunol Infect Dis* 1993;4:197–211.
167. Linton P-J. The status of progenitors of memory B cells in aged mice. *Aging: Immunol Infect Dis* 1993;4:35–46.
168. Daynes RA, Araneo BA, Ershler WB, Maloney C, Li G-Z, Ryu S-Y. Altered regulation of interleukin-6 production with normal aging: possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative. *J Immunol* 1993;150:5219–5230.
169. Goidl EA, Stashak PW, McEvoy SJM, Hiernaux JR. Age-related changes in serum immunoglobulin isotypes and isotype sub-class levels among standard long-lived and autoimmune and immunodeficient strains of mice. *Aging: Immunol Infect Dis* 1988;1:227–236.
170. Haaijman JJ, van den Berg P, Brinkhof J. Immunoglobulin class and subclass levels in the serum of CBA mice throughout life. *Immunology* 1977;32:923–927.
171. Albright JW, Holmes KL, Albright JF. Fluctuations in subsets of splenocytes and isotypes of Ig in young adult and aged mice resulting from Trypanosoma musculi infections. *J Immunol* 1990;144:3970–3979.
172. Lyngbye J, Kroll J. Quantitative immunoelectrophoresis of proteins in serum from a normal population: season-, age-, and sex-related variations. *Clin Chem* 1971;17:495–500.
173. French MAH, Harrison G. Serum IgG subclass concentrations in healthy adults: a study using monoclonal antisera. *Clin Exp Immunol* 1984;56:473–475.
174. Paganelli R, Quinti I, Fagiolo U, et al. Changes in circulating B cells and immunoglobulin classes and subclasses in a healthy aged population. *Clin Exp Immunol* 1992;90:351–354.
175. Ravichandran KS, Osborne BA, Goldsby RA. Quantitative analysis of the B cell repertoire by limiting dilution analysis and fluorescent in situ hybridization. *Cell Immunol* 1994;154:309–327.
176. Viale AC, Chies JA, Huetz F, et al. VH-gene family dominance in ageing mice. *Scand J Immunol* 1994;39:184–188.
177. Bangs LA, Sanz IE, Teale JM. Comparison of D, J_H, and junctional diversity in the fetal, adult, and aged B cell repertoires. *J Immunol* 1991;146:1996–2004.
178. Nicoletti C, Cerny J. The repertoire diversity and magnitude of antibody responses to bacterial antigens in aged mice: I. Age-associated changes in antibody responses differ according to the mouse strain. *Cell Immunol* 1991;133:72–83.
179. Riley SC, Froscher BG, Linton PJ, Zharhary D, Marcu K, Klinman NR. Altered V_h gene segment utilization in the response to phosphorylcholine of aged mice. *J Immunol* 1989;143:3798–3805.
180. Nicoletti C, Borghesi-Nicoletti C, Yang X, Schulze DH, Cerny J. Repertoire diversity of antibody response to bacterial antigens in aged mice. II. Phosphorylcholine-antibody in young and aged mice differ in both V_H/V_L gene repertoire and in specificity. *J Immunol* 1991;147:2750–2755.
181. Nicoletti C, Yang X, Cerny J. Repertoire diversity of antibody response to bacterial antigens in aged mice. III. Phosphorylcholine antibody from young and aged mice differ in structure and protective activity against infection with Streptococcus pneumoniae. *J Immunol* 1993;150:543–549.
182. Goodwin JS, Searles RP, Tung KSK. Immunological responses of a healthy elderly population. *Clin Exp Immunol* 1982;48:403–410.
183. Hayashi Y, Utsuyama M, Kurashima C, Hirokawa K. Spontaneous development of organ-specific autoimmune lesions in aged C57BL/6 mice. *Clin Exp Immunol* 1989;78:120–126.
184. Fernandes G, Friend P, Yunis EJ, Good RA. Influence of dietary restriction on immunologic function and renal disease in (NZB × NZW) F1 mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:1500–1504.
185. Ben-Nun A, Ron Y, Cohen IR. Spontaneous remission of autoimmune encephalomyelitis is inhibited by splenectomy, thymectomy or ageing. *Nature* 1980;288:389–390.
186. Tomer Y, Mendlovic S, Kukulansky T, Mozes E, Shoenfeld Y, Globerson A.

Effects of aging on the induction of experimental systemic lupus erythematosus (SLE) in mice. *Mech Ageing Dev* 1991;58:233–244.

187. Romball CG, Weigle WO. The effect of aging on the induction of experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 1987;139:1490–1495.
188. Riley RL, Kruger MG, Elia J. B cell precursors are decreased in senescent BALB/c mice, but retain normal mitotic activity in vivo and in vitro. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;59:301–313.
189. Zharhary D. Age-related changes in the capability of the bone marrow to generate B cells. *J Immunol* 1988;141:1863–1869.
190. Francus T, Chen YW, Staiano-Coico L, Hefton JM. Effect of age on the capacity of the bone marrow and the spleen cells to generate B lymphocytes. *J Immunol* 1986;137:2411–2417.
191. Zharhary D. T cell involvement in the decrease of antigen-responsive B cells in aged mice. *Eur J Immunol* 1986;16:1175–1178.
192. Kim YT, Goidl EA, Samarut C, Weksler ME, Thorbecke GJ, Siskind GW. Bone marrow function. I. Peripheral T cells are responsible for the increased auto-anti-idiotype response of older mice. *J Exp Med* 1985;161:1237–1242.
193. Weksler ME, Russo C, Siskind GW. Peripheral T cells select the B-cell repertoire in old mice. *Immunol Rev* 1989;110:173–185.
194. Callard RE, Basten A. Immune function in aged mice. IV. Loss of T cell and B cell function in thymus-dependent antibody responses. *Eur J Immunol* 1978;8: 552–558.
195. Liu JJ, Segre M, Segre D. Changes in suppressor, helper, and B-cell functions in aging mice. *Cell Immunol* 1982;66:372–382.
196. Li SP, Verma S, Miller RA. Age-related defects in T cell expression of CD40 ligand and induction of in vitro B cell activation. *Aging: Immunol Infect Dis* 1995;6:79–93.
197. Miller C, Kelsoe G, Han S. Lack of B7-2 expression in the germinal centers of aged mice. *Aging: Immunol Infect Dis* 1994;5:249–257.
198. Whisler RL, Williams JW Jr, Newhouse YG. Human B cell proliferative responses during aging. Reduced RNA synthesis and DNA replication after signal transduction by surface immunoglobulins compared to B cell antigenic determinants CD20 and CD40. *Mech Ageing Dev* 1991;61:209–222.
199. Coico RF, Gottesman SRS, Thorbecke GJ. Physiology of IgD. VIII. Age-related decline in the capacity to generate T cells with receptors for IgD and partial reversal of the defect with IL-2. *J Immunology* 1987;138:2776–2781.
200. Wei C-F, Wali A, Cherniack EP, et al. Correlation between the ability of elderly individuals to respond to influenza vaccination and the capacity of their peripheral blood lymphocytes to express receptors for IgD. *Aging: Immunol Infect Dis* 1992;3:195–202.
201. Yang X, Stedra J, Cerny J. Relative contribution of T and B cells to hypermutation and selection of the antibody repertoire in germinal centers of aged mice. *J Exp Med* 1996;183:959–970.
202. Miller C, Kelsoe G. Ig VH hypermutation is absent in the germinal centers of aged mice. *J Immunol* 1995;155:3377–3384.
203. Holmes KL, Schnizlein CT, Perkins EH, Tew JG. The effect of age on antigen retention in lymphoid follicles and in collagenous tissue of mice. *Mech Ageing Dev* 1984;25:243–255.
204. Szakal AK, Taylor JK, Smith JP, Kosco MH, Burton GF, Tew JG. Morphometry and kinetics of antigen transport and developing antigen retaining reticulum of follicular dendritic cells in lymph nodes of aging mice. *Aging: Immunol Infect Dis* 1988;1:7–22.
205. Burton GF, Kosco MH, Szakal AK, Tew JG. Iccosomes and the secondary antibody response. *Immunology* 1991;73:271–276.
206. Choi KL, Sauder DN. Epidermal Langerhans cell density and contact sensitivity in young and aged BALB/c mice. *Mech Ageing Dev* 1987;39:69–79.
207. Belsito DV, Derarkissian RM, Thorbecke GJ, Baer RL. Reversal by lymphokines of the age-related hyporesponsiveness to contact sensitization and reduced Ia expression on Langerhans cells. *Arch Dermatol Res* 1987;279:S76–S80.
208. Yuan A, Baird MA. Changes in the frequency and function of rat spleen dendritic cells occur with age. *Aging: Immunol Infect Dis* 1994;5:121–132.
209. Chen Y, Ramsey MA, Bradley SF. Differential monokine production by macrophages from aged mice stimulated with various microorganisms. *Aging: Immunol Infect Dis* 1993;4:155–167.
210. Chen Y, Bradley SF. Aging and eliciting agents: effect on murine peritoneal macrophage monokine bioactivity. *Exp Gerontol* 1993;28:145–159.
211. Wei J, Xu H, Davies JL, Hemmings GP. Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects. *Life Sci* 1992;51:1953–1956.
212. Effros RB, Svoboda K, Walford RL. Influence of age and caloric restriction on macrophage IL-6 and TNF production. *Lymphokine Cytokine Res* 1991;10: 347–351.
213. Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, et al. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol* 1993;23: 2375–2378.
214. Foster KD, Conn CA, Kluger MJ. Fever, tumor necrosis factor, and interleukin-6 in young, mature, and aged Fischer 344 rats. *Am J Physiol* 1992;262:R211–R215.
215. Chorinchath BB, Kong LY, Mao L, McCallum RE. Age-associated differences in TNF-alpha and nitric oxide production in endotoxic mice. *J Immunol* 1996;156: 1525–1530.
216. Bruley-Rosset M, Vergnon I. Interleukin-1 synthesis and activity in aged mice. *Mech Ageing Dev* 1984;24:247–264.
217. Delfraissy JF, Galanaud P, Wallon C, Balavoine JF, Dormont J. Abolished in vitro antibody response in elderly: exclusive involvement of prostaglandin-induced T suppressor cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1982;24:377–385.
218. Goodwin JS, Messner RP. Sensitivity of lymphocytes to prostaglandin E2 increases in subjects over age 70. *J Clin Invest* 1979;64:434–439.
219. Sohnle PG, Larson SE, Collins-Lech C, Guansing AR. Failure of lymphokine-producing lymphocytes from aged humans to undergo activation by recall antigens. *J Immunol* 1980;124:2169–2174.
220. Meydani SN, Meydani M, Verdon CP, Shapiro AA, Blumberg JB, Hayes KC. Vitamin E supplementation suppresses prostaglandin E2 synthesis and enhances the immune response of aged mice. *Mech Ageing Dev* 1986;34:191–201.
221. Hayek MG, Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB. Age differences in eicosanoid production of mouse splenocytes: effects on mitogen-induced T-cell proliferation. *J Gerontol* 1994;49:B197–207.
222. Pross HF, Baines MG. Studies of human natural killer cells. I. In vivo parameters affecting normal cytotoxic function. *Int J Cancer* 1982;29:383–390.
223. Weindruch R, Devens BH, Raff HV, Walford RL. Influence of dietary restriction and aging on natural killer cell activity in mice. *J Immunol* 1983;130:993–996.
224. Lanza E, Djeu JY. Age-independent natural killer cell activity in murine peripheral blood. In: Herberman RB, ed. *NK cells and other natural effectors.* New York: Academic Press, 1982:335–340.
225. Kawakami K, Bloom ET. Lymphokine-activated killer cells and aging in mice: significance for defining the precursor cell. *Mech Ageing Dev* 1987;41:229–240.
226. Ho SP, Kramer KE, Ershler WB. Effect of host age upon interleukin-2-mediated anti-tumor responses in a murine fibrosarcoma model. *Cancer Immunol Immunother* 1990;31:146–150.
227. Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, Vogelman JH. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:551–555.
228. Barrett-Conner E, Khaw K-T, Yen SSC. A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality, and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1986;315:1519–1524.
229. Bulbrook RD, Hayward JL, Spicer CC. Relation between urinary androgen and corticoid secretion and subsequent breast cancer. *Lancet* 1971;2:395–398.
230. Barrett-Connor E, Goodman-Gruen D. Dehydroepiandrosterone sulfate does not predict cardiovascular death in postmenopausal women. The Rancho Bernardo Study. *Circulation* 1995;91:1757–1760.
231. Gordon GB, Bush TL, Helzlsouer KJ, Miller SR, Comstock GW. Relationship of serum levels of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate to the risk of developing postmenopausal breast cancer. *Cancer Res* 1990;50:3859–3862.
232. Wichmann U, Wichmann G, Krause W. Serum levels of testosterone precursors, testosterone and estradiol in 10 animal species. *Exp Clin Endocrinol* 1984;83: 283–290.
233. Araneo BA, Woods ML, Daynes RA. Reversal of the immunosenescent phenotype by dehyrdoepiandrosterone: hormone treatment provides an adjuvant effect on the immunization of aged mice with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 1993;167:830–840.
234. Araneo BA, Dowell T, Diegel M, Daynes RA. Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5, and γ-interferon, but not IL-2 by activated murine T cells. *Blood* 1991;78:688–699.
235. Padgett DA, Loria RM. In vitro potentiation of lymphocyte activation by dehydroepiandrosterone, androstenediol, and androstenetriol. *J Immunol* 1994;153: 1544–1552.
236. Pahlavani MA, Harris MD. Effect of dehydroepiandrosterone on mitogen-induced lymphocyte proliferation and cytokine production in young and old F344 rats. *Immunol Lett* 1995;47:9–14.
237. Araneo B, Dowell T, Woods ML, Daynes R, Judd M, Evans T. DHEAS as an effective vaccine adjuvant in elderly humans. Proof-of- principle studies. *Ann NY Acad Sci* 1995;774:232–248.
238. Yen SS, Morales AJ, Khorram O. Replacement of DHEA in aging men and women. Potential remedial effects. *Ann NY Acad Sci* 1995;774:128–142.
239. Ebihara S, Marks T, Hudson DJ, Menaker M. Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science* 1986;231:491–493.
240. Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. The pineal gland and the circadian, opiatergic, immunoregulatory role of melatonin. *Ann NY Acad Sci* 1987;496:67–77.
241. Pierpaoli W, Regelson W. Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:787–791.
242. Caroleo MC, Doria G, Nistico G. Melatonin restores immunodepression in aged and cyclophosphamide-treated mice. *Ann NY Acad Sci* 1994;719:343–352.
243. Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiatergic mechanism. *Clin Exp Immunol* 1987;68:384–391.
244. Cross RJ, Campbell JL, Markesbery WR, Roszman TL. Transplantation of pituitary grafts fail to restore immune function and to reconstitute the thymus glands of aged mice. *Mech Ageing Dev* 1990;56:11–22.
245. Khansari DN, Gustad T. Effects of long-term, low-dose growth hormone therapy on immune function and life expectancy of mice. *Mech Ageing Dev* 1991;57: 87–100.
246. Fabris N, Pierpaoli W, Sorkin E. Lymphocytes, hormones and ageing. *Nature* 1972;240:557–559.
247. Cross RJ, Bryson JS, Roszman TL. Immunologic disparity in the hypopituitary

dwarf mouse. *J Immunol* 1992;148:1347–1352.
248. Brown-Borg HM, Borg KE, Meliska CJ, Bartke A. Dwarf mice and the ageing process. *Nature* 1996;384:33.
249. Harrison DE, Archer JR, Astle CM. The effect of hypophysectomy on thymic aging in mice. *J Immunol* 1982;129:2673–2677.
250. Stutman O. Role of thymic hormones in T cell differentiation. *Clin Immunol Allergy* 1983;3:9–81.
251. Clinton M, Frangou-Lazaridis M, Panneerselvam C, Horecker BL. Prothymosin alpha and parathymosin: mRNA and polypeptide levels in rodent tissues. *Arch Biochem Biophys* 1989;269:256–263.
252. Ershler WB, Coe CL, Laughlin N, et al. Aging and immunity in non-human primates. II. Lymphocyte response in thymosin treated middle-aged monkeys. *J Gerontol* 1988;43:B142–B146.
253. Meroni PL, Barcellini W, Frasca D, et al. In vivo immunopotentiating activity of thymopentin in aging humans: increase of IL-2 production. *Clin Immunol Immunopathol* 1987;42:151–159.
254. Goso C, Frasca D, Doria G. Effect of synthetic thymic humoral factor (THF-gamma 2) on T cell activities in immunodeficient ageing mice. *Clin Exp Immunol* 1992;87:346–351.
255. Hiramoto RN, Ghanta VK, Soong SJ. Effect of thymic hormones on immunity and lifespan. In: Goidl E, ed. *Aging and the immune response.* New York: Marcel Dekker Inc, 1986:177–198.
256. Ghanta VK, Hiramoto NS, Soong SJ, Hiramoto RN. Survey of thymic hormone effects on physical and immunological parameters in C57BL/6NNia mice of different ages. *Ann NY Acad Sci* 1991;621:239–255.
257. Haar JL, Taubenberger JK, Doane L, Kenyon N. Enhanced in vitro bone marrow cell migration and T-lymphocyte responses in aged mice given subcutaneous thymic epithelial cell grafts. *Mech Ageing Dev* 1989;47:207–219.
258. Chandra RK. Effect of vitamin and trace-element supplementation on immune responses and infection in elderly subjects. *Lancet* 1992;340:1124–1127.
259. Meydani SN, Barklund MP, Liu S, et al. Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects [see comments]. *Am J Clin Nutr* 1990;52:557–563.
260. Mocchegiani E, Santarelli L, Muzzioli M, Fabris N. Reversibility of the thymic involution and of age-related peripheral immune dysfunctions by zinc supplementation in old mice. *Int J Immunopharmacol* 1995;17:703–718.
261. Remarque EJ, Witkamp L, Masurel N, Ligthart GJ. Zinc supplementation does not enhance antibody formation to influenza virus vaccine in the elderly. *Aging: Immunol Infect Dis* 1993;4:17–23.
262. Weindruch R, Walford RL. *The retardation of aging and disease by dietary restriction.* Charles C. Thomas Publisher, Springfield, IL: 1988.
263. Yu BP. Putative interventions. In: Masoro EJ, ed. *Handbook of physiology. Section 11: Aging.* New York: Oxford University Press, 1995:613–631.
264. Miller RA. Caloric restriction and immune function: developmental mechanisms. *Aging: Clin Exp Res* 1991;3:395–398.
265. Effros RB, Walford RL, Weindruch R, Mitcheltree C. Influences of dietary restriction on immunity to influenza in aged mice. *J Gerontol Biol Sci* 1991;46: B142–B147.
266. Grossmann A, Maggio-Price L, Jinneman JĆ, Wolf NS, Rabinovitch PS. The effect of long-term caloric restriction on function of T-cell subsets in old mice. *Cell Immunol* 1990;131:191–204.
267. Roecker EB, Kemnitz JW, Ershler WB, Weindruch R. Reduced immune responses in rhesus monkeys subjected to dietary restriction. *J Gerontol [A]* 1996;51A:B276–B279.
268. Bentley DM, Morris RE. T cell subsets required for protection against age-dependent polioencephalomyelitis of C58 mice. *J Immunol* 1982;128:530–534.
269. Orme IM, Griffin JP, Roberts AD, Ernst DN. Evidence for a defective accumulation of protective T cells in old mice infected with Mycobacterium tuberculosis. *Cell Immunol* 1993;147:222–229.
270. Patel PJ. Aging and antimicrobial immunity. Impaired production of mediator T cells as a basis for the decreased resistance of senescent mice to Listeriosis. *J Exp Med* 1981;154:821–831.
271. Utsuyama M, Albright JW, Holmes KL, Hirokawa K, Albright JF. Changes in the subsets of CD4+ T cells in Trypanosoma musculi infection: delay of immunological cure in young mice and the weak ability of aged mice to control the infection. *Int Immunol* 1994;6:1107–1115.
272. Powers DC. Influenza A virus-specific cytotoxic T lymphocyte activity declines with advancing age. *J Am Geriatr Soc* 1993;41:1–5.
273. McElhaney JE, Meneilly GS, Beattie BL, et al. The effect of influenza vaccination on IL2 production in healthy elderly: implications for current vaccination practices. *J Gerontol Med Sci* 1992;47:M3–M8.
274. Ashman RB. Persistence of cell-mediated immunity to influenza A virus in mice. *Immunology* 1982;47:165–168.
275. Orme IM. A mouse model of the recrudescence of latent tuberculosis in the elderly. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:716–718.
276. Urban JL, Schreiber H. Rescue of the tumor-specific immune response of aged mice in vitro. *J Immunol* 1984;133:527–534.
277. Flood PM, Urban JL, Kripke ML, Schreiber H. Loss of tumor-specific and idiotype-specific immunity with age. *J Exp Med* 1981;154:275–290.
278. Ershler WB. The influence of an aging immune system on cancer incidence and progression. *J Gerontol Biol Sci* 1993;48:B3–B7.
279. Miller RA. Aging and cancer—another perspective. *J Gerontol Biol Sci* 1993;48: B8–B9.
280. Covelli V, Mouton D, Di Majo V, et al. Inheritance of immune responsiveness, life span, and disease incidence in interline crosses of mice selected for high or low multispecific antibody production. *J Immunol* 1989;142:1224–1234.
281. Miller RA, Turke P, Chrisp C, et al. Age-sensitive T cell phenotypes covary in genetically heterogeneous mice and predict early death from lymphoma. *J Gerontol* 1994;49:B255–B262.
282. Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol Med Sci* 1990;45:M45–M48.
283. Goodman SA, Makinodan T. Effect of age on cell-mediated immunity in long-lived mice. *Clin Exp Immunol* 1972;19:533–542.
284. Murasko DM, Weiner P, Kaye D. Association of lack of mitogen-induced lymphocyte proliferation with increased mortality in the elderly. *Aging: Immunol Infect Dis* 1988;1:1–6.
285. Roberts-Thomson IC, Whittingham S, Youngchaiyud U, Mackay IR. Ageing, immune response, and mortality. *Lancet* 1974;2:368–370.
286. Mulvihill M, Cohen C, Martemucci W, et al. Anergy in the frail elderly is associated with an increased rate of infection and mortality. *Aging: Immunol Infect Dis* 1995;6:1–13.
287. Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995;50: B378–B382.
288. Hori Y, Perkins EH, Halsall MK. Decline in phytohemagglutinin responsiveness of spleen cells from aging mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973;144:48–53.
289. Murasko DM, Weiner P, Kaye D. Decline in mitogen induced proliferation of lymphocytes with increasing age. *Clin Exp Immunol* 1987;70:440–448.
290. Goidl EA, Innes JB, Weksler ME. Immunological studies of aging. II. Loss of IgG and high avidity plaque-forming cells and increased suppressor cell activity in aging mice. *J Exp Med* 1976;144:1037–1048.
291. Kishimoto S, Tsuyuguchi I, Yamamura Y. Immune responses in aged mice. *Clin Exp Immunol* 1969;5:525–530.
292. Bach MA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: effects of ageing, adult thymectomy and thymic factor. *J Immunol* 1977;119:641–647.
293. Tielen FJ, van Vliet AC, de Geus B, Nagelkerken L, Rozing J. Age-related changes in CD4+ T-cell subsets associated with prolonged skin graft survival in aging rats. *Transplant Proc* 1993;25:2872–2874.
294. Girard JP, Paychere M, Cuevas M, Fernandes B. Cell-mediated immunity in an ageing population. *Clin Exp Immunol* 1977;27:85–91.

第六篇　免疫的效应机制

第29章　补　　体

Wolfgang M. Prodinger, Reubgard Wurzner, Anna Erdei, and Manfred P. Dierich[①]

---

① W. M. Prodinger, R. Würzner, and M. P. Dierich: Institut fur Hygiene, University of Innsbruck, Innsbruck, A-6020, Austia. A. Erdei: Departent of Immunology Eötvös Lorand University, Göd, H-2131, Hungary.

历史回顾

大约在19世纪中叶，补体的研究才刚刚被涉及，最初的研究都与体液免疫的研究混杂在一起，其研究过程也是与对重要病原微生物的观察平行进行的[1]。Nuttall，Buchner 及其他研究者发现，正常血清中有两大类免疫物质在杀灭细菌中起重要作用，即免疫血清中的热敏感性物质(如补体)和热稳定成分。Buchmer 将热敏感性物质命名为“alexin”(希腊文，意为“没有名字”)，并设想 alexin 以酶促级联反应的模式活化。Bordet 在免疫血清溶破红细胞的体系中也证实了相同的反应模式，他还以这一反应体系为基础发展出体外补体结合实验。

967

968

“补体”一词由 Pual Ehrlich 于1899年提出，在他的侧链理论中被用于解释免疫性的细菌溶破作用，即致敏动物血清的溶菌效应[2]，于是“补体”替代了“alexin”。Ehrlich 认为补体是一群并不严格地相互依赖的因子，而其他人(如 Bordet)认为补体是一个单一的物质。补体的化学本质先前被认为是一种去污剂样或脂质破坏性的分子，后来补体的蛋白质性质才变得更加明确。最初补体的概念是作为抗体的一种效应机制，到了20世纪20年代，C1、C2 和 C4 才被用生物化学的方法得到分离鉴定。而补体 C3、C5、C6、C7、C8 和 C9 一直以来均被作为“经典的 C3”一个分子来认识的。

在20世纪40至50年代，Louis Pillemer 将人们对补体被忽略部分的理解向前推进了一大步。他拓展了以前在酵母细胞和眼镜蛇毒上的发现，两者均能在无抗体的条件下活化补体。Pillemer 证实经典 C3 可被酵母多糖(一种酵母细胞壁蛋白糖)所耗竭，但对 C1、C2 和 C4 无作用[3]。1954年，他认为存在一种他称为“备解素”的血浆因子(拉丁文，意“带来破坏者”)，并认为备解素系统是第二条抗体非依赖的补体活化模式[4]。Pillemer 的假设马上遭到严历的批评并且这一学说的研究因为他的去世而中止了一段时间，但是随着备解素系统的各种成分被分离鉴定出来，这一概念(现在称为替代途径补体活化)也被人们广泛接受。

20世纪60年代，人们从生化的角度将经典 C3 分析成为各个独立的蛋白质分子，C3 成分在经典和替代途径中的枢纽作用，以及由从 C5 到 C9 补体成分形成终末复合物的过程也得到明确。Hans Muller-Eberhard 及其同事鉴定出 C3 蛋白(现在的命名)是主要的血浆组成成分，并纯化了补体成分 C5 ~ C9[5]。Robert Nelson 及 Paul Klein 小组对豚鼠 C3 进行了相同的研究[6~8]。

补体介导的溶破这一概念由 Manfred Mayer 进一步将之深化，他认为一个包含了全部补体成分的复合物足以溶破一个红细胞[9]。他的“单次打击学说”总结了来自几个研究小组的结果，并推断 C5b ~ C9 共同在膜上形成一个通道样的结构(膜攻击复合物)[10]，从那以后，有核细胞的破坏是由膜攻击复合物的孔道介导的(如通过改变渗透性引起细胞肿胀)还是由其对膜完整性的破坏造成的，一直是一个有争议的问题。由于两种观点均有实验证据支持，目前这一争议尚未得到解决。

近来,第二个非抗体依赖的补体活化途径被发现,即甘露糖结合凝集素(mannan-binding lectin, MBL)途径(凝集素途径,MBLectin 途径)。MBL 通过识别病原体富含糖的外表面而识别之。MASP-2,一种与 MBL 相联系的丝氨酸酯酶在 1997 年被克隆出来,它是目前补体蛋白家族中最年轻的成员[11]。

除了对补体活化机制的研究,人们还很早就认识到它的促炎症效应,如调理和趋化作用。在 20 世纪初就已经观察到,以非热灭活血清处理病原菌,不但促进其被溶破,同时也增强它们被巨噬细胞清除。这种血清的非杀伤性效应诱导的吞噬细胞吞噬作用增强称为调理作用(希腊文,意为"为消化做准备")。由于这一作用对热敏感,推断介导该效应的血清因子与补体有关,其后十年,这一效应才被证明主要是由 C3 片段介导的。Nelson 于 1953 年首次提出细胞表面有受体与沉积的补体成分相结合。他证明细菌与免疫血清作用后可结合至红细胞表面,这一现象称为免疫黏附。补体受体随后在巨噬细胞和淋巴细胞表面被鉴定出,并证明了其与 C3 片段的特异性结合。

人们观察到免疫复合物作用后的血清具有趋化活性,且该活性表现出热不稳定性的特征。像调理作用一样,人们推断此趋化作用与补体有关。Boyden 在 19 世纪 60 年代证明补体来源的过敏毒素和趋化因子,它们最终被鉴定为 C3a 和 C5a。

20 世纪 80 年代早期,在分子克隆的帮助下,已知的人补体蛋白的氨基酸序列被推断得出,同时它们的染色体定位也得到了明确。鉴于对它们之间保守的结构基序的识别,人们将补体成分按功能群进行定义,并且从进化角度对之加以认识。建立某一补体成分缺陷的实验动物及转基因小鼠,成为广泛研究的领域。

虽然补体在多种临床疾病中发挥作用,但似乎到了补体研究开始 100 年后的今天,在进行了大量细致的生物化学和分子遗传学研究以后,补体在多种疾病中的作用才成为研究的一个热点,包括动脉粥样硬化、阿兹海默综合征,癌症及感染和移植。寻找途径去干预不需要或过度的补体活化是目前尚未达到的目标。临床应用重组蛋白如可溶性 CR1 或人源化的单克隆抗体已经开始,但到目前为止尚无特异性和高效阻断单一补体成分的化学药物可以应用于临床。

概述

顾名思义,无论是从补体自身还是从它与体液免疫的相互作用上来看,补体在免疫中是作为一个辅助的系统而存在的。从其自身角度来看,它对病原微生物初始的监控独立于抗体和 T 细胞之外单独发挥作用。在进化过程中,补体系统开始在多个水平上与体液免疫系统相互作用,现今它已成为抗体的一个主要的效应系统。

970

补体系统由 30 多种血浆蛋白质和膜蛋白组成(表 29.1 和表 29.2)。它的活化依赖于一系列丝氨酸蛋白

表 29.1 补体成分:与活化有关的血浆蛋白

成分	完整蛋白(或亚基)分子质量/kDa	血浆浓度/(μg/ml)
所有活化途径的通用成分		
C3	185(α,110; β,75)	1200 ~ 1300
替代途径		
B 因子	93	200
D 因子	24	2
备解素(主要的寡聚体形式)	110,165,200(单体:55)	25
经典途径		
C1q	460(由 6 个亚基组成,每个亚基 3 条链:A,26;B,26;C,24)	150
C1r	85	50
C1s	85	50
C4	205(α,97; β,75; γ,33)	300-600
C2	102	20
MBL 途径		

续表

成分	完整蛋白(或亚基)分子质量/kDa	血浆浓度/(μg/ml)
MBL(主要形式)	200,300,400(由2~4个亚基组成,每个亚基有3条32 kDa的多肽链)	1(0.01-20)
MASP-1	100	1.5-12
MASP-2	76	nd
终末补体途径		
C5	190(α,115; β,75)	80
C6	110	45
C7	100	90
C8	150(α,64; β,64; γ,22)	55
C9	70	60

MBL,甘露糖结合凝集素;MASP,MBL相关丝氨酸蛋白酶;nd,未确定。

表 29.2 补体调控蛋白

成分	完整蛋白(或亚基)分子质量/kDa	血浆浓度(μg/ml)
血浆中		
I因子	88(50+38)	35
H因子	150	300-450
C1-INH	105	240
C4bp	550(7×70,1×45)	250
S蛋白(玻璃结合蛋白)	84	500
群集素(SP40,40)	70(35+35)	50
羧肽酶N(过敏毒素灭活者)	280(2×90,2×50)	35
不明功能的相关分子		
FHL-1	42	5-20
FHR-1,FHR-2	39/42,24/29	40-60
FHR-3	55	nd
FHR-4	86	nd
成分(CD号)	**完整蛋白分子质量/kDa**	**组织分布**
细胞膜表面分子		
CR1(CD35)	190(最常见的同种异型)	(参见表29.4)
DAF(CD55)	70	非常广泛:外周血细胞(除NK细胞以外)、红细胞、上皮细胞和分泌细胞、内皮细胞和间质细胞
MCP(CD46)	45-70(由于糖基化的关系)	与DAF相同(但在红细胞上不表达)
CD59抗原	18-20	与DAF相同

C1-INH,C1抑制物;FHL,H因子样蛋白;FHR,H因子相关蛋白;nd,未确定;CR,补体受体;DAF,衰变加速因子;MCP,膜辅助蛋白。

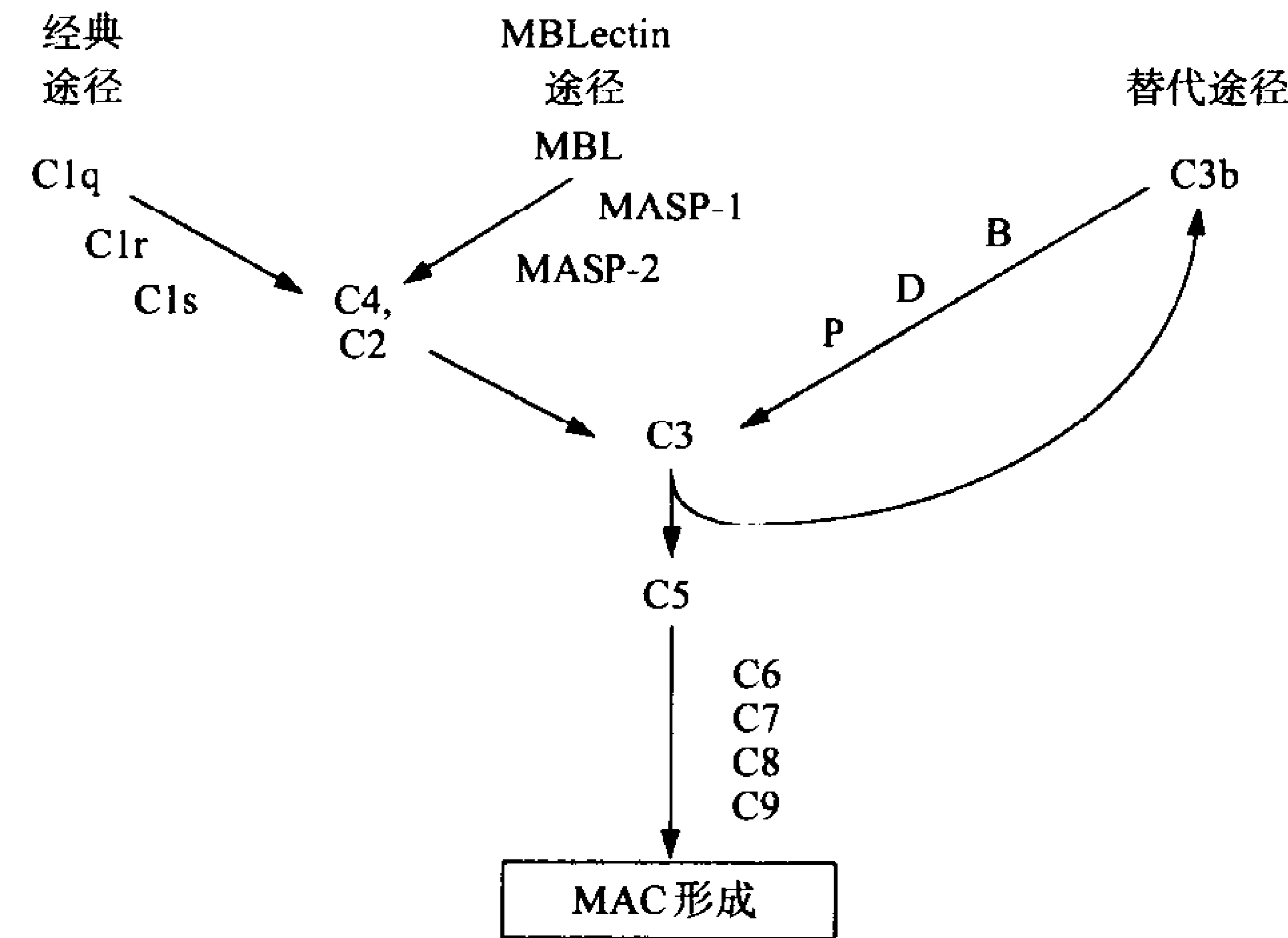


图 29.1 补体活化途径概览。

酶的酶解级联反应。已有三种活化途径被鉴定清楚(图 29.1),它们或由与抗原相结合的抗体介导(经典途径),或由微生物的多糖结构介导(MBLectin 途径),或者是通过补体自身识别外源性物质表面结构介导(替代途径)。所有三种途径的活化均是首先活化 C3,然后是 C5。在共同的补体终末成分的活化中,C5 以后的终末补体成分以非蛋白酶解的形式活化,并组装形成膜攻击复合物 MAC,后者可以直接溶破病原菌。

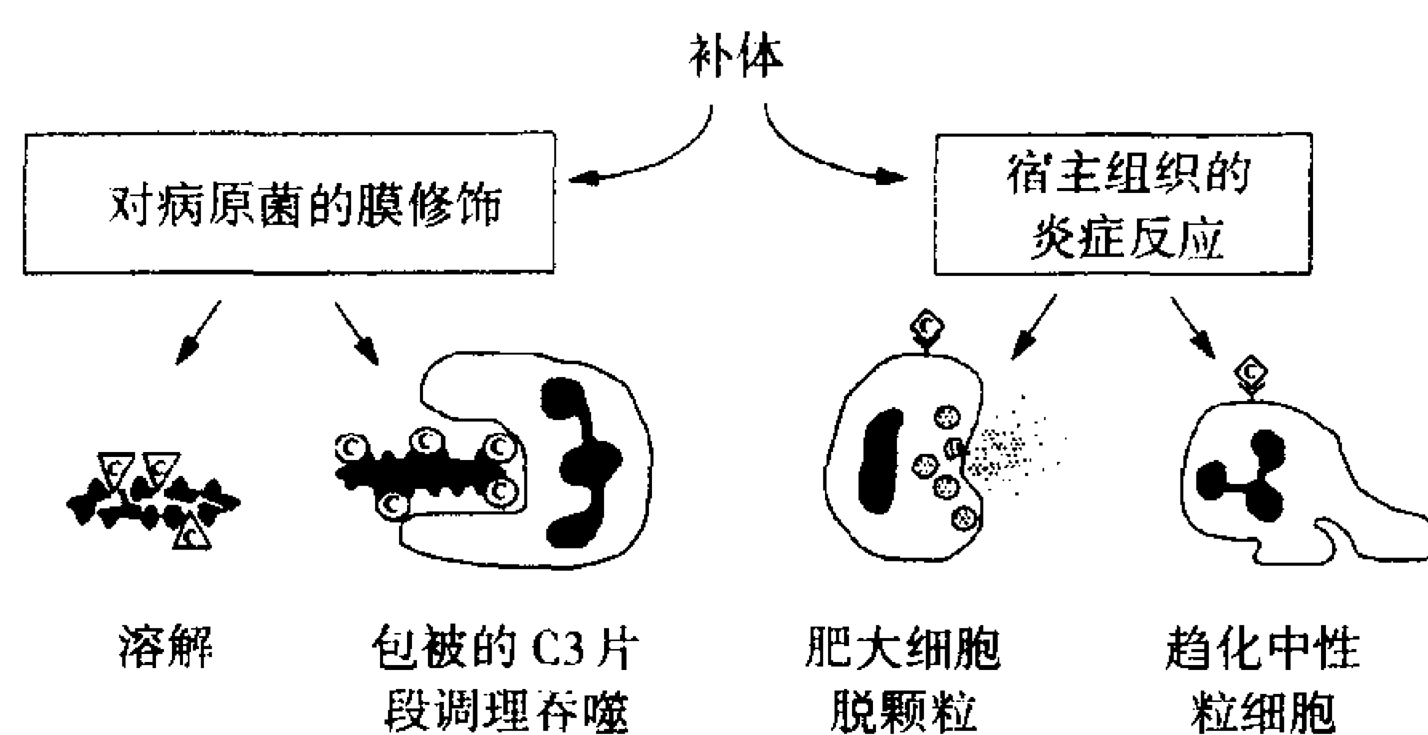


图 29.2　补体活化在感染控制中的作用。

体内这样一个强有力的破坏机制需要安全的、过剩的控制机制,所以有大约一半的补体成分是作为调控成分存在,并用于调控补体活化的关键步骤,特别是控制 C3b 的产生。除了 MAC 可以直接杀伤微生物以外,补体还可招募其他的宿主防御系统(图 29.2)。包被于微生物表面的 C3 片段可以发挥调理作用,通过补体受体介导它们为巨噬细胞吞噬。结合 C3 片段可增加免疫复合物的溶解性及抗原的免疫原性。另一方面,非特异性免疫防御系统(如中性粒细胞、巨噬细胞、肥大细胞)均可被过敏毒素——补体酶解活化过程中产生的小肽刺激活化。

补体命名法

由于历史的原因,补体经典和终末成分被由 C1 到 C9 依次命名,生物学反应次序为 C1-C4-C2-C3-C5-C6-C7-C8-C9。替代途径蛋白成分称为因子并以字母相区别(B、D、H、I、P 因子)。到 C5 为止,各成分的活化均需酶解步骤。从 C2 到 C5,活化中均产生具有其他生物学活性的小肽。较大的片段结合其他成分形成复合物,在下一步活化步骤中发挥作用。按照惯例,较小的片段用字母 a 标志(如 C3a,C5a),较大者则用 b(如 C3 b),但 C2 是一个例外(C2a 为较大的活化片段)。对于 C3 和 C4,失活的 C3 b 和 C4 b 产生的较小片段(但不参与进一步的补体活化)标记为 C3c,C3d 等。活化的产物不应与由二硫键连接的蛋白肽链的标记相混淆,后者用希腊字母表示(如 C3α)。而对 C4 基因的两种等位基因形式 C4A 和 C4B 又存在命名上的不同。两种基因编码的同种型蛋白 C4A 和 C4B 表现出特征性氨基酸残基上的差异,后者进一步决定了分子的硫酯键与受体上的氨基(C4A)还是羟基(C4B)相作用。对于 C3 转化酶的命名按 Muller-Eberhard 的方法进行[12]。补体系统膜蛋白的命名按以下几点进行:或是根据其所发挥的功能(如衰变加速因子 DAF),或用分化群(CD)系统(如 CD55 即 DAF),4 种补体受体则简单地依次命名(CR1 到 CR4)。

补体的生物合成:定位与降解

肝是产生补体蛋白的主要部位。大约 90%的血浆补体成分在肝中合成,只有少数成分以肝以外的其他部位为主要产生地:C1 由肠上皮和单核/巨噬细胞产生,D 因子在脂肪组织中产生。肝组织产生的 C7 不到 60%[14, 15],骨髓来源细胞特别是粒细胞,是 C7 的主要来源[15, 16]。血浆中备解素的主要来源尚未明确[13]。

除了肝,多种器官和细胞均参与了补体成分生物合成,如单核/巨噬细胞、内皮细胞、淋巴细胞、神经胶质细胞、肾上皮细胞、生殖器官及其他多种组织。值得注意的是单核/巨噬细胞可以产生全部的补体成分,有趣的是星形胶质细胞也可以产生补体[17]。这种肝外补体产生的意义尚不明确:对于星形胶质和神经胶质细胞而言,它们是完整血脑屏障外的惟一补体来源。因此,补体在脑的几种非感染性疾病中的作用引起人们的兴趣。巨噬细胞以活化状态存在于感染部位,可能可以增加局部的补体水平。

在组织损伤后的急性期反应中补体产生增多。这包括了大部分的补体成分,虽然它们增加的程度不一致(从 3~50 倍不等)。补体基因主要的共同转录诱导因子是 IFN-γ 及其他重要的急性期介导者,如 IL-1 和 IL-6 型细胞因子(如 IL-1α、IL-1β、肿瘤坏死因子 TNF-α、IL-6、IL-11 及其他)[18]。

971

膜锚固的补体调控蛋白广泛表达于多种组织[13]。补体受体也是广泛表达的，但其表达较弱，仅在细胞活化时可以检出。

补体成分的基因家族和结构基序

含有一个分子内硫酯键的蛋白质分子

目前认为 C3、C4 和 C5 在进化上来自于同一个祖蛋白。在活化过程中，它们在同一个保守性位点发生蛋白酶解并产生非常一致的变化：即表达几种新的表位（在 C3 和 C4 分子中）并获得与其他分子共价结合的能力。这一能力是由分子内原本分离的一个谷氨酰胺残基和一个半胱氨酸残基相互作用，形成一个分子内硫酯键而获得的（图 29.3）[19]。这一硫酯键存在于，C3、C4 和 α2 巨球蛋白中，C5 分子则没有，已在进化过程中丢失。未活化时硫酯键隐藏于分子内部，活化后被暴露并可与周围分子的 NH2 或 OH 残基起反应。两种不同的等位基因型 C4A 和 C4B 的差别在于是否在组氨酸下游存在一个由 115 个氨基酸组成的序列，后者可以催化酯键的形成。C4A 存在这一序列而 C4B 则无。这样，C4B 和 C3 就表现得一样，主要与羟残基形成酯键，而 C4A 则与 NH2 残基形成氨基连接[19]。研究显示，在生物合成过程中不同的硫酯蛋白需要不同的分子伴侣存在[19]。

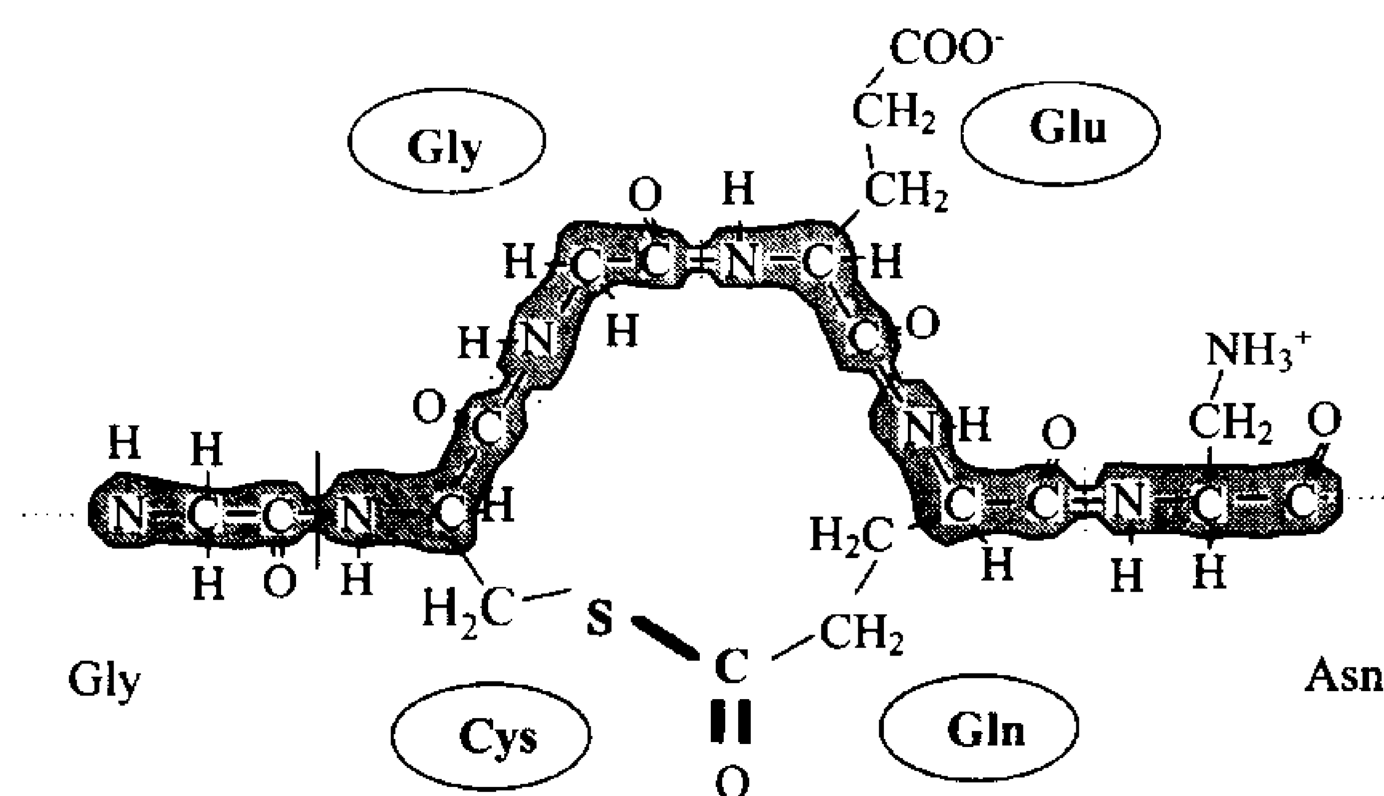


图 29.3　人 C3 的硫酯键结构域：肽键骨架（阴影部分）和 4 个氨基酸形成的硫内酯环（画圈部分）。硫酯键以粗体部分表示。

含有短同源重复的蛋白质分子

补体活化调控蛋白基因家族（regulator of complement activation，RCA）包括 H 因子及 H 因子相关蛋白基因家族，如 C4bp，DAF，CR2，CR1 和 MCP[20]。RCA 蛋白可含有 4～34 个短同源重复（short consensus repeat，SCR）（图 29.4）。这些蛋白还具有短的跨膜段和胞内部分（CR1，CR2，MCP）或者是 GPI 锚，如 DAF[21]。这些同源的 SCR 是由 60 个氨基酸残基形成的一个球形结构域，其中包含有明显的保守性残基如色氨酸、脯氨酸及重要的 4 个半胱氨酸残基，后者可形成 2 个二硫键（Cys1 与 Cys3、Cys2 与 Cys4）。外形上 RCA 蛋白是拉长的分子，其中 CR1 和 CR2 从膜表面开始长度分别为 90 和 28nm（图 29.4）。电镜显示血浆蛋白 H 因子具有一个拉长的发夹样结构。

RCA 基因家族是由一个 SCR 祖分子经基因复制并转变而来，形成的基因家族编码的蛋白质调控 C3 和 C4 的活化[23]。然而有趣的是，每个 RCA 成员分子中只有几个 SCR 能结合活化的 C3/C4。嵌合体蛋白如 B 因子、C2、C1r、C1s、MASP-1、MASP-2、C6 和 C7 中也存在较少的 SCR，所有这些分子均是与 C3/C4/C5 相作用的。SCRs 也在非补

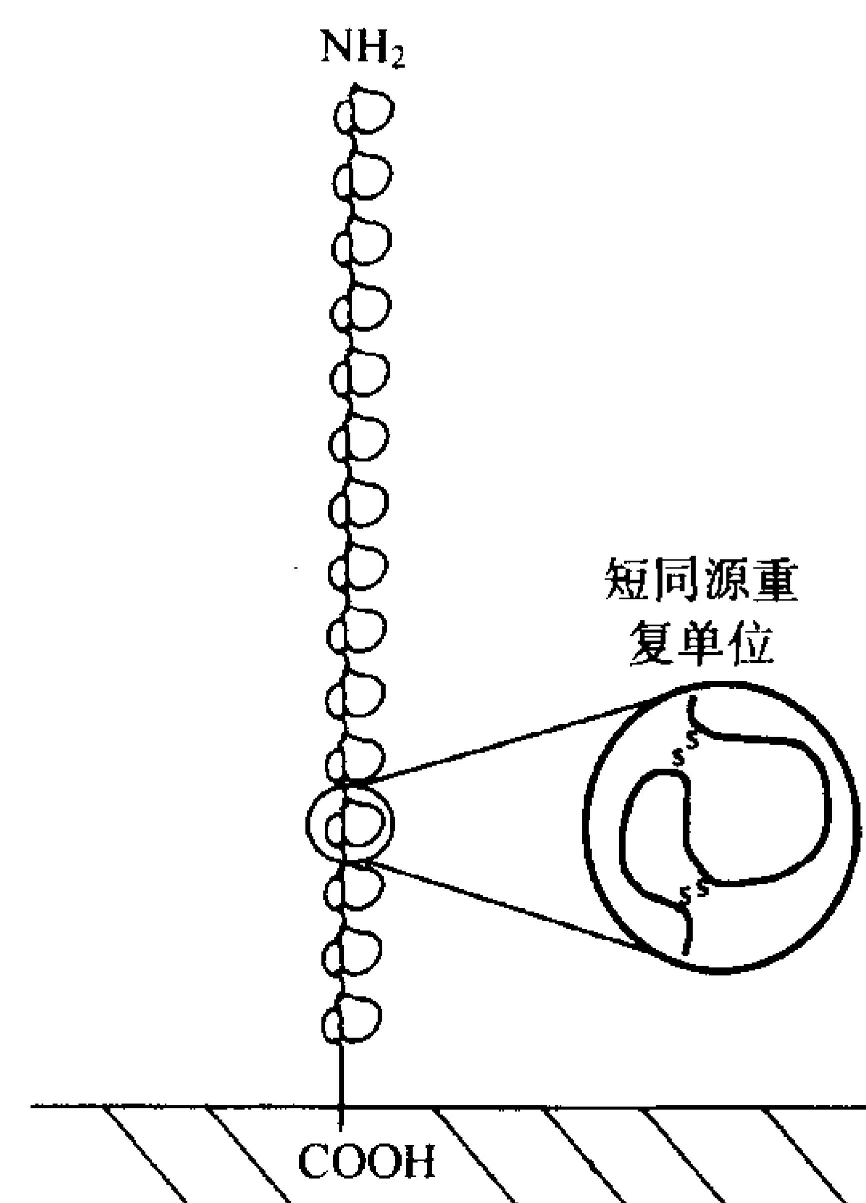


图 29.4　SCR 和基于 SCR 的补体调控蛋白的结构示意图（图中所示为 CR2）。

体蛋白中找到,如凝血因子ⅩⅢB、IL-2受体α链(CD25)和选择素。因为每个SCR通常是由一个独立的外显子编码的,因此这些结构域的组合被认为是外显子扩增的结果。

修饰的丝氨酸蛋白酶

丝氨酸蛋白酶在补体活化早期的放大步骤中起重要作用。丝氨酸蛋白酶结构域存在于C1r、C1s、MASP-1、MASP-2、C2、B因子、I因子、D因子和许多其他的非补体酶分子中(如胰蛋白酶)。

含有凝血酶敏感蛋白重复序列的蛋白质分子

在细胞外基质蛋白凝血酶敏感蛋白中有一个30个氨基酸组成的模块,此序列也存在于补体终末成分及备解素中[25]。C6有3个凝血酶敏感蛋白重复(thrombospondinlike repeats, TSR);C7、C8α和C8β均有2个TSR;C9含有1个;备解素则含有6个串联排列的TSR。上述蛋白均具有两性分子特征,使它们可以在血浆和胞膜中发挥作用,这一点是MAC形成的重要因素。

972

其他结构家族成员

属于丝氨酸蛋白酶抑制物(serpin)的蛋白质均具丝氨酸蛋白酶抑制活性,虽然在补体活化过程中有许多丝氨酸蛋白酶活化,但仅有C1s和C1r可被一种丝氨酸蛋白酶抑制物所抑制,被称为C1抑制物(C1 inhibitor, C1-INH)。

MBL是一种胶凝素,也是一种植物血凝素,其亚基的茎部与胶原有着结构上的相似性。虽然C1q并不与糖基结合,但它与胶凝素,尤其是MBL在结构上相关联。两者均要形成胶原结构域和球形结构域并由几个相同的亚基组装形成。

C9除含有一个TSR以外,还与穿孔素同源,后者由杀伤性T细胞和自然杀伤细胞所分泌的孔道形成蛋白。此外,终末成分还含有一个低密度脂蛋白受体结构域和一个表皮生长因子模块。

CR3和CR4属于异二聚体整合素超家族。它们的β链为β2-整合素类型,与白细胞功能抗原-1相同。整合素在细胞与细胞、细胞与基质间相互作用中发挥广泛的作用。CR3和CR4具有同样的性质。

过敏毒素C3a和C5a受体属于G-蛋白偶联受体(7次跨膜受体)。它们以α-螺旋7次跨越细胞膜,并与胞内G蛋白相偶联。

补体活化:C3活化的枢纽性作用

裂解C3产生C3b是补体活化级联中的枢纽性步骤(图29.5)。这一反应在三种活化途径中相近并由两种不同的C3转化酶催化。虽然其他的蛋白酶(如纤溶酶)或毒素(如眼镜蛇因子)也能活化C3,但C3转化酶是惟一的生理性效应者。在所有的补体成分中,C3在血浆中的浓度最高(1~1.4mg/ml)并且是血浆蛋白中含量最丰富的蛋白组分之一。由于存在分子内硫酯键,C3以及与其关系最密切的C4是血浆中惟一能与多个配体产生共价结合的蛋白分子。

看起来补体系统似乎是在C3(或其祖分子)具有的能与其他分子共价结合这一能力的基础上进化发展而来。一个C3祖蛋白可能与含有硫酯键的蛋白酶抑制剂α2巨球蛋白相似。当蛋白酶裂解了α2巨球蛋白后,后者分子内活性区域形成并可以共价结合于蛋白酶上,从而抑制蛋白酶活性。

973

C3及其衍生物的四种重要的功能特点。

① C3转化酶是2个相似的酶复合物(分别由C3b、Bb和C4b、2a组成)均含有丝氨酸蛋白酶活性和C3b或C4b,它们将C3裂解成为C3a和C3b从而活化C3。

② I因子是一种血浆C3b(和C4b)特异性的丝氨酸蛋白酶抑制剂,它可裂解C3b(和C4b)成为iC3b(和iC4b)从而灭活之。I因子发挥功能需要辅因子。

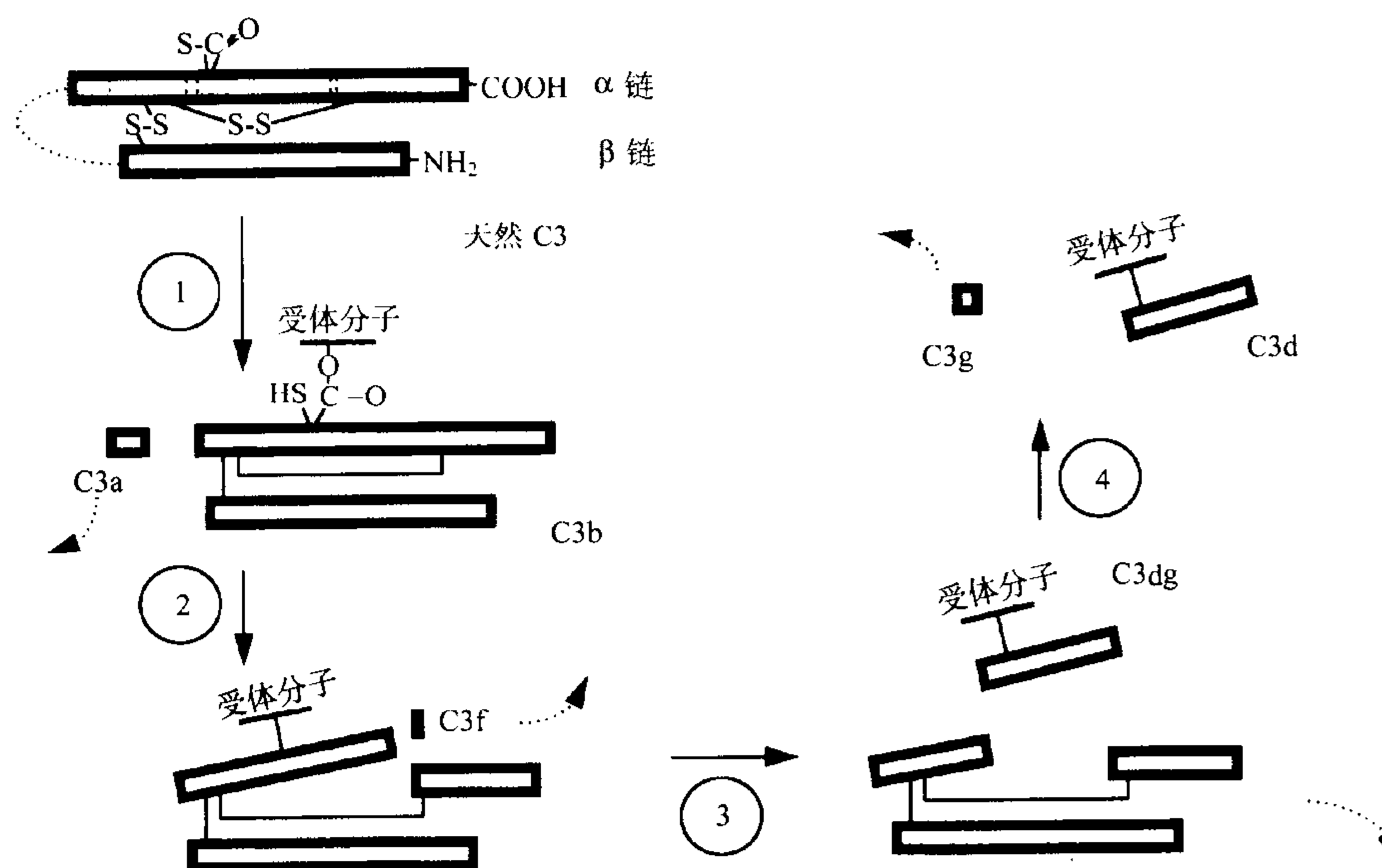


图 29.5　C3 的活化、灭活和降解。
①C3 转化酶活化天然 C3 产生 C3b(结合至一个受体分子上)和 C3a;②I 因子和一个辅因子从 C3b 裂解下 C3f 而将之灭活成为 iC3b;③I 因子和 CR1 进一步将 iC3b 降解为 C3dg 和 C3c;④血浆蛋白酶将与受体分子结合的 C3dg 水解成为 C3d。

③ RCA 家族蛋白分子含有 4～34 个 SCR,它们通过解聚转化酶和作为 I 因子的辅因子下调 C3(和/或 C4)的活化。

④ C3 片段的受体由基因上并不相关联的蛋白质如整合素、7 次跨膜蛋白、RCA 家族蛋白等组成,它们结合 C3 活化残留物从而活化和趋化细胞(如调理吞噬作用)。

无论哪种形式的 C3 转化酶均在天然 C3 分子 α 链上一个特异性的精氨酸残基位点上进行裂解,形成 C3a 和 C3b。C3a 多肽(77 个氨基酸组成)是强效的过敏毒素并可在距 C3 活化部位较远的地方仍可发挥作用。留下分子的主要部分、新生的 C3b 保持活性的时间为 60μs。新生的 C3b 分子构象迅速改变并暴露分子内的硫酯键。通过高活性的硫酯键,新生的 C3b 可与周围分子(称为受体分子)的羟基或氨基甚至 H_2O 分子结合,并可共价结合至中性粒细胞上。

替代途径

在种系发生学角度上替代途径是最古老的 C3 活化途径,它形成抵御入侵微生物的第一道防线(表 29.1 和图 29.6)。它在外源性(非己)物质存在时可以即刻发生活化和放大。与抗体相同,替代途径通过其他的一些准则识别"外源性"物质,因此它本身就代表了一个原始的免疫系统。初始的替代途径系统可能在 5 亿年前即已存在,并在更原始的脊椎动物如七腮鳗和黏盲鳗中已可以找到[23]。在非脊椎动物中也有详尽的证据支持,如在石居蟹中甚至昆虫原始的替代途径或 C3 类似物已经存在,并可能在识别(外源性)糖链的基础上与始祖性的体液免疫系统相联系。

在免疫球蛋白系统进化后,它通过经典途径活化补体这一古老的效应系统。

参与替代途径的蛋白质包括 C3(和 C3b)以及 B 因子和 D 因子。这些蛋白可以建立一个 C3 活化的正反馈环(C3 放大环)。备解素(P 因子)通过稳定转化酶 C3b、Bb 而增强这个环。控制替代途径的蛋白质包括 I 因子(与它的辅因子 H 因子、CR1 和 MCP 共同作用)和 DAF。

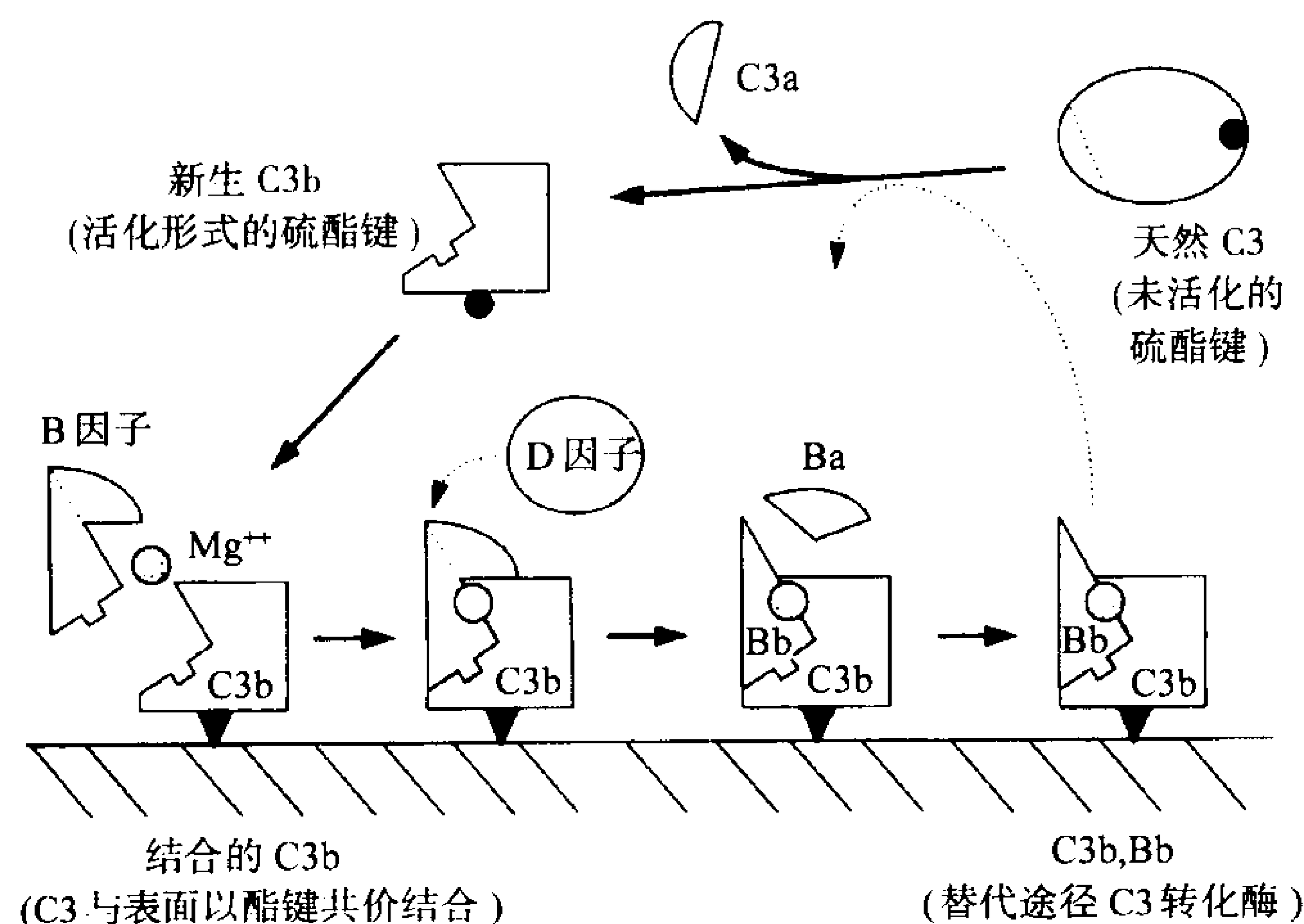


图 29.6 替代途径的 C3b 放大效应。通过替代途径 C3 转化酶 C3b,Bb 的作用,天然 C3 被活化,其分子构象发生改变,并暴露出活化的硫酯键位点(●)。一些新生的 C3b 通过硫酯键与活化表面共价结合(▼),这时在 Mg^{2+} 存在条件下 C3b 与 B 因子结合。结合的 B 因子可被 D 因子裂解,释放 Ba,而 Bb 仍与 C3b 结合,从而形成一个新的替代途径 C3 转化酶。

由 iC3 起始的替代途径活化

一个长期存在的概念性问题是第一个 C3b 是如何产生的。在体外实验而非血浆水平的测量中,替代途径的概念被描述为依赖于非酶促活化 C3(iC3 或 C3b 样 C3)的启动。

这一概念是基于天然 C3 分子持续性地向 iC3 转化(称为"C3 的积累")这样一个背景。iC3 是分子内硫酯键与水分子瞬时反应的结果,因此以前它的名字是 C3(H_2O)。由此,iC3 代表着未裂解、但具溶血性的 C3b 样 C3 的形成。iC3 在血浆中持续低速率地形成,它在血浆中的实际存在在其被推断后的数年时间里方被直接证明,并发现它占血浆未活化 C3 的 0.5%[26]。

iC3 以 Mg^{2+} 依赖方式与 B 因子结合。在这个复合物中,B 因子可被 D 因子所裂解。具酶活性的 Bb 片段保持与 iC3 结合,因此形成 iC3,Bb,后者即为替代途径的起始 C3 转化酶。目前认为这一起始转化酶在液相中持续形成但半衰期非常短。iC3、Bb 很快被 H 因子解聚,iC3 也很容易被 I 因子以与 C3b 相同的方式裂解(图 29.5)。但是,这仍然使得一些新生 C3b 分子产生并随机结合至邻近的血浆或膜表面分子上。

结合至表面的 C3b 分子的命运由其所结合表面的活化或非活化特性决定。一个颗粒或是活化的表面(可促进大量的 C3 活化和 C3b 沉积在其表面),或是非活化的表面(能有效地抑制此反应),是由其对 H 因子(替代途径活性下调分子)和 B 因子(替代途径活性上调分子)的亲和力产生的不同影响决定的。活化表面可使 H 因子与 B 因子的亲和力降低(约 10 倍),而 B 因子本身对两种表面的亲和力相当。

活化表面上替代途径的 C3b 扩增

974

当第一个 C3b 分子随机结合到了活化表面后,C3b 扩增过程快速进行(图 29.6)。首先 B 因子在 Mg^{2+} 存在条件下与 C3b 结合并被 D 因子活化。D 因子是血浆中的一种丝氨酸蛋白酶,存在量很少,当识别了其配基 C3b,B 或 iC3,B 后,D 因子转化为活化形式[27]。在产生了 C3b、Bb 并释放了 Ba 后,D 因子又恢复其非活化状态。表面结合的 C3b、Bb 活化更多的 C3 分子,其中一些新生的 C3b 将也结合在同一表面。只要 Bb 与 C3b 结合,C3b、Bb 即可保持活化。备解素与 C3b 和 Bb 分子均可结合,其作用为稳定转化酶,防止其被降解。

在非活化表面的 C3b 失活

在非活化表面如宿主细胞膜,H 因子通过与阴离子残基如多个唾液酸分子的亲和力而增加对表面的结合。H 因子结合于糖蛋白的糖基上使结合至宿主细胞的 C3b 很快与 H 因子结合并随后被 I 因子降解。H 因子可解聚非活化表面上形成的或存在于液相中的 C3b,Bb 复合物(参见"补体系统的调控"及图29.10)。

经典途径

参与经典途径的补体蛋白

参与经典途径活化级联的蛋白质依次为：C1、C4、C2 和 C3（表 29.1，图 29.1 和 29.7）。C1 抑制物（C1-INH）、C4 结合蛋白（C4bp）、CR1、I 因子、MCP 等作为调控蛋白。

C1 是由一个 C1q 分子非共价结合 2 个 C1r 和 2 个 C1s 分子形成的分子质量为 750kDa 的大分子（图 29.7），Ca^{2+} 是形成 $C1q(C1r)_2(C1s)_2$ 这一稳定复合物所必需的。在血浆中，约 70% 的 C1 成分以复合物形式存在。C1q 蛋白由 6 个相同的亚基组装而成，每个亚基包含 3 个相同的链（A，B 和 C）。这些链形成末端的球形结构域及一个颈部区和一个茎部区，其中茎部区与胶原分子相似，3 个 α-螺旋相互缠绕形成 1 个螺旋。6 个亚基以它们胶原样部分结合在一起，这使 C1q 常常看起来像是"一束六朵郁金香"的外观。C1q 的球形区域结合至免疫球蛋白的 Fc 段，MBL 具有与之相似的整体结构。

C1q 的茎部与 C1r 和 C1s 相互作用，在电镜下可以看到 $C1r_2C1s_2$ 四聚物形成一个线性链状结构[28]。每个 C1s 和 C1r 均含有一个丝氨酸蛋白酶结构域（催化结构域）和一个结合区。在活化以前，4 个催化域均位于锥形 C1q 茎部的内部（图29.7）。

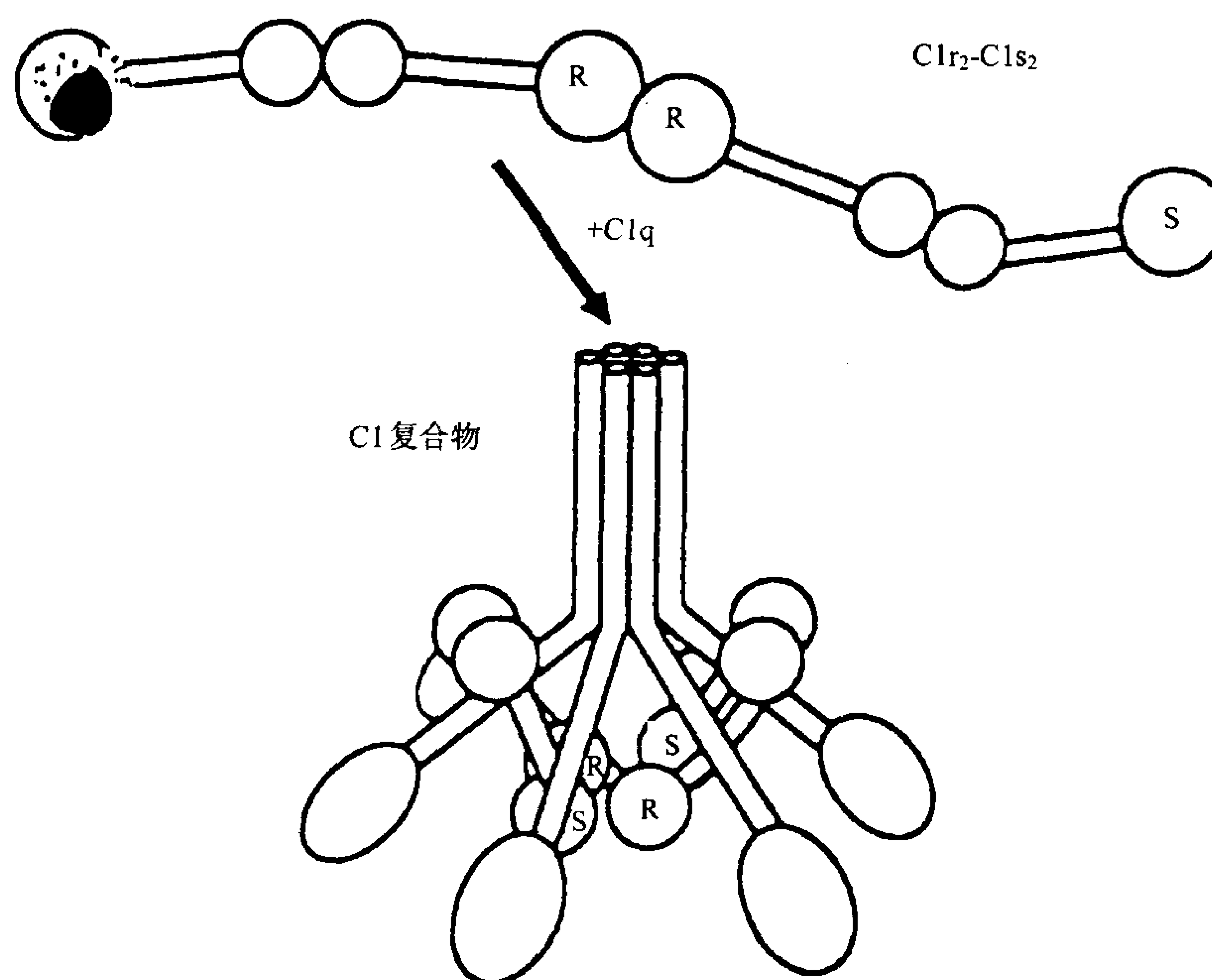


图 29.7　C1 复合物。C1 复合物模型显示了 C1r2-$C1s_2$ 折叠成杆状环绕于 C1q 的臂上，这使得 C1s 与 C1r 的催化位点相接触。

补体经典途径活化

生理学上最重要的 C1 活化是由结合了抗原的 IgG 或 IgM 触发的活化。但人们发现，还有除免疫球蛋白以外的活化途径可触发 C1 活化，包括细菌脂多糖（LPS），多价阴离子复合物、髓鞘脂、急性期 C 反应蛋白和一些病毒（如人免疫缺陷病毒 HIV-1）。C1q 与免疫球蛋白结合时识别其 Fc 段，后者在抗体结合抗原后发生结构改变。C1q 6 个 C 端球形结构域必须结合 2 个结合了抗原的抗体，即 1 分子 IgM（每分子有 5 个 Fc 段）或至少 2 个 IgG 分子方能触发补体活化，而且它们必须离得足够近（相距 < 40nm）。因此，IgG 只有在以适当密

975

度结合抗原后才能有效地活化 C1。在人的 IgG 亚类中,活化 C1q 能力由低到高依次为 IgG4 < IgG2 < IgG1 < IgG3①。

在 C1q 与免疫球蛋白结合并发生结构改变后,2 个 C1r 中的丝氨酸酯酶结构域的相对位置发生变化,这使 C1r 分子的相互裂解得以进行。活化的 C1r 随后裂解(活化)C1s,活化的 C1s 是活化 C4 和 C2 的酶分子。裂解 C1r 和 C1s 并不伴有酶解片段的释出。

未与抗体结合的 C1 分子具有自身活化趋势,其 C1s 和 C1r 的活性受到 C1-INH 严格地控制。活化的 C1r 和 C1s 可与 C1-INH 共价结合,从而被快速失活[每个 C1 分子产生 2 分子的 C1r C1$(C1\text{-}INH)_2$]。但即使是活化的分子半衰期这样短,由于其较低的 *K*m 值和血浆中较高浓度的 C4 分子,1 分子活化的 C1 分子仍可活化约 35 个 C4 分子[29]。C4 裂解产生具较低趋化活性的 C4a 短片段和较大的 C4b 片段,后者在结构上发生较大改变,结果分子内的硫酯键暴露,并与周围分子(蛋白质、糖链、水分子)以氨基化合物或酯形式共价结合,这些反应在数毫秒之内发生[19]。许多新生的 C4b 分子因与 H_2O 反应而损失,约有 5% C4b 共价结合到紧邻活化的免疫球蛋白-C1 复合物颗粒的表面[30]。这样,一个细胞或颗粒表面就被处于中心的 C1 分子和在其周围成簇分布的 C4b 分子所覆盖。

由于较低的血浆浓度,活化 C2 的过程没有活化 C4 的效率高[12],活化 1 个 C1 分子约可活化 4 个 C2 分子。为了代偿这一点,C2 分子可与 C4b 形成 Mg^{2+} 依赖性的复合物。在这个复合物中,C2 可以由 C1s 裂解产生 C2a(较大的片段,继续与 C4b 结合)和 C2b(释出的较小的片段,有激肽活性)。游离的 C2 被 C1s 裂解的可能性小。C2a 是 C4b、2a 复合物中的酶活性片段,即经典途径 C3 转化酶。其活性仅在与 C4b 结合时具有,且一旦解离,C2a 不再能与 C4b 结合。C3 转化酶活化 C3 并帮助 C5 活化,进而促进终末成分活化。

经典途径的作用

在三条补体活化途径中,经典途径在种系发生学上是最年轻的一条。它在脊椎动物免疫球蛋白体系形成后方才出现,并作为体液免疫强有力的效应机制。在形成特异性抗体所需的几天时间中,机体抗感染依赖的是天然免疫:即替代和 MBLectin 途径的调理吞噬作用,其他血浆防御蛋白(CRP、α_2 巨球蛋白)和 NK 细胞。通过经 C1-C4-C2 级联触发 C3 活化,免疫球蛋白与更古老的替代途径中更有效的 C3 增强反馈环路一起协同作用,以更强效的机制形成膜攻击复合物。

MBLectin 途径(凝集素途径)

补体活化的 MBL 途径的概念是近来才提出的(图 29.1)。其主要的组成是血浆蛋白甘露聚糖凝集素(甘露糖结合凝集素)——MBL[31]②。

MBL 是一种属于胶原凝集素家族的蛋白质,它由胶原结构组成(3 个亚基的 α 螺旋部分相互缠绕形成螺圈状的一束),并且可以行使凝集素功能。这说明它可以通过每个亚基 C 端的球形部分识别特异性的糖基。MBL 是一种 C 型凝集素,在依赖 Ca^{2+} 条件下可与其特异性识别的糖链相结合。其他的胶凝素家族成员包括肺表面活性蛋白 SP-D 和 SP-A 及牛血浆蛋白胶固素。每一个胶凝素的整体结构是非常不同的,MBL 则与 C1q 的"一束郁金香"外形很相似。虽然 C1q 并不属于胶凝素家族,但 C1q 与胶凝素有以下几个共同点:其亚基的胶原样结构;C 端的球形结构域以及分子由几个亚基通过二硫键组装而成。

MBL 最先在其他种属动物中被鉴定出[33]。人的 MBL 以其亚基寡聚化的形式在于血浆中。其中二聚

① 一些小鼠免疫球蛋白亚型也能活化人补体,这一特性被用于以单克隆抗体和人血清特异性杀伤人源性细胞(例如制备纯化的淋巴细胞亚群)。但是,小鼠免疫球蛋白亚型活化人补体的能力的顺序与人的不同。

② 由于 MBL 是惟一能活化补体的凝集素,C. Janeway 建议由"MBLectin 途径"这一称呼代替"凝集素途径"。前者是指甘露聚糖结合蛋白 MBL 或甘露糖结合蛋白(mannose binding protein, MBP),请注意与麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein)或髓磷脂碱性蛋白(*myelin basic protein*)相区别。

体/四聚体和五聚物/六聚物分别占总量的 80%和 15%[34]。在急性期反应中 MBL 水平升高约 3 倍,用几种急性期蛋白可诱导其更显著地增高[35]。正常血清水平也存在基本的个体差异(从 10~20μg/ml 不等,见表 29.1),并且这种差异是由基因决定的[36,37]。另外,不同等位基因形式的 MBL 在活化补体的效率上也是不同的。事实上,很早以前就已经有关于患者 MBL 失能造成血浆功能缺陷的观察并被称为酵母调理缺陷[38],但其具体涉及的分子和机制直到最近,在我们认识到 MBL 可以活化经典途径之后才得到揭示[39]。

MBL 活化补体是通过其球形头部(糖链识别区域,carbohydrate recognition domain, CRD)与糖基(如 N-氨基半乳糖或甘露糖)相结合而实现的。由于对某一个 CRD 而言,其配基亲和力较低(Kd 约为 10^{-3}mol/L),因此 MBL 只有在它的多个 CRD 与寡聚或多聚糖链残基相结合后才能发生结合。这样的重复性的糖基多在 LPS 或其他微生物表面存在。各 CRD 之间的距离较大,不允许一个 MBL 结合至一个哺乳动物糖蛋白分子上[31]。

另一方面,已发现几种病原菌可与 MBL 结合,如沙门氏菌、利斯特氏菌、奈瑟氏球菌属、白色念珠菌以及新型隐球菌。而细菌被膜的存在是 MBL 结合的重要条件[31]。与配基结合后分子结构改变,导致两种与 MBL 结合的丝氨酸蛋白酶——MASP-1 和 MASP-2 活化[11]。MASP-1 和 MASP-2 分别与 C1r 和 C1s 同源,这更显示了 MBL 与 C1q 之间的相似性。与 C1s 相同,活化的 MASP-2 可以活化 C4 并导致不依赖 C1 的经典途径 C3 转化酶 C4b、2a 形成。MBL 途径的调控由 α_2-巨球蛋白和 C1-INH 实施,两者均可共价结合至活化的 MBLectin/MASP 复合物上[40,41]。与 C1 复合物相反,至今人们对 MBL 和 MASP-1/MASP-2 形成复合物的相互作用位点仍不清楚。

976

MBL 对宿主免疫防御的贡献不仅仅表现在活化补体上,结合了配基的 MBL 可为胶凝素受体识别[42]。由于 MBL 与胶凝素受体亲和力低,受体在细胞膜上成簇化和多个配基的存在是稳定的相互作用所需的。受体是否参与介导巨噬细胞的调理作用至今仍有争议。

活化 C5

已如前述,所有三条补体活化途径通过形成两种不同的 C3 转化酶活化 C3 而走到一起(图 29.8)。这些分子复合物在活化级联的下一个步骤中也有用,即 C5 的裂解,但是这需要更多的 C3b 分子共价结合在其紧邻的周围。这一 C3b 作为 C5 的砧板,它与 C5 相互作用并将 C5 以合适的构像呈递给先前 C3 转化酶的 C2a 或 Bb 部分,将其裂解。这样,C3b,Bb,3b 和 C4b,2a,3b 组成了两种不同的 C5 转化酶复合物,它们均需要 Mg^{2+}。在 C5α 链上的裂解产生 11kDa 的 C5a 肽和一个更大的片段 C5b。C5a 是强力的趋化肽,远离补体活化部位仍有作用。C5b 是形成膜攻击复合物的启始分子。

终末补体途径

无论补体活化由经典、替代还是 MBLectin 途径启动,其终末成分活化过程均相同(图 29.1 和图 29.8)。在 C5 由经典或是替代途径的 C5 转化酶裂解以后,终末补体成分

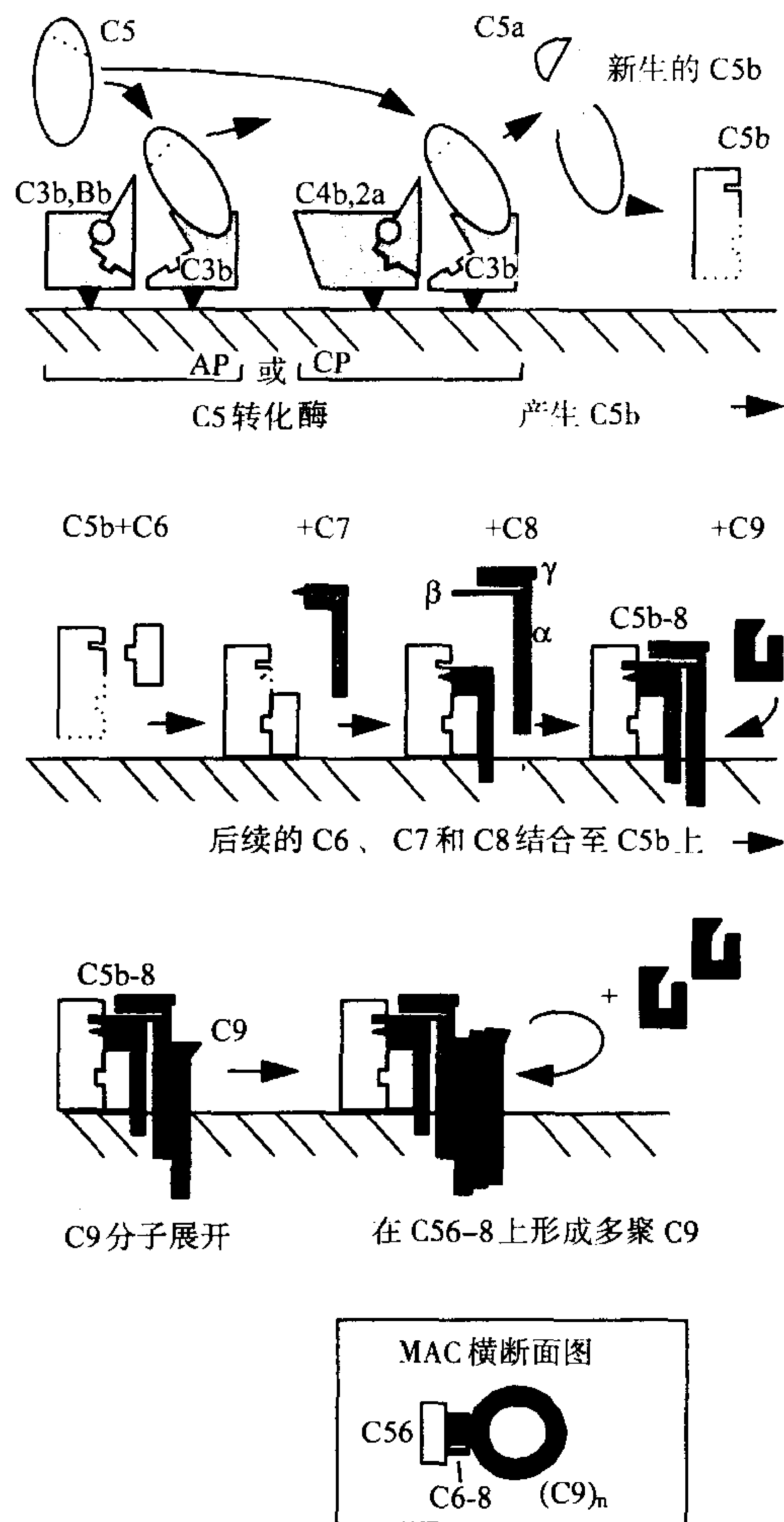


图 29.8 C5 和补体终末途径的活化。C5 可通过经典或替代途径的 C5 转化酶活化。新生的 C5b 与后续的 C6、C7 和 C8 相互作用并结合至脂膜。作为最后一个步骤,C9 在 C5b-8 上发生多聚化而形成完整的 MAC。

C6、C7、C8 和 C9 顺次活化而不伴有酶解作用,导致终末补体复合物形成(terminal complement complex, TCC)[43]。

TCC 可以在生物膜上组装成为具膜溶破效应的 MAC,或者在 S-蛋白(也称为玻璃连接蛋白)存在时在胞外液相中形成无裂解效应的 SC5b-9,两种形式均由 C5b,C6,C7,C8 和 C9 组成。C5 裂解后,C5b 发生构像改变并暴露一个 C6 结合位点。在靶目标 C5 转化酶周围的 C5b,其结合 C6 的能力衰变很快,但一旦结合,C5b6 形成一个稳定的双分子复合物。C5b6 结合 C7,导致膜结合位点暴露而可以插入到靶膜中。如果补体活化部位 C7 浓度有限,则稳定的双分子 C5b6 复合物与 C5 转化酶脱离并在液相中聚集。遇到 C7 分子后,C5b-7 在液相中形成。这一复合物有短暂的、结合至膜上的能力并介导溶破,而不是只能存在于液相中,这一过程称为反应性溶破[44]。无论是膜结合形式还是液相中的 C5b-7 均可结合 C8。C8 由 3 条不同的肽链组成:α 和 γ 由二硫键共价结合,而 β 链以非共价形式结合。新生的 C5b-7 以 C5b 与 C8β 结合,此复合物并不具有溶细胞效应,可能因为它主要与外层质膜作用而未涉及内层质膜(图 29.8)。

977

虽然 C5b-8 可表现出部分的溶破活性,有效的溶破还是依赖于 C8α 亚基与 C9 的相互作用。C5b-8 是 C9 的促聚合剂,第一个 C9 结合至 C5b-8 后发生显著的构像变化,形成一个拉长的分子并可使更多的 C9 结合于上,进而形成 C9 圆柱体插入膜中(图 29.8)。TCC 形成需要 C5b,C6,C7 和 C8 各 1 个分子,而 C9 的分子数在液相中可是 1 ~ 3 不等,在膜上则可以是 1 ~ 12 个。当 C9 足够多时,多达 15 个 C9 分子形成的 C9 多聚物也可以观察到。由于 C9 分子的数量不同,管状结构也就并不一致。在液相中,C9 在不结合 C5b-8 的条件下可以自行聚合,并且这种多聚化的趋势在金属离子存在条件下增强。

但是,对于终末补体在 C9 插入膜后介导的细胞毒作用的确切机制目前仍不清楚。现在两种相互对立的主要假说争论得非常激烈。根据一种模式,插入膜上的补体蛋白形成的孔道结构域(主要是 C9)引起磷脂双层局部破坏,导致“渗漏斑”形成[45]。另一种理论认为终末补体蛋白形成一个穿膜的亲水性通道(孔),并最终导致细胞崩解[46]。

补体介导的膜穿孔并不是惟一的。位于细胞毒性 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞的胞浆颗粒中的穿孔素,能在靶膜上多聚化从而形成跨膜通道。它与 C9 高度同源。因此在抗体或 T 细胞识别一个靶目标后,机体再以非特异性的破坏力(C9 或穿孔素)将之摧毁。

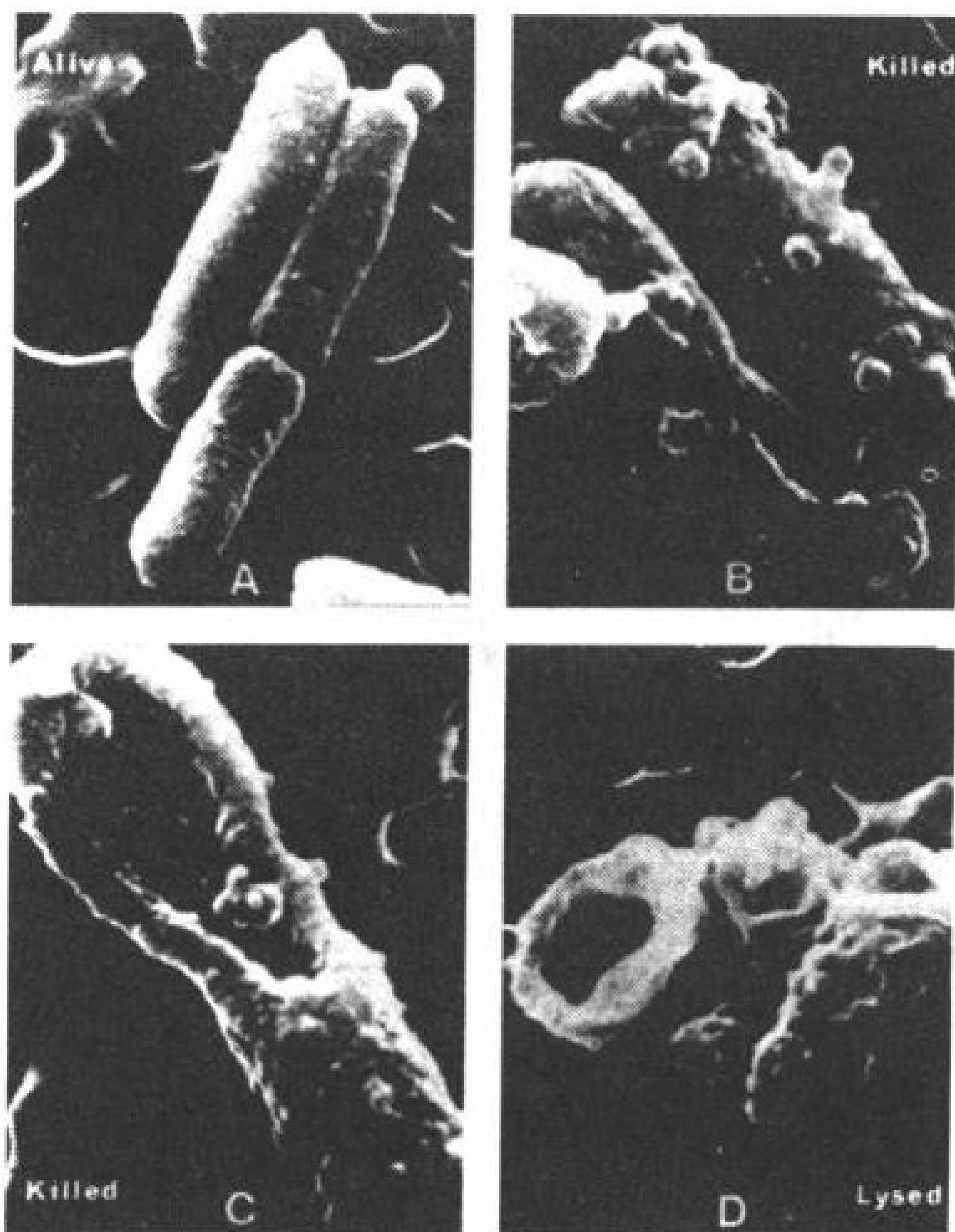


图 29.9　扫描电镜下补体杀伤前后的大肠杆菌形态。A:完整的细菌;B 和 C:纯化的补体蛋白杀伤细菌;D:补体和溶菌酶联合杀伤细菌。经作者同意后引用[47]。

补体终末复合物的生物学特征

由于在多种病变组织中发现 TCC 的存在,并检测到血中 TCC 水平上升,人们推断 TCC 与许多疾病可能有关,但现在并不清楚检测 TCC 是否具有重要的病理学意义。可以肯定的是它的溶破作用对于宿主抗细菌和病毒是非常重要的(图 29.9)。

在一个未被鉴定为“非己”的有核细胞表面,补体的活化常是亚溶破剂量的[48]。术语“亚溶破”是一个定量的而不是定性的称呼(即 TCC 复合物在数量而不是结构上的存在差异)。亚溶破攻击使细胞获得一些保护能力,因为它可以承受一次(且是错误的)攻击,而不像红细胞在一次打击中即发生溶破。另外,先前在有核细胞上发生的亚溶破效应可以保护细胞,使之可以承受更多的、甚至是溶破剂量的攻击。这对那些持续与补体接触的宿主细胞有利[49]。亚溶破攻击不但保护宿主细胞,它们还可刺激细胞的新蛋白质合成和花生四烯酸代谢并活化多形核白细胞。另外,亚溶破 TCC 瞬时增高有核细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度、活化蛋白激酶 C 和 GTP 结合调节蛋白(G 蛋白)[50]。它也是有效的促凝血和促炎症活化者[48, 51]。可以推测,多种

免疫细胞表面存在的 TCC 提示,其对沉积细胞生理功能可能具有调节作用[52]。这样,作为宿主重要的体液防御效应武器的终末补体级联的功能得到了极大的扩展和延伸。SC5b-9 仅仅代表非活化形式的 TCC 还是它在免疫防御中仍可发挥作用,目前尚有争议。

补体活化的控制

作为一个有效的自我损伤机制,补体在自身细胞上的活化必须被避免或至少应被限制(表 29.3 和图 29.5、29.10)。调控效应并非均匀地分布于整个级联,而是集中在导致 C3 活化和 C9 多聚化(产生 MAC)的关键性事件上。液相中有控制活化的蛋白,如血浆和其他定位于膜上的蛋白,它们只在自身或同种细胞上有效,而在异种细胞上则无效。

表 29.3 补体调控蛋白作用模式

调控蛋白	主要作用位点	作用模式			
C4 活化					
C1-INH	血浆	与活化的 C1s 和 C1r 共价结合			
		促转化酶衰变加速[a]		辅因子活性[b]	
C3 和 C5 活化		C3b, Bb	C4b, 2a	C3b	C4b
H 因子	血浆和非活化膜	+	-	+	-
C4bp	血浆	-	+	-	+
CR1	自身[c] 膜(有限的组织分布)	+	+	+	+
MCP	自身[c] 膜(广泛的组织分布)	-	-	+	+
DAF	自身[c] 膜(广泛的组织分布)	+	+	-	-
形成攻膜复合物					
S 蛋白	血浆	与可溶性 C5b-7 结合,阻止其结合至膜			
群集素	血浆	与可溶性 C5b-7 结合,阻止其结合至膜			
CD59	自身[c] 膜(广泛的组织分布)	抑制 C9 的结合及其多聚化			

[a] 衰变加速是指使 C3 转化酶 C3b,Bb 或 C4b,2a 解离的能力。
[b] 辅因子活性是指辅助 I 因子裂解 C3b 或 C4b 的能力。
[c] 本文中,"自身"代表的是"同种属"。调控蛋白对其他种属补体大部分均无调节活性。

对经典途径而言,活化的 C1 很快由于 C1-INH 共价结合至活化的 C1r 和 C1s 而灭活。在这一复合物中,C1s 失去裂解 C4 的能力。正常情况下 C1-INH 以比较高的浓度存在于血浆中,C1-INH 缺乏将形成遗传性血管神经性水肿,C1-INH 还在控制 MASP-1 和 MASP-2 中发挥作用。

979

调控的下一步发生在 I 因子对 C4b 的裂解,这需要 C4bp(液相)或 CR1、MCP(膜相)作为辅因子。另外,C4bp 与 C4b 结合阻止了 C4b 在液相中与 C2 的结合。调控进一步延伸到组装好的 C3 转化酶 C4b、2a,该复合物可被 DAF 或 CR1 作用,并解离成为 C4b 和失活的 C2a,这一机制对经典途径的 C5 转化酶同样有效。

最严密的控制是针对替代途径中的 C3b 增强环路的,存在于非活化表面(图29.10B)或液相中(图 29.10A)的转化酶被解离成为 C3b 和 Bb,其中 Bb 的酶活性不可逆地丢失。而 C3b 裂解成为 iC3b,从而阻止了一个新的转化酶(重新)形成。首先,C3b、Bb 的降解可由膜锚固分子 DAF 或 CR1 或血浆蛋白 H 因子而加速。三者均可将 Bb 从 C3b 中置换下来,其中 H 因子和 CR1 自身与 C3b 结合是随后 I 因子裂解底物所必需的。H 因子是血浆中主要的控制蛋白,对于那些 DAF 作用不到的细胞膜部分也可发挥其分离 C3b, Bb 的作用。有趣的是,DAF 通过不同的 SCR 解聚 C4b,2a 和 C3b,Bb。有人指出,没有衰变加速分子的作用,C3 转化酶也很快发生衰变,仅有 2 分钟的短半衰期。这一点非常重要,因为它们是非常强有力的酶,即使在活化表面 C3 的活化也必须被限制。

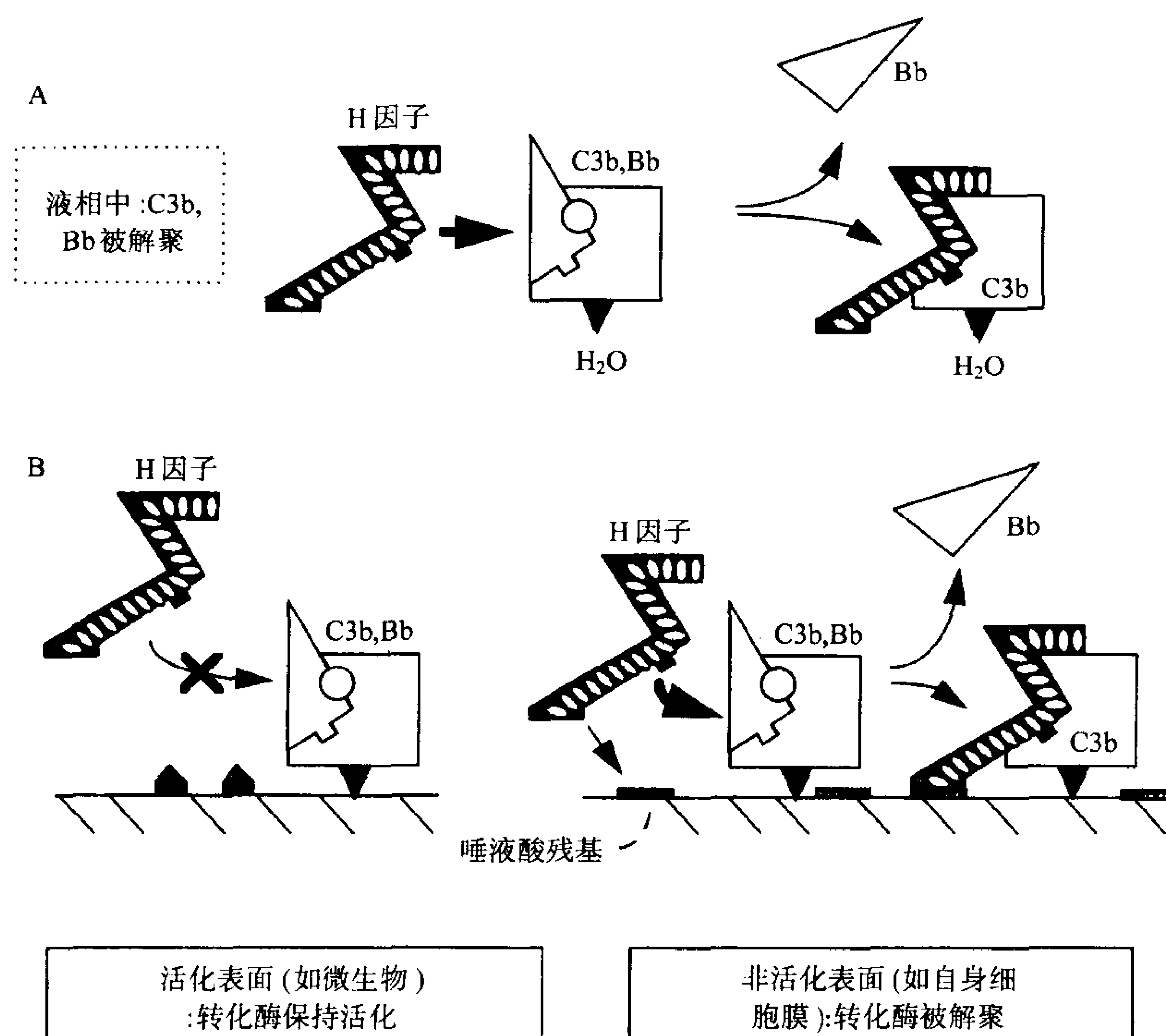


图 29.10 H因子对 C3b 放大反应的调控。A:H因子通过置换 Bb、导致 C3b 可为 I 因子所裂解而破坏血浆中循环的 C3 转化酶;B:在非活化表面发生相同的过程(右面部分),其中该表面可通过唾液酸残基促进 H因子结合。在活化膜表面(左面部分),H因子的结合未得到促进而使 C3b,Bb 保持在活化状态。

C3b 向 iC3b 的失活依赖 I 因子及其辅因子 H 因子、CR1 或 MCP。由于 H 因子的高血浆浓度,事实上所有在血浆中形成的 C3b(如与 H_2O 反应的新生 C3b)很快与 H 因子结合。I 因子对 C3b 只具有较低的 *K*m 值,H 因子使人血浆中 I 因子即使在低水平也可有效地裂解 C3b (和 iC3)。

C3b 降解(图 29.5)达到两个目的:危险的 C3b 被破坏,但 C3b 片段 iC3b 和 C3dg 仍保持在活化表面上,为调理作用打上了标记。I 因子可裂解 C3b 3 次,在第一和第二次后,C3b 失活成为 iC3b。第三次裂解释放较大的、生物学惰性的 C3c,而更小的 C3dg 片段仍保持与靶目标的结合,因为它含有硫酯键区域(图 29.5)。C3dg 可进一步被几种血浆蛋白酶降解为 C3d。

对于不断发现的 H 样因子(factor H-like, FHL)或相关 H 因子(Factor H-related, FHR)蛋白在 C3b 调控中的生理作用目前尚不清楚[53]。辅因子活性在 FHL-1 存在,但其较低的血浆浓度提示该蛋白可能具有其他更重要的特性[54]。FHR-1 和 FHR-2 无辅因子活性,但在与 C3b 结合相关位点的 C 端与 H 因子同源。

终末途径的调控均发生在组装的 MAC 整合入膜或在孔道形成之前(与 C8 和 C9 多聚化相关)。多种不同的膜和血浆分子参与调控 TCC 的组装,其中对 C8 的调控可能最为重要。它不仅代表了组成溶破复合物所必需的一个成分,另外它与新生的 C5b-7 在液相中的结合从而防止其牢固地插入膜内,从而阻止了膜损伤。

不仅仅是 C8,足量的 S 蛋白[55]、群集素(也称为 SP-40,40)[56]、脂蛋白、抗凝血酶Ⅲ、蛋白糖类如肝素和鱼精蛋白(肝素的强力解药),均可与新生 C5b-7 结合从而阻止它与膜结合。另外,这些抑制剂之间的多种相互作用也被观察到,其中一些在酸性条件下更易发生。这些在参考文献[5]中被综述。

这些复合物在体内的相互作用对宿主防御的影响程度尚不完全清楚。在 C5b-7 插入膜后,MAC 组装进入终末步骤,这时 MAC 更牢固地插入脂双层,其组装由细胞膜蛋白调控。它们被称为同源限制因子,因为它

们表现出一定程度的种属限制性,即它们只能防止自身补体攻击造成的溶破[58]。这些同源限制因子包括:①一种 65~68kDa 的分子(C8bp,HRF,MIP),目前仍未得到很好的鉴定,只是认为它主要是与 C8 相结合;②一种 18~20kDa、研究得相当清楚的糖脂锚固的膜分子(CD59),它通过干扰 C9 与 C8α 链相互作用而保护细胞免遭补体介导的溶破,而这正是 C9 插入和随后多聚化所必需的。

CD59 在有核细胞上广泛存在,包括那些位于(完整的)血脑屏障中的细胞[17]和红细胞,并且在血清、尿液、精液、初乳和乳汁中也存在。最近,人 CD59 的转基因猪被构建并研究了其在对人异种器官移植中的作用,认为这一途径可以缓解合适的人类供体短缺的问题。表达 CD59 可保护器官在体外实验中的超急性排斥反应。

补体受体

在补体活化途径中产生的活化产物与补体受体结合后,可介导几种生物学反应(图 29.4,图 29.11 和 29.12)。每个红细胞和白细胞均表达多种补体分段的细胞膜受体(表 29.4)。有一点非常重要,即未活化的、完整的补体成分不与受体结合,配基是在活化中产生的。

表 29.4　补体受体

类型	配基	结构,分子质量	分布	功能
CR1(CD35)	C3b > C4b > iC3b	单链,160~250kDa,糖蛋白,4 个同种异型,含有 28-34 个 SCR	单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞、T、B 细胞、FDC	免疫黏附,吞噬,免疫复合物清除,免疫复合物定位至生发中心,控制活化
CR2(CD21)	C3db/C3d > iC3b EBV,CD23,IFNα	单链,140~145kDa,糖蛋白,2 个亚型,CD21S(15 个 SCR),CD21L(16 个 SCR)	B 细胞、活化的 T 细胞、上皮细胞、LDC(CD21L)	B 细胞活化,免疫复合物定位至生发中心,拯救生发中心细胞免于发生凋亡
CR3(CD11b/CD18)	iC3b,Ⅹ因子,ICAM-1,纤维蛋白原,LPS	异二聚体糖蛋白,α 链:165kDa;β 链:95kDa	单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、NK 细胞、FDC、T 细胞、肥大细胞	吞噬,细胞黏附,信号转导,氧爆发
CR4(CD11c/CD18)	iC3b,纤维蛋白原	异二聚体糖蛋白,α 链:150kDa;β 链:95kDa	单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、NK 细胞、T 细胞、肥大细胞	吞噬、细胞黏附

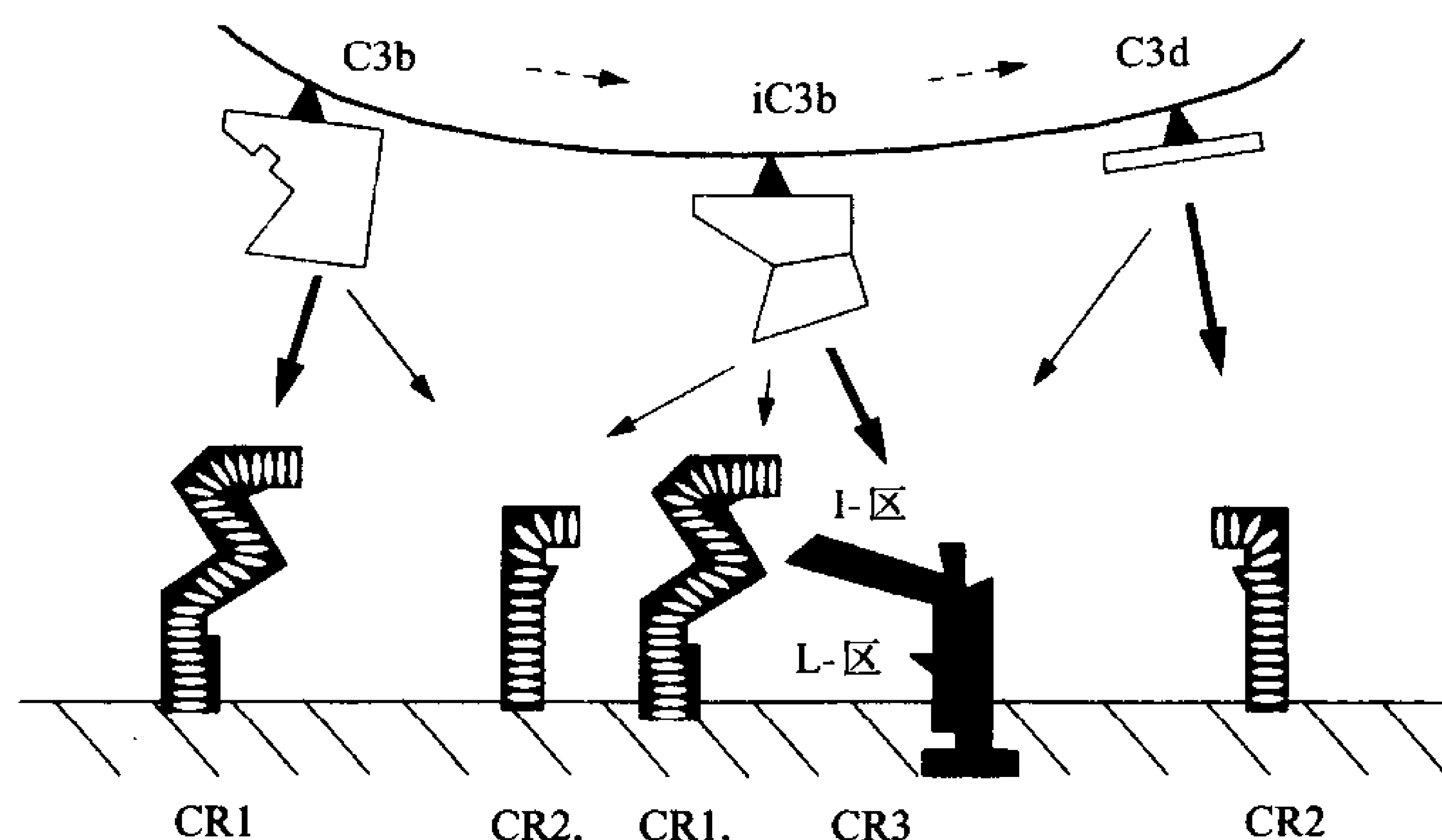


图 29.11　不同的 C3 片段与特异的补体受体相结合。CR1 和 CR2 含有 SCRs(以卵圆形表示),而 CR3 则为异型二聚体(整合素)。以加深的箭头表示 C3 片段与特定 CR 有更高的亲和力。

研究得最清楚的补体受体是与共价结合至活性表面的 C3 片段相结合的细胞膜表面分子。C3 遭降解导致细胞或颗粒结合 C3b,iC3b 和 C3dg/C3d 片段,形成了针对多种受体的配体(图 29.11)。所有的受体结合位点均位于 C3α 链。而由 C3 受体介导的最重要的补体生理功能是调理颗粒的吞噬和活化多种表面带有补体

受体的细胞。

补体受体Ⅰ型(CR1、C3b受体、CD35)

这一单链膜蛋白可以与C3b和C4b结合高亲和力,并且它不但是细胞膜受体,还参与补体活化的调节[59]。CR1有4型,每分子中含有34个SCR。2种共显性的等位基因分别表达220和250kDa两种形式的分子,另2种相差较大的型分别为190和280kDa。不同CR1最相似的胞外部分由首尾相连的30多个SCR结构组成,它们可被分为4组,称为长同源重复。每个长同源重复中含有7个重复的SCR(SCR1~7、8~14、5~21和22~28),再加上C端的另外2个SCR。配基结合部位位于4个长同源重复的第2个SCR上,使每个CR1分子具有多个C3b或C4b包被细胞或颗粒的作用位点。

980

CR1在红细胞、单核/巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、滤泡树突细胞和T、B淋巴细胞表面上存在。CR1在红细胞表面的数量仅约每细胞500个,而在白细胞上则相反,每个细胞上有>50 000个CR1分子,但是由于红细胞数量巨大,血液当中大约85%的CR1存在于红细胞上。

CR1功能

免疫黏附现象,如被调理的微生物结合至灵长类动物红细胞,是人们首次认识到补体介导的细胞反应。这一反应由红细胞表面的CR1介导,在清除血循环中免疫复合物的过程中发挥重要作用。抗体形成后产生可溶性的抗原-抗体复合物(如毒素-抗毒素复合物)将活化补体系统,产生的C3b可以共价结合至复合物上。表达CR1的红细胞吸附这些复合物并将它们转移给肝、脾内的巨噬细胞将其清除。

表达在巨噬细胞和多形核细胞表面的CR1可作为调理受体。依赖C3b和iC3b的吞噬作用很可能是机体抵抗全身性细菌和真菌感染的主要机制。在未活化的巨噬细胞中,单独的CR1不能介导吞噬作用,但可以有效地与Fc受体和CR3协同作用,结合并摄入受调理的颗粒。而T细胞来源的细胞因子IFN-γ和过敏素C5a可以活化巨噬细胞,使其能仅通过CR1便可摄入C3b/iC3b包被的微生物。通过CR1激活单核细胞可导致受体磷酸化和NF-κB的核转位[60]。如前所述,CR1也可以通过抑制C3转化酶活性调控补体活化,从而保护宿主细胞免受补体介导的损伤。另外,基因工程产生的可溶性的CR1已被证明可以抑制两条途径的补体活化。淋巴结和脾的滤泡树突细胞表面表达的CR1在保持免疫记忆中发挥重要作用。这些细胞捕获补体包被的免疫复合物,使抗原在生发中心内存在时间延长。

982

补体受体Ⅱ型(CR2、C3d受体、CD21)

目前对这种单链糖蛋白的两种单体形式了解得很清楚,短型CR2(CD21S)包含15个SCR,较长的CR2(CD21L)包含1个额外的外显子(编码一个SCR额外的10个氨基酸)。较短形式的CR2表达在B淋巴细胞、活化的T细胞和上皮细胞上,但不在单核细胞、巨噬细胞、粒细胞或红细胞上表达。而较长的CR2单体似乎只选择性地表达在滤泡树突细胞(FDC)上。CR2的配基结合位点是在其头2个SCR,它结合C3dg,C3d和(较弱地结合)iC3b,也可与B细胞上低亲和力的Fcε受体CD23相互作用,这种相互作用被认为在型别转换和生发中心细胞的存活中有重要作用[61]。但是,Epstein-Barr病毒(EBV)的衣壳蛋白gp350/220是目前所知与CR2亲和力最高的配基。人和小鼠的CR2和CR1蛋白是相似的。但人的CR1和CR2由2个独立的基因分别编码,而小鼠的CR1和CR2则是编码C3b和C4b结合位点的同一基因不同剪接形式的产物。

CR2功能

CR2最重要的生理功能可能是新近发现的CR2、CD19和TAPA-1(CD81)在细胞膜上结合参与B细胞的活化[62]。膜上Ig复合物交联这3个分子形成复合物,可以降低B细胞活化的域值,并且随结合在抗原上的C3b片段数量增加,Ig产生量可增加10~10 000倍(图29.12)。

像CR1一样,CR2也可以捕获免疫复合物,使之停留于生发中心,对于B细胞记忆的形成可能有重要作

用。最近报道长型 CR2 只在 FDC 表达，为解释这一过程的机制提供了线索。CR2 可作为 EBV 进入 B 细胞或其他 CR2 表达细胞的门户，在发病机制上有重要意义。这一功能不需补体参与。

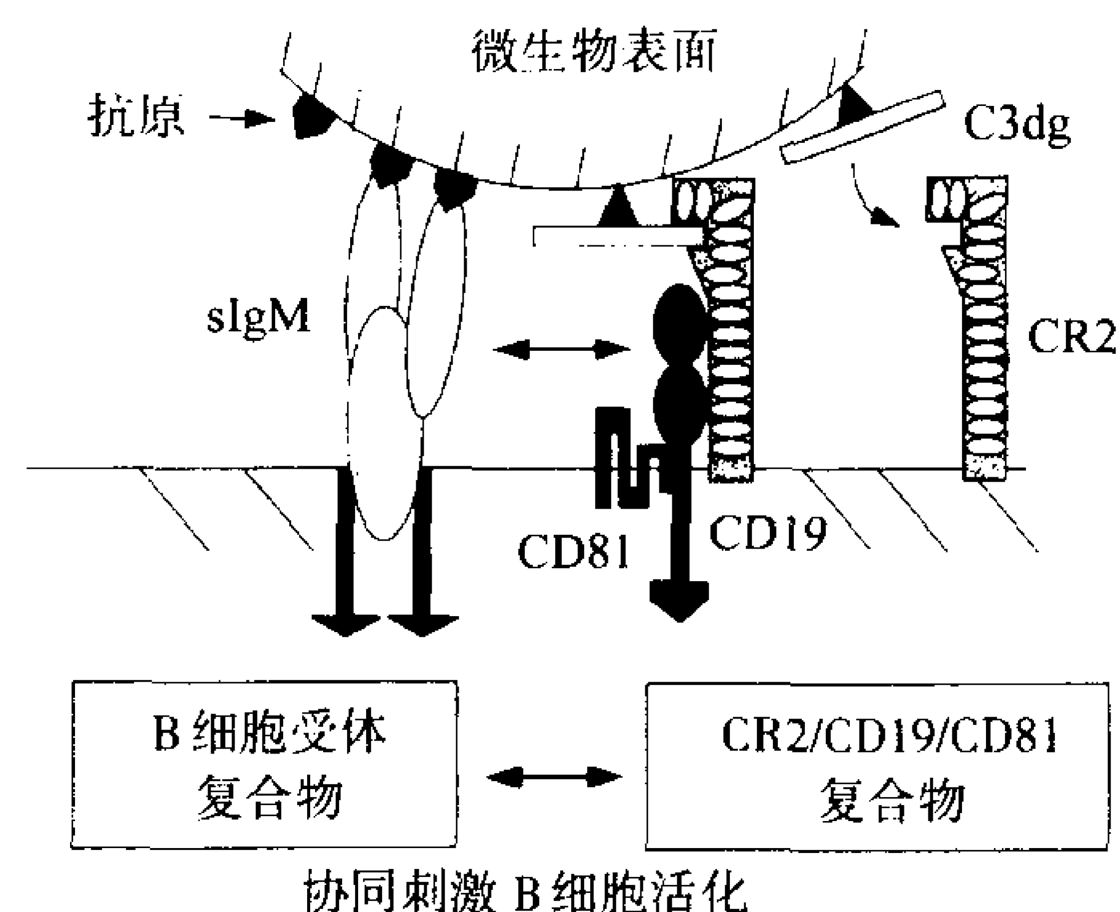


图 29.12 抗原及其表面的补体片段与 B 细胞受体复合物和 CR2-CD19-CD81 复合物的相互作用介导 B 细胞活化。C3d 包被的抗原与 B 细胞特异性膜表面 IgM 和 CR2 结合，并交联两种受体复合物。经 CR2 介导的额外的信号可将 B 细胞刺激增强约 100 倍，其强度取决于结合至抗原的 C3d 数量。

补体受体Ⅲ型(CR3, Mac-1, CD11b/CD18)

CR3 是一个由 165kDa α 链(CD11b)和 95kDa β 链(CD18)2 亚基组成的异二聚体(图 29.11)，其中 β 链即是 LFA-1 和 p150,95——白细胞相关整合素(也称为 β2 整合素)的 β 链。α 链是 iC3b 的结合位点(也与 C3b、C3dg 以低亲和力相结合)，整合素与配基相结合依赖 Ca^{2+} 的存在。

CR3 功能

CR3 表达在单核巨噬细胞、中性粒细胞、细胞毒性 T 细胞、FDC、NK 细胞和肥大细胞表面，其最重要的作用是介导 iC3b 调理的颗粒和微生物的结合吞噬。不像 C3b 与 CR1 的相互作用，iC3b 与 CR3 的结合足以触发吞噬。除了与 iC3b 结合(通过 I-结构域)，CR3 还有糖基结合能力(通过它的凝集素或 L 结构域)，并通过之与膜上其他成分相互作用。另外，一些酵母如酿酒酵母，及一些细菌如表皮葡萄球菌可以直接结合至此受体上而不需补体参与。经 L 结构域触发 CR3 可在中性粒细胞和单核巨噬细胞中诱发氧爆发。通过与 ICAM-1 结合，CR3 在不依赖补体蛋白情况下加强了单核细胞和中性粒细胞对内皮细胞的黏附从而促进这些细胞在组织损伤局部聚集。CR3 其他的配体包括纤维蛋白原、凝血因子。在一些特定的细胞中，GPI-锚固蛋白利用 CR3 作为受体传递跨膜信号。当 LPS 与受体结合后，CR3 与 LPS 受体(CD14)在物理上和功能上发生联系。同样的反应还在尿激酶组织因子活化受体(uPAR, CD87)与 uPA 结合、Ⅲ型 Fcα 受体(CD16)与其配体结合中得到证明[63]。

补体受体Ⅳ型(CR4, p150/95, CD11c/CD18)

CR4 是一个由 150kDaα 链和与 CR3 相同的 β 链组成的异二聚体，其配基特异性和组织分布均与 CR3 相同。

过敏毒素肽的受体：C5aR(CD88)和 C3aR

在补体活化过程中，有 74～77 个氨基酸从补体 C4、C3 和 C5 的 α 链 N 端被裂解下来(表 29.5 和图 29.13)。裂解部位在一个精氨酸残基之后，导致 C4a, C3a, C5a 的 C 端均为精氨酸残基。C5a 和 C3a 的受体

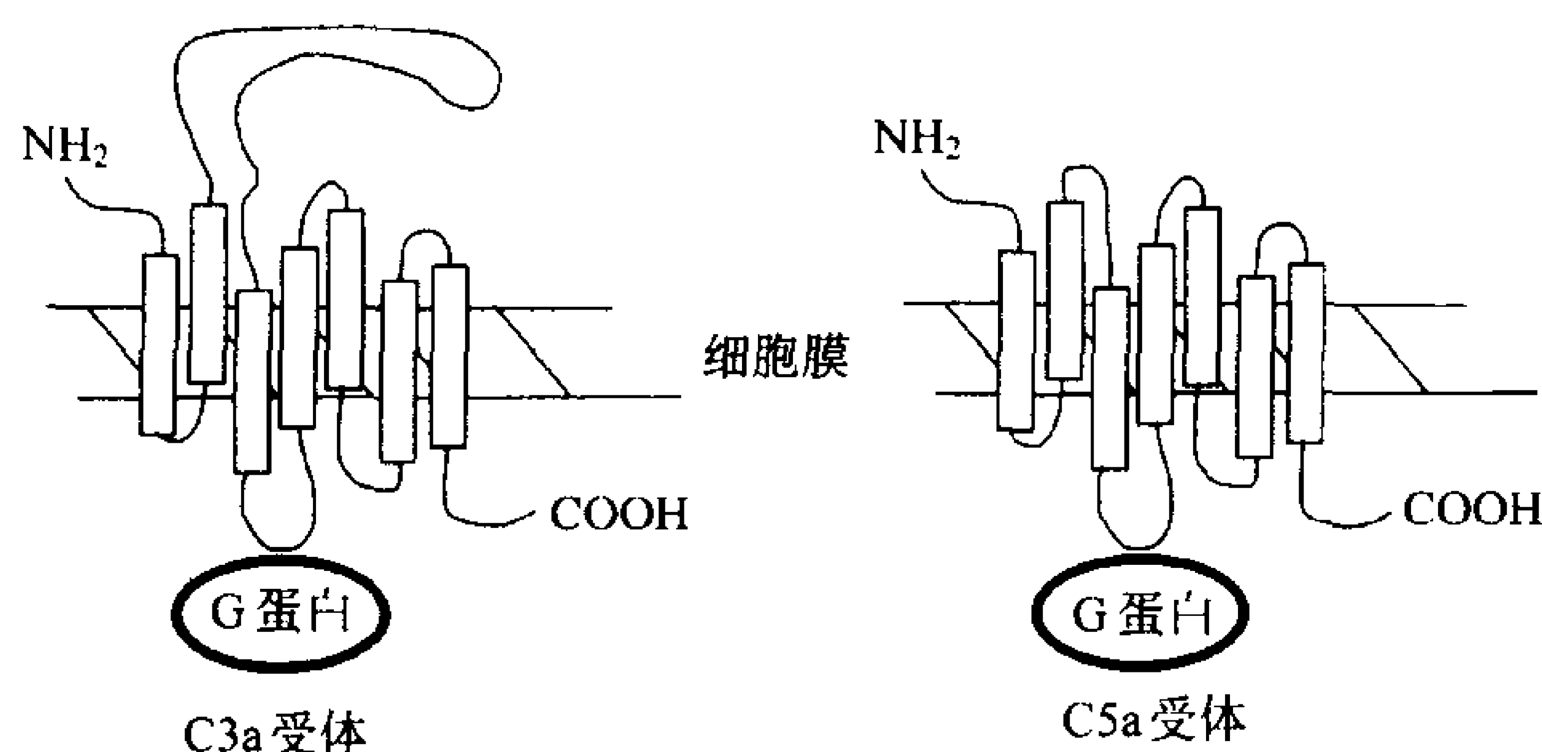


图 29.13 过敏毒素 C5a 和 C3a 的受体结构。两者均属于 7 次跨膜受体家族成员。它们通过其第二个胞浆环与 GTP-结合蛋白相互作用而介导信号转导。

表 29.5 过敏毒素、C1q、H 因子受体

类型	配基	结构,分子质量	分布	功能
C3aR	C3a	单链,48kDa,G 蛋白偶联,含有 7 次跨膜片段	肥大细胞、嗜碱性粒细胞、平滑肌细胞、淋巴细胞	增加血管通透性,触发浆膜型肥大细胞
C5aR (CD88)	C5a, C5a desArg	43kDa,单链, G 蛋白偶联,含有 7 次跨膜片段	肥大细胞、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、淋巴细胞	增加血管通透性,触发浆膜型肥大细胞,促进趋化
cC1qR,	C1q 胶原样结构区,"胶凝素":MBL, CL-43, SP-A,黏合素	单链,60kDa,酸性糖蛋白,与内质网蛋白相同	B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、血小板、内皮细胞、成纤维细胞	
gC1qR	C1q 球状头部,凝血酶,肝素结合形式的 S 蛋白,Hageman 因子,高分子量激肽	33kDa,酸性糖蛋白,在非解聚的条件下四聚体,可能不是表面受体,而是线粒体蛋白	B 细胞,单核细胞,巨噬细胞,血小板,内皮细胞,中性粒细胞	
C1qRP	C1q 胶原区,MBL,SP-A	单链,126kDa,膜蛋白,高度糖基化	单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、内皮细胞、神经胶质细胞	吞噬作用
FH-R	H 因子	两型:由 150kDa 和 50 kDa 亚基组成;或 170 kDa 单链	B 细胞和 B 细胞株、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞	B 细胞活化,刺激呼吸暴发,释放 I 因子、前列腺素 E 和血栓素

分子均已得到克隆[64]。C3aR 和 C5aR 均是视紫红质超家族受体成员,它们有 7 次跨膜区域并在胞质中与 G 蛋白相偶联(图 29.13)。它们与介导趋化信号的受体同源,如 fMLP 受体(可结合细菌肽)、IL-8 受体或 RANTES 受体(如趋化因子受体 5 型)。推断的 C5aR 分子质量为 43kDa,而 C3aR 较大为 48kDa(表 29.5),因为它具有一个更大的第二胞外环,可能与识别配基特异性有关。

C5aR 和 C3aR 的功能

对于几种已知的生物学功能,C5a 是所有小分子活化产物中活性最强者,其后是 C3a 和 C4a。这些肽与其相应受体的结合介导了局部的炎症反应,因此它们常被称为过敏毒素。它们可诱导平滑肌收缩和血管通透性增高。结果是抗体、补体、巨噬细胞被招募至感染部位,并且局部产生水肿,限制巨噬细胞的活动,所有这些过程均有助于触发获得性免疫反应。

984

C3a 和 C5a 均可触发浆膜肥大细胞脱颗粒,导致这些细胞释放组织胺和其他血管活性介质。C3aR 和 C5aR 广泛地表达在不同的淋巴细胞表面,且它们的 mRNA 也在多种非淋巴器官组织中检测出。对于过敏毒素多肽不同的细胞类型反应并不相同。对于中性粒细胞,C5a 具有很强的趋化活性并可诱导黏附分子的表达。这些细胞也可被补体多肽刺激产生氧自由基、前列腺素和花生四烯酸。

C5a 在循环中半衰期很短,因为血浆中的羧肽酶 N(也称为过敏毒素灭活者)可裂解其 C 端的精氨酸,这时产生的 C5a desArg 在几种生物系统中均较 C5a 活性低。与 C5a 相同,C3a 和 C4a 均可被羧肽酶 N 裂解产生去精氨酸肽,后者活性较原分子大大降低。

C1q 受体

最近克隆出一种可与 C1q 的胶原样茎部相互作用细胞膜表面蛋白,称为 C1qRp。这一高度糖基化的 126kDa 蛋白表达在巨噬细胞表面,但在 T 或 B 淋巴细胞上则无。它含有 1 个 C 型糖链识别结构域和 5 个 EGF 样结构域。

此外还有两种膜蛋白可以与补体亚成分 C1q 相互识别和结合。由于它们分布在质膜上,有人提出了它

们作为受体的可能性[65]。其中之一是一种60-kDa的糖蛋白,可与C1q胶原样部分结合,有人提出将之称为cC1qR。这一蛋白也可作为胶凝素受体,因为除了与C1q结合外,它还可与胶凝素家族的其他成员结合,如MBL,黏合素,SP-A和CL-43(表29.5)。包括单核细胞、巨噬细胞、B细胞、粒细胞、内皮细胞和血小板在内的数种细胞表面均有这种受体。它的多肽序列几乎与补体DNA-来源的钙网素(calreticulin),一种存在于内质网的Ca^{2+}结合蛋白完全相同。C1qR与钙网素之间的关系尚不完全清楚。另一种酸性细胞蛋白可与C1q球形头部相反应,从而被命名为gC1qR(见表29.5)。这一33kDa的蛋白在分布上与cC1qR非常一致。

C1q受体功能

C1q受体在多种细胞中介导几种反应,如增强C1q调理的免疫复合物吞噬和MBL调理的细菌的吞噬,调节吞噬作用,促氧自由基产生,增强细胞介导的细胞毒作用。

H因子受体

在B淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞表面均检测到H因子受体的表达。应用H因子-纤维素分离此受体,获得由2个以二硫键相联系的50kDa亚基和另一个非共价结合的50kDa亚基所组成的复合物。另一种膜H因子结合蛋白在扁桃体B细胞和B淋巴细胞上通过亲和层析得到分离,该单链蛋白的表观分子质量为170kDa。

H因子受体功能

就H因子受体可能的功能而言,H因子可作为B细胞株的一种生长因子,另外它还可刺激B-淋巴细胞和淋巴母细胞瘤细胞株释放内源性I因子。H因子还可以促单核细胞氧代谢。

补体在联系先天免疫和获得性免疫中的作用

先天免疫的组成包括补体系统、巨噬细胞、NK细胞和粒细胞,是高等脊椎动物的第一道防线。这些细胞和分子能够识别外源性物质并在感染后数分钟(或小时)内产生行动。几种微生物以进入机体后可通过活化替代或MBL途径立即触发补体级联活化而不需抗体介导。补体和补体受体通过以下几条途径联系天然免疫和获得性免疫反应。

①补体在触发获得性免疫反应中发挥作用。因为抗体非依赖性的、补体介导的对微生物的调理作用可通过补体受体促进抗原呈递细胞吞噬和呈递抗原。

②结合在抗原上的C3d通过交联膜IgM和CR2/TAPA-1复合物促B细胞活化。

③表达在滤泡树突细胞上的CR1和CR2可将免疫复合物固定于生发中心之中,是形成记忆B细胞所必需的。

④感染部位中的补体活化产生过敏毒素多肽可通过募集炎症细胞促进抗原被清除。

⑤补体可抑制大的免疫复合物形成,并促进已经沉淀的复合物溶解,在免疫复合物的处理中发挥重要作用。

⑥补体活化后溶破细胞和细菌是几种病原体清除所必需的。

985

补体系统与凝血和激肽系统的相互作用

在补体系统和另两个血浆蛋白系统中存在着生物化学上的关联。首先,三种系统的活化均依赖多种成分接连的蛋白酶裂解作用,而修饰的丝氨酸蛋白酶结构域是其效应者。另一方面,一个系统中某些活化的成分可以对另一系统发挥效应。

例如，C1-INH不仅控制C1r和C1s，它也可抑制激肽释放酶、血浆纤溶酶、凝血因子Ⅶ和Ⅵ[66]。虽然在纤溶和凝血系统中有针对纤溶酶和凝血因子Ⅶ和Ⅵ更强的抑制者，但这是丝氨酸蛋白抑制物分子功能相互重叠的一个很好的例子。纤溶酶则具有部分活化C3的能力。虽然这在生理条件下并不重要，但在像弥漫性血管内凝血或成人呼吸迫综合征等休克条件下则相对重要，这时有三个系统的伴行活化[67]。

补体的定量检测

传统的血清补体活性分析是补体总溶血活性分析(CH_{50})。在这一分析中，绵羊红细胞与一种抗红细胞抗体共孵育(溶血素)，然后与不同稀释度的人血清共育，使50%红细胞溶破的血清稀释度即为CH_{50}值。这一实验只检测了经典和终末补体途径，它常与免疫化学分析测量C3和C4蛋白一同进行。这些免疫化学分析主要包括放射免疫扩散(mancini)，电泳免疫扩散(火箭电泳，Laurell)和酶免疫分析(EIA)。它们只检测了一种补体蛋白的存在及其完整性，对其功能活性则无法判断。

在分析补体活化时，检测未裂解补体蛋白的下降情况不如检测裂解产物的增高(C4d，C3dg，C3a，C5a)或由特定成分组成的复合物(如TCC)敏感。这很容易理解——对于一种浓度由1%增加至5%(增加5倍)的成分要比另一种从99%减少至95%(这在分析的误差范围之内)的成分在检测上要容易得多。基于这些原因，针对活化特异性，也称为新表位特异性的单克隆抗体和只识别天然未活化分子的单抗，被成功地用于活化的或天然分子的检测分析[68]。为了分析的准确性，它们最好同时进行。因为较小数量的天然分子不会产生同样高浓度的活化产物。活化特异性抗体的应用显著提高了生物体液中补体活化分析的敏感性，并被用于判断疾病的病程，显示病情恶化的程度和估计治疗的预后。特别是这些新方法还被应用于体外分析膜的生物相容性以及区分完全或部分补体缺陷。对于后一点，TCC EIA——基于新表位特异性的抗C9单克隆抗体有额外的好处，因为它可以作为一种功能分析——TCC只有在所有参与的蛋白分子均具有功能活性时方能组装形成，即使其中之一只以有限的量存在。但是，即使这些复杂的分析也不能鉴定出那些杂合子缺失型的个体。补体浓度正常的个体中大约有50%的人为此型，但即使是杂合子状态也使该补体成分表现为接近正常浓度。

补体遗传学

对补体蛋白的遗传学研究最先是由于在人与动物中发现有补体缺陷而引发的。过去常常在家族调查中检测同源缺损个体和杂合子携带者，并进一步搜集证据将特定的补体等位基因与疾病相联系。但是，补体遗传学也是研究血浆蛋白普通遗传学及其进化的有用工具。补体蛋白编码基因的染色体定位(图29.14)显示有趣的现象：结构同源的补体成分成组地联系在一起，证实了早先基于蛋白质水平同源分析推断认为大多数补体蛋白是由少数的前体基因扩增进化而来的观点[69]。

由于补体受体和一些调控蛋白均在红细胞上表达，它们有成为血型抗原的可能：Knops、McCoy、Swain-Langley和York抗原是位于CR1分子上的。DAF抗原的多态性，包括很罕见的缺乏DAF的Inab表型在内，形成了Cromer血型系统。Chido和Rogers血型抗原与C4相关[69]。在这方面，补体遗传学被广泛应用于人类学研究和法医学鉴定。

近来，分子水平的进步促进了补体等位基因型在分子水平上得到认识。无论是蛋白质水平的表型分析

987

(表型)还是染色体DNA的鉴定(基因型)最近都被使用[70]。传统的表型分析是通过分析蛋白质在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶的移动或等电点进行的。另外，单克隆抗体也被用于区分不同的补体等位基因型。基因型的鉴定是通过分析限制性片段长度多态性或用特异性引物进行聚合酶链式反应后再进行酶切或测序实现的。表型鉴定的好处在于可以直接证实其存在，而在应用有些方法时，还能确定等位基因编码的蛋白分子的功能活性。基因型鉴定不能区分出静止或无效基因。但是，一旦一个突变被查明，一个缺陷基因可以在家系

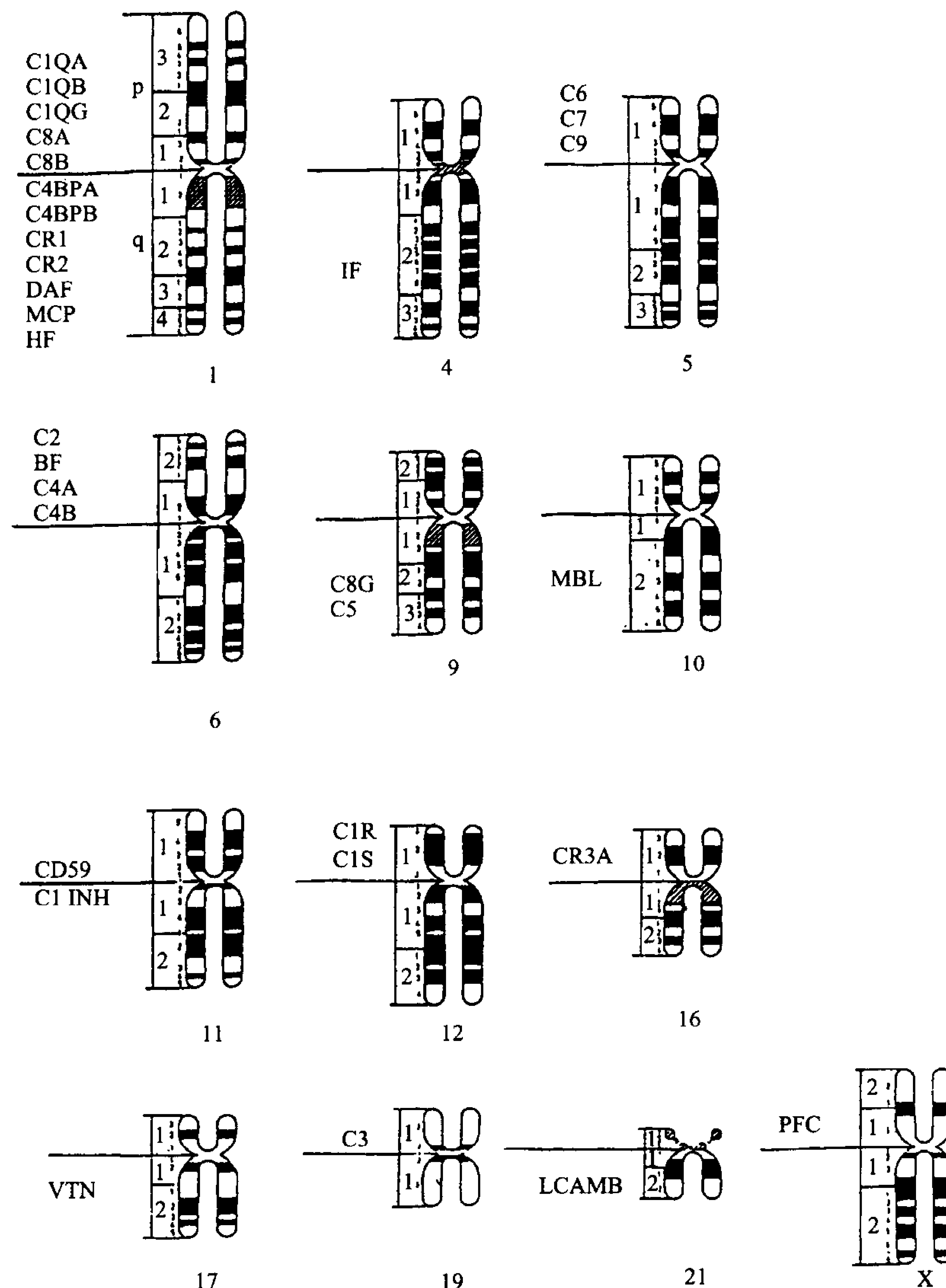


图 29.14 人补体及其相关蛋白结构基因的染色体定位,分子名称标注于染色体的左侧(引自巴黎命名法,巴黎大会,1971 年)。图中只显示带有补体基因的染色体。其中 C1QA、C1qα 链、C1QB、C1qγ 链均位于 1p34-36;C8B、C8β 链位于 1p22;C4BPA、C4 结合蛋白 α 链、C4BPB、C4 结合蛋白 β 链、CR1、CR2、DAF、MCP 和 H 因子均位于 1q32(RCA 基因簇);I 因子位于 4q25;C6、C7 和 C9 位于 5p14-p12(MAC 基因簇);B 因子与 C2、C4A 和 C4B 均位于 MHC Ⅲ类基因中的 6p21;C8G、C8γ 链在 9q22-32;C5 在 9q33;MBL 在 10q22;CD59 在 11p13;C1-INH 在 11q12-13;C1R 和 C1S 在 12p13;CR3A、CR3α 链(CD11b)在 16p13-11;VTH、玻璃连接蛋白在 17q11;C3 在 19p13;LCAMB、白细胞黏附分子 β 链(CD18)和 CR3 与所有的其他整合素家族分子一样,位于 21q22;PFC、备解素在 Xp11。

调查中被追踪,为被疾病所苦的家族提供了遗传咨询的基础。

补体作为疾病的致病因子

补体系统在神经退行性变和自身免疫性疾病中,特别在肾、皮肤病变以及在缺血、再灌注损伤和休克状态中均参与介导炎症和组织损伤。证据包括在体液或组织中检测到补体活化产物,以及在动物体内当补体

被有效地抑制后疾病发病情况得到改变。表 29.6 显示这一情况下的一个不完全统计。绝大多数情况下，补体不是直接的发病原因而是发病机制中相关联的几种因子之一[71]。补体在免疫复合物正确处理中十分关键。当过量的复合物沉积于组织当中，持续的补体活化会影响甚至破坏周围组织，如对血管内皮细胞功能的影响造成脉管炎的发生。

表 29.6 补体参与的疾病

系统/疾病	证据		
	实验测定[a]	组织学证据[b]	动物模型[c]
生物相容性/休克			
后旁路综合征	有	有	有
导管反应	有	有	无
ARDS	有	有	有
过敏反应	有	无	无
移植排斥反应	有	有	有
先兆子痫	有	有	无
皮肤病学			
天疱疮/类天疱疮	无	有	无
光毒反应	有	有	有
脉管炎	有	有	无
神经病学			
重症肌无力	有	有	有
多发性硬化	有	有	有
大脑的狼疮	有	无	无
Guillain-Barre 综合征	有	有	有
阿兹海默症	无	有	无
肾脏			
狼疮性肾炎	有	有	有
膜性增生性肾小球肾炎	有	有	有
膜性肾炎	有	有	有
类风湿性疾病			
类风湿性关节炎	有	有	有
系统性红斑狼疮	有	有	有
贝切特综合征	有	有	无
幼年类风湿病	有	无	无
Sjogren 综合征	有	无	无
其他			
动脉粥样硬化	有	有	无
肠炎	有	有	无
甲状腺炎	有	有	有
不育、不孕	有	有	无

[a] 是指检测体液中的补体活化产物。
[b] 在病变组织中检测补体产物。
[c] 疾病的动物模型。经允许有所改动[71]。

补体结合可能通过两种途径影响免疫复合物的命运[72]。首先，C4 和 C3 结合至抗原-抗体晶格后可改变免疫复合物大小，使少量大的复合物变成大量小的复合物，前者可以在局部沉积并引起 Arthus 反应和免疫复合物疾病。这样，补体帮助溶解最初的免疫复合物（补体的去污剂样作用）。其次，也许更为重要的是免疫复合物上的 C4b 和 C3b 的存在可以通过循环红细胞表面的 CR1 促进其转运。在生理条件下，结合免疫复合物的红细胞被隔绝于肝脏之中，而抗原性物质可以被网状内皮细胞清除（图 29.15）。如果这些复合物表面缺乏足够的补体结合，它们可以被内皮细胞摄取，并隐藏在外周，使炎症加剧，更多免疫复合物形成。

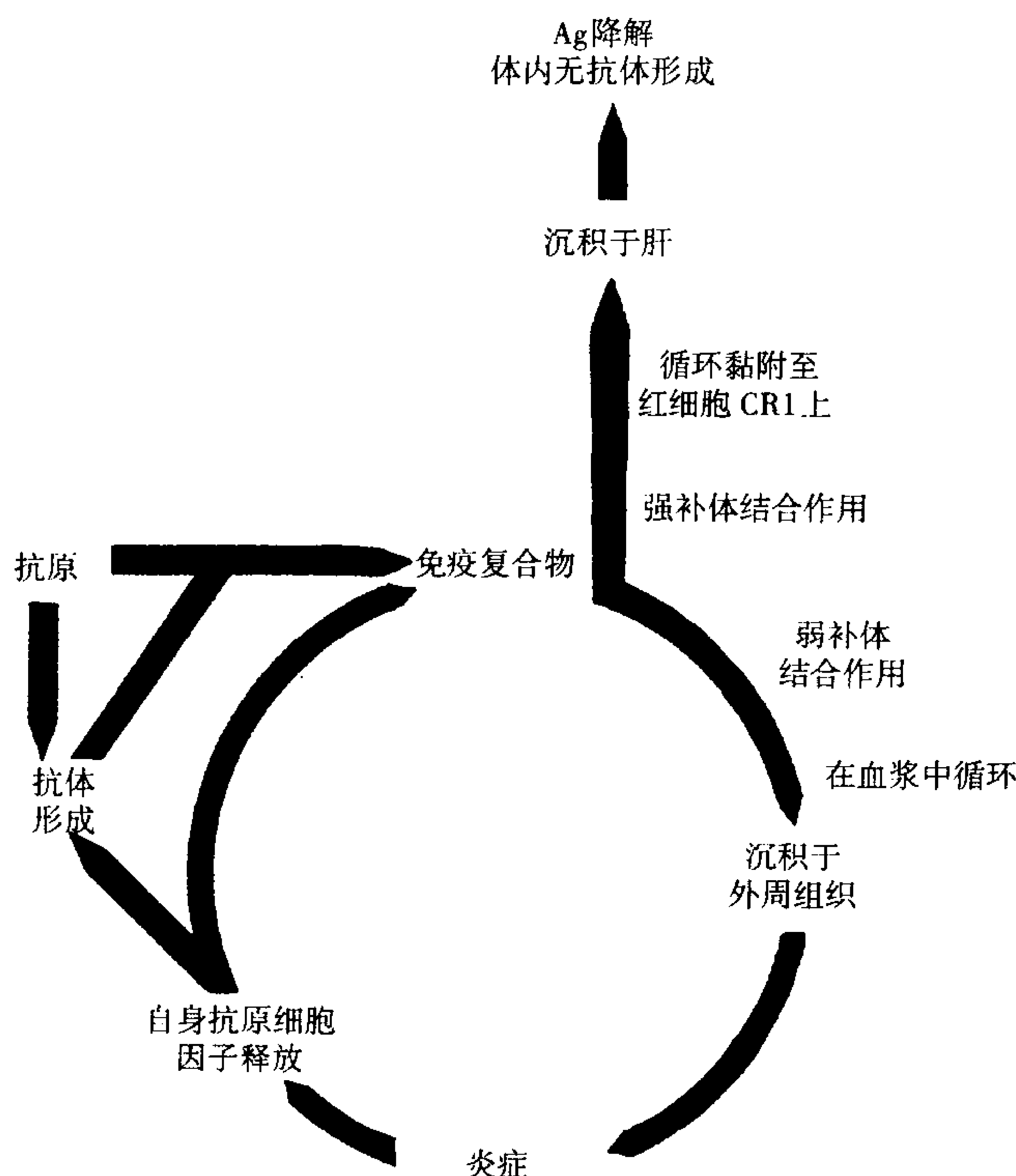


图 29.15　图显示补体在免疫复合物的清除中的作用以及补体功能缺陷导致自身免疫病发病率增高机制的示意图。获得牛津出版社的允许使用[72]。

补体缺陷

大多数补体成分和调节蛋白均有遗传性缺陷发生（表 29.7）。这些异常发生相对较罕见且通常以常染色体隐性方式遗传，因为仅有纯合子个体方能被检出并对疾病易感。遗传性血管神经性水肿是一个重要的例外，它们以常染色体显性方式遗传，也存在于杂合子中。补体缺陷可被视为重要的天然体内实验模型。可以明确某一特定成分在免疫系统中的作用，使人们认识到它们的正常功能。某一基因的 2 个等位基因型突变是造成缺失的原因。

988

一种特定的缺失是夜间阵发性血红蛋白尿（PNH），它不是一种补体缺陷，缺失发生在 PIG-A 基因，影响了 GPI 锚成分的合成，从而造成以这种锚结合至膜上的分子表达障碍，包括 CD55 和 CD59。缺乏这两种补体调控蛋白造成 PNH 红细胞易于被补体溶破的超敏状态。活化可以经替代途径产生或在酸性条件下产生 C5-C6 复合物，特别是在夜间生理性血 pH 值降低时。

由于 C1-INH 缺乏或功能失活而发生的遗传性血管神经性水肿（HAE）是更为严重的补体缺损，如果未经治疗有致死危险。这一疾病表现为间歇性发作，当病人经历损伤或感染而形成补体活化的诱因时，由于机体缺乏 C1-INH 的储存，C1 的活化将不受调控地产生 C4 和 C2 并活化激肽。后者是典型 HAE 产生的重要原因：腹部绞痛和喉头水肿引起窒息。

表 29.7 补体缺陷和疾病

补体	报道的人数	功能缺陷	相关联的疾病
C1	50~100	免疫复合物处理障碍	SLE,细菌感染
C4	20~50	免疫复合物处理障碍	SLE,细菌感染
C2	>100	免疫复合物处理障碍	SLE,细菌感染
C3	20~50	调理异常	细菌感染
C1-INH	≫100	过量的 C2 和激肽活化	HAE
B	无		生命不相容性
D	3	替代途径的活化异常	细菌感染?
P	50~100	替代途径的活化异常	脑膜炎球菌感染
H	<20	替代途径过度活化	脑膜炎球菌感染,肾小球肾炎
H	20~50	替代途径过度活化	细菌感染
C5	20~50	趋化异常,溶破活性缺失	脑膜炎球菌感染
C6	>100	溶破活性缺失	脑膜炎球菌感染
C7	>100	溶破活性缺失	脑膜炎球菌感染
C8	>100	溶破活性缺失	脑膜炎球菌感染
C9	>100	溶破活性障碍	脑膜炎球菌感染

表中只列出了显著的和已经明确的联系,例如超过 50% 的缺陷个体表现出该种疾病。但需注意的是,健康的补体缺陷个体是通过家系调查发现的。

补体缺陷的发生率难以计算,需要考察大量有代表性的个体。已收集的数据显示,不同成分补体缺陷发生率根据种族和地理背景的不同而表现出很大的差异。对补体缺陷患者的亲属进行研究或人口筛查使人们鉴定到相对较多数量(多达 10%~20%,依不同的成分而不同)的健康缺陷个体。

但是,通常补体缺陷个体被查出是由于他们易感染或易患免疫复合物病,如系统性红斑狼疮(SLE)(表 29.7)。尤其令人吃惊的是 SLE 与上游经典途径成分缺陷的相关性。由于只有 C4 和 C2 由位于同一染色体的基因编码(位于 6 号染色体 MHCⅢ类基因内),因此这些补体成分缺陷与一个疾病易感基因相连的可能性可以排除,并且没有理由质疑"(自身)免疫复合物疾病发病率增高是由补体缺陷造成的直接后果"这一观点。这样,上游经典途径成分的缺陷可被看作是单一缺陷即可发展成为一种自身免疫性疾病(如果不是必需的)的极少数例子,如果不是惟一的例子[72]。

989

纯合子 C3 缺陷个体通常在幼年早期即发生由荚膜细菌引起的严重化脓性感染,感染反复发作,威胁生命。I 因子和 H 因子的缺失均造成 C3b 不能降解,由于不能对 C3 转化酶 C3b,Bb 进行调控,导致大量 C3 不可控制地裂解,机体获得性 C3 严重缺乏[73]。有趣的是,疾病的相关性并不统一。因为与 C3 或 I 因子缺乏相反,H 因子缺乏可导致肾小球肾炎的易患性增高,这在猪的 H 因子缺陷研究中得到证实[74]。H 因子相关蛋白缺陷较常遇见,但不与任何疾病相关联[75]。

终末补体成分的遗传性缺陷导致不能产生功能性终末补体复合物而造成血清溶血和溶菌活性持续性缺失。终末补体缺陷患者特别容易发生脑膜炎双球菌感染,提示补体系统细胞裂解活性在抵抗脑膜炎奈瑟氏球菌中发挥重要作用[76]。在西方国家已提供的数据显示,无论是反复感染还是不常见血清型感染,临床医师均应警惕,而反复发作的疾病是地方性流行病的重要提示[77]。另外,令人吃惊的是虽然奈瑟氏球菌或革兰氏阴性菌通常是导致补体终末成分缺陷个体患病的原因,但淋球菌感染的发病率在这些缺陷个体中并未增加,可能因为淋球菌的感染被限制在局部黏膜并且通常不会像脑膜炎球菌样爆发性地侵入血循环和脑中。以前就有人注意到,终末成分缺陷与自身免疫性疾病和非奈瑟氏球菌感染的易感性相联系。推断缺陷造成这些微生物清除速率下降,使它们能长时间存在于体内以致触发异常的免疫应答或加重疾病[73]。但是通过

对收集到病例的仔细研究人们发现，这种联系可能性极小，可能是调查中人为假象的结果[77]。例如，SLE 在纯合子终末补体缺陷个体中存在，但其发生率非常低，并且与补体无缺陷患者相比并不显著增高。

近年来归纳的终末补体缺陷的几个特征包括：

① 较少量的功能活性终末补体蛋白足以阻止脑膜炎球菌感染性疾病发生，提示存在较宽的安全区间。

② 终末补体缺陷患者虽然脑膜炎球菌感染的发生率明显增高，但是与正常人相比其死亡率和暴发性病例的发生率似乎更低。由于不能产生膜攻击复合物，不能溶破外源性和自身细胞，终末补体缺陷患者体内具有较低的内毒素浓度和较少的宿主细胞损伤，这将导致更温和的发病形式。另外，较少的病原微生物即可引起全身性感染。但是，在被研究的许多病人家庭中，经常有家庭中的其他同胞在童年的早期阶段发生意外死亡，人为造成假象的可能性也不能排除。

③ 在补体缺陷个体中，首次发生脑膜炎球菌感染的平均年龄似乎较补体完整患者要大，而在脑膜炎患者中罕见的 N 脑膜炎在缺陷患者中发病率最高。这显示在普通型脑膜炎感染中终末补体缺陷者少(在早期儿童期和在脑膜炎区带的国家如 Sahel 带)，并显示 TCC 是处理脑膜炎球菌的惟一方法。

补体的抗感染作用

微生物的入侵策略和逃避机制

入侵人体微生物通常被免疫系统识别为非已。非已结构首先受到替代途径和 MBLectin 途径攻击(由入侵者的自身表面构成触发)，然后再被经典途径攻击(由与入侵者结合的特异性抗体触发，几种病毒自身还可直接触发)，趋化巨噬细胞调理和溶破病原微生物，从而最大限度地限制病原菌攻击和控制感染。这种类型的宿主防御对处理许多细菌、病毒、真菌起关键性作用。 *990*

但是，微生物和宿主两方面的进化也在人类与几种微生物之间产生了共生关系，以致许多情况下潜在感染的微生物并不造成攻击并与宿主共生，它们中的许多仅在宿主防御能力显著减弱时才致病。

第三种类型的关系在医学上很重要，并且也是最有科学趣味的——具有高度致病性的微生物可以逃避机体的识别或抑制机体合适的攻击和破坏[78]。为了达到这些目的，微生物在进化中发展出了一系列的策略，包括利用生物化学和生物生理的方法抵抗 C3b 沉积、调理或补体介导的细胞溶破损伤(表 29.8)，或者明显地模拟补体样结构与功能(表 29.9)，许多病原微生物甚至利用补体受体从两种途径触发感染：最普通的一条是微生物改进了其活化补体的特性，导致非调理作用的 C3 片段在其表面结合，并引起多形核细胞(PMNs)不适当的识别(伪装)(表 29.8)。在一些微生物表面有模拟 C3 的蛋白质抗原或功能性 C3 分子存在，可与补体受体结合从而以补体非依赖的方式介导内吞摄入(表 29.9)。通过这两种方法，伪装和模拟，病原体逃避了补体和抗体介导的破坏并为其自身的繁殖增加了细胞动力，但应该强调的是，补体抵抗依赖的分子并不仅仅是蛋白质。 *992*

另一有趣的特性是微生物介导的蛋白酶解作用可以降解补体分子，保护其免于被调理或溶破(表29.8)。蛋白酶裂解 C1-INH 导致持续的 C1 耗竭和 C3 裂解，导致炎症反应和对周围无辜细胞的反应性溶破。这些微生物一定具有高度复杂的调节机制以保证有足够但不是过多的终末活化发生。这一点也同样适用于利用特异性的受体进入宿主细胞的病原菌。裂解一定要非常精确，以保证绝大多数表面沉积的 C3 以合适的形式存在(C3b 或 iC3b)，以便进行受体结合。

另一个机制是利用宿主提供的补体蛋白。当 HIV-1 离开一个被感染细胞时(出芽过程)，它表面被覆着来源于宿主细胞的脂双层，并且脂双层作为一个载体，其上不仅有病毒的衣壳蛋白也包括宿主细胞的膜蛋白。对于后者，DAF 和 CD59 尤其重要，因为它们保护 HIV-1 免遭补体溶破[79]。H 因子与结合于病毒上的 C3b 及 gp41 外部的几个位点及 gp120 上的一个位点的结合，可协同病毒抵抗有效的破坏[80,81]。

表 29.8　通过干扰或利用补体抵抗补体介导的损伤(不包括分子模拟)

病原菌表面缺乏活化分子,从而干扰补体活化	
脂多糖	沙门氏菌;肺炎杆菌
唾液酸	曼氏裂体吸虫
胰蛋白酶/唾液酶敏感分子	克(鲁斯)氏锥虫
血清抵抗性原鞭毛虫	利什曼原虫
通过病原菌上的 C1q/C1s 结合蛋白干扰补体活化	
抑制[a]	明尼苏达沙门氏菌孔蛋白
抑制	曼氏裂体吸虫副肌球蛋白
抑制	猪肉绦虫副肌球蛋白
增强[a]	HIV-gp41
干扰 C3 转化酶	
阻断组装	链球菌;弯曲杆菌属
阻止巨噬细胞与细胞表面 C3 片段相互作用	
发展出荚膜	几种有荚膜的细菌
病原菌吸附 C3 片段并由之介导进入靶细胞	(通常是单核/巨噬细胞)
利用 C1r,靶细胞为红细胞	巴贝虫属;疟原虫裂殖性芽孢
利用 CR1 和 CR3	嗜肺军团菌;麻风分枝杆菌结核分枝杆菌;硕大利什曼原虫
利用 CR2	HIV-1
利用 CR3	HIV-1
	西尼罗河病毒
干扰 C3 形成后的补体活化环节	
膜上无 C6 和 C9 的沉积	博氏疏螺旋体
抑制 C5b6 形成或使之失活	大肠杆菌(traT)
C3b 在远离膜的地方结合,无 MAC 组装	肺炎克雷白菌
干扰 C5b-9 插入质膜	
由于外膜的疏水性组成而使 C5b-9 不能作用于质膜	沙门氏菌属;克(鲁斯)氏锥虫
限制微生物的进展	淋病奈瑟氏球菌
?	耶尔森菌
?	黏膜炎莫拉菌
与可溶性 C5b-9/群集素结合,吸收、结合或表达补体调节蛋白	化脓性链球菌 A(SIC)
与 H 因子相互作用	链球菌 A(M 蛋白)
吸收 DAF	HIV-1
结合 DAF	巨细胞病毒
表达 DAF	曼氏裂体吸虫
表达 MCP	巨细胞病毒
结合 CD59	HIV-1
水解、裂解补体成分	
裂解 C1q 和 C3	绿脓假单胞菌弹性蛋白酶和碱性蛋白酶
裂解 C1-INH	黏质沙雷菌蛋白水解酶,56kDa
裂解 C3	胰蛋白酶样蛋白水解酶,80 kDa
	溶组织内阿米巴半胱氨酸蛋白酶,56 kDa
	硕大利什曼原虫酸性蛋白酶,gp63
裂解 C3 和 C9	曼氏裂体吸虫丝氨酸蛋白酶,28kDa
裂解 C4、C3、C5-C9	液化沙雷菌金属蛋白酶,53 kDa

[a] 推断/假定。

? 尚不清楚。

表 29.9　模拟补体蛋白以抵抗补体介导的损伤

	配基	模拟功能	结构家族	抗原交叉反应	序列同源性
模拟 C3 转化酶控制蛋白(DAF,C4bp)					
阻断替代途径 C3 转化酶的组装					
克(鲁斯)氏锥虫 gp60					
阻断经典途径 C3 转化酶的组装					
克(鲁斯)氏锥虫 gp160	C3b				DAF
克(鲁斯)氏锥虫 gp58/68		CR1,DAF			
阻断经典和替代途径的组装并加速经典途径 C3 转化酶的衰变					
痘苗病毒 VCP,gp35	C4b,C3b	CR1	C4bp		C4bp,DAF,MCP
加速替代途径 C3 转化酶的衰变					
单纯疱疹病毒-1/2 gC 1/2	C3b, iC3b	CR1		CR1 *	CR1
E-B 病毒	C3b,iC3b ,C4	CR1			
疱疹病毒松鼠猴属 CCPH(ORF-4)	C4bp	DAF		C4bp,DAF,MCP	
加速经典和替代途径 C3 转化酶的衰变					
克(鲁斯)氏锥虫 gp87-93		CR1,DAF		DAF	
曼氏裂体吸虫	C3,C4	CR1			
未知的模式					
HIV-1 gp120	iC3, C3b, C4b	C4bp		C4bp	C4bp
模拟 C3 和 C4,促进受体结合					
E-B 病毒 gp350/220	CR2	C3d/ C3dg		C3d/ C3dg	C3d/ C3dg
HIV-1 gp41	CR3	C3			C3
结核分枝杆菌	CR3	iC3b			
硕大利什曼原虫 gp63	CR3, CR4	iC3b			
荚膜组织胞浆菌	CR3, CR4	iC3b			
麻疹病毒	MCP				
链球菌 A M-蛋白	MCP				
肠道病毒(ECHO, Coxsackie)	DAF				
HIV-1 gp41	P,H	C3			C3
链球菌 A	C4bp	C4b			
模拟含血小板凝血酶敏感蛋白重复的蛋白分子					
HIV-1 gp120	C3b,H	P		P	P
恶性疟原虫　TRAP 和 CSP	CR1[a]		P,C6-C9		
克(鲁斯)氏锥虫溶血素, 75 kDa	C9			C9	
模拟补体受体促进黏附					
HIV-1 gp120	C3b	CR3			CR3
白色念珠菌, CR3-like, 188 kDa	iC3b	CR3	CR3(CD11b)	CR3(CD11b)	CR3
白色念珠菌, CR2-like	C3b	CR2		CR2	
模拟 CD59 限制膜攻击					
松鼠猴属疱疹病毒 ORF-15 (ORF-LS)	C9[a]	CD59	CD59		
溶组织阿米巴原虫黏附素,260 kDa	C8,C9	CD59		CD59	CD59
曼氏裂体吸虫, SCIP-1	C8,C9	CD59		CD59	

[a] 推断/假定。

微生物模拟补体分子结构

在与宿主一起经过的几百万年进化中,几种病原微生物发展出了与正常哺乳动物细胞相同、保护其自身免遭补体破坏的功能特性,特别是许多重要的微生物蛋白已被鉴定出在结构或基因上与补体或补体受体具

有相似性(抗原交叉反应,序列同源性)。这样的分子模拟不仅使病原微生物能逃避补体破坏,也促进了通过补体受体进行的、补体介导的感染[82]。在特定的条件下,模拟甚至可以导致自身免疫的发生。

在另外一些情况下,只有一些规律被接纳。几种微生物特异性的细胞溶素利用多聚化或圆柱体形式在脂双层中打孔攻击人体细胞。链球菌溶血素-O,大肠杆菌溶血素或链球菌 α-毒素[83],这些孔道形成蛋白的存在显然与它们的致病力联系在一起。但是,虽然应用与 C9 相同的生物学原理,这些微生物毒素与 C9 或穿孔素在氨基酸序列水平并不显示出结构的同源性。许多像这样能介导溶破的分子已被鉴定出来[84],部分模拟补体蛋白的微生物蛋白列于表 29.9 中。它们中的绝大部分是在分子水平的定义,但是对它们中的部分而言,其在体内的免疫逃避作用并无充足的数据支持,还有更多的分子可能被列入此表中。

问题是这些分子是如何发挥作用的。从目的论角度看,一些补体样分子的表达是基于促进黏附,渗透进入宿主细胞或逃避溶破的进化选择的结果[84]。以痘病毒为例,DNA 编码 VCP,一个功能性 CR1 样和结构上 C4bp 样的补体调控蛋白,可能最初出现于宿主体内。在进化过程中,被捕获的基因持续性以保持最基本结构域的形式工作,因为任何操作产生更小的病毒蛋白均将导致分子功能丧失,提示基因在以最少的氨基酸数编码一个蛋白质分子方面已获得最大效率[85]。在另一些病原菌,分子模拟可代表重要祖分子识别基序的保守性。表 29.9 中列出的一些分子将在此更详细地讨论,其中许多分子与哺乳动物 CR1,DAF,MCP 或 C4bp 相关,也证实了 C3 和 C4 结合分子的重要性。

HIV 衣壳蛋白 gp41 和 gp120 与补体蛋白的整体同源性非常低,但是在特定的短的伸展中可以发现明显的相似性。代表性的位点似乎位于补体结合部位,可能参与促进补体受体介导的病毒摄取,或在 gp41 和 gp120 的非共价结合中发挥作用[80]。

曼氏血吸虫似乎拥有最精致的抗补体武装。首先,它可以修饰其表面的唾液酸,进而调节补体活化;第二,它能获得 DAF 以加速表面结合 C3 的衰变;第三,它能模拟 CR1 结合和裂解 C4 和 C3;第四,它可以裂解 C9,阻止 MAC 的组装;第五,但可能不是最后,它编码一个蛋白模拟 CD59,抑制膜攻击。

白色念珠菌在其表面拥有一个整合素/CR3 样分子,该分子与形态变化有关,代表了一种致病力因子[86]。另外,该分子与所有人整合素基因家族一样,似乎可以促进细胞间黏附。有趣的是,该分子不仅在功能上[87],而且在抗原性和结构上均与人 CR3 相关联。有确切的证据显示 HIV-1 可以直接与念珠菌结合,可能通过 gp41 上的 C3 样区域和念珠菌上的 CR3 样结构介导[88]。这一相互作用增加了念珠菌蛋白酶释放和抑制 PMN 的吞噬作用[89]。这样,两种病原菌一致的模拟在增加念珠菌和 HIV 的致病力中均发挥了作用。

目前认为分子模拟的部位可能代表了可发展成为疫苗的有用位点[90]。但是考虑到多种尚未揭示的相互作用,这样的疫苗有害的可能性尚不能排除。

补体异常与临床治疗

由活化的补体蛋白介导的效应功能在炎症组织损伤中有害,这在多种疾病的临床中得到证实,包括脓毒血症和多器官功能衰竭。动物中,补体耗竭或应用遗传缺陷种属能够有效地减少组织损伤和改善病情。

993

可以预期,干预性治疗阻止补体活化在控制补体介导的炎症和减小宿主细胞溶破中的作用,并为治疗大范围的急性和慢性疾病提供了无穷的临床应用的可能。有效抑制补体的尝试包括以下几个方面:

① 应用内源性的纯化补体抑制剂(C1-抑制物);

② 应用重组可溶性补体抑制剂(重组可溶性 CR1);

③ 应用抗体阻断级联反应的关键步骤,如形成 TCC 组装或 C5a 产生(抗 C5a 抗体);

④ 以中和性抗体抑制宿主组织中的过敏毒素效应(炎症,抗 C5a,抗 C5aR);

⑤ 应用抗体干扰炎症细胞与血管内皮细胞的黏附(抗 CR3);

⑥ 将膜结合补体调控分子结合至转基因动物(猪)器官以作为异种移植物来源(CD55、CD46 和 CD59)[91]。

摘要与结论

当免疫学家在19世纪后50年开始仔细分析体液免疫应答的功能时，一个基础的观察就是热稳定和热不稳定性因子的区别。热稳定的抗原特异性成分被称为抗体，而热不稳定性因子被认为在多种方面辅助抗体进行攻击，因此被 Pall Ehrlich 命名为“补体”。但是在体液免疫反应过程中被认为执行者的角色也只是导致补体活化三条途径中的一条(经典途径)，如从 C3 中产生 C3b 和它的共价沉积于活性表面。而所有补体活化通路中的共同末端部分是终末途径，最终导致可形成孔道的溶破性膜攻击复合物的组装。

比经典途径更古老的替代途径形成了它自己的天然免疫系统。它以一种完全不同于抗体的途径识别微生物表面而直接将 C3b 沉积于这些颗粒上，宿主组织被强有力的、严密的调控机制保护而免遭自身破坏性的替代途径活化。

最近发现的 MBLectin 途径与经典途径具有最为相似的生物化学步骤，但它是由 MBL 与存在于许多微生物表面的多糖结合后触发的，三条途径在天然和获得性免疫中的重要性在遗传学中反映出来，遗传性缺陷与感染易感性增高或免疫复合物疾病相关联。

补体的分子核心主要由两个主要的蛋白家族形成。首先，硫酯蛋白 C3 和 C4 拥有独立的能力，在活化后复杂的构像改变导致分子可与表面共价结合。第二，几种血浆和膜蛋白经过 SCR 结构域与硫酯蛋白相互作用。SCR 是由60个氨基酸(其中10~16个高度保守)组成的结构单位。另一方面，SCR 在进一步的补体活化中也存在(如 C1r 和 C1s，C2，B 因子)。另外，这些蛋白有丝氨酸蛋白酶结构域以触发起始的 C3 和 C4 蛋白酶解步骤，为扩增活化级联所需。此外，SCR 广泛存在于补体受体(CR1，CR2)或补体调节蛋白(如 H 因子，DAF)中，后者通过与活化形式的 C3 和 C4 结合并导致其失活而限制补体活化。这些蛋白的基因构成了 RCA 基因簇。

补体系统的形成贯穿脊椎动物的进化，而它的原始形式在非脊椎动物中就已发现。从那以后，病原体一直努力逾越这一主要的障碍并将之挪为己用。分子模拟在各种病原体中均可找到，从线虫、原虫到细菌和病毒。例如，锥虫合成类似宿主细胞表面的补体调控蛋白帮助寄生虫逃避补体攻击，其他的病原体如利什曼原虫或 EB 病毒利用宿主细胞的补体受体作为它们进入细胞的通道。

补体活化虽然是为抵抗微生物而设计的，但在特定条件下它可以对宿主自身产生危害，过度补体活化在免疫复合物疾病和自身免疫综合征中发挥作用。干预这种不需要的补体活化是补体研究中的长期目标，近年来获得的成果如重组产生的补体调控蛋白(可溶性 CR1)或人源化的抗 C5 单克隆抗体，已达到在几种临床情况下使用的首期目标。另一方面，补体在多种病理性异常中的作用也被仔细探讨。除了感染性和风湿性疾病，现在动脉粥样硬化、阿尔茨海默氏症以及癌症均被包含在内，其结果是全新的临床需要将把补体研究带入新的世纪。

致谢

本文作者在他们的研究中受到奥地利 zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF)的资助。

(周镜然 译)

参 考 文 献

1. Ross GD. Introduction and history of complement research. In: Ross GD, ed. *Immunobiology of the complement system.* New York: Academic Press, 1986:1–19.
2. Ehrlich P, Morgenroth J. Über Hämolysine. Zweite Mittheilung. *Berl Klin Wochenschr* 1899;36:481–486.
3. Pillemer L, Lepow IH, Blum L. The requirement for a hydrazine-sensitive serum factor and heat-labile serum factors in the inactivation of human C′3 by zymosan. *J Immunol* 1953;71:339–345.
4. Pillemer L, Blum L, Lepow IH. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, *properdin, and its role in immune* phenomena. *Science* 1954;120:279–285.

5. Müller-Eberhard HJ, Nilsson UR. Relation of a β1-glycoprotein of human serum to the complement system. *J Exp Med* 1960;111:217–234.
6. Klein PG, Wellensieck HJ. Multiple nature of the third component of guinea-pig complement. I. Separation and characterization of three factors a, b, and c, essential for haemolysis. *Immunology* 1965;8:590–603.
7. Wellensieck HJ, Klein PG. Multiple nature of the third component of guinea-pig complement. II. Separation and description of two additional factors beta and d: preparation and characterization of four intermediate products. *Immunology* 1965; 8:590–603.
8. Nelson RAJ, Jensen J, Gigli I, Tamura N. Methods for the separation, purification and measurement of nine components of hemolytic complement in guinea-pig serum. *Immunochemistry* 1966;3:111–135.
9. Mayer MM. Development of a one-hit theory of immune hemolysis. In: Heidelberger M, Plescia DJ, eds. *Immunochemical approaches to problems in microbiology*. New Brunswick: Rutgers, 1961:268–279.
10. Mayer MM. Mechanism of cytolysis by complement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69:2954–2958.
11. Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 1997;386:506–510.
12. Müller-Eberhard HJ. Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem* 1988;57:321–347.
13. Morgan BP, Gasque P. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clin Exp Immunol* 1997;107:1–7.
14. Würzner R, Joysey VC, Lachmann PJ. Complement component C7. Assessment of in vitro synthesis after liver transplantation reveals that hepatocytes do not synthesize the majority of the C7. *J Immunol* 1994;152:4624–4629.
15. Naughton MA, Walport MJ, Würzner R, Carter MJ, Alexander GJ. Organ-specific contribution to circulating C7 levels by the bone. *Eur J Immunol* 1996;26: 2108–2112.
16. Hogasen AK, Würzner R, Abrahamsen TG, Dierich MP. Human polymorphonuclear leukocytes store large amounts of. *J Immunol* 1995;154:4734–4740.
17. Morgan BP, Gasque P. Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunol Today* 1996;17:461–466.
18. Volanakis JE. Transcriptional regulation of complement genes. *Annu Rev Immunol* 1995;13:277–305.
19. Law SKA, Dodds AW. The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci* 1997;6:263–274.
20. Heine-Suner D, Diaz-Guillen MA, Pardo F, et al. A high resolution map of the regulator of the complement activation gene cluster on 1q32 that integrates new genes and markers. *Immunogenetics* 1997;45:422–427.
21. Nicholson Weller A. Decay accelerating factor (CD55). *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;178:7–30.
22. Janatova J, Reid KB, Willis AC. Disulfide bonds are localized within the short consensus repeat units of complement regulator proteins: C4b-binding protein. *Biochemistry* 1989;28:4754–4761.
23. Farries TC, Atkinson JP. Evolution of the complement system. *Immunol Today* 1991;12:295–300.
24. Kalli KR, Hsu P, Fearon DT. Therapeutic uses of recombinant complement protein inhibitors. *Springer Semin Immunopathol* 1994;15:417–431.
25. Reid KB, Day AJ. Structure-function relationships of the complement components. *Immunol Today* 1989;10:177–180.
26. Hack CE, Paardekooper J, Van Milligen F. Demonstration in human plasma of a form of C3 that has the conformation of "C3b-like C3." *J Immunol* 1990; 144:4249–4255.
27. Volanakis JE, Narayana SV. Complement factor D, a novel serine protease. *Protein Sci* 1996;5:553–564.
28. Tschopp J, Villiger W, Fuchs H, Kilchherr E, Engel J. Assembly of subcomponents C1r and C1s of the first component of complement: electron microscopic and ultracentrifugal studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:7014–7018.
29. Ziccardi R. Activation of the early components of the classical complement pathway under physiologic conditions. *J Immunol* 1981;126:1769–1773.
30. Morgan BP. *Complement*. London: Academic Press, 1990.
31. Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate. *Immunol Today* 1996;17:532–540.
32. Kolble K, Lu J, Mole SE, Kaluz S, Reid KB. Assignment of the human pulmonary surfactant protein D gene (SFTP4) to 10q22-q23 close to the surfactant protein A gene cluster. *Genomics* 1993;17:294–298.
33. Kawasaki T, Etoh R, Yamashina I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;81: 1018–1024.
34. Lu JH, Thiel S, Wiedemann H, Timpl R, Reid KB. Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. *J Immunol* 1990;144:2287–2294.
35. Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB, Jensenius JC. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol* 1992;90:31–35.
36. Lipscombe RJ, Lau YL, Levinsky RJ, Sumiya M, Summerfield JA, Turner MW. Identical point mutation leading to low levels of mannose binding protein and poor C3b mediated opsonisation in Chinese and Caucasian populations. *Immunol Lett* 1992;32:253–257.
37. Ryley NG, Heryet AR, Lu J, Reid KB, Fleming KA. Comparison between liver and serum concentrations of mannan binding protein. *J Clin Pathol* 1993;46: 259–263.
38. Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ, Turner MW. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet* 1989;2:1236–1239.
39. Ikeda K, Sannoh T, Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J Biol Chem* 1987;262:7451–7454.
40. Storgaard P, Nielsen EH, Andersen O, et al. Isolation and characterization of porcine mannan-binding proteins of different size and ultrastructure. *Scand J Immunol* 1996;43:289–296.
41. Terai I, Kobayashi K, Matsushita M, Fujita T, Matsuno K. Alpha 2-macroglobulin binds to and inhibits mannose-binding protein-associated serine protease. *Int Immunol* 1995;7:1579–1584.
42. Malhotra R, Willis AC, Jensenius JC, Jackson J, Sim RB. Structure and homology of human C1q receptor (collectin receptor). *Immunology* 1993;78:341–348.
43. Müller-Eberhard HJ. The membrane attack complex of complement. *Annu Rev Immunol* 1986;4:503–528.
44. Thompson RA, Lachmann PJ. Reactive lysis: the complement-mediated lysis of unsensitized cells. I. The characterization of the indicator factor and its identification as C7. *J Exp Med* 1970;131:629–641.
45. Esser AF. Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. *Immunol Today* 1991;12:316–318.
46. Bhakdi S, Tranum Jensen J. Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol Today* 1991;12:318–320.
47. Schreiber RD, Morrison DC, Podack ER, Müller-Eberhard HJ. Bactericidal activity of the alternative complement pathway generated from 11 isolated plasma proteins. *J Exp Med* 1979;149:870–882.
48. Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J* 1989;264:1–14.
49. Reiter Y, Ciobotariu A, Fishelson Z. Sublytic complement attack protects tumor cells from lytic doses of antibody and complement. *Eur J Immunol* 1992;22:1207–1213.
50. Niculescu F, Rus H, Shin ML. Receptor-independent activation of guanine nucleotide-binding regulatory proteins by terminal complement complexes. *J Biol Chem* 1994;269:4417–4423.
51. Sims PJ, Wiedmer T. Induction of cellular procoagulant activity by the membrane attack complex of complement. *Semin Cell Biol* 1995;6:275–282.
52. Würzner R, Xu H, Franzke A, Schulze M, Peters JH, Götze O. Blood dendritic cells carry terminal complement complexes on their cell surface as detected by newly developed neoepitope-specific monoclonal antibodies. *Immunology* 1991; 74:132–138.
53. Zipfel PF, Skerka C. Complement factor H and related proteins: an expanding family of. *Immunol Today* 1994;15:121–126.
54. Misasi R, Huemer HP, Schwaeble W, Sölder E, Larcher C, Dierich M. Human complement factor H: an additional gene product of 43 kDa isolated from human plasma shows cofactor activity for the cleavage of the third component of complement. *Eur J Immunol* 1989;19:1765–1768.
55. Preissner KT. Structure and biological role of vitronectin. *Annu Rev Cell Biol* 1991;7:275–310.
56. Jenne DE, Tschopp J. Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *TIBS* 1992;17:154–159.
57. Würzner R, Schuff Werner P, Franzke A, et al. Complement activation and depletion during LDL-apheresis by heparin-induced extracorporeal LDL-precipitation (HELP). *Eur J Clin Invest* 1991;21:288–294.
58. Lachmann PJ. The control of homologous lysis. *Immunol Today* 1991;12:312–315.
59. Ahearn JM, Fearon DT. Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Adv Immunol* 1989;46:183–219.
60. Thieblemont N, Haeffner Cavaillon N, Haeffner A, Cholley B, Weiss L, Kazatchkine MD. Triggering of complement receptors CR1 (CD35) and CR3 (CD11b/CD18) induces nuclear translocation of NF-kappa B (p50/p65) in human monocytes and enhances viral replication in HIV-infected monocytic cells. *J Immunol* 1995;155:4861–4867.
61. Bonnefoy JY, Gauchat JF, Life P, Graber P, Aubry JP, Lecoanet Henchoz S. Regulation of IgE synthesis by CD23/CD21 interaction. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:40–42.
62. Fearon DT, Carter RH. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:127–149.
63. Stockinger H. Interaction of GPI-anchored cell surface proteins and complement receptor type 3. *Exp Clin Immunogenet* 1997;14:5–10.
64. Wetsel RA. Structure, function and cellular expression of complement. *Curr Opin Immunol* 1995;7:48–53.
65. Reid KBM, Colomb MG, Loos M. Complement component C1 and the collectins: Parallels between routes of acquired and innate immunity. *Immunol Today* 1998;19:56–59.
66. Büscher KH, Opferkuch W. Control mechanisms: C1 inhibitor. In: Rother K, Till GO, eds. *The complement system*. Berlin: Springer, 1988:168–175.
67. Rother U. Shock and shock fragments. In: Rother K, Till GO, eds. *The complement system*. Berlin: Springer, 1988:504–510.
68. Würzner R, Mollnes TE, Morgan BP. Immunochemical assays for complement components. In: Johnstone AP, Turner MW, eds. *Immunochemistry 2: a practical*

approach. Oxford, England: Oxford University Press, 1997:197–223.

69. Schneider PM, Rittner C. Complement genetics. In: Dodds A, Sim RB, eds. *Complement—a practical approach.* Oxford, England: Oxford University Press, 1997: 165–198.
70. Mauff G, Würzner R. Complement genetics. In: Herzenberg LA, Weir DM, Blackwell C, eds. *Weir's handbook of experimental immunology.* Malden, MA: Blackwell Science, 1997:77.1–77.11.
71. Morgan BP. Clinical complementology: recent progress and future trends. *Eur J Clin Invest* 1994;24:219–228.
72. Lachmann PJ. Complement. In: McGee JOD, Isaacson PG, Wright NA, eds. *Oxford textbook of pathology.* Oxford, England: Oxford University Press, 1992: 259–266.
73. Morgan BP, Walport MJ. Complement deficiency and disease. *Immunol Today* 1991;12:301–306.
74. Hogasen K, Jansen JH, Mollnes TE, Hovdenes J, Harboe M. Hereditary porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II is caused by factor H deficiency. *J Clin Invest* 1995;95:1054–1061.
75. Feifel E, Prodinger WM, Mölgg M, et al. Polymorphism and deficiency of human factor H-related proteins p39 and p37. *Immunogenetics* 1992;36:104–109.
76. Figueroa JE, Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:359–395.
77. Würzner R, Orren A, Lachmann PJ. Inherited deficiencies of the terminal components of human complement. *Immunodefic Rev* 1992;3:123–147.
78. Joiner KA. Complement evasion by bacteria and parasites. *Annu Rev Microbiol* 1988;42:201–230.
79. Marschang P, Sodroski J, Würzner R, Dierich MP. Decay-accelerating factor (CD55) protects human immunodeficiency virus type I from inactivation by human complement. *Eur J Immunol* 1995;25:285–290.
80. Stoiber H, Schneider R, Janatova J, Dierich MP. Human complement proteins C3b, C4b, factor H and properdin react with specific sites in gp120 and gp41, the envelope protein of HIV-1. *Immunobiology* 1995;193:98–113.
81. Stoiber H, Pinter C, Siccardi AG, Clivio A, Dierich MP. Efficient destruction of human immunodeficiency virus in human serum by inhibiting the protective action of complement factor H. *J Exp Med* 1996;183:307–310.
82. Cooper NR. Complement evasion strategies of microorganisms. *Immunol Today* 1991;12:327–331.
83. Bhakdi S, Tranum Jensen J. Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. *Prog Allergy* 1988;40:1–43.
84. Fishelson Z. Complement-related proteins in pathogenic organisms. *Springer Semin Immunopathol* 1994;15:345–368.
85. Kotwal GJ. The great escape: immune evasion by pathogens. *Immunologist* 1997; 4:157–164.
86. Gale C, Finkel D, Tao N, et al. Cloning and expression of a gene encoding an integrin-like protein in *Candida albicans. Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:357–361.
87. Heidenreich F, Dierich MP. *Candida albicans* and *Candida stellatoidea,* in contrast to other *Candida* species, bind iC3b and C3d but not C3b. *Infect Immun* 1985;50:598–600.
88. Würzner R, Gruber A, Stoiber H, et al. Human immunodeficiency virus type I gp41 binds to Candida albicans via complement C3-like regions. *J Infect Dis* 1997 176:492–498.
89. Gruber A, Lukasser-Vogl E, Borg-von Zepelin M, Dierich MP, Würzner R. Human immunodeficiency virus type 1 gp160/gp41 binding to *Candida albicans* enhances candidal virulence in vitro. *J Infect Dis* 1998;177:1057–1063.
90. Fishelson Z. Complement evasion by parasites: search for "Achilles' heel." *Clin Exp Immunol* 1991;86(suppl 1):47–52.
91. Kirschfink M. Controlling the complement system in inflammation. *Immunopharmacology* 1997;38:57–62.

第30章　吞 噬 作 用

Samuel L. Jones, Frederik P. Lindberg, and Eric J. Brown①

吞噬作用与感染

997　多细胞生物生存的一个基本要求就是保护机体免受环境中潜在危险的侵害,包括创伤、有毒条件下的损伤,如缺氧、接触化学毒剂以及潜在病原体的攻击。多细胞生物保护自身不被细菌、病毒、单细胞真核生物如真菌和原生生物感染的机制称为宿主防御。宿主对这些入侵者的许多细胞和分子防御机制,同时也适用于其他机制造成的组织损伤的识别和修复。脊椎动物的宿主防御体系可描述为对这些威胁的一套高度完善的多层次反应。进化早期的原始防御反应,如通过补体链裂解,虽然迅速但不能区分自我和非我,且相对容易被病原体逃避。多形核白细胞和单核细胞对入侵物的吞噬、杀伤在效应机制和毒剂检测的范围上都有显著提高。T细胞和B细胞的抗原特异性是宿主防御中最高级、最精确的防御机制。当然,没有哪一种防御机制可以不依赖于其他防御方式而成功保护宿主。既然吞噬细胞的防御功能是在补体系统基础上的发展,那么这些细胞的活化和识别信号也高度依赖于补体。获得性免疫以上述两系统为基础进化而来,因此其抗原识别和效应功能也依赖于补体和吞噬细胞。而且特异性免疫系统产生的抗体也用于增强原始防御系统的功能,如抗体介导的补体活化及抗体依赖的吞噬作用。

单独地检测单个细胞和系统的作用通常比较容易,但是宿主防御、组织损伤和稳态在体内是高度统一的。比如,一个简单的裂伤导致血液暴露于组织磷脂,后者反过来促进激活凝血和补体以及血小板的活化和聚集;血小板活化导致如凝血酶、组胺、腺苷二磷酸(ADP)和腺苷三磷酸(ATP)以及血小板活化因子(PAF)的释放,这些活性物质扩张微脉管,使周围的内皮细胞活化表达新的黏附分子以募集循环中的白细胞。凝血和补体的活化有助于中性粒细胞募集,后者也能直接被凝血酶、PAF、ATP、细胞因子和其他感染因子活化。组织定居的巨噬细胞和肥大细胞也被活化,释放更多的化学诱导因子募集中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞。中性粒细胞也释放化学诱导因子吸引更多的中性粒细胞。中性粒细胞、血小板以及内皮细胞之间的跨细胞生化合作在于白三烯,如LTB4的合成。这些效应直接限制了创伤范围和防止潜在病原体感染。上述过程

① S. L. Jones, Department of Molecular Biology and F. P. Lindberg, and E. J. Brown: Department of Internal Medicine, *Division of Infectious Diseases*, Washington University School of Medicine St. Louis, Missouri 6310.

998 也启动体内修复。血小板释放的血小板源生长因子(PDGF)导致血管上的平滑肌细胞收缩和增殖。PDGF与中性粒细胞和巨噬细胞释放的生长因子和趋化因子导致成纤维细胞侵入、紧缩伤口以及形成痂。通过细胞内化其他细胞、细胞碎片、蛋白聚集物以及外源小体的吞噬过程,在稳态紊乱时发生的复杂事件起着重要作用。本章将结合当前对宿主防御中吞噬细胞的作用的理解,综述吞噬作用的细胞生物学和生物化学事件。

通过吞噬作用摄入的对象可以是任意大小,而吞噬作用通常指的是直径大于1μm的颗粒,因为这种大小的颗粒内化机制明显不同于可溶物的胞饮[1]。吞噬作用首先由Eli Metchnikoff提出,他观察到海星幼虫中有些细胞能够吞噬和破坏外来物或入侵者[2,3]。据此,他提出一个假设,认为这些细胞和其他多细胞生物中相应细胞的吞噬作用是宿主防御的一个基本方面。当时虽然有些争议,这一假说后来得到证实。的确,吞噬作用是一种生理过程。例如,阿米巴原虫(amoebae)吞噬细菌和其他生物作为一种食物来源,某些植物根部细胞在类似吞噬泡的胞内小体隐藏细菌,对植物的固氮能力有利。对于多细胞动物,吞噬最突出的作用是清除受伤后的组织碎片和发育过程中的凋亡细胞,消灭入侵的病原体。

吞噬细胞的类型和演化

作为宿主防御的一个重要组成部分,吞噬作用是多数潜在病原体最终被消灭的机制之一。吞噬作用的宿主防御要求识别潜在的病原体,这也是一类专门白细胞的主要功能,这些髓样细胞被认为是多形核中性粒细胞(PMN)、单核细胞或巨噬细胞,总称为"专职吞噬细胞"。PMN和单核细胞在血液和组织间移动,检查需要修复的体内稳态的破坏情况。所有吞噬细胞都来源于骨髓。PMN来自定向前体细胞,在骨髓中6天后成熟释放进入脉管系统,在脉管系统中只能循环6~12小时[4],接下来进入多种组织,最终发生凋亡并被该处的巨噬细胞清除。感染期间,PMN从骨髓中大量释放,有时还未完全成熟。血液中PMN数量增加和(或)不成熟PMN的存在,多年来在临床上作为感染征兆。在体内稳态或感染期间释放PMN的信号和机制仍未完全阐明。

根据髓样细胞中颗粒的染色特性,分为中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。多形核中性粒细胞最丰富,占总粒细胞的95%。成熟PMN至少含有初级、二级和三级三类不同的颗粒,各含有不同的内容物。总体上,这些颗粒包含溶酶体酶和(或)抑菌(杀菌)的分子,并作为膜分子的贮藏库,能够迅速移至细胞表面,在宿主防御上起作用。颗粒中内容物的可调节分泌在宿主防御中起重要作用,缺少一种或多种中性粒细胞颗粒的人,其易感性明显增加[5~8]。嗜酸性粒细胞占循环中粒细胞的2%~4%,颗粒中含有蛋白水解酶和糖分解酶、碱性蛋白和过氧(化)物酶。嗜酸性粒细胞在宿主对寄生物感染的防御中特别重要,而且过敏反应时数量增加。嗜碱性粒细胞和组织定居的、长寿的肥大细胞含有肝素和组胺的酸性颗粒。嗜碱性粒细胞和肥大细胞表面有IgE受体,与抗原交联时脱颗粒分泌组胺和其他血管活性介质。肥大细胞在宿主对细菌防御的早期有重要作用[9,10]。这可能是因为炎症的产生和吞噬细胞的定向移动要求肥大细胞脱颗粒,而不是由于肥大细胞颗粒内容物对细菌的直接毒性作用。

单核吞噬细胞来自骨髓,当单核细胞迁入不同组织,在那里进一步分化为成熟的巨噬细胞。这些细胞的表型高度依赖于所在的组织。肝窦和脾窦的库普弗细胞清除血流中衰老的红细胞。库普弗细胞也清除其他碎片,如循环中纤维蛋白的降解物和免疫复合物。肺泡巨噬细胞吞噬、清除那些到达末梢支气管的吸入颗粒。中枢神经系统的小胶质细胞吞噬降解的髓磷脂。胃肠道和泌尿生殖道的黏膜下层、皮肤及关节腔的滑液膜也可发现巨噬细胞。在这些部位及腹腔和胸腔,它们清除从肠或肺渗漏入这些组织的少量细菌。

单核细胞迁入组织成为组织巨噬细胞之前循环的半衰期为16~20小时[11]。没有炎症发生时,它们迁入组织是随机的还是有些单核细胞亚群定向一定组织还不清楚。完全分化的巨噬细胞在它们定居组织的寿命为4~15天。炎症期间,发炎部位单核细胞集聚大大增加。主要是循环单核细胞增加流入和仅仅很少量定居巨噬细胞的增殖。炎症时的巨噬细胞和定居的组织细胞有不同表型,包括髓过氧物酶的表达、吞噬细胞的能力增强及加强了产生毒性氧和氮代谢的能力。

吞噬细胞向宿主防御位点募集

白细胞的滚动

999 成功的宿主防御首先要求专职吞噬细胞识别病原体并移向入侵位点。由于所有 PMN 和多数巨噬细胞来自血液，移向这些位点首先需要识别覆盖于炎症位点的内皮细胞，然后穿过血管壁和胞间基质。移向感染位点的过程中，需要吞噬细胞识别炎症位点的特异性受体，黏附并穿过内皮和管壁的其他组分，去消灭病原体。目前的模型认为，这是一个顺序黏附的多步骤过程(图 30.1)。对于凝血、血小板活化或肥大细胞活化释放的凝血酶、PAF、白细胞介素-1(IL-1)、组胺和其他调节分子，感染位点小静脉内皮细胞最迅速的反应是质膜上表达黏附分子——P 选择素[12~14]。P 选择素贮存在内皮细胞的 Weibel-Palade 中，在细胞暴露于适当的感染性刺激物后几秒内可移至细胞表面。P 选择素是介导白细胞与内皮细胞相互作用的 3 个 Ca^{2+} 依赖的碳水化合物结合蛋白之一：P 选择素、L 选择素和 E 选择素，也称为 CD62P、CD62L 和 CD62E[14,15]。PMN 表达 P 选择素配体和选择素家族的第二个成员——L 选择素，后者识别内皮细胞上的一个配体[15,16]。总之，P 选择素和 L 选择素与其配体相互作用使白细胞与内皮细胞暂时结合，可明显降低 PMN 在感染部位穿过血管的速度[17,19]。这是白细胞特异性识别炎症位点的第一步，但是选择素介导的相互作用不足以使白细胞跨内皮细胞移动，甚至不足以稳定 PMN 与内皮细胞之间的黏附。准确地说，这种相互作用导致白细胞沿着炎症位点血管滚动。

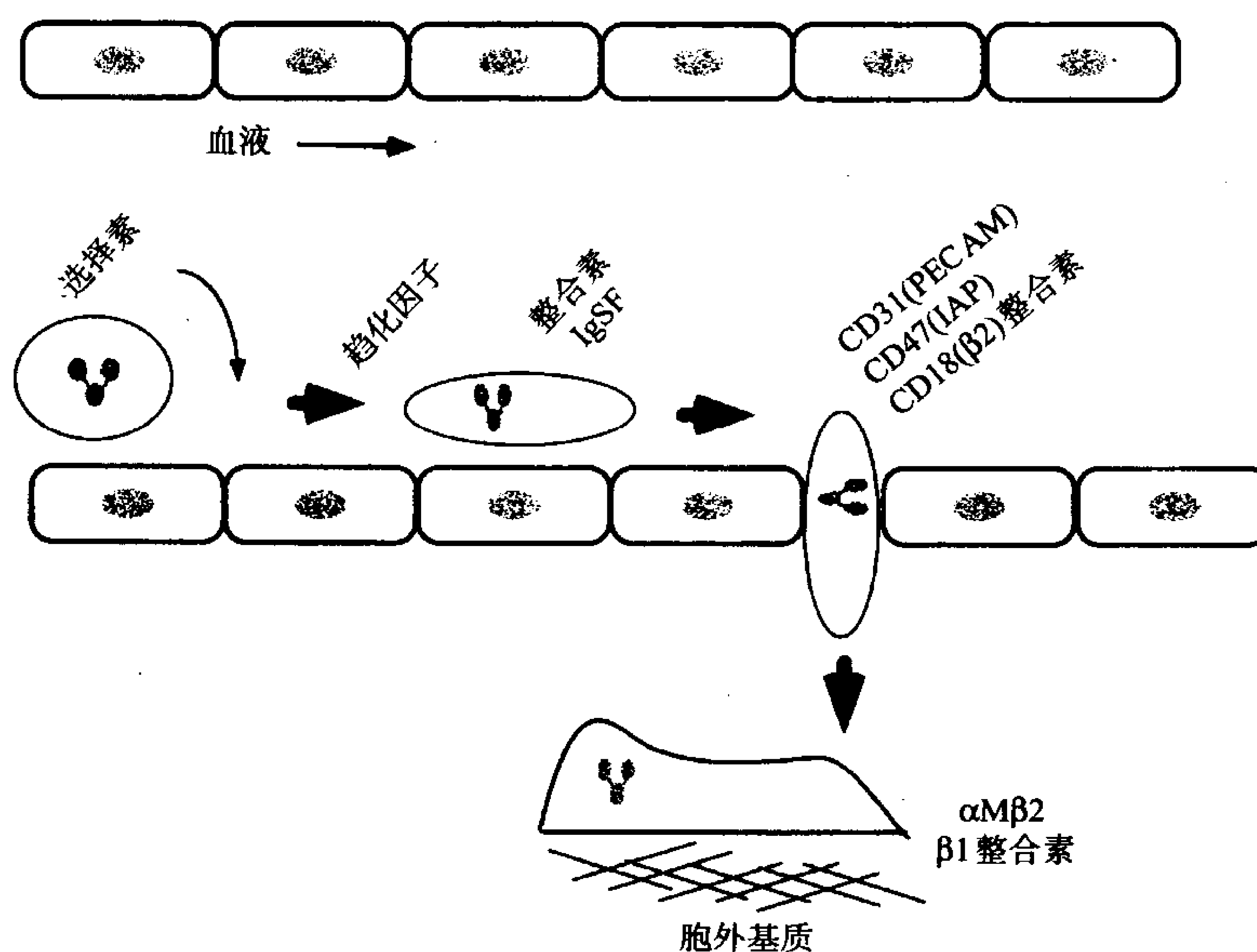


图 30.1 白细胞向炎症位点移动。白细胞识别炎症表面的内皮细胞后，先在内皮细胞膜上滚动，逐渐稳定，后在趋化因子、组胺、凝血酶或其他炎症介质作用下与内皮细胞牢固黏附。最后白细胞从内皮细胞间隙离开血管，在胞外基质蛋白的趋化作用下跨过血管。

吞噬细胞的滚动使其与内皮细胞紧密接触，在组织损伤和炎症区缓慢通过。被内皮细胞表面的蛋白质捕获的多是活化的内皮细胞或其下组织合成的调节分子。吞噬细胞受体与这些调节分子的偶联是白细胞募集的第二步[20]。PMN 表面有多种高亲和力受体(nmol/L)结合化学引诱剂或趋化因子，如补体片段 C5α、IL-8、PAF、LTB4、Gro-α 和 *N*-甲酰肽(如甲酰甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸(fMLP))[21,22]。炎症部位的单核细胞有一套交叠但又明显不同的受体分子[23,24]。

1000 对趋化因子反应很可能使白细胞特异性地募集至特定的炎症部位。单核细胞和巨噬细胞有多种趋化因

子如 MIP-α 和 MCP-1 的受体，PMN 不能识别这些趋化因子[25]。另一方面，与 PMN 相反，巨噬细胞对 IL-8 不反应[26,27]。粒细胞中只有嗜酸性粒细胞对补体片段 C3a 反应。RANTES、MIP-1α、MCP-3 和嗜酸性粒细胞活化趋化因子(eotaxin)也对嗜酸性粒细胞有化学吸引作用，但对中性粒细胞无作用[29~31]。所有化学吸引剂受体都是 G 蛋白偶联受体中 7 次跨膜蛋白家族成员[32]。

牢固黏附内皮细胞

白细胞在选择素介导的相互作用下运动速度减慢并与趋化因子产生部位接触，它们在原始接触位点的几个细胞直径内活化。这个阶段，牢固黏附是接下来跨内皮细胞移动的前提。白细胞整合素(CD18 或 β2 整合素)与内皮细胞免疫球蛋白家族成员结合是这一事件最主要的介导者(图 1)。

整合素是异源二聚体形式的细胞表面受体，其多肽链来自两个基因家族，α 和 β。α 家族有 14 种多肽，β 家族有 8 种，它们能组成 22 个不同的组合，有交叉的配体特异性[33]。两种肽链都是Ⅰ型膜蛋白，包括较大的胞外 N 端部分(α 链约 160kDa，β 链 90 kDa)，跨膜区和短的胞质尾(20～50 个氨基酸)。整合素家族表达范围广，且所有整合素受体都与黏附有关。整合素可能介导细胞附着胞外基质(ECM)或其他细胞。白细胞表达 β1、β2、β3、β5、β7 整合素亚族。它们中多数也在其他细胞表达，而 β2 和 β7 整合素仅在白细胞上表达，并在调节淋巴细胞循环至淋巴窦或吞噬细胞移向炎症位点的黏附过程中特别重要。白细胞整合素至少有两种不同状态(活化和失活状态)，主要是介导黏附的能力有很大差异[34~39]。白细胞在血液中循环时，整合素呈失活状态且黏附能力差。内皮细胞表面缓慢滚动的白细胞接触趋化因子而活化整合素，活化的整合素介导白细胞快速、稳固地黏附内皮细胞。

跨内皮细胞移动和血管外的趋化作用

对吞噬细胞跨过血管壁的了解远不及最初的黏附过程清楚。β2 整合素和免疫球蛋白超家族成员 PECAM-1(CD31)及整合素相关蛋白(IAP)(CD47)似乎都在起作用，另一个整合素 αvβ3 可能也有相似功能[40~45]。内皮细胞产生的 IL-8 在这一过程中也很关键[46]。一旦跨过内皮细胞，吞噬细胞在移向炎症位点期间可能黏附其它细胞，如血管壁的平滑肌细胞或连接组织的纤维细胞，也依赖于白细胞特有的 β2 整合素 αMβ2 和 αXβ2[47,48]。穿过胞外基质到达创伤或感染位点也是整合素介导的，细胞表面 β1、β3、β5 整合素识别胞外基质特异性蛋白配体[49]。这些整合素介导的相互作用，与内皮细胞的整合素一样，要求整合素在炎症位点的趋化因子作用下活化至高亲合状态。趋化因子也决定吞噬细胞移动的方向，因为细胞将移向趋化因子浓度高的位点，这一过程叫做趋化。PMN 和炎症巨噬细胞到达趋化因子浓度最高的地方，是感染和炎症集中的位点。细胞移过胞外基质也依赖于吞噬细胞相关的蛋白酶活化，可能是降解胞外基质以易于移动[50,51]。一旦到达炎症位点，吞噬细胞潜在的效应功能被活化，包括产生毒性氧和氮代谢，释放蛋白酶和其他破坏性酶以及合成细胞因子和趋化因子，从而增强宿主防御反应和吞噬作用。

吞噬作用的细胞生物学

可以认为吞噬作用有 4 个基本步骤(图 30.2)。最初是吞噬细胞识别吞噬对象。识别吞噬对象可以是直接的，即吞噬细胞受体与吞噬细胞认为是“外来物”的吞噬对象特异性相互作用，也可以是通过调理作用。宿主蛋白与侵入病原体、凋亡细胞或细胞碎片相互作用时发生调理作用。接着是吞入，受体-配体相互作用通过信号转导产生特异的细胞反应，并要求细胞膜和细胞质发生改变以便吞入，且伴随其他炎症反应，如酶分泌、黏附、脱颗粒和呼吸爆发。第三步是内在化，要求一个或多个吞噬细胞膜融合，把吞噬对象从胞外环境带入胞内小泡。最后，摄入的颗粒进入吞噬细胞的溶酶体系统、降解。研究对感染性微生物的这些反应，以及对毒性生物侵入的吞噬、消灭机制，有助于阐明吞噬过程的步骤。

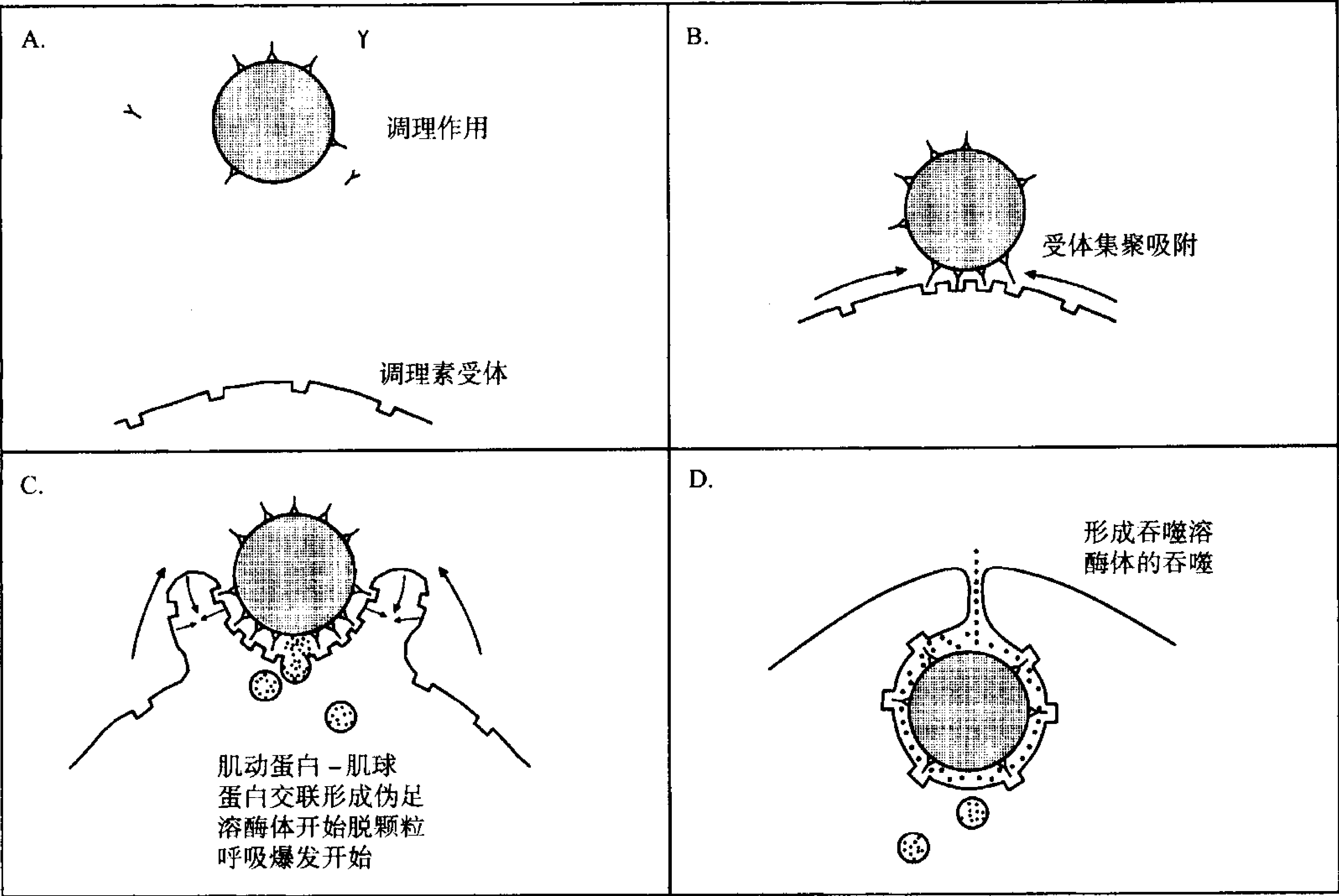


图 30.2　吞噬作用的 4 个步骤。最初可通过吞噬细胞表面识别细菌、凋亡细胞或细胞碎片的受体直接识别吞噬对象，或者如图 A 所示的调理作用。最初的相互作用导致吞噬细胞膜和细胞骨架的一系列协同变化，在吞噬对象周围伸出伪足（图 B）。由于脱颗粒和调节性分泌，摄取部位最初的吞入伴随质膜和内环境组成的变化（图 C）。最后吞噬细胞质膜融合，吞噬对象内在化于吞噬小体中。

吞噬对象的识别

非调理性识别

吞噬作用的第一步是识别吞噬颗粒至被吞噬细胞摄入。“专职吞噬细胞”是由于吞噬细胞表面表达一套与识别入侵微生物、死亡细胞或组织有关的受体。它们识别特异性特征区分是吞噬对象还是正常细胞或组织。比如，吞噬细胞表面有受体识别细菌脂多糖，后者是革兰氏阴性菌细胞壁的组分，有识别革兰氏阳性生物肽糖的受体，有识别某些碳水化合物的受体，还有识别变性蛋白的受体以及识别磷脂酰丝氨酸（凋亡细胞表面暴露的一个组分）的受体[52~58]。非调理性吞噬细胞受体在表 30.1 中列出。但是它们不能广泛识别潜在的病原体，因为许多致命细菌和寄生物通过进化机制得以逃避。这些受体是宿主保护的第一道防线，由于细菌的逃避策略，宿主不得不进化相应的更复杂的机制来识别多种不同的潜在病原体。

1001

表 30.1　吞噬细胞受体直接识别的吞噬对象

吞噬对象的配体	吞噬细胞受体	受体家族	包含在吞噬过程中	参考文献
脂多糖	CD14	GPI-偶联	可能	[54]
	CD11/Cd18	整合素	是	[287]
磷脂酰丝氨酸	? 死亡捕捉器	清除剂受体	凋亡细胞	[150]
	其他	未知	凋亡细胞	[58]
肽聚糖	Ⅰ型清除剂受体		是	[55]
碳水化合物	甘露糖受体	C 型凝集素	是	[64]

清除剂受体是主要的非调理性吞噬细胞受体之一[57,59]，能够识别多种配体，包括修饰后蛋白、多聚阴离子(包括核酸)和酸性磷脂包括革兰氏阴性菌的脂多糖和革兰氏阳性菌的磷壁(酸)质。这种分布使得这些受体似乎与清除损伤组织和碎片，以及多种潜在病原体的宿主防御有关。这个家族成员识别低密度脂蛋白和高密度脂蛋白的能力说明它们可能在动脉硬化的病理过程中也起作用[60,61]。结构上看，清除剂受体家族庞大且具多样性[57]。它们的统一特征是存在一个或多个富含半胱氨酸的结构域，叫作"清除剂受体半胱氨酸丰富区"(SRCR)[57]。序列同源性比较确定了 SRCR 结构域的三个亚群；清除剂受体亚群结构上的区别在于配体结合特性的差异。清除剂受体也能介导巨噬细胞黏附[62,63]。

吞噬细胞的另一类非调理性受体是 C 型凝集素[64]，主要是甘露糖受体。甘露糖受体是巨噬细胞上带有 8 个 C 型凝集素结构域的 175 kDa Ⅰ型膜蛋白，虽然并不是所有甘露糖受体都具备甘露糖结合活性[65]。转染中国仓鼠细胞的甘露糖受体介导的吞噬作用[66]，至少与下面介绍的 IgG Fc 受体不同。IFN-γ、脂多糖和免疫复合物可下调甘露糖受体的表达[64]。报道的吞噬细胞上其他凝集素受体，包括 β-葡聚糖受体、海藻糖受体、高级糖基化终产物受体、半乳糖受体，还没有进一步研究。

调理性受体

成功的体内稳态要求进化其他机制识别、清除入侵物或损伤组织。面对这些挑战，宿主进化产生了一系列能识别入侵物，又能被吞噬细胞表面特异性受体识别的可溶性蛋白(表 30.2)。这些血浆蛋白扩大了识别可能为病原体的微生物，或者是损伤或有缺陷胞外碎片的范围，并且它们也有能力参与更有效的信号机制，清除、消灭黏附的吞噬对象，而不是以上讨论的非调理性受体处理的方法。这些血浆蛋白叫作调理素(希腊文 *opson*，"准备吞噬")。血浆中主要的调理素是免疫球蛋白和补体，吞噬细胞表面有多种针对它们的受体，参与介导宿主防御的效应机制，包括吞噬作用。

1002

表 30.2　吞噬细胞识别入侵病原体或凋亡细胞的一些调理素

调理素	吞噬细胞受体	参考文献
抗体	IgG Fc	[288]、[289]
补体		
C3 片段	CR1, CR3, CR4	[125]、[290]
C1q	C1qR	[291]、[292]
凝集素		
甘露糖结合蛋白	? C1qR	[131]、[293]
C-反应蛋白	?	[136]
血纤蛋白原	几种整合素	[294]、[295]
纤连蛋白	几种整合素	[296]、[297]
血小板反应蛋白	αVβ3, CD36, CD47	[298]

Fc 受体

Fc 受体结合 IgG、IgA 和 IgE 分子的 Fc 段(免疫球蛋白重链的 C2-C3 结构域)[67,68]。吞噬细胞不表达 IgE 受体，但有 IgG 受体(FcγR)和 IgA 受体(FcαR)[69,70]。FcγR 和 FcαR 是免疫球蛋白家族成员，含有 3 个(FcγRIA)或 2 个(其他 Fc 受体)胞外免疫球蛋白结构域，1 个跨膜区和 1 个相对短的胞质尾，但人 FcγRⅢB 除外，它通过聚糖磷脂酰肌醇(GPI)连接锚定在膜上，因此缺乏跨膜区和胞内区[71]。吞噬细胞 Fc 受体列于表 30.3。人和鼠的所有 Fcγ 受体基因都定位于 1 号染色体的一个小区。很可能不同 Fcγ 受体基因来自于一个 FcγR 祖先，通过一系列复制而来。FcγRⅠ以 nmol/L 亲和力能结合单价 IgG，而 FcγRⅡ和 FcγRⅢ主要结合多

价 IgG,比如免疫复合物或者抗体包被的细胞、病毒或细胞碎片[72]。不同 FcγR 的亲和力由于不同 IgG 亚类形成的免疫复合物差异很大[73]。

表 30.3 吞噬细胞上免疫球蛋白 Fc 区受体

受体	CD	Mr(kd)	细胞分布
FcγRⅠ[a]	64	75	单核细胞
			巨噬细胞
			IFN-γ 处理的 PMN
FcγRⅡA[b]	32	40	PMN
			单核细胞
			巨噬细胞
			血小板
FcγRⅡB[b]	32	40	单核细胞
			巨噬细胞
			B 淋巴细胞
			肥大细胞
FcγRⅢA[c]	16	50-65	巨噬细胞
			NK 细胞
			肥大细胞
FcγRⅢB[c]	16	50	灵长类动物的 PMN
FcαR	89	55-75	粒细胞
			单核细胞
			巨噬细胞

[a] 有 3 个编码 FcγRⅠ蛋白的基因座。[b] 抗体不能区分 FcγRⅡA 和 FcγRⅡB 的胞外区。[c] FcγRⅢA 和 FcγRⅢB 胞外区序列一致。

FcγRⅠ

FcγRⅠ是 IgG 的高亲和力受体(1～10nmol/L),有 3 个免疫球蛋白结构域。从 FcγRⅠA 到 FcγRⅠC,有 3 个 FcγRⅠ基因。FcγRⅠA 通常在巨噬细胞和单核细胞上表达(表 30.3),其他 2 个基因的蛋白表达情况仍未确定。PMN 通常不表达 FcγRⅠ,但 IFN-γ(或粒细胞集落刺激因子(G-CSF)能诱导其表达[74]。像 FcγRⅠ一样,FcεRⅠA 与另一膜分子——γ 链二聚体结合[75]。γ 链,由于与嗜碱性粒细胞上高亲和力 IgE 受体的 α 链和 β 链结合而得名,与 T 细胞抗原受体的 ζ 链相似,且同它一样介导基于免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)的受体信号,并与 syk 家族激酶结合。与 FcεRⅠA 和 T 细胞抗原受体不同的是,FcγRⅠA 在细胞表面表达不依赖于 γ 链的表达。FcγRⅠ是 FcγR 中惟一有足够亲和力结合单价 IgG 的受体。它能够介导 IgG 调理对象的吞噬,循环中单核细胞的 FcγRⅠ也可被单价 IgG 中和。因此,它也可能作为与嗜碱性粒细胞高亲合力 IgE 受体相似的嗜细胞抗体功能,只是要求二聚体抗原诱导细胞活化。

1003

FcγRⅡ

FcγRⅡ是中等亲和力的 Fcγ 受体。同 FcγRⅠ一样,有 3 个编码 FcγRⅡ蛋白的基因座(FcγRⅡA、FcγRⅡB 和 FcγRⅡC)。PMN 仅表达 FcγRⅡA。单核细胞和巨噬细胞表达 FcγRⅡB,但以 FcγRⅡA 为主。没有检测到蛋白水平的 FcγRⅡC。人类 FcγRⅡA 近膜区的免疫球蛋白结构域(H131R)多态性产生的一个同种型大大降低了 IgG2 的亲和力。这可能影响宿主防御,因为高亲合力的 131H 等位基因纯合子与荚膜菌感染率低有关[76,77]。

FcγRⅡA 和 FcγRⅡB 的胞质尾序列不同而在功能上有很大差异,主要表现在支持吞噬的能力方面。附着 FcγRⅡA 可引起颗粒吞入,而 FcγRⅡB 不能[78,79]。可能是由于 FcγRⅡB 不能活化白细胞特异的酪氨酸激酶 syk,影响后者与肌动蛋白微丝的组成型结合,最终不能使吞噬的膜区活化[78,82]。FcγRⅡA 通过酪氨酸激酶激活 syk 而活化吞噬细胞。同其他吞噬细胞 Fc 受体一样,FcγRⅡA 可能与跨膜的含 ITAM 的 γ 链结合[81],后者传递信号活性的关键在于其胞质尾上 3 个酪氨酸中的 2 个氨基酸[82,83]。同 ITAM 的酪氨酸一样,这 2 个

酪氨酸在 YXXL 基序中，但 2 个 YXXL 基序之间间隔 12 个氨基酸而不是典型 ITAM 的 6～8 个。而且这些酪氨酸磷酸化时，syk 似乎直接与 FcγRⅡA 结合并活化[83～86]，说明 FcγRⅡA 胞质尾的确表达一个功能性 ITAM。相反，FcγRⅡB 没有 ITAM 序列；它的磷酸化酪氨酸存在于一个结合抑制性 SH2 结构域的序列中，这个 SH2 结构域含有肌糖磷酸酶 SHIP[87～90]。因此，FcγRⅡA 活化吞噬细胞，FcγRⅡB 使细胞活化降低。

FcγRⅢ

FcγRⅢ是由 2 个近乎相同的基因——FcγRⅢA 和 FcγRⅢB 编码。FcγRⅢA 是含 2 个免疫球蛋白的结构域的膜蛋白编码 FcγRⅢA 和 FcγRⅢB 的基因有 9 个核酸不同。一个核酸的改变导致 FcγRⅢA 第 185 位 Phe 替换为 FcγRⅢB 的 Ser。这一差异使 FcγRⅢB 中产生一个 GPI 锚定位点，而不是跨膜区。FcγRⅢA 有中等亲和力结合 IgG(30nmol/L)，而 FcγRⅢB 结合单价 IgG 的能力很弱，说明 FcγRⅢA 与 γ 链结合可能影响配体的亲和力[91]。巨噬细胞、某些单核细胞、自然杀伤细胞(NK)和某些 T 淋巴细胞表达 FcγRⅢA。FcγRⅢB 只在中性粒细胞中组成型表达，嗜酸性粒细胞接触 IFN-γ 后也表达 FcγRⅢB[74]。FcγRⅢA 如果不与 γ 链结合，在其跨膜区有一段序列导向内质网。因此不只是 FcγRⅢA 的信号传递而且在细胞表面表达都依赖于与 γ 链的结合。在这方面，它不同于 FcγRⅠ和 FcγRⅡ与 γ 链二聚体结合只传递信号，质膜表达则不要求这种结合。FcγRⅢB(和部分 FcγRⅡC)的染色体缺失导致的 FcγRⅢ不表达没有造成对细菌易感的明显增加[92]。

可溶性 Fcγ 受体

几种 FcγR 可以不同剪接的 mRNA 合成后分泌，或者通过蛋白酶裂解从细胞表面释放[93]。在炎症性疾病和吞噬细胞数量增加的情况下，这些可溶性产物增加。体外它们可阻断免疫复合物与细胞 Fc 受体相互作用而抑制免疫复合物介导的吞噬细胞活化，体内这些受体片段的意义仍不清楚。

FcαR

FcαR 在单核细胞和 PMN 中表达[70]，对 IgA 有 nmol/L 亲和力，同 FcγR 一样与 γ 链二聚体结合[94]。FcαR 的表达同 FcrRⅠ和 FcγRⅡA 一样不依赖于与 γ 链结合。由于它对 IgA 相对高的亲和力及与 γ 链结合，FcαR 可能有与 FcγRⅠ功能相似。虽然对 FcαR 介导的吞噬作用有报道，但是对其吞噬能力没有深入研究。某些细菌和病毒的 IgA 抗体事实上增加了系统感染的易感性，而且体外阻断调理和吞噬作用，提示 IgA 没有有效的调理效应[95～98]。转运 IgA 通过黏膜屏障[99]的多聚 Ig 受体对正常宿主防御是基本的，但是在吞噬细胞上不表达。

补体受体

补体成分 C3 是血清中第二个主要调理素。补体活化期间，C3 裂解为 C3b 并进一步裂解为 iC3b，二者都共价结合到补体活化的表面上。吞噬细胞表达这 2 个 C3 片段的受体，且与吞噬作用有关。补体受体在细胞活化后体内外均能有效介导 C3 调理的吞噬，而未活化细胞的补体受体不能介导吞入[100,101]。因此，这些受体的吞噬能力不是组成性的，而是依赖于多种细胞事件。对这些控制补体受体吞噬能力的分子特性仅仅有部分了解。由于宿主防御中吞噬作用主要是在充满了活化刺激物的感染和炎症位点，该处补体受体很可能对效应细胞的吞噬能力起重要作用。

CR1

CR1 是单链Ⅰ型跨膜蛋白，在红细胞、肾小球足状突细胞、吞噬细胞和某些淋巴细胞表达[102]。该分子由多个约 60 个氨基酸含二硫键丰富的结构域称作短同源重复顺序(SCR)的松散重复组成。CR1 表达的多个 SCR 有等位基因多态性，与不同免疫复合物的清除和自身免疫有关[103]，但是否影响 CR1 的吞噬功能未知。C3b 单独调理以及和 CR1 结合、交联的调理均不能导致未活化吞噬细胞的吞噬。另一方面，当蛋白激酶 C (PKC)被外源性活化，如佛波酯、PMN 和单核细胞均可吞噬 C3b 调理颗粒[100,104]，提示 CR1 配体偶联不能使吞入所要求的 PKC 活化，但 CR1 偶联的信号转导比 Fc 受体了解得更少。

1004

整合素补体受体

β2 家族有 2 个吞噬细胞特异性整合素是 C3 的 iC3b 片段受体[105,106]——αMβ2(也叫作补体受体 3/CR3，Mac1 和 CD11b/CD18)和 αXβ2(也叫作 CR4、p150、95 或 CD11c/CD18)。它们在上述通过 ECM 的跨内皮细胞移

动和趋化中起作用。与白细胞上的其他整合素一样，这2个吞噬细胞 iC3b 受体为高亲合力的配体结合需要活化。因此，它们同 CR1 一样，不能介导静止的未活化吞噬细胞的吞噬，但在吞噬细胞暴露于细胞因子和趋化因子后可被活化。

CR3(αMβ2)在 PMN 的许多黏附依赖的功能中有非常特殊的中心作用，比如吞噬，多种受体为了黏附和吞噬与相应的吞噬细胞细胞骨架的相互作用要求 CR3 的表达。PMN 中 CR3 的中心作用在Ⅰ型白细胞黏附缺陷(LAD)的人、牛或狗的表型中最能体现，它们完全或几乎完全缺少 β2 整合素的表达[107,108]。这些患者的 PMN 不能移向炎症位点，以致不能控制组织感染，延迟碎片清除和伤口愈合[109]。患者的典型特征是不能重吸收脐带残段。这是由于白细胞不能黏附内皮细胞和(或)不能穿过 ECM，这正是3个 β2 整合素的识别作用[20,110]。白细胞黏附缺陷的 PMN 也不能对炎症信号作出相应的活化反应，体现在不能介导 IgG 或 C3b 调理的吞噬[111,112]，结合免疫复合物后不能产生正常量的 LTB4[113]，Fcγ 受体与配体结合后胞包内 Ca^{2+} 浓度不能正常增加[114]，对 TNF-α 反应不能产生呼吸爆发[115]，多种活化刺激后不能磷酸化细胞骨架桩蛋白(paxillin)。不能活化是由于特异性缺少 αMβ2，LAD 的 PMN 体外不能在多种表面黏附或移动也是如此[118]。由于整合素通过其胞质尾间接结合肌动蛋白细胞骨架，αMβ2 缺陷的多种效应说明 PMN 活化与整合素依赖的细胞骨架效应密切相关。然而，即使没有其明显的配体结合，对 Mac-1 的需求也是惊人的，提示 Mac-1 的功能之一可能是介导吞噬细胞质膜上其他受体之间的相互作用[119]。深入研究 αMβ2 与 Fcγ 受体或者是尿激酶受体(urokinase receptor，uPAR)之间的相互作用有些有意义的证据[120]。PMN 中 αMβ2 共帽化于 FcγRIIIB 和 uPAR。FcγRIIIB 转染入成纤维细胞，不能介导 IgG 调理的颗粒吞噬，但当 αMβ2 共转染时，即发生 IgG 调理的吞噬[121]。FcγRIIIB 与 αMβ2 的协同性能量传递的证明也说明一种密切的交互关系，αMβ2 的共转染降低 GPI 连接的 FcγRIIIB 细胞膜的扩散也可说明这一点[122]。其他证据也支持 PMN 中 FcγRIIA 与 αMβ2 功能上和物理上的联系[113,123,124]。综合这些数据支持这样的假说，吞噬细胞效应机制中 αMβ2 不仅具有补体受体的功能，还可能是多种吞噬细胞质膜受体黏附和吞噬功能的基本成分(图 30.3)。

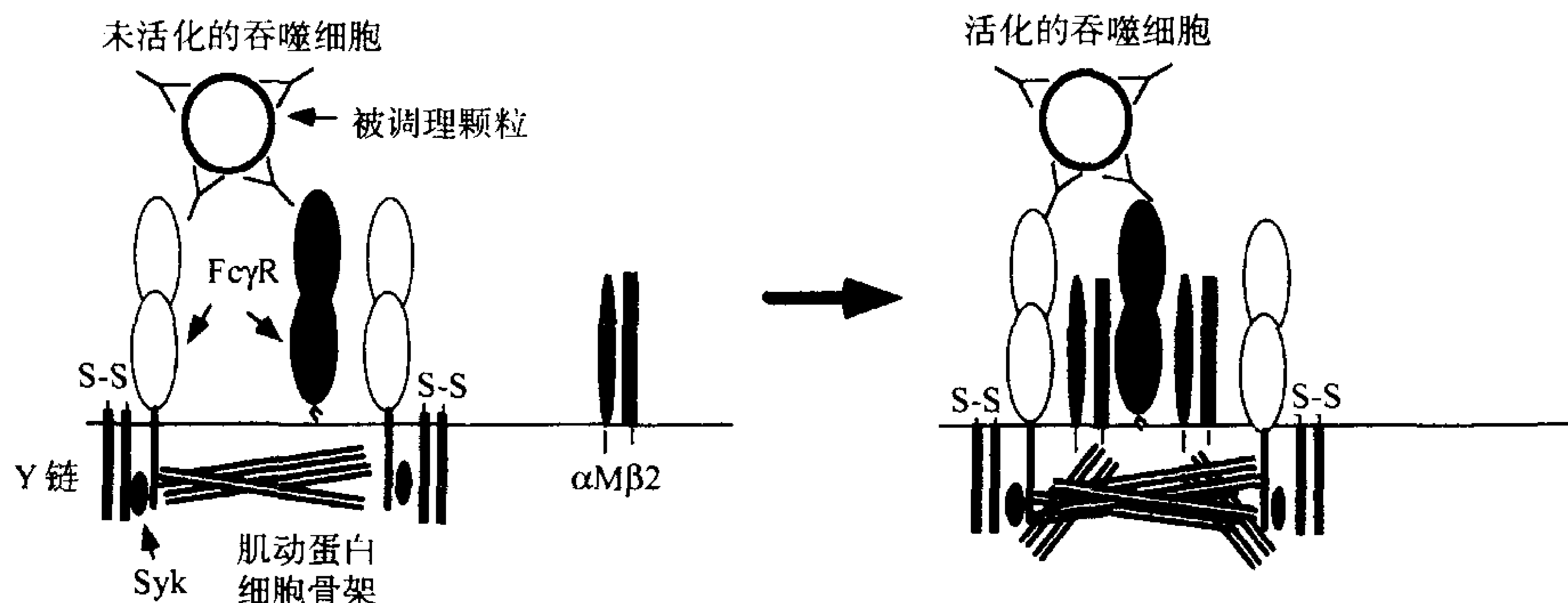


图 30.3 吞噬过程中 αMβ2 的作用。αMβ2 在吞噬中作为补体受体的功能虽然并未证实，这个吞噬细胞特异的整合素最可能的功能是使肌动蛋白细胞骨架和吞噬体质膜间更有效的相互作用。

1005

αMβ2 的另一个突出特征是认为多种受体与之结合，包括 ICAM-1、纤维蛋白原、X 因子、颗粒脂多糖、硫酸乙酰肝素、利什曼原虫(*Leishmania*)的脂肽多糖及 iC3b[125]。iC3b、ICAM、纤维蛋白原和 X 因子可与之直接结合，其他推断的许多配体是通过抗体抑制配体包被颗粒和表面的黏附而确定的。由于 Mac-1 在 PMN 黏附至任何表面明显的重要作用，配体结合研究的结果解释必须谨慎。

PMN 和单核细胞的 αXβ2(CR4、CD11c/CD18)较 αMβ2 少，但体外单核细胞和组织中单核细胞向巨噬细胞分化时表达上调。小鼠 αXβ2 的表达似乎限制在树突细胞[126]。同 αMβ2 一样，αXβ2 结合 iC3b 和纤维蛋白原，虽然没有证据表明它结合 αMβ2 的其他广谱配体。这2个整合素识别纤维原的位点不同[127,128]。虽然二者均能介导吞噬细胞黏附，似乎功能并不相同。比如，PMN 是通过 αXβ2，而不是 αMβ2 的黏附活化呼吸爆发[129]，

而在单核细胞跨内皮细胞迁移过程中，似乎 αXβ2 的作用较 αMβ2 更重要[130]。由于 αXβ2 和 αMβ2 的 β 链相同，功能上的不同被认为是明显不同的 α 链。然而，二者功能差异的分子基础缺少详细分析。

其他调理素受体

多种其他的调理素能够结合细菌和吞噬细胞，导致吞噬。主要的一类调理分子是胶原凝集素，是表达 1 个氨基端胶原质结构域，1 个颈状区，1 个球状 C 端 C 型凝集素结构域的可溶性分子[131]。所有胶原凝集素的共同特征是形成高度有序的寡聚体。比如甘露糖结合蛋白(MBP)，单链 32 kDa，循环中是 9 ~ 18 个单链组成寡聚体。寡聚体结合富含甘露糖的表面，如许多细菌的表面，允许 MBP 活化补体的经典和旁路途径[132~134]。据报道，MBP 无义突变导致的免疫缺陷，表现为频繁的细菌感染[135]。另一个胶原凝集素 C 活化蛋白(CRP)，结合其配体肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)的 C 糖后，能活化补体的经典和旁路途径[136]，且 CRP 可能有自己的细胞受体[137]。小鼠仅表达少量的 CRP，CRP 转基因的过量表达可保护肺炎链球菌血症和其他几个实验性炎症疾病[138~140]。

混入血块或 ECM 的血浆蛋白，有时能结合入侵病原体。比如，血纤蛋白原和纤连蛋白能结合多种链球菌(*streptococci*)，纤连蛋白能结合金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和多种分枝杆菌(mycobacteria)，玻连蛋白能结合卡氏肺囊虫(*Pneumocystis carinii*)[141]。与细菌的这些相互作用由于允许它们保留在组织中而常常被认为增强了致病性，但它们也能介导与吞噬细胞结合。事实上，纤连蛋白最初的描述之一是作为血清调理素介导变性胶原的清除。

凋亡细胞的吞噬

凋亡是正常胚胎发育和 T 淋巴细胞发育的典型特征，并可能是预防肿瘤发展的机制。另外，凋亡是炎症消退的一个正常组成部分，因为炎症位点的中性粒细胞迅速走向凋亡。巨噬细胞的作用之一就是能吞噬炎症消退[144]和胚胎形成[145]过程中产生的凋亡细胞，它通过受体直接识别和通过调理吞噬凋亡细胞(图 30.4)。

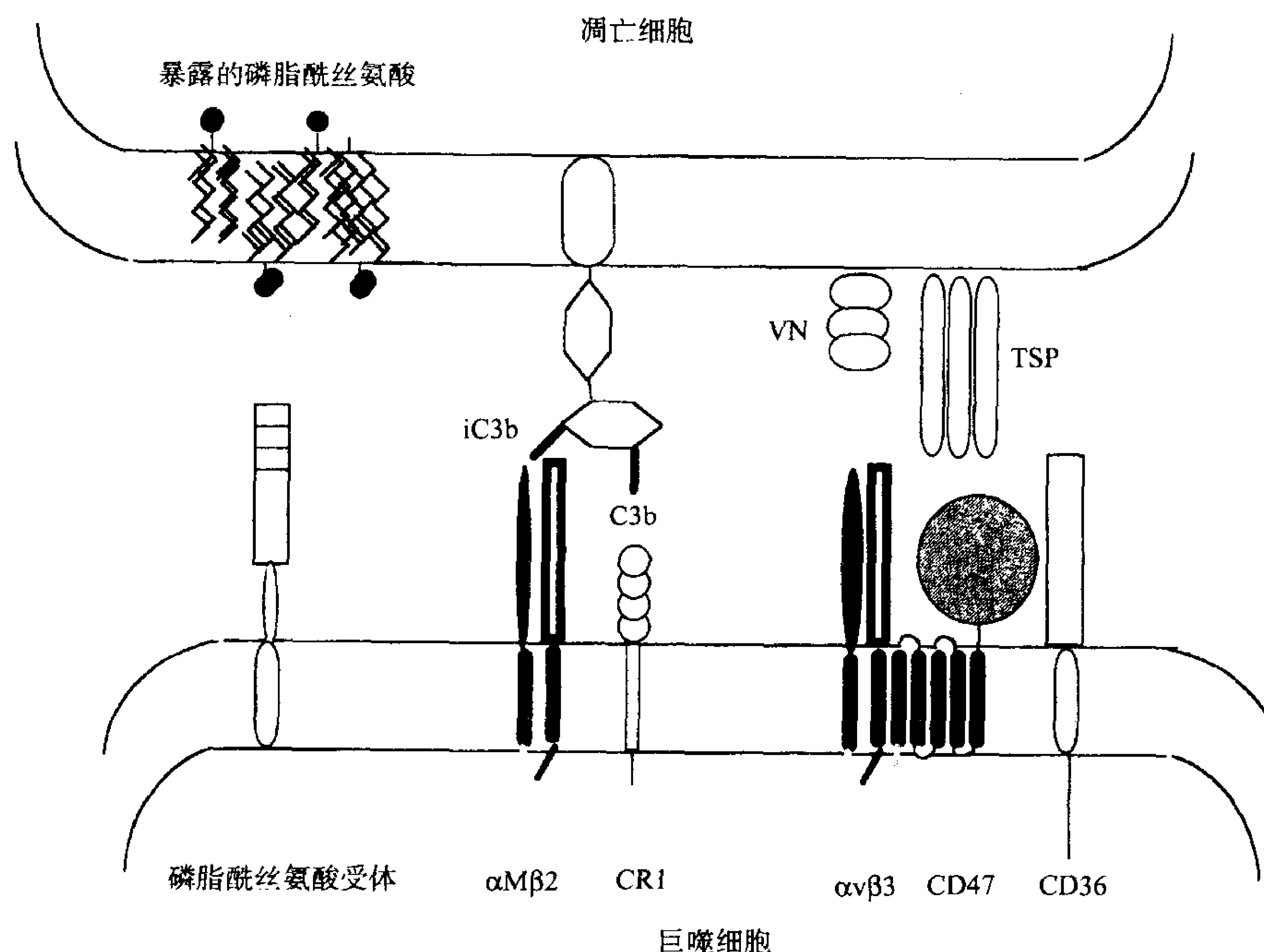
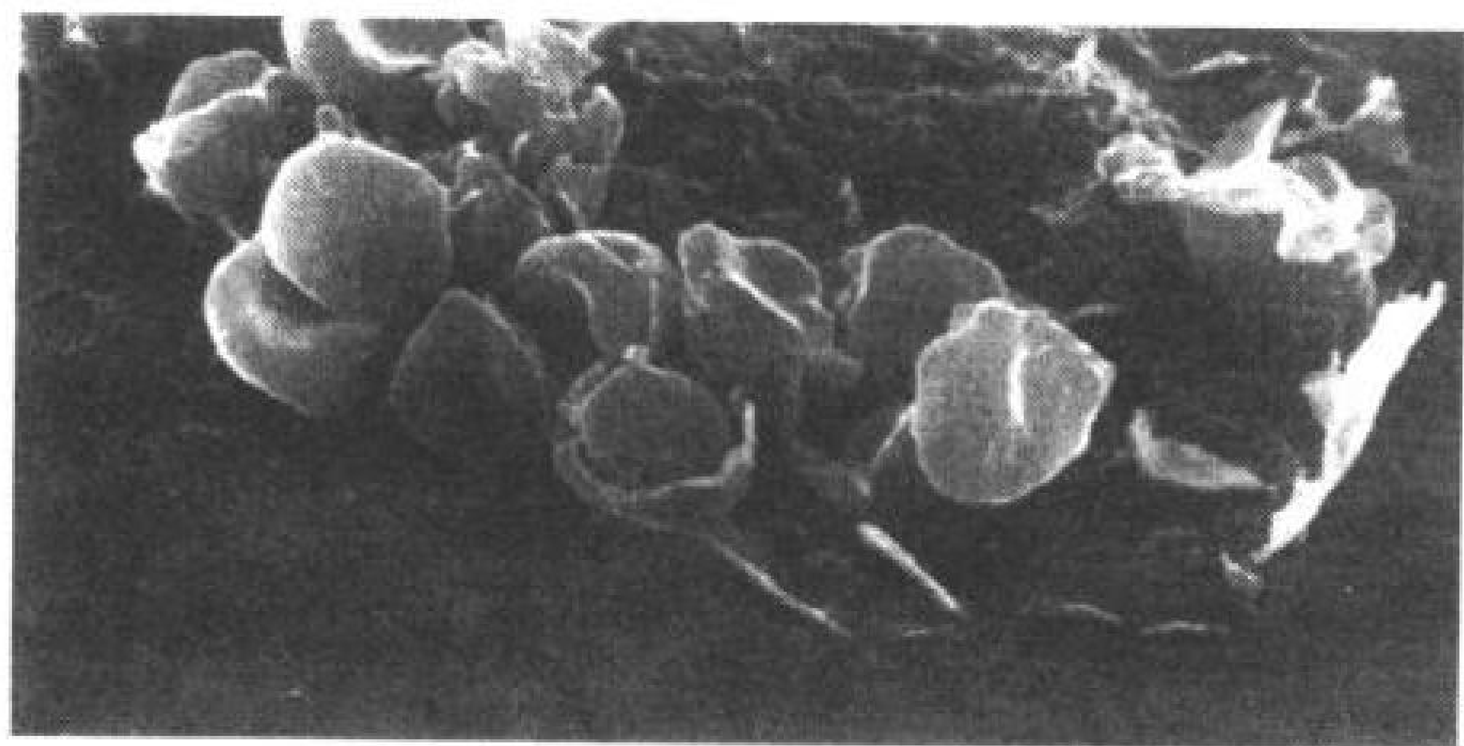


图 30.4　凋亡细胞的吞噬。巨噬细胞吞噬凋亡细胞的过程中某些重要的相互作用，包括识别磷脂酰丝氨酸[58]、玻连蛋白(VN)[146]、血小板反应蛋白(TSP)[147]以及识别由于细胞表面唾液酸丢失而沉积的 C3 片段[310]。

血小板源分子血小板反应蛋白(thrombospondin)常常是炎症位点 ECM 的一个组分,能够调理凋亡的 PMN,接着巨噬细胞的 CD36 和 αvβ3/CD47 复合物识别血小板反应蛋白调理的 PMN[146,147]。CD36 是清除剂受体超家族成员[61,148]。另外,巨噬细胞非调理性直接识别凋亡细胞质膜外侧的磷脂酰丝氨酸,和巨噬细胞吞噬凋亡的 PMN 和胸腺细胞有关[149]。但是识别磷脂酰丝氨酸的巨噬细胞受体未被鉴定。果蝇巨噬细胞结合凋亡细胞的受体已鉴定,叫做(*croquemort* 死亡捕捉器),结构上与 CD36 同源,但似乎是直接与凋亡细胞结合,而不是与血小板反应蛋白作用[150]。CD36 和视网膜上皮细胞上杆体外节的吞噬也有关[151]。CD36 家族可能是原始的吞噬细胞受体之一,而实际上吞噬的原始功能就是清除发育过程中的凋亡细胞和细胞碎片。吞噬,作为宿主防御的主要机制可能是后来的进化适应。凋亡细胞和入侵病原体的吞噬机制可能不同,比如与凋亡细胞吞噬有关的阴离子转运体在酵母的吞噬中明显无作用。

吞噬作用中的信号转导

二十多年前,Silverstein 等提出的吞噬模型引起了这一领域的大量研究。这个叫做拉链假说的模型指出,吞噬要求吞噬颗粒上的配体与吞噬细胞受体反复作用,在任何点形成新的相互作用将阻碍颗粒吞噬[154,155]。模型中吞噬细胞像拉链一样在吞噬颗粒上移动(图30.5)。质膜和吞噬对象在拉链的前沿紧密作用,而在吞噬杯底稍远。肌动蛋白微丝也在拉链前沿聚合、组装,在吞噬杯底则较少组装。支持这个模型的证据,包括吞噬细胞在吞入 IgG 包被颗粒,应用抗-受体抗体和通过成帽作用清除部分吞噬对象调理素的电镜观察[155](图30.6)。拉链模型的另一特征是涉及吞入的细胞膜定位非常局部。当未活化巨噬细胞(含非吞噬性补体受体)结合补体调理的红细胞和 IgG 调理的肺炎球菌时,只有 IgG 调理的细菌被吞噬,即使红细胞和肺炎球菌黏附在质膜的邻近区[156]。虽然许多细节被修饰和扩充,拉链模型的基本方面至今仍被接受。它的意义在于,首先配体结合的吞噬细胞受体和其下的细胞质及细胞骨架之间的通讯是连续的,第二这种通讯受空间和动力学限制,因此吞噬作用的信号不会通过质膜扩大。模型的第三个意义是,由于信号传递是时空限制的,吞噬的信号转导途径可能与从质膜向细胞核,如激素或生长因子受体结合,传递的信号不同。对于这些受体,质膜启动的信号转导的最终结果几小时内可能不会发生;而吞噬过程中细胞骨架和膜重排在几分钟内就完成。



1006 图 30.5 巨噬细胞吞噬 IgG 调理的绵羊红细胞的扫描电镜图。IgG 调理的靶细胞加入巨噬细胞后 30 分钟,吞噬过程与拉链假说一致,注意与红细胞结合的吞噬细胞膜近距离并置,巨噬细胞伸出伪足包围靶细胞。(来自参考文献[244],照片由 N. Araki 友好提供。)

1007

拉链假说是否能解释所有的吞噬作用仍有争议。比较 IgG 介导和补体介导的吞噬,早期研究提示其超微结构明显不同[157]。拉链的一个重要组分——伪足的伸出,在补体介导的吞噬和受损红细胞的吞噬中不明显[158]。对细胞松弛素 D 和秋水仙素不同敏感性说明,IgG 介导的吞噬比补体介导的内在化更依赖于肌动蛋白微丝,而补体介导的吞噬对微管抑制剂更敏感。这些研究早于对 Fcγ 和补体受体多样性的阐明。更近的研究证明,αMβ2 是吞噬作用的重要补体受体,αMβ2 和 FcγR 介导的吞噬中细胞骨架和信号分子在吞噬体中分布不同进一步证实和延伸了这一观点。

显然,并不是吞噬细胞表面的所有这种分布差异对于吞噬的细胞生物学意义不清楚。分子都介导吞噬。由于吞噬细胞受体必须向细胞骨架成分和调节细胞骨架组装的信号分子传递信号,但是比较介导吞噬的受体胞质区并没有显示与颗粒吞噬有关的共同氨基酸基序。

吞噬作用中酪氨酸激酶信号

FcγR 介导的吞噬是理解吞噬信号转导的主要范例。FcγR 家族是结合配体的跨膜蛋白,胞外区高度同源,但是胞内序列常常明显不同。介导吞噬的这个家族成员(FcγRI、FcγRIIA和FcγRIIIA)均能扩大酪氨酸激

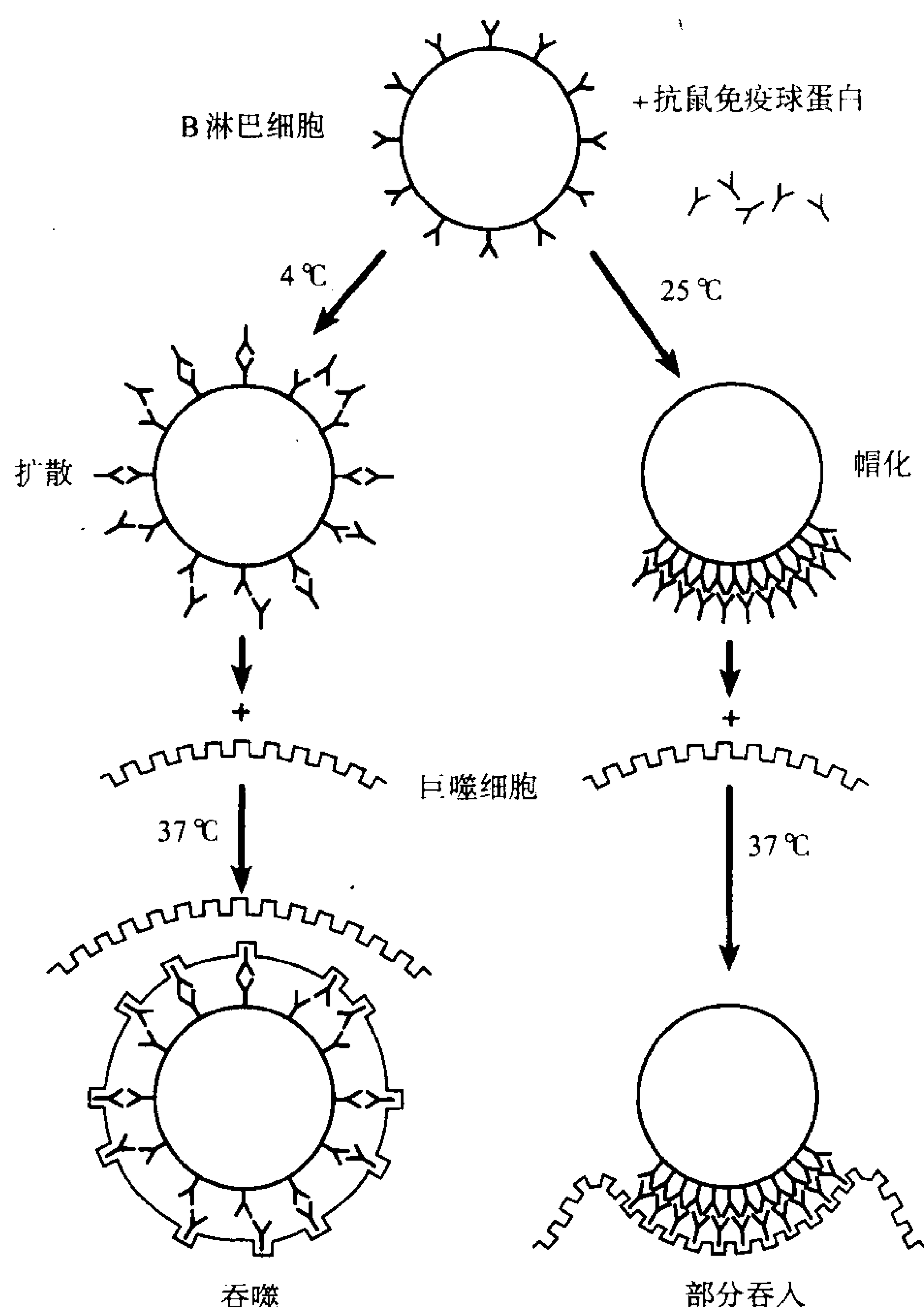


图30.6 拉链式吞噬需要吞噬细胞与吞噬对象之间连续相互作用。图示 Griffin 和 Silverstein 的经典试验[154]。当淋巴细胞周围被调理,即发生吞噬;当淋巴细胞被调理素帽化,巨噬细胞可识别、结合,但不能吞噬。

酶级联,至少部分是通过结合 γ 链二聚体。γ 链磷酸化后能活化酪氨酸激酶 syk;FcγRIIA 胞质尾的 ITAM 类似序列可能也有此作用[80]。吞噬要求 syk 活化[86],sky 聚集直接活化而诱导吞噬和肌动蛋白多聚化[160]说明这是启动 FcγR 介导吞噬的关键。吞噬作用中 syk 及肌动蛋白多聚化的下游效应分子仍未知。有证据表明 FcγR 介导的吞噬与磷脂酰肌醇-3 激酶有关[161],并且磷脂酰肌醇-3 激酶能被酪氨酸激酶信号活化。由于磷脂酰肌醇-3 激酶能影响整合素和肌动蛋白聚合而调节细胞的形状[162,163],可能是诱导吞噬的信号级联中的重要中介分子。 1008

FcγR 偶联后磷脂酶 Cγ(PLCγ)也活化作为 syk 活化的下游效应[84]。导致产生 IP3 和二酰基甘油(DAG),前者导致胞内 Ca^{2+} 释放进入细胞质,后者活化多种 PKC 同种型。PKC 活化是吞噬所要求的[164~166]。PKC-α 迅速结合初级吞噬体并贯穿至成熟[166]。巨噬细胞中 PKC 的主要底物豆蔻酰化富丙氨酸 C 激酶底物(myristoylated alanine-rich C-kinase substitute, MARCKS)和 MacMARCKS,可能与吞噬体形成中肌动蛋白组装的调节有关[167]。由于 PKC 的药理活化剂 PMA(phorbol myristate acetate),能够诱导未活化细胞 αMβ2 的吞噬能力,活化的与未活化的 αMβ2 差异可能在于募集 PKC 至初生吞噬体的能力不同。

吞噬过程中 PLCγ 活化的另一结果,胞内 Ca^{2+} 浓度增加的重要性更有争议。虽然有些研究报道,细胞的正常吞噬在胞内 Ca^{2+} 浓度非常低时减缓,另有报道在同样条件下被抑制[83,168,169]。造成这种差异的原因可能在于吞噬是否与 αMβ2 募集有关[170]。当仅有 FcγR 参与吞噬,胞内 Ca^{2+} 浓度增加是不重要的。然而,炎症位点的吞噬细胞被刺激至最大吞噬能力时,FcγR 介导的吞噬要求 αMβ2[111],Ca^{2+} 浓度增加对于最大刺激的吞噬可能是必须的。不同的吞噬机制对胞内要求不同的 Ca^{2+} 浓度原因仍未知。Ca^{2+} 能调节 PKC 活化、肌动蛋白与多种结合蛋白的相互作用和钙调蛋白依赖的过程,包括与肌球蛋白 I 的相互作用[171],其中任一过程对本底的和刺激后的吞噬可能要求均有不同。胞内 Ca^{2+} 的增加与吞噬相关时,如通过 PAF 或甲酰化细菌肽刺激

IgG 介导的吞噬,从胞内 Ca^{2+} 库释放 Ca^{2+} 的刺激物必须在初生吞噬体中产生,距吞噬对象一定距离产生的胞内 Ca^{2+} 库释放信号是不能替代的[170]。而且,吞噬细胞内 Ca^{2+} 库重新分布集中于形成吞噬体的周围[172]。这些事实强调了信号的局部性以及吞噬作用信号的时空性。

吞噬过程中除 PLCγ 外磷脂酶也起着重要作用。磷脂酶 D(PLD)裂解磷脂,特别是磷脂酰胆碱裂解为磷脂酸和胆碱。PLD 活性与补体受体介导的吞噬密切相关,似乎也是必须的[165,173,174]。酪氨酸级联和 7 跨膜区受体可协同增强 PLD 活性说明炎症位点包括黏附、趋化因子、补体和细菌肽的多种信号,调节迁移至该位点吞噬细胞的表型。但 PLD 活化产物如何影响吞噬仍未知。可能是 PLD 产生的磷脂酸提供另一来源的二酰基甘油以活化 PKC。

磷脂酶 A2(PLA2)从多种磷脂的 R2 切下脂肪酸。药理学实验显示特殊的 PLA2 同种型在吞噬中起重要作用[175]。这种 PLA2 不同于主要在花生四烯酸(arachidonate)至环加氧酶和白细胞三烯途径起作用的 PLA2。吞噬细胞的 PLA2 不依赖于 Ca^{2+},最适底物为磷脂酰丝氨酸,并被 PKC 活化[176,177],与内体 - 内体融合有关[178],并介导最终的膜融合以形成吞噬体从质膜脱离(图 30.2),在初生吞噬体的囊泡融合中可能也起作用[178]。

并不清楚 FcγR 介导吞噬的这些信号途径与补体介导吞噬的相关程度。与 FcγR 不同,补体受体不是酪氨酸磷酸化,因此明显与酪氨酸级联的启动或扩大无关。然而,αMβ2 可能与吞噬细胞中叫做 pyk2、cakb 或 raftk 的酪氨酸激酶结合[179,180]。吞噬过程中这种相互作用的意义未知。补体介导的摄取的确要求 PKC 活化。

吞噬作用中的细胞骨架

吞噬作用中肌动蛋白细胞骨架

肌动蛋白细胞骨架是吞噬作用信号转导的直接目标。白细胞的一个重要特征——活化时能迅速改变细胞形状,对于吞噬来说很关键。肌动蛋白细胞骨架对于细胞黏附、移动和吞噬颗粒所必须的细胞膜改变至关重要。肌动蛋白细胞骨架在膜形状改变的效应功能上的作用有两方面。第一,肌动蛋白细胞骨架提供了一个机械框架以完成膜形状改变。同时,伪足、牌板(lamellae)、丝足(filopodia)或吞噬体形成时驱动细胞膜伸展,浓缩的动力并没有完全阐明,有证据表明肌动蛋白-肌球蛋白复合物为此提供动力[182]。第二,肌动蛋白细胞骨架调节信号转导,对效应细胞表型的发展至为重要。细胞骨架作为一个台架使表面受体、可活化的酶及其底物靠近。细胞骨架的双重作用被以下发现阐明,去聚合剂如细胞松弛素 D,不仅抑制细胞形状改变,比如吞噬作用中细胞形状改变[183],而且抑制受体偶联启动的信号,比如 FcγR 与免疫复合物结合诱导的胞内钙浓度上升[184]。

显然,肌动蛋白纤丝组装和去组装是吞噬过程的基础,但是吞噬过程中肌动蛋白细胞骨架的组装和调节的分子细节并未确定。然而,来自其他白细胞其他细胞的信息可能与吞噬过程非常相关,而且在吞噬作用的

1009

拉链模型首次提出的几年里,吞噬过程中细胞骨架的调节模型即开始出现。成纤维细胞以整合素介导黏附至胞外基质时,细胞骨架和质膜相互作用的部位形成黏着斑结构[185]。黏着斑是成纤维细胞与其黏附底物最紧密接触的一些点。这些点可能与拉链作用中吞噬细胞膜与吞噬对象之间的紧密接触点类似。在黏着斑的胞质面,整合素受体通过几个蛋白与肌动蛋白纤丝相互作用,包括黏着斑蛋白、踝蛋白、α-肌动蛋白和细丝蛋白(filamin)[185]。

黏着斑也是信号分子集中的位点,如酪氨酸和丝氨酸-苏氨酸激酶和磷酸酶、脂激酶和 sGTPase[185,186]。有可能白细胞也形成相应结构。黏附的吞噬细胞与其底物有多个紧密接触点,叫做足体(podosome)。足体的特征是 F 肌动蛋白点状聚集,包含整合素的集聚以及在黏着斑发现的多种肌动蛋白结合蛋白的集聚[187,188]。但是足体形态上明显不同于黏着斑。比如,白细胞很少使压力纤维——F 肌动蛋白成簇,后者终止于成纤维细胞的黏着斑。底物黏附与吞噬是否为等同的过程并不清楚。吞噬过程中黏附靶颗粒是关键的一步,黏附的吞噬细胞形成的细胞骨架结构在形态和分子组成上和吞噬细胞杯中形成的相似[159]。许多细胞

骨架分子在吞噬细胞杯和吞噬体中被鉴定，也在黏着斑和足体中发现，如 α 肌动蛋白、L 丝束蛋白（L-plastin，LPL）、踝蛋白（talin），黏着斑蛋白（vinculin）和桩蛋白（paxillin）（表 30.4）。这些形态学研究有助于确定吞噬作用中潜在相关的细胞骨架成分。虽然吞噬过程中细胞骨架调节缺乏细节研究，基于其他系统的研究工作，提出了五步模型。

表 30.4　吞噬体相关的细胞骨架和信号蛋白

细胞骨架蛋白	吞噬对象	参考文献
F-肌动蛋白	COZ[a]，IgG-LB[b]，LB[c]，志贺氏菌[d]	[159]、[299]、[300]
黏着斑蛋白	COZ，IgG-LB，志贺氏菌	[159]、[300]
桩蛋白	COZ，IgG-LB，IgG-E[e]志贺氏菌	[159]、[236]、[300]
α-肌动蛋白	COZ，IgG-LB，LB，志贺氏菌	[159]、[299]、[300]
踝蛋白	COZ，IgG-LB，IgG-E，志贺氏菌	[159]、[300]、[301]
MARCKS，MacMARCKS	COZ，IgG-LB	[159]、[221]
膜突蛋白	LB	[299]
L-丝束蛋白	LB	[299]
T-丝束蛋白	志贺氏菌	[302]
α-微管蛋白	LB	[299]
β-微管蛋白	LB	[299]
cortactin	志贺氏菌	[303]
肌球蛋白 I	COZ	[166]
PKCα	COZ	[166]
钙网蛋白	LB	[299]
钙联接蛋白	LB	[299]
Rab5、rab7	LB	[299]
Rap1	LB	[299]
$G_{\beta1}$、$G_{\beta2}$	LB	[299]
BiP	LB	[299]
膜联蛋白 II、VI	LB	[299]

[a] 补体调理的酵母。[b] IgG 调理的乳胶珠。[c] 未调理的乳胶珠，许多未鉴定蛋白也与乳胶珠诱导的吞噬体有关。[d] 志贺氏菌侵入是整合素 α5β1 介导的。[e] IgG 调理的绵羊红细胞。

1. *F-肌动蛋白成核和肌动蛋白聚合*。当靶颗粒开始接触吞噬体膜，肌动蛋白迅速聚合是早期事件之一。与拉链假说一致，伪足顶端活化的肌动蛋白聚合先于包围靶颗粒。虽然多年来已知吞噬作用要求肌动蛋白聚合，吞噬细胞中肌动蛋白聚合是如何调节的仍未知。小 GTP 酶（small GTP 酶，sGTP 酶）rac 、rho 及 cdc42 在吞噬功能调节中的重要性近 10 年才被认识[189]。多种细胞中，包括吞噬细胞，这些鸟苷三磷酸（GTP）水解酶协同细胞黏附、肌动蛋白纤丝聚合[190~192]。cdc42、rac 和 rho 对生长因子刺激以等级方式活化[193]。组成性活化的 cdc42 和 rac 的表达分别导致丝足伸展和膜皱缩。在表达组成性活化 cdc42 和 rac 的细胞中少量的点状肌动蛋白聚合形式明显不同于黏着斑，与黏附的吞噬细胞中的足体相似[193,194]。rho 活化诱导压力纤维和经典的黏着斑形成[195]。由于吞噬作用有许多特征与黏附相同，这些结构和调节它们的 GTP 酶很可能与吞噬过程高度相关。然而，这一假说仍没有实验分析公开发表。实验显示 GTP 酶活化 p21-活化激酶或 pak 的丝氨酸-苏氨酸激酶[196,197]。pak 是在控制肌动蛋白细胞骨架组装，还是在 rac 介导的压力蛋白激酶如 p38 和 jun 激酶的活化中更重要仍未确定[198,199]。Pak1 组成型活化形式——rac/cdc42 活化的丝氨酸-苏氨酸激酶的表达，导致细胞膜皱缩以及肌动蛋白在片状伪足（lamellipodia）聚集和成纤维细胞中形成大量黏着斑类似的复合物[200]。虽然这些分子在吞噬中的作用并未确定，FcγR 偶联诱导 pak1 活化动力学与 PMN 中吞噬作用动力学相似，并且 pak1 活化与 αMβ2 介导的黏附活化相关[200a]。

1010

sGTPase 调节多种肌动蛋白细胞骨架结构形成的机制同样未知。然而用可渗透的血小板模型研究显示，活化的 Rac 通过 D3 和 D4 磷脂酰肌醇的合成诱导肌动蛋白纤丝刺端解聚[201]。D4 磷脂酰肌醇结合加帽蛋白和肌动蛋白凝溶胶蛋白（gelsolin）抑制其加帽活性，暴露作为成核区的肌动蛋白纤丝刺端[202,203]。有关 GTP-结合蛋白的相似途径也导致 PMN 中纤丝解聚和肌动蛋白聚合。肌动蛋白凝溶胶蛋白以钙依赖方式切断肌动

蛋白纤丝，产生自由刺端。PIP2 调节 ADF/cofilin-和肌动蛋白抑制蛋白（profilin）-G 肌动蛋白结合[205,206]，激动剂诱导的 PIP2 增加促进肌动蛋白聚合[201]。另外，特异性结合 PIP2 并定位于吞噬体膜的踝蛋白使肌动蛋白成核并锚定肌动蛋白纤丝至细胞膜[207]。因此，吞噬作用的早期事件可能是 sGTPase rac 和 cdc42 及 PI3-激酶活化，后者反过来活化肌动蛋白聚合。应当强调，这个模型提供了有关外部刺激时调节肌动蛋白纤丝聚合机制的假说，但与吞噬作用的相关性没有实验证实。

2. *F-肌动蛋白结合吞噬体膜*。新组装的 F-肌动蛋白必须与质膜相互作用，以提供靶颗粒吞噬所需的动力。至少有两个机制将肌动蛋白纤丝锚定至吞噬体膜：①通过 MARCKS 或 MacMARCKS，下面将详细描述。②通过与肌动蛋白结合蛋白如 α 肌动蛋白、肌动蛋白细丝蛋白（filamin）和踝蛋白（talin）-黏着斑蛋白（vinculin）复合物偶联整合素 β 链胞质尾[185]。这个机制可能部分说明 FcγR 介导的吞噬中 αMβ2 的重要性。

3. *F-肌动蛋白组装的调节*。结合吞噬体的细胞骨架复合物，其三维结构的动力学调节是复杂的。吞噬细胞杯的伪足中肌动蛋白纤丝与几个肌动蛋白交联蛋白，如 LPL、ABP-120 和 α-肌动蛋白交联，平行排列[208,209]。在吞噬杯底，肌动蛋白纤丝较少整齐排列。吞噬体细胞骨架中发现的肌动蛋白结合蛋白，如 LPL、黏着斑蛋白（vinculin）、cortactin、ABP-120、α-肌动蛋白、MARCKS、膜突蛋白（moesin）、和细胞绒毛蛋白（埃兹蛋白 ezrin），调节纤丝和结合 F-肌动蛋白的细胞膜的稳定性。包围补体-和 IgG-调理颗粒的吞噬体，其细胞骨架体系不同说明对于补体受体和 FcγR 偶联的反应，肌动蛋白纤丝组装的调节也是不同的。IgG 和补体同时调理相对于各自单独调理，导致的吞噬作用明显增强[210]，确信最佳的吞噬功能同时要求 IgG 和补体受体的信号。这种协作可能部分是通过吞噬体细胞骨架的协同调节起作用的。

4. *信号蛋白定位于吞噬体*。吞噬体膜的细胞骨架结构可能与黏着斑相似，因为它们形成了一个信号分子如蛋白激酶和磷酸酶、脂修饰酶以及许多接头和调节性蛋白集聚的台架，这些对于吞噬的协同作用是重要的。细胞骨架的这个功能提供了一个机制，使吞噬细胞受体、可活化的酶及其底在形成吞噬体的位点靠近。由于吞噬过程中多个连续的受体偶联事件必须发生（图 30.5），单个受体偶联产生的信号不足以启动这个过程。因此，吞噬的分子事件必须局部调节，每个受体耦联产生的信号限制在受体附近。所以，类似于吞噬过程中形成足体的细胞骨架结构允许分子局部化使得进一步形成吞噬体。

5. *产生吞入必需的动力*。有三个模型可能解释产生吞噬过程中伸出伪足和吞噬颗粒要求的动力[211]。第一个模型预测，肌动蛋白聚合产生的动力足以导致伪足和片层伪足伸出。活化的肌动蛋白聚合发生在伪足伸出之前的事实支持这个模型。然而，这个模型不能解释吞噬体内在化所要求的收缩力。第二个模型预测，吞噬体中肌动蛋白聚合时产生的渗透力使细胞膜膨胀突出。然而，几乎没有支持这个模型的证据。第三个模型预测，肌动蛋白-肌球蛋白复合物产生的动力驱动吞噬。来自网柄菌（*Dictyostelium*）的遗传证据，证明肌球蛋白 I 在这一过程中的重要作用[182]，但是其他非经典的肌球蛋白可能也参与。这些模型没有相互排斥，综合第一和第三个模型对解释产生吞噬必需的动力可能是重要的。

基于吞噬过程中的细胞骨架作用模型，某些肌动蛋白结合分子和信号分子可能在吞噬中起关键作用。下面详细阐述这些蛋白质。

L 丝束蛋白

L 丝束蛋白（LPL）是 65kDa 的肌动蛋白成束蛋白，也叫微丝结合蛋白（fimbrin），在白细胞、胚胎内胚层和转化细胞中表达[212,213]。两个很相近的同种型，I 丝束蛋白和 T 丝束蛋白，分别在上皮和实体组织表达[212,214]。酵母、小鼠、大鼠、人和鸡的丝束蛋白序列高度保守，提示进化上功能的保守。LPL 定位于吞噬细胞的吞噬杯、吞噬体和足体，但 LPL 在这些过程中所起的作用不清楚。对 LPL 功能的理解大多从丝束蛋白无义突变的酵母表型推断而来[215]。丝束蛋白无义突变细胞中 α 因子内在化削弱，表明与吞噬过程相似的酵母肌动蛋白依赖的受体介导的胞吞作用中，丝束蛋白是关键。在丝束蛋白无义突变或者是抑制丝束蛋白结合的肌动蛋白突变的酵母中，肌动蛋白纤丝不稳定[216]。

由于多种激活剂，特别是造成那些需要能迅速调节肌动蛋白细胞骨架的细胞形状变化、移动、黏附和（或）吞噬的刺激，使细胞活化时 LPL 氨基端可调节区磷酸化，丝束蛋白中它是独一无二的[217~220]。可以推

测,LPL磷酸化提供了另一个调节LPL功能的机制,但缺乏支持该假说的直接证据。LPL的磷酸化动力学同PMN中IgG调理颗粒的吞噬和免疫复合物包被表面的黏附,以及整合素αMβ2的活化相关[217]。因此,LPL可能对吞噬中F-肌动蛋白纤丝的形成和稳定性是重要的。

MARCKS

MARCKS及其家族成员MacMARCKS与巨噬细胞活化和吞噬有关[166,221]。实验发现MARCKS和MacMARCKS均和巨噬细胞中吞噬体的形成以及成纤维细胞中质膜和溶酶体间的循环相关[159,166,222]。转染显性的阴性MacMARCKS的J774巨噬细胞不能吞噬酶原,但受体介导的胞吞持续在正常水平[222]。显性的-阴性突变表达也抑制整合素介导的黏附培养板及免疫复合物包被的表面,二者均要求整合素αMβ2[221]。MARCKS交联肌动蛋白纤丝[223]并通过十四烷酰化位点和叫做效应结构域的高度碱性区与质膜相连[224],为肌动蛋白纤丝以可调节方式锚定至质膜提供了一个机制。MARCKS和MacMARCKS是PKC的特异底物。PKC活化使效应结构域的丝氨酸磷酸化并抑制MARCKS结合细胞膜和MARCKS与肌动蛋白交联的活性,使MARCKS和肌动蛋白纤丝从细胞膜释放[225]。MARCKS磷酸化调节细胞膜-肌动蛋白的连接可能解释PKC抑制剂阻断吞噬的现象[166]。钙离子存在时钙调蛋白结合效应结构域也抑制肌动蛋白的交联,但不抑制膜与结合[223]。于是提出了一个模型[226],未活化细胞的MARCKS介导肌动蛋白纤丝与细胞膜的交联和结合,并定位于纤丝。一旦PKC活化,MARCKS磷酸化,纤丝从细胞膜释放。MARCKS去磷酸化可与膜重新结合,但细胞活化诱导瞬时的钙浓度诱导钙调蛋白结合。这种条件下,MARCKS结合,但不交联肌动蛋白纤丝,为肌动蛋白纤丝与细胞膜提供一个锚定点。因此,MARCKS和MacMARCKS对调节肌动蛋白纤丝与细胞膜的结合起重要作用。

肌球蛋白

肌球蛋白的作用主要集中在作为分子发动机——调节细胞运动和吞噬,是由于肌动蛋白在其中有重要作用。肌球蛋白长时间被认为定位于PMN和巨噬细胞的吞噬杯[227,228]。然而,肌球蛋白家族的多样性使得难以研究特异性肌球蛋白的功能。肌球蛋白由非常大的蛋白家族组成,至少有11个亚族[229]。丝状肌球蛋白II或者肌肉肌球蛋白,在非肌肉细胞包括白细胞中存在,但吞噬杯或移动伸出的伪足中不存在[230]。突变的网柄菌,缺少肌球蛋白II或者表达截断蛋白,完全能够趋化和吞噬[231,232]。相对而言,非肌肉肌球蛋白很可能是调节吞噬过程细胞膜改变的代表分子。肌球蛋白I是研究最多的非传统的非肌肉肌球蛋白。多个基因编码不同的肌球蛋白I,且单一组织中可能不只一个基因表达[233]。肌球蛋白I以高度保守的单个球状帽为特征,它们有不相关的尾部,均含有一个肌动蛋白结合位点和一个结合酸性磷脂的碱性区,可能调节细胞移动和吞噬时肌动蛋白肌球蛋白与细胞膜的结合[233,234]。

在小鼠巨噬细胞系J774、小鼠骨髓源巨噬细胞和人外周血白细胞中发现肌球蛋白I同种型[229]。非白细胞的免疫定位研究显示肌球蛋白I主要集中在细胞延长部分,如丝足、片层伪足和生长锥(growth cones)[235]。肌球蛋白I集中在吞噬杯,特别是腹膜巨噬细胞中伪足末梢,而不是吞噬体,以及网柄菌移动时的片层伪足和吞噬过程中的吞噬杯[230]。这些数据说明肌球蛋白I的作用在于膜结构延伸。网柄菌中肌球蛋白I的功能遗传学分析显示肌球蛋白I的两个同种型,myoB和myoC,在吞噬中起重要作用[182]。任一基因的缺失造成吞噬的明显缺陷,二者同时缺失没有进一步抑制吞噬,说明每个基因产物的作用不同,两个肌球蛋白I顺序起作用。同样肌球蛋白I对脊椎动物吞噬可能有作用,但没有数据显示肌球蛋白I的同种型与脊椎动物的吞噬有关。

桩蛋白

桩蛋白是广泛表达的68kDa蛋白,定位在细胞膜变化时的肌动蛋白细胞骨架,整合素介导的黏附和吞噬时其酪氨酸和丝氨酸磷酸化[236~238]。桩蛋白与黏着斑的几个重要的信号分子结合,包括黏着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)、crk和src,但自身缺少任何酶活性,说明它是接头分子,调节细胞骨架的信号转导[185,239]。桩蛋白可能是结合黏着斑蛋白和FAK募集至肌动蛋白细胞骨架[185,239]。

桩蛋白定位于黏附的巨噬细胞和PMN中的足体,巨噬细胞的吞噬杯[159,236]。黏附细胞的整合素偶联使其酪氨酸磷酸化并定位于肌动蛋白细胞骨架[240~243]。吞噬杯中发现有桩蛋白,并在FcγR诱导的IgG-调理颗

粒的吞噬时酪氨酸磷酸化，桩蛋白的酪氨酸磷酸化要求β2整合素，即使没有明显的β2配体存在[116,117]。β2整合素缺少时，免疫复合物黏附还是IgG包被颗粒的吞噬均不能诱导桩蛋白酪氨酸磷酸化，可能解释FcγR介导的吞噬和黏附对β2整合素的要求，需要肌动蛋白为基础的细胞膜变化的事实。

吞噬体的形成与融合

1012

吞噬对象附着于吞噬细胞膜后，迅速内在化。内在化需要肌动蛋白细胞骨架，以下讨论它的启动、扩大和调节模型。吞噬体形成最终要求膜融合(图30.2)。对膜融合的了解很少，但有证据表明需要胞内不依赖于钙的PLA2[176]和磷脂酰肌醇-3激酶[244]。的确，吞噬的细胞质膜表面区变化很少，说明吞噬过程中胞内膜向细胞表面的传递速率增加。吞噬时脂合成增加与摄取时细胞膜充盈相一致[245]。

吞噬体形成过程中，胞内囊泡也发生的一系列融合。这一过程的模型多数归于不依赖细胞骨架的液体胞吞过程的详细理解[246,247]。然而，不像内体成熟的依次过程，配体内在化后20分钟内，内体-溶酶体融合不会发生，而吞噬体与溶酶体的融合相当迅速。事实上，溶酶体开始与吞噬体融合先于吞噬体从质膜脱离[248]。同时也有不同成熟状态的内体与吞噬体融合。内体-吞噬体融合不依赖吞噬常伴随的胞内Ca^{2+}浓度增加，而吞噬体-溶酶体融合是否依赖钙仍存在争议[249,250]。吞噬体-内体融合要求的许多分子与内体-内体融合所要求的分子一致[247]。

吞噬体迅速成为一个酸性器，在整个胞吞过程的囊泡中富集蛋白酶。另外，对清除病原体很重要的PADPH氧化酶和一氧化氮合成酶与吞噬体结合[251]。因此，吞噬体是专门清除吞噬物质的细胞器。为对抗这种杀伤机制，许多胞内病原体进化了抑制吞噬体成熟的能力，将在以下详细讨论。吞入后，吞噬体从细胞外围移向核周围区域。胞内迁移的意义不清楚。

吞噬作用的调节

同许多基本的免疫过程一样，吞噬作用在吞噬细胞中是一个受到高度调节的功能。由于吞噬常伴随组织损伤，如溶酶体酶的释放，以及高能量的氧和氮代谢，将这一过程主要限制在感染或炎症位点是合理的。因此，静止、循环的吞噬细胞仅有最低限度的吞噬能力，接触其他信号，如细菌肽、补体片段、凝血蛋白、花生四代谢物或其他炎症位点的优势分子后，才会发展为完全的吞噬能力。

细胞因子和胞外基质对吞噬的调节

如以上讨论的一样，炎症位点吞噬的刺激依赖于吞噬细胞特异的整合素αMβ2。未活化细胞的αMβ2处于不能黏附的基础态。多种信号中任一种刺激细胞后，αMβ2达到活化态，此时可较强黏附至配体包被的表面[252]。αMβ2活化至少增强吞噬细胞黏附至吞噬对象，可能也有其他的信号影响。αMβ2缺乏时，循环吞噬细胞不能活化为完全吞噬能力，并且某些受体，如CR1(CD35)，即使有最适宜的刺激也不能诱导吞噬。细胞因子刺激的吞噬能力与αMβ2介导的黏附活化接近。诱导吞噬细胞黏附的细胞因子将刺激吞噬，包括G-CSF、GM-CSF和TNF-α[253]。对αMβ2活化的分子机制了解很少，但可能诱导酪氨酸激酶级联和PI3激酶[254]。

增强PMN和单核细胞吞噬速率和范围的主要机制是黏附ECM蛋白。这是正常吞噬细胞了解它们处于血液外的方法，在感染或损伤位点获得完全吞噬能力。ECM蛋白增强吞噬的信号似乎是许多这类蛋白中存在的一个短肽——Arg-Gly-Asp。含有Arg-Gly-Asp的蛋白可能与多种整合素相互作用，αvβ3整合素是吞噬细胞对这些蛋白反应而活化的关键分子。PMN和巨噬细胞表面都表达αvβ3整合素。深入研究了αvβ3活化PMN的信号转导机制。αvβ3介导PMN活化的信号至少需要一个W.E膜蛋白，免疫球蛋白超家族成员、整合素相关蛋白(integrin-associated pro/tein，IAP，CD47)[256]。IAP和αvβ3物理上的相互作用产生的信号复合物最终导致αMβ2活化[257,258]。某些微生物利用αvβ3与αMβ2整合素之间的联系侵入单核细胞，如百日咳杆菌[259]，它的丝状血凝素表达的RGD结合αvβ3/IAP及一个未完全鉴定的位点结合αMβ2。细菌通过与αvβ3/IAP相互作用附着单核细胞，活化αMβ2为高亲和力状态，使细菌与单核细胞能够牢固黏附以及附着微生物

的吞噬。相似的机制在巨噬细胞附着和吞入非致病的 Q 热立克次氏体(*Coxiella burnetii*)中可发现。

几种 ECM 蛋白以不同于 αvβ3/IAP 的机制活化吞噬细胞。巢蛋白[260]和层粘连蛋白[261]能够以不依赖于配体的 Arg-Gly-Asp 序列机制刺激吞噬,是 α3β1 整合素介导的。胶原凝胶通过 α2β1 刺激巨噬细胞吞噬[262]。这些数据说明 β1 整合素偶联能活化 αMβ2,但还没有直接证实。

Fc 受体与其他受体的信号作用

质膜受体间协作是吞噬调节的基本特征。首次认识到这一点是在 20 世纪 70 年代初,发现 PMN 和单核细胞对补体和 IgG 调理的吞噬对象直接下来的吞入有协同效应[210]。当时的解释是补体受体介导的黏附提高了 IgG 结合吞噬细胞受体的效率。然而,接下来的研究表明这种相互作用更复杂。缺少 αMβ2,Fc 受体介导的吞噬缺陷,虽然不是缺少。而且,虽然正常 PMN 能较强、持续地黏附免疫复合物(叫做"落空吞噬"),但 αMβ2 缺陷的 PMN 仅能暂时黏附,不能极化[113]。因而,Fc 受体和细胞骨架联系的关键成分依赖于 αMβ2。这 2 个受体的信号效应协同,因为 αMβ2 活化需要以 PI3-激酶依赖机制,通过免疫复合物引起 FcγRIIA 聚合诱导的酪氨酸激酶级联。接着,活化的 αMβ2 扩大 FcγR 偶联启动的信号、黏附、脱颗粒和吞噬。如以上所讨论的,协同的分子机制可能与 Mac-1 的胞外区和 PMN 的 FcγR 直接的相互作用有关。

协作信号也发生在 PMN 的 2 个 FcγR 之间。PMN 识别免疫复合物时二者靠拢,产生协同刺激脱颗粒、呼吸爆发和胞内 Ca^{2+} 浓度升高[263,264]。FcγRIIIB 能结合 src 家族酪氨酸激酶 hck。FcγRIIIB 结合的 hck 能磷酸化 FcγRIIA 的胞质尾[264]。由于 FcγRIIA 磷酸化足以活化 syk 及其下游效应分子,hck 诱导的磷酸化可能是 FcγRIIIB 协同 FcγRIIA 的机制。然而,其他机制,比如质膜 Ca^{2+} 通道的持续开放[265],对于协作可能也是重要的。

微生物与吞噬作用

吞噬是防御病原体,如细菌和原生动物入侵的主要机制。因而对于致病微生物通过进化干扰吞噬作用以增强在宿主体内的存活能力并不意外。事实上,胞内病原体就是利用吞噬作为它们的入侵机制,也是以宿主细胞为避难所逃避胞外不利环境的一种策略。许多病原体诱导宿主细胞专职的和非专职的吞噬细胞吞噬的策略相当多。过去十年许多信息开始揭示几种模式病原体控制吞噬的策略,以及吞噬微生物的命运。这些信息不仅丰富了我们对微生物感染和在宿主中存活的认识,对于了解宿主吞噬、细胞骨架调节和囊泡运输的基本过程也是有价值的。

非专职吞噬细胞的摄取

成纤维细胞和上皮细胞能够摄取。虽然这些细胞相对于专职吞噬细胞的吞噬慢,但形态上相似。成纤维细胞和上皮细胞缺少 IgG 或补体调理素的受体,因而难以获得专职吞噬细胞的标准识别机制。微生物与其他介导黏附的细胞表面受体相互作用,这些细胞不仅通过内源性受体,如整合素或者钙黏着蛋白[266,267],也通过转染的 Fcγ 或者甘露糖受体摄取。不表达 syk 的细胞能通过 Fcγ 受体吞噬,说明 syk 可能增加专职吞噬细胞吞噬的速率和范围,而不是绝对必须。而且,非专职吞噬细胞缺少专职吞噬细胞的特有杀菌机制,如一氧化氮合成酶和 NADPH 氧化酶。因此,许多潜在病原体利用这些细胞的吞噬潜力跨过解剖屏障,侵入宿主。这个意义上,作为宿主防御机制的吞噬反过来作为入侵微生物的致病机制,如整合素。

致病生物必须侵入外部防御,包括细胞屏障或上皮,感染宿主。也许对病原体入侵技术的最好理解是来自肠道生物,如沙门氏菌(*Salmonella*)、耶尔森氏菌(*Yersinia*)、利斯特氏苗(*Listeria*)和志贺氏菌(*Shigella*)。这些生物采用独特的策略,通过覆盖于派尔集合淋巴结的专门细胞——M 细胞侵入宿主胃肠道上皮[268]。M 细胞来源于正常黏膜上皮,并与淋巴细胞接触[269]。专门的细菌蛋白结合 M 细胞受体以诱导细胞摄入(表 30.5)。病原体诱导吞噬的机制分为两大类,一是与传统吞噬类似的拉链机制,二是与胞饮类似的触发机制。

表 30.5 微生物-宿主细胞间的相互作用

微生物	配体	受体	细胞	参考文献
耶尔森氏菌	侵染素	β1 整合素	M 细胞-上皮细胞	[270]
军团菌	C3bi	αMβ2(CR3, Mac1)	巨噬细胞	[286]
	C3bi	αMβ2	巨噬细胞	[279]
利斯特氏菌	C3bi	αMβ2	巨噬细胞	[304]
			上皮细胞	[305]
分枝杆菌	C3b	αMβ2, CR1	巨噬细胞	[306]、[307]
	FAP/Fn	α5β1	M 细胞-上皮细胞	[308]
志贺氏菌	IpaA/B/C	α5β1	M 细胞-上皮细胞	[309]
利什曼原虫	C3bi	αMβ2	巨噬细胞	[270]
	LPG	αMβ2	巨噬细胞	[312]
组织胞浆菌	C3bi	αMβ2	巨噬细胞	[270]

以拉链机制吞噬的例子是假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)。假结核耶尔森氏菌的一个毒性基因表达侵染素,是与 M 细胞顶膜和其他上皮细胞基底膜的 β1 家族整合素结合的蛋白[270]。一旦结合整合素,诱导吞噬,同黏着斑类似与肌动蛋白聚合和肌动蛋白结合蛋白相关,导致 FAK 和 cas 的酪氨酸磷酸化[271,272]。侵入宿主组织后,耶尔森氏菌作为胞外菌定居在派尔集合淋巴结和淋巴窦[273]。作为胞外生物,它们分泌毒性因子 Yop 与宿主吞噬细胞接触,Yop 转位进入胞质抑制吞噬[274]。HeLa 细胞中的一种 Yop,YopH 是酪氨酸磷酸酶,使宿主蛋白 cas 和 FAK 去磷酸化[271,272]。YopH 的表达对耶尔森氏菌抑制吞噬是必需的[275]。第二个 Yop,YopE 是以未知的机制解聚肌动蛋白纤丝的细胞毒素[276]。显然,耶尔森氏菌能诱导非专职吞噬细胞,如上皮细胞吞噬而侵入,避免专职吞噬细胞吞噬而存活于宿主胞外。

触发机制而不是传统拉链机制诱导微生物入侵的经典例子是沙门氏菌[277]。与宿主成纤维细胞或巨噬细胞接触,沙门氏菌诱导细胞膜边缘波动导致细菌以胞吞类似的方式被吞入(图 30.7)。这个机制的重要特征是只有毒性沙门氏菌能诱导细胞膜边缘波动,而摄取过程则不区分是致病的还是非致病的沙门氏菌。因此,触发机制不能显示拉链吞噬的特异性。细胞膜边缘波动与生长因子受体所诱导的相似。事实上,表皮生长因子受体偶联能诱导非致病沙门氏菌的吞噬[278]。

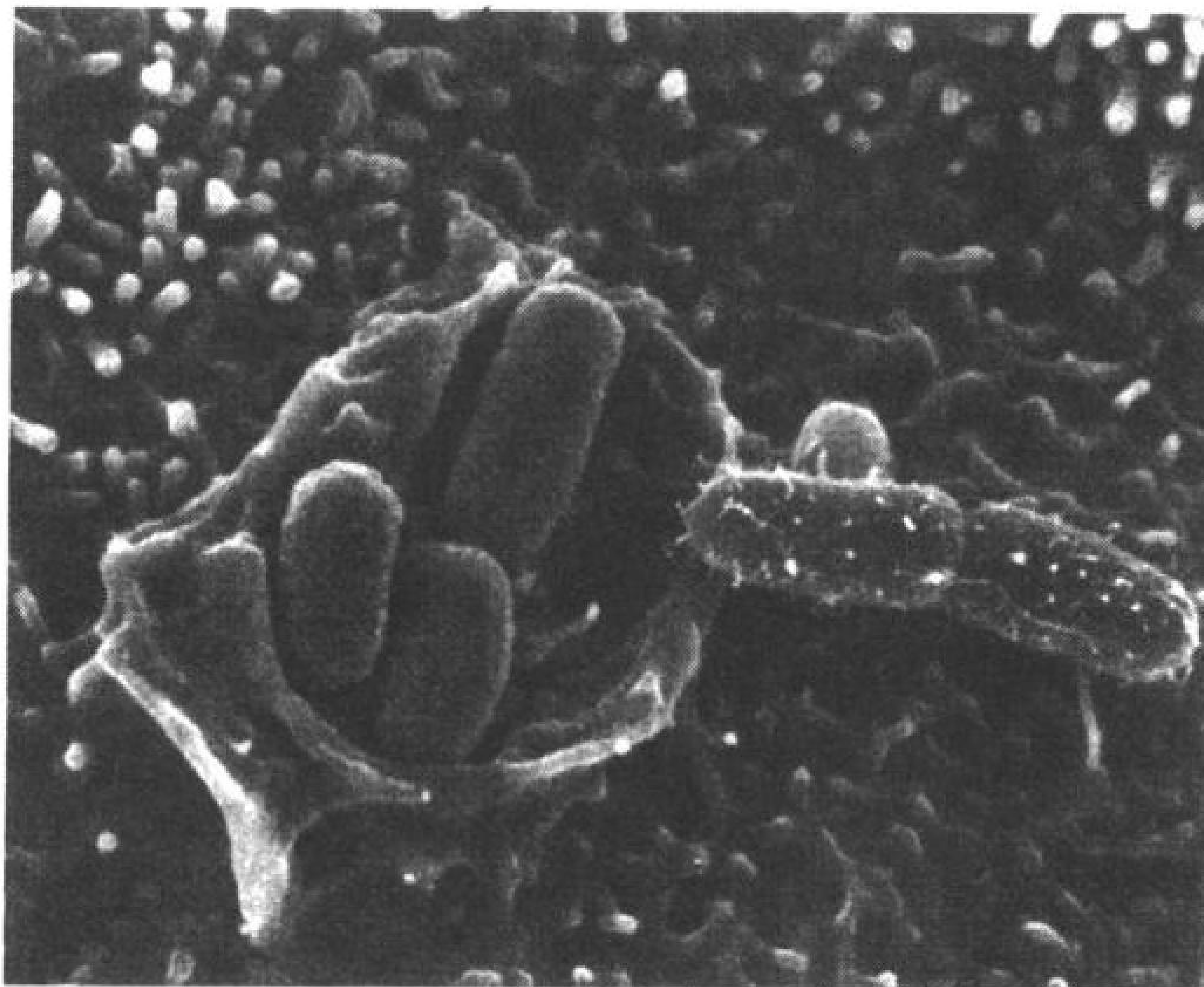


图 30.7 无拉链作用的吞噬。感染野生型鼠沙门氏菌的培养 Madin-Darby 狗肾细胞的高分辨率扫描电镜图。感染 30 分钟内清晰可见细菌与宿主细胞结合,细胞膜边缘波动,但黏附细菌周围没有伪足伸出。

专职吞噬细胞的摄取

许多胞内病原体以巨噬细胞为避难所，可能是因为在巨噬细胞中可避免 PMN 的识别和破坏，以及补体和宿主防御的其他成分。这些病原体的共同特征是能在貌似敌对的吞噬细胞中的生存，但破坏吞噬细胞杀菌的活性策略各不相同(图 30.8)。胞内病原体常常诱导吞噬而入侵巨噬细胞。多种病原体，包括利斯特氏菌、利什曼原虫(*Leishmania*)、红球菌(*Rhodococcus*)和分枝杆菌，被补体片段 C3bi 调理，后者结合巨噬细胞整合素补体受体 αMβ2 和 αXβ2 诱导吞噬[270,279,280]。相对于 FcγR 介导的吞噬，补体受体介导的吞噬不诱导呼吸爆发活性[281]。这种机制提供了相对安全的方式侵入吞噬细胞，但是某些病原体通过直接抑制如 PKC 依赖的呼吸爆发活化途径抑制细胞活化[282]。

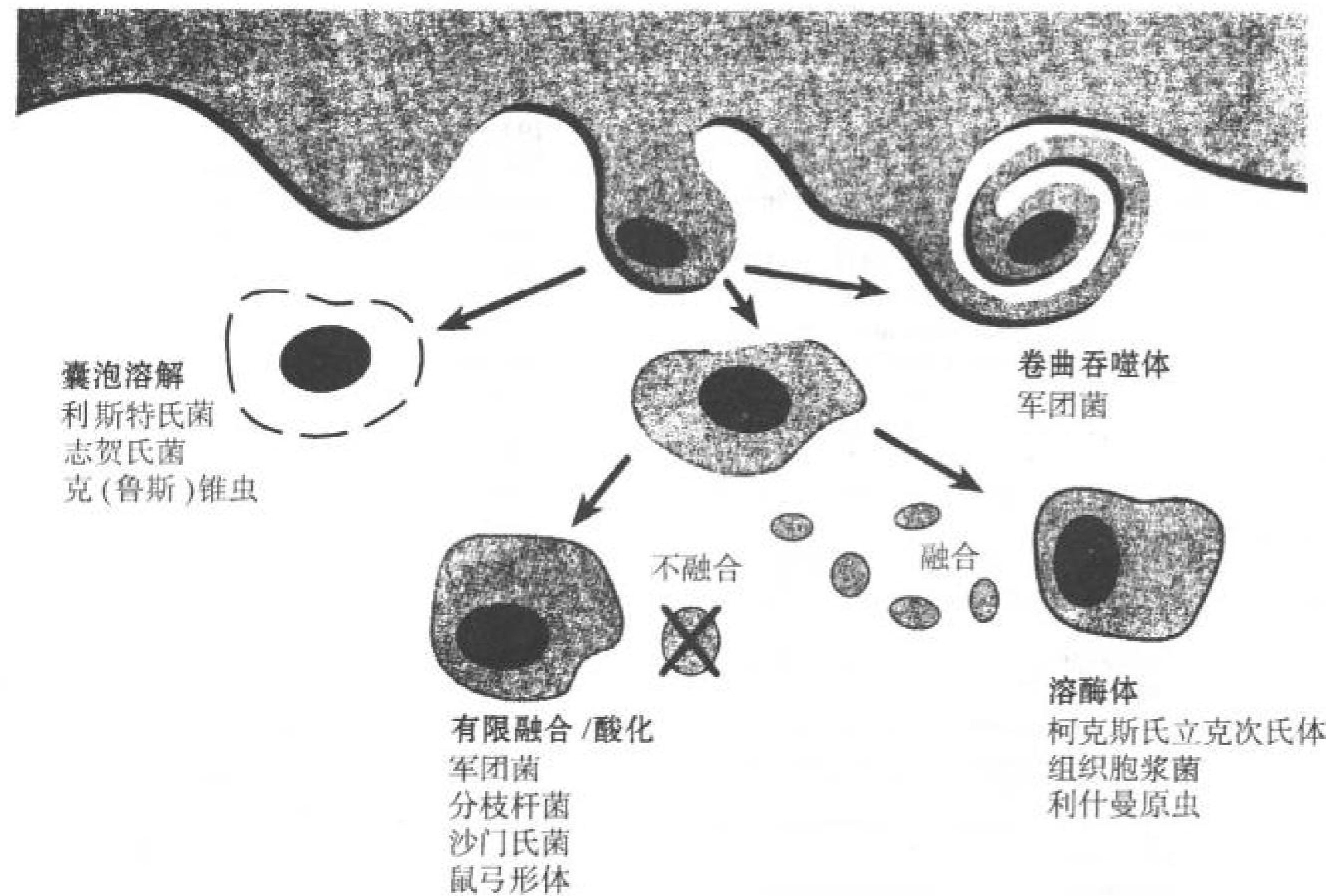


图 30.8 胞内病原体侵入巨噬细胞及生存策略。巨噬细胞内病原体通过多种机制保护自身免受正常宿主防御的袭击，包括改变吞噬模式(卷曲吞噬)，避开吞噬小体，抑制吞噬体酸化和(或)与其他效应囊泡的融合。某些生物能在吞噬溶酶体中存活。

1015

一旦进入吞噬体，病原体利用多种方法改变环境以允许其生存增殖。某些病原体，像利斯特氏菌和志贺氏菌，表达溶血素溶解吞噬体，使细菌进入胞质而生长[283]。利斯特氏菌和志贺氏菌均能诱导细胞骨架形成"彗星结构"，因为这些富含肌动蛋白的结构类似彗星尾[283]。这些"彗星结构"是细胞间的感染传播所必须的，因为细菌利用被感染宿主细胞的聚合肌动蛋白推动它们通过胞质，并诱导含有细菌的突触从细胞表面伸出而被邻近吞噬细胞吞噬。某些病原体能够耐受酸性 pH 值和吞噬溶酶体的酸性水解酶，而其他病原体则改变吞噬体成熟或者防止与溶酶体融合[284]。分枝杆菌通过分泌 NH_3 或者阻止吞噬体获得 Na^+/H^+ ATP 酶抑制囊泡酸化[285]。高 pH 值抑制许多溶酶体水解酶活化，后者仅在溶酶体的正常低 pH 值条件下起作用。军团菌属(*Legionella*)通过卷曲吞噬过程诱导自身吞噬[286]。它们卷曲自己于巨噬细胞质膜，接着被巨噬细胞内在化。内在化的细胞膜与含有粗面内质网的细胞器复合体结合，被认为对细菌提供营养是重要的[286]。尽管以前的研究对病原体如何改变囊泡运输有一定了解，但是对于许多病原体改变胞内环境的认识仍只是初步的。

结论

吞噬作用是细胞黏附机制的一种古老的进化适应，是宿主防御中对于创伤修复和发育的特殊要求。虽然发展了特异性受体和信号机制以提高专职吞噬细胞摄取的有效性和反应性，吞噬作用的基本细胞生物学

与细胞黏附的调节仍有许多共同特征。多细胞生物的宿主防御中，这些过程是交互的。专职吞噬细胞必须能迅速移向存在病原体的实体组织，能与病原体有效作用并清除之。吞入细胞黏附和吞噬对宿主也有威胁，如自身免疫病和动脉硬化症可能部分是由于黏附和吞噬异常。希望进一步理解相关过程的分子机制以对炎症和宿主防御提供临床相关的药理调节。

（牟芝蓉 译）

参 考 文 献

1. Brown EJ, Steinberg TH. Phagocytosis. In: Lee AG, ed. *Endocytosis and exocytosis*. Greenwich, CT: JAI Press Inc, 1996:33–64.
2. Metchnikoff E. Uber eine Sprosspilzkankheit der Daphnei: Beitrag zur libre uber den Kampf der phagocyten gegen Darmkrankheitserreger. *Virchows Arch* 1884; 96:177.
3. Metchnikoff E. Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes. *Ann Inst Pasteur* 1887;1:321.
4. Bainton DF. Developmental biology of neutrophils and eosinophils. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press, 1992:303–324.
5. Gallin JI. Neutrophil specific granule deficiency. *Annu Rev Med* 1985;36: 263–274.
6. Davis WC, Douglas SD. Defective granule formation and function in the Chediak-Higashi syndrome in man and animals. *Semin Hematol* 1972;9:431–450.
7. Root RK. Host defenses against infection: importance of phagocytic mechanisms from the study of genetic disorders of leukocyte function [review, 75 refs]. *Bull NY Acad Med* 1982;58:669–680.
8. Baehner RL. Neutrophil dysfunction associated with states of chronic and recurrent infection. *Pediatr Clin North Am* 1980;27:377–401.
9. Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 1996;381:77–80.
10. Echtenacher B, Mannel DN, Hultner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 1996;381:75–77.
11. Van Furth R. Development and distribution of mononuclear phagocytes. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:325–339.
12. McEver RP. Selectins: novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation. *Thromb Haemost* 1991;65:223–228.
13. Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 1994;8:504–512.
14. McEver RP. Selectins. *Curr Opin Immunol* 1994;6:75–84.
15. Kansas GS. Selectins and their ligands—current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259–3287.
16. Spertini O, Luscinskas FW, Kansas GS, et al. Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. *J Immunol* 1991;147:2565–2573.
17. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991;65:859–873.
18. Von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors K-E, Butcher EC. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte β_2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7538–7542.
19. Ley K, Bullard DC, Arbones ML, et al. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* 1995;181:669–675.
20. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301–314.
21. Wilkinson PC. Chemotactic factors: an overview. *Methods Enzymol* 1988;162: 127–132.
22. Zwahlen R, Walz A, Rot A. In vitro and in vivo activity and pathophysiology of human interleukin-8 and related peptides [review, 48 refs]. *Int Rev Exp Pathol* 1993;34:27–42.
23. Premack BA, Schall TJ. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med* 1996;2:1174–1178.
24. Graves DT, Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995;6:109–118.
25. Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* 1990;11:97–101.
26. Leonard EJ, Yoshimura T, Tanaka S, Raffeld M. Neutrophil recruitment by intradermally injected neutrophil attractant/activation protein-1. *J Invest Dermatol* 1991;96:690–694.
27. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9233–9237.
28. Daffern PJ, Pfeifer PH, Ember JA, Hugli TE. C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *J Exp Med* 1995;181:2119–2127.
29. Lukacs NW, Strieter RM, Warmington K, Lincoln P, Chensue SW, Kunkel SL. Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation. *J Immunol* 1997;158:4398–4404.
30. Kitaura M, Nakajima T, Imai T, et al. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. *J Biol Chem* 1996;271:7725–7730.
31. Rot A, Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, Schall TJ, Dahinden CA. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med* 1992;176:1489–1495.
32. Birnbaumer L. Transduction of receptor signal into modulation of effector activity by G proteins: the first 20 years or so. *FASEB J* 1990;4:3068–3078.
33. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11–25.
34. Ginsberg MH, Loftus JC, D'Souza S, Plow EF. Ligand binding to integrins: common and ligand specific recognition mechanisms. *Cell Differ Dev* 1990;32: 203–214.
35. O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, et al. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* 1994;124:1047–1059.
36. Faull RJ, Kovach NL, Harlan JM, Ginsberg MH. Stimulation of integrin-mediated adhesion of T lymphocytes and monocytes: two mechanisms with divergent biological consequences. *J Exp Med* 1994;179:1307–1316.
37. Wright SD, Meyer BC. Phorbol esters cause sequential activation and deactivation of complement receptors on polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1986;136:1758–1764.
38. Hogg N, Harvey J, Cabanas C, Landis RC. Control of leukocyte integrin activation. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:S55–S59.
39. Brown E, Hogg N. Where the outside meets the inside: integrins as activators and targets of signal transduction cascades. *Immunol Lett* 1996;54:189–193.
40. Cheng Y-F, Clyman RI, Enenstein J, Waleh N, Pytela R, Kramer RH. The integrin complex $\alpha_v\beta_3$ participates in the adhesion of microvascular endothelial cells to fibronectin. *Exp Cell Res* 1991;194:69–77.
41. Piali L, Hammel P, Uherek C, et al. CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol* 1995; 130:451–460.
42. Luscinskas FW, Lawler J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J* 1994;8:929–938.
43. Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): A novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1991;114:1059–1068.
44. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 1993;178:449–460.
45. Cooper D, Lindberg FP, Gamble JR, Brown EJ, Vadas MA. The transendothelial migration of neutrophils involves integrin associated protein (CD47). *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3978–3982.
46. Rot A. Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration [review, 47 refs]. *Immunol Today* 1992;13:291–294.
47. Gao JX, Issekutz AC. Mac-1 (CD11b/CD18) is the predominant beta 2 (CD18) integrin mediating human neutrophil migration through synovial and dermal fibroblast barriers. *Immunology* 1996;88:463–470.
48. Burns AR, Simon SI, Kukielka GL, et al. Chemotactic factors stimulate CD18-dependent canine neutrophil adherence and motility on lung fibroblasts. *J Immunol* 1996;156:3389–3401.
49. Brown EJ, Lindberg FP. Matrix receptors of myeloid cells. In: Horton MA, ed. *Blood cell biochemistry*. Vol 5: *Macrophages and related cells*. New York: Plenum Press, 1993:279–306.
50. Mandeville JT, Lawson MA, Maxfield FR. Dynamic imaging of neutrophil migration in three dimensions: mechanical interactions between cells and matrix. *J Leukoc Biol* 1997;61:188–200.
51. Owen CA, Campbell MA, Sannes PL, Boukedes SS, Campbell EJ. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine

proteinases. *J Cell Biol* 1995;131:775–789.
52. Chow CW, Grinstein S, Rotstein OD. Signaling events in monocytes and macrophages. *New Horiz* 1995;3:342–351.
53. Morrison DC, Lei MG, Kirikae T, Chen TY. Endotoxin receptors on mammalian cells. *Immunobiology* 1993;187:212–226.
54. Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 1993;14:121–125.
55. Dunne DW, Resnick D, Greenberg J, Krieger M, Joiner KA. The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1863–1867.
56. Stahl PD. The macrophage mannose receptor: current status. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;2:317–318.
57. Resnick D, Pearson A, Krieger M. The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem Sci* 1994;19:5–8.
58. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, et al. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992;149:4029–4035.
59. Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 1994;63:601–637.
60. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor [see comments]. *Science* 1996;271:518–520.
61. Rigotti A, Acton SL, Krieger M. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 1995;270: 16221–16224.
62. Hughes DA, Fraser IP, Gordon S. Murine macrophage scavenger receptor: in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. *Eur J Immunol* 1995;25:466–473.
63. Hughes DA, Fraser IP, Gordon S. Murine M phi scavenger receptor: adhesion function and expression. *Immunol Lett* 1994;43:7–14.
64. Stahl PD. The mannose receptor and other macrophage lectins. *Curr Opin Immunol* 1992;4:49–52.
65. Taylor ME. Recognition of complex carbohydrates by the macrophage mannose receptor. *Biochem Soc Trans* 1993;21:468–473.
66. Ezekowitz RA, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 1990;172:1785–1794.
67. Gergely J, Sarmay G. The two binding-site models of human IgG binding Fc-gamma receptors. *FASEB J* 1990;4:3275–3283.
68. Powell MS, Hulett MD, Brinkworth RI, Hogarth PM. Human FcgR:Ligand interactions. In: van de Winkel JGJ, Capel PJA, eds. *Human IgG Fc receptors.* Austin, TX: R.G. Landes Company, 1996:5–24.
69. Erbe DV, Collins JE, Shen L, Graziano RF, Fanger MW. The effect of cytokines on the expression and function of Fc receptors for IgG on human myeloid cells. *Mol Immunol* 1990;27:57–67.
70. Shen L. Receptors for IgA on phagocytic cells [review, 40 refs]. *Immunol Res* 1992;11:273–282.
71. Salmon JE, Edberg JC, Kimberly RP. FcgR on Neutrophils. In: van de Winkel JGJ, Capel PJA, eds. *Human IgG Fc receptors.* Austin, TX: R.G. Landes Company, 1996:79–106.
72. Kurlander RJ, Batker J. The binding of human immunoglobulin G1 monomer and small, covalently cross-linked polymers of immunoglobulin G1 to human peripheral blood monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1982;69:1–8.
73. Van de Winkel JGJ, Capel PJA. Human IgG Fc receptor yellow pages. In: van de Winkel JGJ, Capel PJA, eds. *Human IgG Fc receptors.* Austin, TX: R.G. Landes Company, 1997:227–237.
74. Fanger NA, Yeaman GR, Guyre PM. Regulation of FcgR expression and function by cytokines and hormones. In: van de Winkel JGJ, Capel PJA, eds. *Human IgG Fc receptors.* Austin, TX: R.G. Landes Company, 1996:123–148.
75. Ernst LK, Duchemin AM, Anderson CL. Association of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI) with the gamma subunit of the IgE receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6023–6027.
76. Sanders LA, van de Winkel JG, Rijkers GT, et al. Fc gamma receptor IIa (CD32) heterogeneity in patients with recurrent bacterial respiratory tract infections. *J Infect Dis* 1994;170:854–861.
77. Bredius RG, Derkx BH, Fijen CA, et al. Fc gamma receptor IIa (CD32) polymorphism in fulminant meningococcal septic shock in children. *J Infect Dis* 1994;170:848–853.
78. Miettinen HM, Matter K, Hunziker W, Rose JK, Mellman I. Fc receptor endocytosis is controlled by a cytoplasmic domain determinant that actively prevents coated pit localization. *J Cell Biol* 1992;116:875–888.
79. Indik Z, Kelly C, Chien P, Levinson AI, Schreiber AD. Human Fc_{gamma}RII, in the absence of other Fc_{gamma} receptors, mediates a phagocytic signal. *J Clin Invest* 1991;88:1766–1771.
80. Indik ZK, Park JG, Hunter S, Schreiber AD. The molecular dissection of Fcgamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* 1995;86:4389–4399.
81. Masuda M, Roos D. Association of all three types of Fc gamma R (CD64, CD32, and CD16) with a gamma-chain homodimer in cultured human monocytes. *J Immunol* 1993;151:7188–7195.
82. Mitchell MA, Huang M-M, Chien P, Indik ZK, Pan XQ, Schreiber AD. Substitutions and deletions in the cytoplasmic domain of the phagocytic receptor FcgammaRIIA: effect on receptor tyrosine phosphorylation and phagocytosis. *Blood* 1994;84:1753–1759.
83. Edberg JC, Lin CT, Lau D, Unkeless JC, Kimberly RP. The Ca^{2+} dependence of human Fcgamma receptor-initiated phagocytosis. *J Biol Chem* 1995;270: 22301–22307.
84. Shen Z, Lin CT, Unkeless JC. Correlations among tyrosine phosphorylation of Shc, p72syk, PLC-gamma 1, and [Ca2+]i flux in Fc gamma RIIA signaling. *J Immunol* 1994;152:3017–3023.
85. Hunter S, Kamoun M, Schreiber AD. Transfection of an Fc[gamma] receptor cDNA induces T cells to become phagocytic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 10232–10236.
86. Matsuda M, Park JG, Wang DC, Hunter S, Chien P, Schreiber AD. Abrogation of the Fc gamma receptor IIA-mediated phagocytic signal by stem-loop Syk antisense oligonucleotides. *Mol Biol Cell* 1996;7:1095–1106.
87. Ono M, Bolland S, Tempst P, Ravetch JV. Role of the inositol phosphatase ship in negative regulation of immune function by mast cell Fc receptors. *Nature* 1996;383:263–266.
88. Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch JV. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* 1996;379:346–349.
89. Muta T, Kurosaki T, Misulovin Z, Sanchez M, Nussenzweig MC, Ravetch JV. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature* 1994;369:340
90. Ono M, Okada H, Bolland S, Yanagi S, Kurosaki T, Ravetch JV. Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell* 1997; 90:293–302.
91. Miller KL, Duchemin AM, Anderson CL. A novel role for the Fc receptor gamma subunit: enhancement of Fc gamma R ligand affinity. *J Exp Med* 1996; 183:2227–2233.
92. De Haas M, Kleijer M, Van Zwieten R, Roos D, Von dem Borne AEGK, von dem Borne AE. Neutrophil FcgammaRIIIb deficiency, nature, and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families. *Blood* 1995;86:2403–2413.
93. Koene HR, De Haas M, Roos D, Von dem Borne AEGK. Soluble FcgRIII: biology and clinical implications. In: van de Winkel JGJ, Capel PJA, eds. *Human IgG Fc receptors.* Austin, TX: R.G. Landes Company, 1996:181–194.
94. Morton HC, van den Herik-Oudijk IE, Vossebeld P, et al. Functional association between the human myeloid immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and FcR gamma chain. Molecular basis for CD89/FcR gamma chain association. *J Biol Chem* 1995;270:29781–29787.
95. Scott CB, Ratcliffe DR, Cramer EB. Human monocytes are unable to bind to or phagocytize IgA and IgG immune complexes formed with influenza virus in vitro. *J Immunol* 1996;157:351–359.
96. Nikolova EB, Russell MW. Dual function of human IgA antibodies: inhibition of phagocytosis in circulating neutrophils and enhancement of responses in IL-8-stimulated cells. *J Leukoc Biol* 1995;57:875–882.
97. Saito K, Kato C, Katsuragi H, Komatsuzaki A. IgA-mediated inhibition of human leucocyte function by interference with Fc gamma and C3b receptors. *Immunology* 1991;74:99–106.
98. Griffiss JM. Biologic function of the serum IgA system: modulation of complement-mediated effector mechanisms and conservation of antigenic mass. *Ann NY Acad Sci* 1983;409:697–707.
99. Mostov KE. Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 1994;12:63–84.
100. Wright SD, Silverstein SC. Tumor-promoting phorbol esters stimulate C3b and C3b′ receptor-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J Exp Med* 1982;156:1149–1164.
101. Bianco C, Griffin FM Jr, Silverstein SC. Studies of the macrophage complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. *J Exp Med* 1975;141:1278–1291.
102. Holers VM. Complement receptors. *Year Immunol* 1989;4:231–240.
103. Liszewski MK, Atkinson JP. The role of complement in autoimmunity. *Immunol Ser* 1991;54:13–37.
104. Roubey RAS, Ross GD, Merrill JT, et al. Staurosporine inhibits neutrophil phagocytosis but not iC3b binding mediated by CR3 (CD11b/CD18). *J Immunol* 1991;146:3557–3562.
105. Wright SD, Rao PE, Wesley C, et al. Identification of the C3bi receptor of human monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:5699–5703.
106. Myones BL, Dalzell JG, Hogg N, Ross GD. Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b receptor (CR4) activity. *J Clin Invest* 1988;82:640–651.
107. Todd RF, Freyer DR. The CD11/CD18 leukocyte glycoprotein deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988;2:13–31.
108. Etzioni A. Adhesion molecule deficiencies and their clinical significance. *Cell Adhes Commun* 1994;2:257–260.
109. Anderson DC, Schmalsteig FC, Finegold MJ, et al. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis* 1985; 152:668–689.
110. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to

specificity and diversity. *Cell* 1991;67:1033–1036.

111. Gresham HD, Graham IL, Anderson DC, Brown EJ. Leukocyte adhesion deficient (LAD) neutrophils fail to amplify phagocytic function in response to stimulation: evidence for CD11b/CD18-dependent and -independent mechanisms of phagocytosis. *J Clin Invest* 1991;88:588–597.
112. Arnaout MA, Todd RF III, Dana N, Melamed J, Schlossman SF, Colten HR. Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte granulocyte membrane glycoprotein (Mo1). *J Clin Invest* 1983;72:171–179.
113. Graham IL, Lefkowith JB, Anderson DC, Brown EJ. Immune complex-stimulated neutrophil LTB4 production is dependent on beta2 integrins. *J Cell Biol* 1993;120:1509–1517.
114. Sehgal G, Zhang K, Todd RF, Boxer LA, Petty HR. Lectin-like inhibition of immune-complex receptor-mediated stimulation of neutrophils—effects on cytosolic calcium release and superoxide production. *J Immunol* 1993;150: 4571–4580.
115. Nathan C, Srimal S, Farber C, et al. Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J Cell Biol* 1989;109:1341–1349.
116. Fuortes M, Jin W, Nathan C. β2 integrin-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils treated with tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 1994;127:1477–1483.
117. Graham IL, Anderson DC, Holers VM, Brown EJ. Complement receptor 3 (CR3, Mac-1, Integrin alpha-M beta-2, CD11b/CD18) is required for tyrosine phosporylation of paxillin in adherent and nonadherent neutrophils. *J Cell Biol* 1994;127:1139–1147.
118. Coxon A, Rieu P, Barkalow FJ, et al. A novel role for the beta-2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis—a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity* 1996;5:653–666.
119. Petty HR, Todd RF. Integrins as promiscuous signal transduction devices. *Immunol Today* 1996;17:209–212.
120. Sitrin RG, Todd RF, Petty HR, et al. The urokinase receptor (cd87) facilitates cd11b/cd18-mediated adhesion of human monocytes. *J Clin Invest* 1996;97: 1942–1951.
121. Krauss JC, Poo H, Xue W, Mayo-Bond L, Todd RF, Petty HR. Reconstitution of antibody-dependent phagocytosis in fibroblasts expressing Fc gamma receptor IIIB and the complement receptor type 3. *J Immunol* 1994;153:1769–1777.
122. Poo H, Krauss JC, Mayobond L, Todd RF, Petty HR. Interaction of Fc-gamma receptor type IIIB with complement receptor type 3 in fibroblast transfectants—evidence from lateral diffusion and resonance energy transfer studies. *J Mol Biol* 1995;247:597–603.
123. Zhou M-J, Brown EJ. CR3 (Mac-1, $\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) and Fc(gamma)RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc(gamma)RII and tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol* 1994;125:1407–1416.
124. Brown EJ, Bohnsack JF, Gresham HD. Mechanism of inhibition of immunoglobulin G-mediated phagocytosis by monoclonal antibodies that recognize the Mac-1 antigen. *J Clin Invest* 1988;81:365–375.
125. Brown EJ. Complement receptors and phagocytosis. *Curr Opin Immunol* 1991;3:76–82.
126. Metlay JP, Witmer Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1990;171:1753–1771.
127. Wright SD, Weitz JI, Huang AJ, Levin SM, Silverstein SC, Loike JD. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7734–7738.
128. Loike JD, Sodeik B, Cao L, et al. CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the Aα chain of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1044–1048.
129. Berton G, Laudanna C, Sorio C, Rossi F. Generation of signals activating neutrophil functions by leukocyte integrins: LFA-1 and gp150/95, but not CR3, are able to stimulate the respiratory burst of human neutrophils. *J Cell Biol* 1992; 116:1007–1017.
130. Keizer GD, te Velde AA, Schwarting R, Figdor CG, de Vries JE. Role of p,150,95 in adhesion, migration, chemotaxis, and phagocytosis of human monocytes. *Eur J Immunol* 1987;17:1317.
131. Epstein J, Eichbaum Q, Sheriff S, Ezekowitz RA. The collectins in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:29–35.
132. Schweinle JE, Ezekowitz RA, Tenner AJ, Kuhlman M, Joiner KA. Human mannose-binding protein activates the alternative complement pathway and enhances serum bactericidal activity on a mannose-rich isolate of Salmonella. *J Clin Invest* 1989;84:1821–1829.
133. Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 1992;176:1497–1502.
134. Matsushita M, Fujita T. Cleavage of the third component of complement (C3) by mannose-binding protein-associated serine protease (MASP) with subsequent complement activation. *Immunobiology* 1995;194:443–448.
135. Summerfield JA. The role of mannose-binding protein in host defence. *Biochem Soc Trans* 1993;21:473–477.
136. Mold C, Du Clos TW, Nakayama S, Edwards KM, Gewurz H. C-reactive protein reactivity with complement and effects on phagocytosis. *Ann NY Acad Sci* 1982;389:251–262.
137. Crowell RE, Du Clos TW, Montoya G, Heaphy E, Mold C. C-reactive protein receptors on the human monocytic cell line U-937. Evidence for additional binding to Fc gamma RI. *J Immunol* 1991;147:3445–3451.
138. Xia D, Samols D. Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2575–2580.
139. Ahmed N, Thorley R, Xia D, Samols D, Webster RO. Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein exhibit diminished chemotactic factor-induced alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1141–1147.
140. Szalai AJ, Briles DE, Volanakis JE. Human C-reactive protein is protective against fatal Streptococcus pneumoniae infection in transgenic mice. *J Immunol* 1995;155:2557–2563.
141. Hook M, McGavin MJ, Switalski LM, et al. Interactions of bacteria with extracellular matrix proteins. *Cell Differ Dev* 1990;32:433–438.
142. Saba TM, Blumenstock FA, Weber P, Kaplan JE. Physiologic role of cold-insoluble globulin in systemic host defense: implications of its characterization as the opsonic alpha 2-surface-binding glycoprotein. *Ann NY Acad Sci* 1978;312: 43–55.
143. Saba TM. Fibronectin: relevance to phagocytic host response to injury. *Circ Shock* 1989;29:257–278.
144. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 1997;61: 375–380.
145. Morris L, Graham CF, Gordon S. Macrophages in haemopoietic and other tissues of the developing mouse detected by the monoclonal antibody F4/80. *Development* 1991;112:517–526.
146. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990;343:170–173.
147. Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* 1992;90:1513–1522.
148. Ryeom SW, Silverstein RL, Scotto A, Sparrow JR. Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by the scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 1996;271:20536–20539.
149. Hart SP, Haslett C, Dransfield I. Recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Experientia* 1996;52:950–956.
150. Franc NC, Dimarcq JL, Lagueux M, Hoffmann J, Ezekowitz RA. Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* 1996;4:431–443.
151. Ryeom SW, Sparrow JR, Silverstein RL. CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J Cell Sci* 1996;109: 387–395.
152. Luciani M-F, Chimini G. The ATP binding cassette transporter ABC1 is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death. *EMBO J* 1996;15:226–235.
153. Polte T, Newman W, Raghunathan G, Venkat Gopal T. Structural and functional studies of full-length vascular cell adhesion molecule-1: internal duplication and homology to several adhesion proteins. *DNA Cell Biol* 1991;10:349–357.
154. Griffin FM Jr, Griffin JA, Silverstein SC. Studies on the mechanism of phagocytosis: II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived-lymphocytes. *J Exp Med* 1976;144:788–809.
155. Griffin FM Jr, Griffin JA, Leider JE, Silverstein SC. Studies on the mechanism of phagocytosis: I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J Exp Med* 1975;142:1263–1282.
156. Griffin FM Jr, Silverstein SC. Segmental response of the macrophage plasma membrane to a phagocytic stimulus. *J Exp Med* 1974;139:323–336.
157. Kaplan G. Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand J Immunol* 1977;6:797–807.
158. Kaplan G, Bertheussen K. The morphology of echinoid phagocytes and mouse peritoneal macrophages during phagocytosis in vitro. *Scand J Immunol* 1977;6:1289–1296.
159. Allen LAH, Aderem A. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med* 1996;184:627–637.
160. Greenberg S, Chang P, Wang DC, Xavier R, Seed B. Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 1103–1107.
161. Ninomiya N, Hazeki K, Fukui Y, et al. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *J Biol Chem* 1994;269:22732–22737.
162. Shimizu Y, Mobley JL, Finkelstein LD, Chan ASH. Role for phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of β1 integrin activity by the CD2 antigen. *J Cell Biol* 1995;131:1867–1880.
163. Hotchin NA, Hall A. Regulation of the actin cytoskeleton, integrins and cell growth by the Rho family of small GTPases. *Cancer Surv* 1996;27:311–322.
164. Zheleznyak A, Brown EJ. IgG-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation: evidence for protein kinase C translocation to phagosomes. *J Biol Chem* 1992;267:12042–12048.
165. Fällman M, Gullberg M, Hellberg C, Andersson T. Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine-derived diglyceride in human neutrophils. Involvement of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase C. *J Biol Chem*

1992;267:2656–2663.
166. Allen LH, Aderem A. A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J Exp Med* 1995; 182:829–840.
167. Aderem A. The MARCKS family of protein kinase-C substrates. *Biochem Soc Trans* 1995;23:587–591.
168. Lew DP, Andersson T, Hed J, Di Virgilio F, Pozzan T, Stendahl O. Ca2+-dependent and Ca2+-independent phagocytosis in human neutrophils. *Nature* 1985;315:509–511.
169. DiVirgilio F, Meyer BC, Greenberg S, Silverstein SC. Fc receptor-mediated phagocytosis occurs in macrophages at exceedingly low cytosolic Ca^{2+} levels. *J Cell Biol* 1988;106:657–666.
170. Rosales C, Brown EJ. Two mechanisms for IgG Fc-receptor-mediated phagocytosis by human neutrophils. *J Immunol* 1991;146:3937–3944.
171. Collins K, Sellers JR, Matsudaira P. Calmodulin dissociation regulates brush border myosin I (110-kD-calmodulin) mechanochemical activity in vitro. *J Cell Biol* 1990;110:1137–1147.
172. Stendahl O, Krause K-H, Krischer J, et al. Redistribution of intracellular Ca^{2+} stores during phagocytosis in human neutrophils. *Science* 1994;265:1439–1441.
173. Serrander L, Fallman M, Stendahl O. Activation of phospholipase D is an early event in integrin-mediated signalling leading to phagocytosis in human neutrophils. *Inflammation* 1996;20:439–450.
174. Kusner DJ, Hall CF, Schlesinger LS. Activation of phospholipase D is tightly coupled to the phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* or opsonized zymosan by human macrophages. *J Exp Med* 1996;184:585–595.
175. Lennartz MR, Brown EJ. Arachidonic acid is essential for Fc-receptor-mediated phagocytosis by human monocytes. *J Immunol* 1991;147:621–626.
176. Lennartz MR, Lefkowith JB, Bromley FA, Brown EJ. Immunoglobulin G-mediated phagocytosis activates a calcium-independent, phosphatidylethanolamine-specific phospholipase. *J Leukoc Biol* 1993;54:389–398.
177. Karimi K, Lennartz MR. Protein kinase C activation precedes arachidonic acid release during IgG-mediated phagocytosis. *J Immunol* 1995;155:5786–5794.
178. Mayorga LS, Colombo MI, Lennartz M, et al. Inhibition of endosome fusion by phospholipase-a(2) (PLA2) inhibitors points to a role for PLA2 in endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10255–10259.
179. Manie SN, Beck AR, Astier A, et al. Involvement of p130(Cas) and p105(HEF1), a novel Cas-like docking protein, in a cytoskeleton-dependent signaling pathway initiated by ligation of integrin or antigen receptor on human B cells. *J Biol Chem* 1997;272:4230–4236.
180. Salgia R, Avraham S, Pisick E, et al. The related adhesion focal tyrosine kinase forms a complex with paxillin in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1996;271:31222–31226.
181. Allen LAH, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol* 1996;8:36–40.
182. Jung G, Wu XF, Hammer JA. Dictyostelium mutants lacking multiple classic myosin I isoforms reveal combinations of shared and distinct functions. *J Cell Biol* 1996;133:305–323.
183. Zigmond SH, Hirsch JG. Effects of cytochalasin B on polymorphonuclear leucocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis. *Exp Cell Res* 1972;73:383–393.
184. Rosales C, Jones SL, McCourt D, Brown EJ. Bromophenacyl bromide binding to the actin bundling protein l-plastin inhibits IP_3-independent $[Ca^{+2}]_i$ rise in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3534–3538.
185. Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1996;12:463–518.
186. Yamada KM, Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:76–85.
187. Gaidano G, Bergui L, Schena M, et al. Integrin distribution and cytoskeleton organization in normal and malignant monocytes. *Leukemia* 1990;4:682–687.
188. Marchisio PC, Bergui L, Corbascio GC, et al. Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood* 1988;72:830–833.
189. Bokoch GM, Knaus UG. The role of small GTP-binding proteins in leukocyte function. *Curr Opin Immunol* 1994;6:98–105.
190. Tapon N, Hall A. Rho, rac and cdc42 gtpases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:86–92.
191. Allen WE, Jones GE, Pollard JW, Ridley AJ. Rho, Rac, and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J Cell Sci* 1997;110:707–720.
192. Zigmond SH, Joyce MP, Borleis J, Bokoch GM, Devreotes PN. Regulation of actin polymerization in cell-free systems by GTPgammaS and Cdc42. *J Cell Biol* 1997;138:363–374.
193. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995;81:53–62.
194. Hotchin NA, Hall A. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol* 1995;131: 1857–1865.
195. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992;70:389–399.
196. Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao ZS, Lim L. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 1994;367:40–46.
197. Knaus UG, Morris S, Dong HJ, Chernoff J, Bokoch GM. Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein–coupled receptors. *Science* 1995;269:221–223.
198. Lamarche N, Tapon N, Stowers L, et al. Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* 1996;87:519–529.
199. Joneson T, McDonough M, Bar-Sagi D, Van Aelst L. RAC regulation of actin polymerization and proliferation by a pathway distinct from Jun kinase. *Science* 1996;274:1374–1376.
200. Sells M, Knaus U, Bagrodia S, Ambrose D, Bokoch G, Chernoff J. Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* 1997;7:202–210.
200a. Jones SL, Knaus UG, Bokoch GM, Brown EJ. Two signalling mechanisms for activation of αMβ2 avidity in polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem.* 1998;273:10556–10566.
201. Hartwig JH, Bokoch GM, Carpenter CL, et al. Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* 1995;82:643–653.
202. Schafer DA, Jennings PB, Cooper JA. Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J Cell Biol* 1996;135:169–179.
203. Barkalow K, Witke W, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH. Coordinated regulation of platelet actin filament barbed ends by gelsolin and capping protein. *J Cell Biol* 1996;134:389–399.
204. Tardif M, Huang S, Redmond T, Safer D, Pring M, Zigmond SH. Actin polymerization induced by GTP gamma S in permeabilized neutrophils is induced and maintained by free barbed ends. *J Biol Chem* 1995;270:28075–28083.
205. Lassing I, Lindberg U. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* 1985;314:472–474.
206. Theriot JA. Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J Cell Biol* 1997;136:1165–1168.
207. Kaufmann S, Kas J, Goldmann WH, Sackmann E, Isenberg G. Talin anchors and nucleates actin filaments at lipid membranes. A direct demonstration. *FEBS Lett* 1992;314:203–205.
208. Dubreuil RR. Structure and evolution of the actin crosslinking proteins. *Bioessays* 1991;13:219–226.
209. Matsudaira P. Modular organization of actin crosslinking proteins [review, 26 refs]. *Trends Biochem Sci* 1991;16:87–92.
210. Ehlenberger AG, Nussenzweig V. The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. *J Exp Med* 1977;145:357–371.
211. Mitchison TJ, Cramer LP. Actin-based cell motility and cell locomotion [review, 76 refs]. *Cell* 1996;84:371–379.
212. Lin CS, Park T, Chen ZP, Leavitt J. Human plastin genes: comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells. *J Biol Chem* 1993;268:2781–2792.
213. Chafel MM, Shen W, Matsudaira P. Sequential expression and differential localization of I-, L-, and T-fimbrin during differentiation of the mouse intestine and yolk sac. *Dev Dyn* 1995;203:141–151.
214. Lin CS, Shen W, Chen ZP, Tu YH, Matsudaira P. Identification of I-plastin, a human fimbrin isoform expressed in intestine and kidney. *Mol Cell Biol* 1994;14:2457–2467.
215. Kubler E, Riezman H. Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J* 1993;12:2855–2862.
216. Karpova TS, Tatchell K, Cooper JA. Actin filaments in yeast are unstable in the absence of capping protein or fimbrin. *J Cell Biol* 1995;131:1483–1493.
217. Jones SL, Brown EJ. FcgammaRII-mediated adhesion and phagocytosis induce L-plastin phosphorylation in human neutrophils. *J Biol Chem* 1996;271:14623–14630.
218. Messier JM, Shaw LM, Chafel M, Matsudaira P, Mercurio AM. Fimbrin localized to an insoluble cytoskeletal fraction is constitutively phosphorylated on its headpiece domain in adherent macrophages. *Cell Motil Cytoskeleton* 1993;25:223–233.
219. Shinomiya H, Hagi A, Fukuzumi M, Mizobuchi M, Hirata H, Utsumi S. Complete primary structure and phosphorylation site of the 65-kDa macrophage protein phosphorylated by stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1995;154:3471–3478.
220. Shibata M, Ohoka T, Mizuno S, Suzuki K. Characterization of a 64-kd protein phosphorylated during chemotactic activation with IL-8 and fMLP of human polymorphonuclear leukocytes. I. Phosphorylation of a 64-kd protein and other proteins. *J Leukoc Biol* 1993;54:1–9.
221. Li J, Aderem A. MacMARCKS, a novel member of the MARCKS family of protein kinase C substrates. *Cell* 1992;70:791–801.
222. Zhu Z, Bao Z, Li J. MacMARCKS mutation blocks macrophage phagocytosis of zymosan. *J Biol Chem* 1995;270:17652–17655.
223. Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 1992;356:618–622.
224. Seykora JT, Myat MM, Allen LAH, Ravetch JV, Aderem A. Molecular determinants of the myristoyl-electrostatic switch of MARCKS. *J Biol Chem* 1996;271:18797–18802.
225. Thelen M, Rosen A, Nairn AC, Aderem AA. Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* 1991;351:320–322.

226. Aderem A. The MARCKS brothers: A family of protein kinase C substrates. *Cell* 1992;71:713–716.
227. Stendahl OI, Hartwig JH, Brotschi EA, Stossel TP. Distribution of actin-binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis. *J Cell Biol* 1980;84:215–224.
228. Valerius NH, Stendahl OI, Hartwig JH, Stossel TP. Distribution of actin-binding protein and myosin in neutrophils during chemotaxis and phagocytosis. *Adv Exp Med Biol* 1982;141:19–28.
229. Bement WM, Hasson T, Wirth JA, Cheney RE, Mooseker MS. Identification and overlapping expression of multiple unconventional myosin genes in vertebrate cell types [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 Nov 22;91(24):11767]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6549–6553.
230. Fukui Y, Lynch TJ, Brzeska H, Korn ED. Myosin I is located at the leading edges of locomoting Dictyostelium amoebae. *Nature* 1989;341:328–331.
231. Manstein DJ, Titus MA, De Lozanne A, Spudich JA. Gene replacement in Dictyostelium: generation of myosin null mutants. *EMBO J* 1989;8:923–932.
232. Knecht DA, Loomis WF. Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in Dictyostelium discoideum. *Science* 1987;236:1081–1086.
233. Ostap EM, Pollard TD. Overlapping functions of myosin-I isoforms? [comment] [review, 40 refs]. *J Cell Biol* 1996;133:221–224.
234. Hasson T, Mooseker MS. Molecular motors, membrane movements and physiology—emerging roles for myosins. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:587–594.
235. Wagner MC, Barylko B, Albanesi JP. Tissue distribution and subcellular localization of mammalian myosin I. *J Cell Biol* 1992;119:163–170.
236. Greenberg S, Chang P, Silverstein SC. Tyrosine phosphorylation of the gamma subunit of Fc_{gamma} receptors, $p72^{syk}$, and paxillin during Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem* 1994;269:3897–3902.
237. Turner CE, Glenney JR Jr, Burridge K. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J Cell Biol* 1990;111:1059–1068.
238. De Nichilo MO, Yamada KM. Integrin alpha v beta 5-dependent serine phosphorylation of paxillin in cultured human macrophages adherent to vitronectin. *J Biol Chem* 1996;271:11016–11022.
239. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken [review]. *Science* 1995;268:233–239.
240. Burridge K, Nuckolls G, Otey C, Pavalko F, Simon K, Turner C. Actin-membrane interaction in focal adhesions. *Cell Differ Dev* 1990;32:337–342.
241. Burridge K, Turner CE, Romer LH. Tyrosine phosphorylation of paxillin and $pp125^{FAK}$ accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role i cytoskeletal assembly. *J Cell Biol* 1992;119:893–903.
242. Turner CE, Miller JT. Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and $pp125^{FAK}$ binding region. *J Cell Sci* 1994;107:1583–1591.
243. Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking β integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* 1995;130:1181–1187.
244. Araki N, Johnson MT, Swanson JA. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 1996;135:1249–1260.
245. Sbarra AJ, Karnovsky ML. The biochemical basis of phagocytosis: II. Incorporation of C^{14}-labeled building blocks into lipid, protein, and glycogen of leukocytes during phagocytosis. *J Biol Chem* 1960;235:2224–2229.
246. Mayorga LS, Bertini F, Stahl PD. Fusion of newly formed phagosomes with endosomes in intact cells and in a cell-free system. *J Biol Chem* 1991;266: 6511–6517.
247. Funato K, Beron W, Yang CZ, Mukhopadhyay A, Stahl PD. Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin o-permeabilized cells. *J Biol Chem* 1997;272:16147–16151.
248. Joiner KA, Ganz T, Alabert A, Rotrosen D. The opsonizing ligand on Salmonella typhimurium influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes. *J Cell Biol* 1989;109: 2771–2782.
249. Lew PD, Monod A, Waldvogel FA, Dewald B, Baggiolini M, Pozzan T. Quantitative analysis of the cytosolic free calcium dependency of exocytosis from three subcellular compartments in intact human neutrophils. *J Cell Biol* 1986;102: 2197–2204.
250. Zimmerli S, Majeed M, Gustavsson M, Stendahl O, Sanan DA, Ernst JD. Phagosome-lysosome fusion is a calcium-independent event in macrophages. *J Cell Biol* 1996;132:49–61.
251. Rotrosen D. The respiratory burst oxidase. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:589–601.
252. Brown EJ. Adhesive interactions in the immune system. *Trends Cell Biol* 1997;7:289–295.
253. Rosales C, Brown EJ. Neutrophil receptors and modulation of the immune response. In: Abramson JS, Wheeler JG, eds. *The neutrophil.* Oxford: IRL Press, 1993:23–62.
254. Shimizu Y, Hunt SW III. Regulating integrin-mediated adhesion: one more function for PI 3-kinase? *Immunol Today* 1996;17:565–573.
255. Brown EJ. Signal transduction from leukocyte integrins. In: Hemler ME, Mihich E, eds. *Cell adhesion molecules.* New York: Plenum Press, 1993:105–126.
256. Brown EJ, Lindberg FP. Leucocyte adhesion molecules in host defence against infection. *Ann Med* 1996;28:201–208.
257. Van Strijp JAG, Russell DG, Tuomanen E, Brown EJ, Wright SD. Ligand specificity of purified complement receptor type 3 (CD11b/CD18, Mac-1, alphaM beta2): indirect effects of an Arg-Gly-Asp sequence. *J Immunol* 1993;151: 3324–3336.
258. Zhou M-J, Brown EJ. Leukocyte response integrin and integrin associated protein act as a signal transduction unit in generation of a phagocyte respiratory burst. *J Exp Med* 1993;178:1165–1174.
259. Ishibashi Y, Claus S, Relman DA. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 1994;180:1225–1233.
260. Gresham HD, Graham IL, Griffin GL, et al. Domain-specific interactions between entactin and neutrophil integrins—g2 domain ligation of integrin alpha(3)beta(1) and e domain ligation of the leukocyte response integrin signal for different responses. *J Biol Chem* 1996;271:30587–30594.
261. Gresham HD, Goodwin JL, Anderson DC, Brown EJ. A novel member of the integrin receptor family mediates Arg-Gly-Asp-stimulated neutrophil phagocytosis. *J Cell Biol* 1989;108:1935–1943.
262. Newman SL, Tucci MA. Regulation of human monocyte/macrophage function by extracellular matrix. Adherence of monocytes to collagen matrices enhances phagocytosis of opsonized bacteria by activation of complement receptors and enhancement of Fc receptor function. *J Clin Invest* 1990;86:703–714.
263. Vossebeld PJM, Kessler J, Von dem Borne AEGK, Roos D, Verhoeven AJ. Heterotypic FcgammaR clusters evoke a synergistic Ca^{2+} response in human neutrophils. *J Biol Chem* 1995;270:10671–10679.
264. Zhou M-J, Lublin DM, Link DC, Brown EJ. Distinct tyrosine kinase activation and Triton X-100 insolubility upon $Fc_{gamma}RII$ or $Fc_{gamma}RIIIB$ ligation in human polymorphonuclear leukocytes: implications for immune complex activation of the respiratory burst. *J Biol Chem* 1995;270:13553–13560.
265. Watson F, Gasmi L, Edwards SW. Stimulation of intracellular Ca^{2+} levels in human neutrophils by soluble immune complexes: functional activation of Fc[gamma]RIIIb during priming. *J Biol Chem* 1997;272:17944–17951.
266. Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege R, Cossart P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of L. monocytogenes into epithelial cells. *Cell* 1996;84:923–932.
267. Isberg RR. Uptake of enteropathogenic Yersinia by mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;209:1–24.
268. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization [review, 19 refs]. *Cell* 1996;86:345–348.
269. Kerneis S, Bodganova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* 1997;277:949–952.
270. Isberg R, Tran Van Nhieu G. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends Microbiol* 1994;2:10–14.
271. Persson C, Carballeira N, Wolfwatz H, Fallman M. The PTPase YopH inhibits uptake of Yersinia, tyrosine phosphorylation of P130(CAS) and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J* 1997;16:2307–2318.
272. Black DS, Bliska JB. Identification of P130(CAS) as a substrate of Yersinia YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J* 1997;16:2730–2744.
273. Fallman M, Persson C, Wolf-Watz H. Yersinia proteins that target host cell signaling pathways [Review, 35 refs]. *J Clin Invest* 1997;99:1153–1157.
274. Pettersson J, Nordfelth R, Dubinina E, et al. Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact [see comments]. *Science* 1996;273: 1231–1233.
275. Bliska JB, Guan KL, Dixon JE, Falkow S. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential Yersinia virulence determinant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1187–1191.
276. Rosqvist R, Magnusson KE, Wolf-Watz H. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of Yersinia YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* 1994;13:964–972.
277. Pace J, Hayman MJ, Galan JE. Signal transduction and invasion of epithelial cells by S. typhimurium. *Cell* 1993;72:505–514.
278. Francis CL, Ryan TA, Jones BD, Smith SJ, Falkow S. Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* 1993;364: 639–642.
279. Hondalus MK, Diamond MS, Rosenthal LA, Springer TA, Mosser DM. The intracellular bacterium Rhodococcus equi requires Mac-1 to bind to mammalian cells. *Infect Immun* 1993;61:2919–2929.
280. Marra A, Isberg RR. Common entry mechanisms. Bacterial pathogenesis [review, 14 refs]. *Curr Biol* 1996;6:1084–1086.
281. Wright SD, Silverstein SC. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med* 1983; 158:2016–2023.
282. Reiner NE. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection [review, 70 refs]. *Immunol Today* 1994;15:374–381.
283. Theriot JA. The cell biology of infection by intracellular bacterial pathogens [review, 106 refs]. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1995;11:213–239.
284. Garcia-del Portillo F, Finlay B. The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. *Trends Microbiol 1995;3:373–380.*

285. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, et al. Lack of acidification in *Mycobacterium phagosomes* produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994;263:678–681.
286. Horwitz MA. Interactions between macrophages and Legionella pneumophila [review, 102 refs]. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;181:265–282.
287. Wright SD, Levin SM, Jong MTC, Chad Z, Kabbash LG, Jong MT. CR3 (CD11b/CD18) expresses one binding site for Arg-Gly-Asp-containing peptides and a second site for bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1989;169:175–183.
288. Schreiber AD, Rossman MD, Levinson AI. The immunobiology of human Fcgamma receptors on hematopoietic cells and tissue macrophages. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;62:S66–S72.
289. Edwards SW. Cell signalling: by integrins and immunoglobulin receptors in primed neutrophils. *Trends Biochem Sci* 1995;20:362–367.
290. Brown EJ, Joiner KA, Frank MM. Complement. In: Paul WE, ed. *Fundamental immunology*. New York: Raven Press, 1984:645–668.
291. Guan E, Robinson SL, Goodman EB, Tenner AJ. Cell-surface protein identified on phagocytic cells modulates the C1q-mediated enhancement of phagocytosis. *J Immunol* 1994;152:4005–4016.
292. Alvarez-Dominguez C, Carrasco-Marin E, Leyva-Cobian F. Role of complement component C1q in phagocytosis of Listeria monocytogenes by murine macrophage-like cell lines. *Infect Immun* 1993;61:3664–3672.
293. Tenner AJ, Robinson SL, Ezekowitz RA. Mannose binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000 M(r) component of the C1q receptor. *Immunity* 1995;3:485–493.
294. Francois P, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP. Host-bacteria interactions in foreign body infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17:514–520.
295. Shen W, Steinruck H, Ljungh A. Expression of binding of plasminogen, thrombospondin, vitronectin, and fibrinogen, and adhesive properties by Escherichia coli strains isolated from patients with colonic diseases. *Gut* 1995;36:401–406.
296. Hasty DL, Courtney HS. Group A streptococcal adhesion. All of the theories are correct. *Adv Exp Med Biol* 1996;408:81–94.
297. Westerlund B, Van Die I, Hoekstra W, Virkola R, Korhonen TK. P fimbriae of uropathogenic Escherichia coli as multifunctional adherence organelles. *Zentralbl Bakteriol* 1993;278:229–237.
298. Zareba TW, Pascu C, Hryniewicz W, Wadstrom T. Binding of extracellular matrix proteins by enterococci. *Curr Microbiol* 1997;34:6–11.
299. Desjardins M, Celis JE, van Meer G, et al. Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem* 1994;269:32194–32200.
300. Galan JE, Bliska JB. Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells [review, 172 refs]. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1996;12:221–255.
301. Greenberg S, Burridge K, Silverstein SC. Colocalization of F-actin and talin during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Exp Med* 1990;172:1853–1856.
302. Adam T, Arpin M, Prévost M-C, Gounon P, Sansonetti PJ. Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J Cell Biol* 1995;129:367–381.
303. Dehio C, Prevost MC, Sansonetti PJ. Invasion of epithelial cells by Shigella flexneri induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60c-src-mediated signalling pathway. *EMBO J* 1995;14:2471–2482.
304. Drevets DA, Campbell PA. Roles of complement and complement receptor type 3 in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by inflammatory mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1991;59:2645–2652.
305. Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege R-M, Cossart P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of L. monocytogenes into epithelial cells. *Cell* 1996;84:923–932.
306. Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *J Immunol* 1991;147:1983–1994.
307. Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum. *J Clin Invest* 1990;85:1304–1314.
308. Schorey JS, Li Q, McCourt DW, et al. A *Mycobacterium leprae* gene encoding a fibronectin binding protein is used for efficient invasion of epithelial cells and Schwann cells. *Infect Immun* 1995;63:2652–2657.
309. Watarai M, Funato S, Sasakawa C. Interaction of ipa proteins of shigella flexneri with alpha(5)beta(1) integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J Exp Med* 1996;183:991–999.
310. Brown EJ, Joiner KA, Frank MM. Interactions of desialated guinea pig erythrocytes with the classical and alternative pathways of guinea pig complement in vivo and in vitro. *J Clin Invest* 1983;71:1710–1719.
311. Ginocchio CC, Olmsted SB, Wells CL, Galan JE. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on Salmonella typhimurium. *Cell* 1994;76:717–724.
312. Talamas-Rohana P, Wright SD, Lennartz MR, Russell DG. Lipophosphoglycan from Leishmania mexicana promastigotes binds to members of the CR3, p150.95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J Immunol* 1990;144:4817–4824.

第 31 章 细胞毒性 T 淋巴细胞

Pierre A. Henkart[1]

淋巴细胞与巨噬细胞均具有摧毁其他细胞的不寻常的细胞特性。不要吃惊，这种活性肯定会被严密控制以避免损伤宿主自身。本章就我们目前对淋巴细胞的细胞毒功能的理解做一小结。并着重讲解细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)，因为对其特性已经做了很多研究，但颗粒分泌途径触发后事件的描述同样也使用于自然杀伤细胞(NK)。关于 NK 细胞更多的描述，请参阅第 16 章。有时，关于细胞毒机制的研究进展是首先在 NK 细胞中取得的。

1021

由于有细胞毒活性的细胞毒性淋巴细胞也是细胞因子(CK)的重要产生细胞，所以有时在试图将这些细胞的容易论证的体外细胞毒活性同体内的各种现象联系起来的时候很容易引起混淆。本章不打算描述 CTL 分泌的细胞因子活性，因为它同非细胞毒淋巴细胞的分泌活性并没有两样。因此本章集中讨论细胞毒性淋巴细胞独特的与摧毁其他细胞能力相关的活性。

细胞毒性 T 细胞是根据其体外功能定义的

细胞毒性分析可通过短期(4～18 小时)的微量培养而完成，即细胞毒效应细胞同靶细胞按各种比例混

① P. A. Henkart: Experimental Immunology Branch, National Cancer Institure, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892-1360.

合培养，然后按靶细胞死亡的情况加以评估。这样一种功能性定义在体内是否恰当还有问题，但是在体外，细胞毒性分析的简易性和定量特性允许这种淋巴细胞效应器功能的分子定义。反过来，也允许以设计明确的实验来说明体内的相关性，请见下面的讨论。

体外靶细胞死亡可通过测量两个不同但有关联的靶细胞特性来评估。最常用的特性是质膜的完整性，淋巴细胞的细胞毒活性最初就是通过在显微镜下观察靶细胞的死亡或这种完整性的丢失而发现的。随着Cr释放[1]方法的发展，已经获得这种死亡满意的定量，这种方法已经成为本领域使用很多年的标准技术。 1022 这种细胞毒性分析使用同痕量氧化剂$^{51}Cr_2O_7^{-2}$预培养而标记上同位素^{51}Cr的靶细胞。靶细胞的死亡是通过测量细胞培养上清中同位素^{51}Cr的裂解释放，^{51}Cr在胞内被还原成$^{51}Cr^{+3}$并同胞内的多聚阴离子形成聚合物[2]。这种复合物不能被活细胞摄入，但能通过对上清抽样方便地定量出放射强度。最近已经发展了同样敏感的非放射性靶细胞裂解定量分析方法，包括测量预先包被的非穿透可溶性荧光染料的释放[3]，或测量可通过稀土元素复合物的时间解析荧光检测到的螯合剂的释放[4]。特定靶细胞所专有的胞质酶的裂解释放或胞浆中表达的病毒蛋白抗原的裂解释放是可用于体内的另一些替代方法[5,6]。

反映死亡并可方便检测的第二个靶细胞特征是测量DNA的破碎。如下所述，这是同细胞死亡相关的凋亡核损伤的特征性行为的一部分。这种死亡可由很多因素引起，如细胞毒性淋巴细胞等。碎裂的DNA从胞核中释放，可以释放入去污剂裂解液中[7]，或使用自动细胞收集仪[8]虽然DNA碎裂只是靶细胞死亡的一部分，并常常在裂解之前就可以测出[10,11]。但是裂解或DNA碎裂一般是很相关的[9]。然而，一些靶细胞或实验条件可能使这两种细胞死亡检测方法割裂开。纤维母细胞，特别是处于不分裂时，在CTL诱导的裂解期间显示很少有DNA的释放[12,13]。因此，如果不精确和不在实验基础上定义，细胞死亡这个名词可能让人误解。

通过上述方法测量靶细胞死亡不适于不同细胞群细胞毒效力的直接比较，因为靶细胞死亡同效应细胞的投入量并不呈线性相关。而且，在该分析方法的培养物中，一些细胞毒性淋巴细胞介导的细胞毒性可能比另一些更有效。比较不同细胞群体细胞毒效力的可行方法是，比较在一个给定的分析系统中达到一给定水平的靶细胞裂解所需要的效应细胞数。结果用裂解单位表示，并同所需的效应细胞数呈负相关[14]。

淋巴细胞介导的细胞毒性的基本特性

在认识到靶细胞损伤的多种不同分子途径之前，进行了许多细胞毒淋巴细胞机制的研究，这些较早的研究结果一定要慎重地解释。然而，这些研究清楚地显示，细胞毒淋巴细胞能迅速地、有顺序地和选择性地杀死靶细胞。缺乏抗原的旁观者细胞同裂解的靶细胞混合后的通常并不会被破坏[15]，尽管在某些系统中可检测到低水平的旁观者细胞的CTL裂解[16~18]。在研究细胞毒过程的延时电影中，可观察到几分钟内CTL结合靶细胞并施加可见的损伤；有时再过几分钟即见细胞死亡[19,20]。这种研究显示，单个CTL可以在数小时内杀死多个靶细胞，并可见CTL靶细胞簇[21]。这种CTL诱导的快速死亡过程不能被蛋白质合成抑制剂所阻断[22]，提示已预先形成了裂解介体。CTL诱导的细胞毒性最显著的特性是，严格的TCR识别[TCR]的特异性，而MHC限制现象就是作为一个快速而方便的TCR识别结果，用细胞毒性来首次定义的[23]。用IL-2和其他CK培养的CTL克隆表现出强烈的细胞毒性，当与靶细胞$<1:1$的比例混合时，数小时内可以彻底破坏靶细胞[24]。

20世纪70年代，CTL杀伤机制研究确定了此过程的三个不同阶段[25,26]。首先是CTL靶细胞黏附，形成温和剪切力不能破坏的牢固附着。这种黏附需要在37℃下数分钟；如有镁离子存在可不需要钙离子；低温和许多药物可阻断此过程。紧接着第二步称为致死性攻击或程序化裂解，也需数分钟。其特性是媒介中需要钙离子；同黏附一样，低温和许多药物也可以阻断此过程。最后一步是CTL细胞毒性的靶细胞瓦解阶段，并以靶细胞的裂解结束。它持续的时间最长，其平均半衰期为1.7小时。本阶段只包括靶细胞，因为即使CTL被清除，如补体清除，也不会有影响。此阶段的特征是二价阳离子非依赖性，目前尚无药物可有效阻断致死性损伤的靶细胞裂解。

淋巴细胞发挥细胞毒性效应的两个主要机制的区别

1023

如图 31.1 所示,在体外的 4~6 小时分析中,CTL 运用两种不同的细胞裂解途径:穿孔素依赖的胞吐途径和 FasL/Fas 途径。因为每种途径的功能需要不同的效应分子,所以选择性地阻断每个途径以及它们对特异 CTL 靶细胞结合的相对重要性的评估最近已成为可能。如图 31.2 所示,FasL/Fas 途径可用多种方法来选

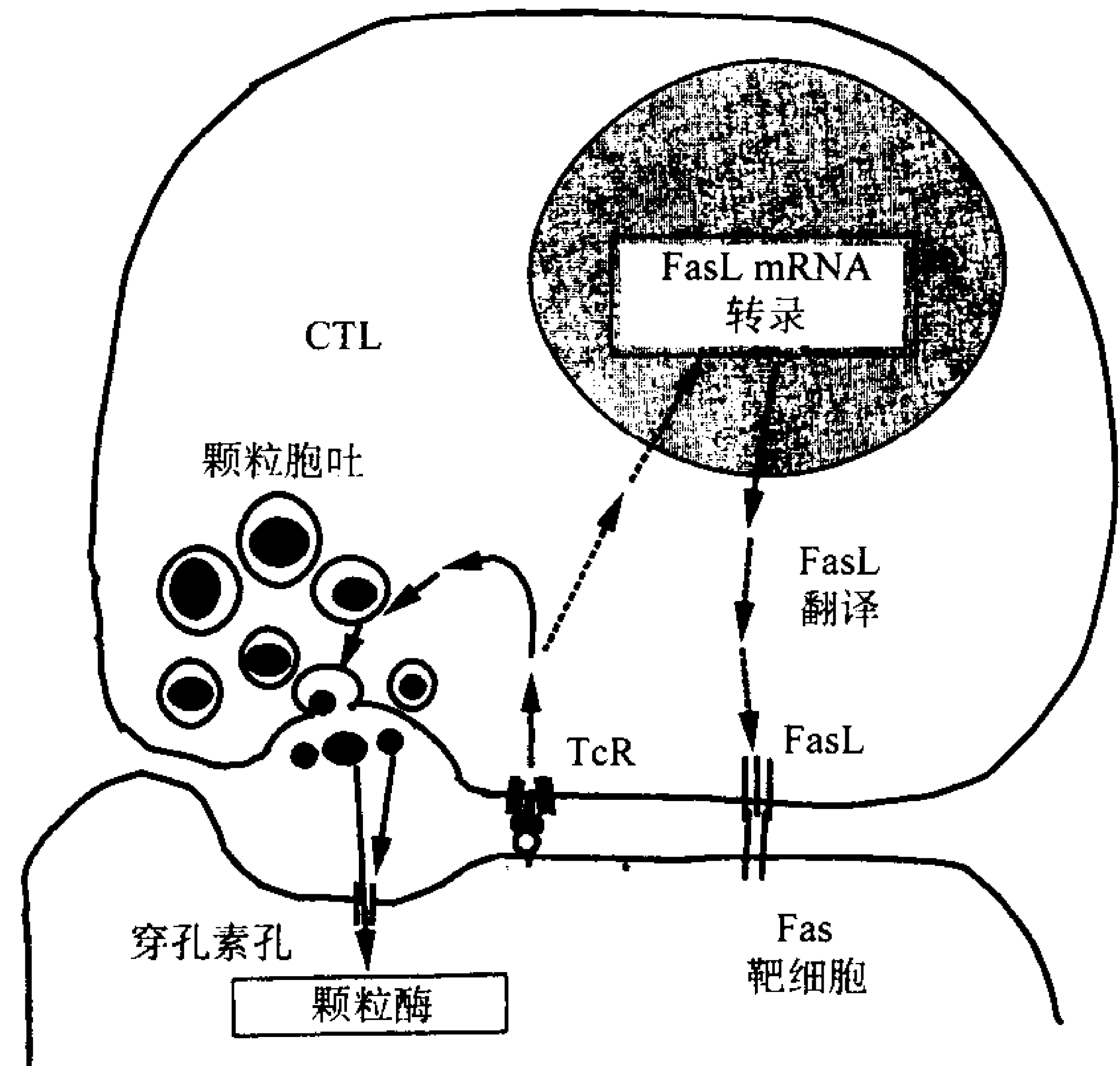


图 31.1 CTL 在体外所使用的两种细胞毒途径。两种途径通过 TCR 交联靶细胞抗原而启动,这可能是通过细胞间黏附作用完成的。在 CTL 中,共同起始细胞传导步骤是两条途径所共用的,并从此开始各行其道。左侧的颗粒胞吐途径是一个典型的受体控制的分泌过程,并从颗粒中释放穿孔素和颗粒酶到 CTL 和其靶细胞间突触样接头区中。右侧的 FasL/Fas 途径需要从头合成 Fas 配体的 mRNA 及随后在 CTL 表面的表达,并在那里同靶细胞的 Fas 交联。

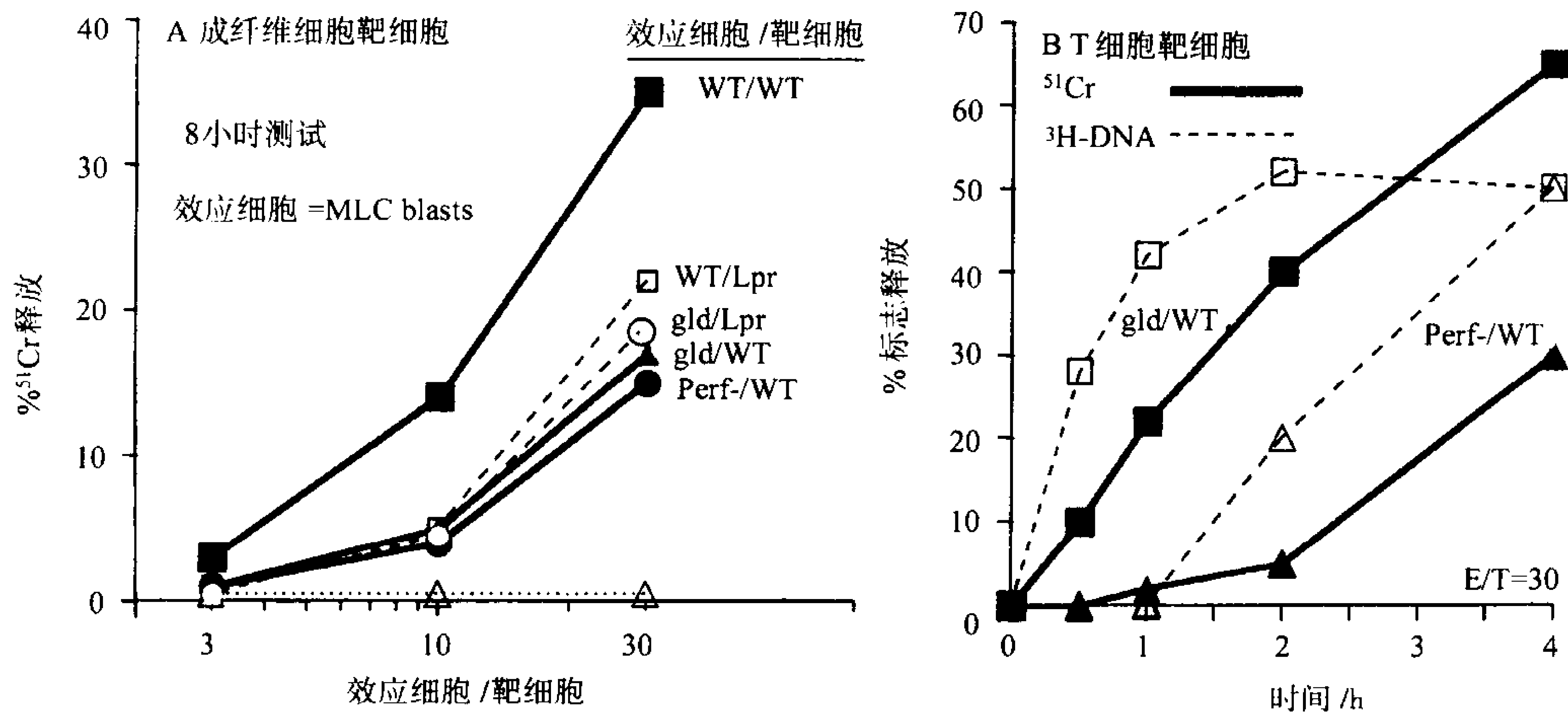


图 31.2 两种 CTL 途径的细胞毒性。A:来自一个或两个细胞毒途径缺陷小鼠 MLC 的 CTL 体外杀伤 8 小时后,成纤维细胞裂解情况的比较.数据来自 Lowin 等[29]。B:两种途径的裂解(实线和实心标志)和 DNA 碎裂(虚线和空心标志)的动力学比较。DNA 碎裂是通过测量从预先刺激的靶细胞中释放到上清中的标记胸腺嘧啶核苷而确定。效应细胞和靶细胞的结合同 A,但靶细胞为 ConA 刺激的 T 细胞。数据来自 Lowin 等[27]。

择性地阻断:①使用来自于缺乏功能性 FasL 的 *gld* 突变小鼠的 CTL 效应细胞;②使用 Fas 阴性靶细胞,特别是来自于 *lpr* 突变小鼠;③使用非交联的抗 Fas 抗体或可溶性 Fas 来阻断 FasL-Fas 的结合。转录和翻译的抑制剂是另一种方法[27],但是除了这些药物的不良反应外,一些 CTL 可能含有预先存在的 FasL。穿孔素依赖的颗粒胞吐途径可用来自于穿孔素敲除小鼠的效应细胞彻底阻断[28,29]。可能有用的阻断颗粒胞吐途径的药

理学方法是包括用伴刀豆素 A 处理效应细胞[30]或用 Sr^{+2} 预处理以激发脱颗粒[31]。对于含完全功能性 Fas 的靶细胞,FasL/Fas 途径可占 4~6 小时分析方法中细胞毒性的一半。然而,对于大多数 CTL 靶细胞结合来说,这种短期分析法中颗粒胞吐途径占主导地位[28,29]。如图 31.2 所示,当两条途径都被封阻后,在短时间分析法中 CTL 丢失了所有可检测的细胞毒性。对于 12-20h 的分析实验,Fas/FasL 机制在一些含 Fas 的靶细胞中更占优势[27]。对于这样长期分析,利用 CTL 产生的肿瘤坏死因子(TNF)的第三个机制也对 TNF 敏感的靶细胞有细胞毒性[32]。

CTL 分泌颗粒

"调节型"与"组成型"蛋白的分泌途径

细胞分泌通过膜融合过程而产生,即胞吐作用。在这个过程中胞内小囊或颗粒被膜同质膜融合,从而释放颗粒内的包含物于胞外间隙。这种分泌被分为两类,如果胞吐作用是对膜信号的应答而出现预先形成颗粒的胞外分泌则称为调节型分泌;如果含新近合成的蛋白的小囊没有延滞分泌则称为组成型分泌[33]。大多数淋巴细胞蛋白分泌(抗体、细胞因子)是组成型分泌,因为分泌过程中,脑内并未检测到有新近分泌的蛋白。这种分泌在对淋巴细胞的活化和分化的应答时得到很大的提高,特别是在 B 淋巴细胞成熟为浆细胞时,在这个意义上,组成型分泌在淋巴细胞中是被高度调节的。调节性分泌在很多非淋巴细胞中占优势,其特征是将初始小泡新合成蛋白向更大的分泌颗粒转运,并没有确定期限地在那里贮存。脱颗粒通常由质膜受体所激发。

CTL 利用调节型和组成型两条分泌途径。CK 如 γ 干扰素显示是通过组成型途径被分泌的[34]。甚至原则上由调节型途径分泌的细胞毒性介体在抗原激发克隆的 CTL 后也可以通过组成性途径立即分泌[35],并且这种组成型分泌可以介导一些旁观者细胞对杀伤。第 25 章描述了 $CD8^+$ T 细胞对细胞因子分泌的控制。

分泌颗粒在淋巴细胞中的出现并不总是明显的,因为同粒细胞或肥大细胞相比其数量太少。颗粒成分敏感的免疫染色方法显示静息初始 TCR-α T 细胞即使有也只有很少的颗粒,而大多数静息 TCR-δ T 细胞和 NK 细胞都有可检测的颗粒[36]。抗原激发的活化导致 $CD8^+$ 及在某种程度上 $CD4^+$ T 细胞中的颗粒形成,而颗粒在大多数静息的血液 $CD45RO^+$ 记忆表型的 $CD8^+$ T 细胞中是可以检测的。

颗粒形态学

1024

图31.3A显示体外生长的CTL克隆的CTL颗粒的电子显微照片(E)图像。这种颗粒直径一般是0.5~

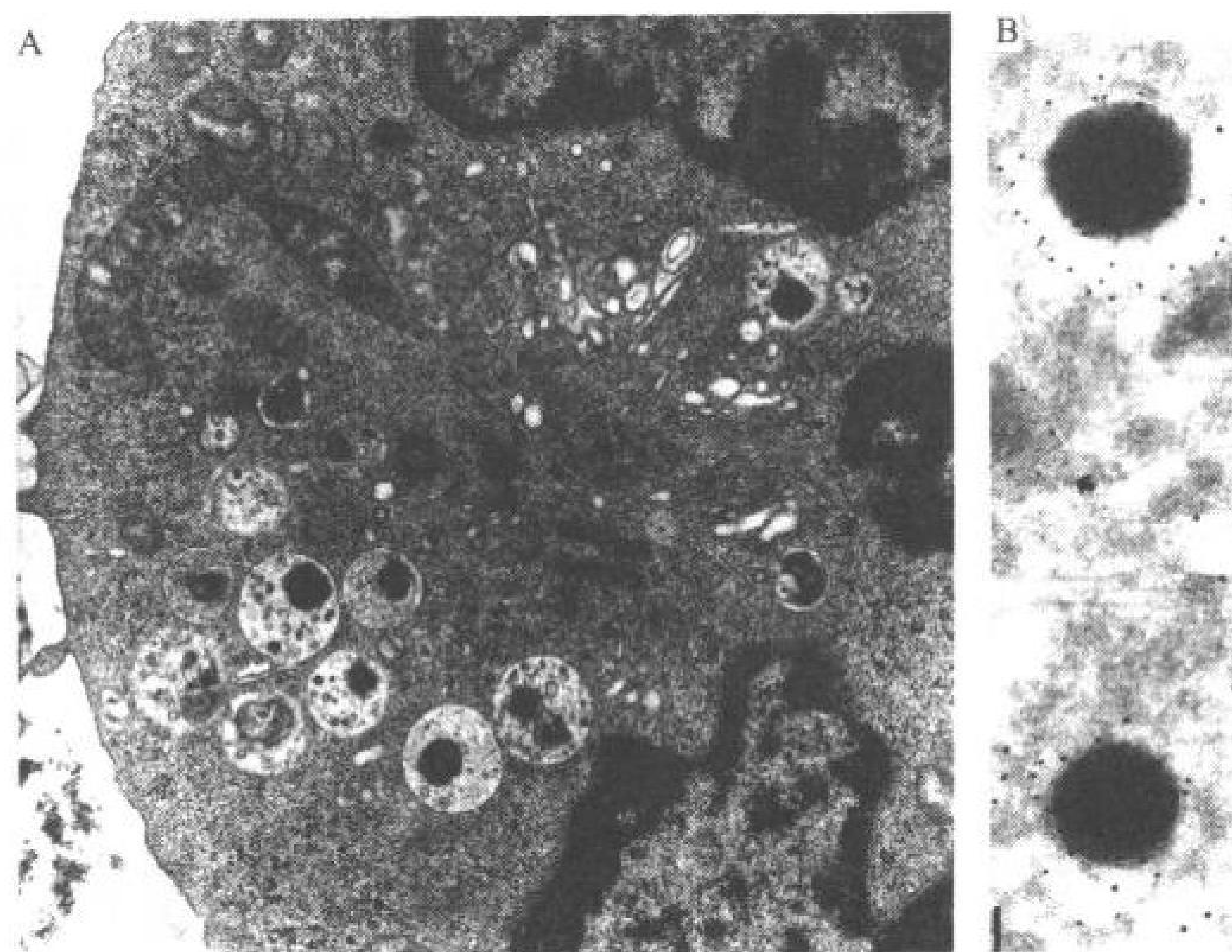


图 31.3 电镜所见的 CTL 颗粒。A:显示了大多数胞浆细胞器包括颗粒的人 CTL 克隆。这张切片显示了大多数颗粒中的核心,这是中间型,因为它们还含有一个显著的多泡区。胞浆还含有线粒体、内质网(小空泡)、高尔基体和中心粒。B:人 CTL 克隆的免疫金标记颗粒,显示了颗粒核心的颗粒酶 B(大颗粒)的定位和在外膜上的溶酶体膜标志 LAMP1。标尺为 100nm[37],图像由 Peter Peters 博士提供(Utrecht 大学)。

1μm,并有一个异质性结构,含两种成分。颗粒核心是浓染的均质区,显示同肥大细胞的颗粒核心相似。在有些颗粒中,核心由双层膜包被,而有些颗粒中核心则没有被膜包围(图 31.3B)[37]。其他成分是是多泡的,由直径在30~150nm之间的很多膜性小泡组成。根据这些成分的多寡,可对颗粒进行分类:Ⅰ型颗粒主要含核心,只有少量外膜成分;Ⅱ型颗粒只含多泡成分而不含核心。这显示同其他细胞中的晚期内涵体或前溶酶体相似。中间颗粒含两种成分,其核心比Ⅰ型颗粒小。

利用免疫金染色法(图 31.3B)的电子显微照片研究显示,颗粒核心含穿孔素、颗粒酶和蛋白多糖;而多泡区则含溶酶体酶和溶酶体膜标志[37]。小囊泡通过胞吞作用来自于质膜的证据源于免疫金的 EM 研究,囊泡中显示有 TCR、CD8 和 MHCI 类分子的存在。这些蛋白定位在朝向颗粒内腔的正常细胞外区域,这同此膜的胞吞起源是相吻合的。

同显微镜相结合,弱碱性 pH 探针显示 CTL 颗粒有一个酸性的内部环境,pH 值约为 5.4[38]。在其他细胞的分泌颗粒中也获得相似的结果,但这种 pH 值没有成熟溶酶体中的那样低。

CTL 颗粒的成分

CTL 颗粒已经从体外培养的同源淋巴细胞克隆中纯化。做生化分析时,这些颗粒显示有限数量的蛋白条带。最多的蛋白是穿孔素和颗粒酶,这两种成分已经在靶细胞死亡研究了它们的功能性作用。这些成分的生化特性将在本节讨论,它们在细胞毒性中的功能将在下一节中讨论。

穿孔素(溶胞素, PFP)

穿孔素只在细胞毒淋巴细胞颗粒中表达,并且在细胞毒性的颗粒胞吐作用中是必须的。它是一个 555 个氨基酸的糖蛋白,约 65~75 kDa。在钙存在时,能插入膜的脂质双层中多聚化,形成导致细胞死亡的结构性和功能性小孔[39]。虽然小心地从颗粒中分离后,穿孔素是一个水溶性蛋白,但是暴露于正常的胞外钙离子浓度后显示可以触发一个构像改变,其暴露出疏水基团并使该蛋白成为两性分子。在钙离子存在下,穿孔素插入脂质膜中并自我组装成稳定的多聚形式,EM 显示为孔样结构,同补体形成的孔状结构有惊人的相似图 31.4。穿孔素形成的这种结构的内径大于补体形成的结构,但大体形状相似。这种孔样结构可见于被大颗粒淋巴细胞或 CTL 杀死的靶细胞表面[40~42],证明效应细胞的脱颗粒伴随着靶细胞的死亡。

1025

如图 31.4 所示,来自三个物种的穿孔素的克隆和序列分析已显示很可能有重要功能的两个序列同源区:①一个同补体膜攻击复合体蛋白相关的补体同源区(C6、C7、C8a、C8b 和 C9),它同形成溶细胞小孔的形成有关[43~46];②一个 C2 区,它同其他钙结合、脂质-相互作用蛋白的区域相关[47]。这些区域由一个短的富含 Cys 区相连。该分子氨基端的第三位同数据库中的蛋白质没有显著的同源性。C 端肽是新合成的穿孔素分子在从高尔基体到颗粒期间被蛋白裂解加工而去掉的,此活化的 C2 区是磷脂结合位点[48]。

将穿孔素的功能性成孔特性同其结构相联系比较困难。它没有 α 螺旋跨膜区约 20 个疏水氨基酸的典型跨膜结构域。构成两性螺旋的周期性出现的疏水氨基酸的序列分析揭示,此序列是能以这种方式与胞膜相作用的候选序列,最突出特点在于其补体同源结构域的 N 端[49]。因为疏水探针同膜相关 C9 的 150 个氨基酸残基区域相互作用,此区包含同穿孔素同源区,因此,人们提出了一个非常推理性的模型,在此模型中,此区是胞膜孔隙的一部分[50]。还没有明确的实验证据显示在膜相互作用中存在任何穿孔素区域。从 N 端合成肽的功能性研究已显示了在人工膜中的裂解活性和成孔活性[51],但这些结果的生理关联性仍不清楚。在杆状病毒中表达的重组穿孔素有钙-依赖的裂解活性,缺少 N 端区的重组穿孔素有大致相似但不依赖钙的裂解活性[52,53]。

1026

虽然穿孔素补体同源区 N 端和 C 端部分显示了同补体蛋白 C6、C7、C8a 和 C9 的高度同源性,但是功能性暗示仍不清楚。这些补体蛋白都通过尚不清楚的相互作用同膜有关联[54],但是只有 C9 形成与穿孔素同源的大的功能性孔隙和孔样结构。C9 多聚化和孔隙形成的分子基础仍是一个有待解决的问题[54],它只对穿孔素提供有限的洞隙。

虽然钙对穿孔素功能很关键，但穿孔素序列没有显示出在钙调蛋白结构域中典型的 EF 臂钙结合基序。然而，最近发现了一个同 C2 结构域家族同源的序列，该 C2 家族最初在多个磷脂酶 C 亚型中描述过[55]。这些结构域也见于其他蛋白质中，并以钙依赖方式同脂质相互作用，包括蛋白激酶 C 的亚型、v-SNARE 蛋白和 ras-GTP 酶活化蛋白[47]。此结构域由 4 股反向平行的 β-片层的三明治对组成，与连接环一起在一端形成一个可结合 1～2 个 Ca^{+2} 的口袋。值得注意的是，结合 Ca^{2+} 离子的 5 个天冬氨酸残基出现在穿孔素所有三个序列和大多数共同氨基酸形成肽链。在其他蛋白质中出现时，C2 结构域似乎负责钙依赖的同胞膜中磷脂头部基团的结合。

穿孔素已显示可与胞膜在低温或低离子强度下形成钙依赖的可逆的复合体[56-59]，并且似乎这种相互作用包括 C2 结构域。磷酸胆碱主要基团的相互作用被认为是，基于可溶性及膜相关性磷酸胆碱对穿孔素介导的溶破作用的抑制效应[59]，但穿孔素可在包含磷酸胆碱主要基团的脂质体中形成小孔[60]。与膜结合的 C2 结构域主要基团特异性是易变的[47]。C2 结构域与钙、脂质结合被认为可引起邻近蛋白结构域发生构像变化，提示了穿孔素作用的一个模型，在此模型中，这种变化伴随着疏水蛋白基团的暴露、膜插入和多聚化。聚合意味着分子间两种不同表面的相互作用，如图 31.4 所示。尽管这些可能在类似 C9 的补体同源结构域中，但是 C2 结构域也可能与之有关[61]。

穿孔素在膜上迅速聚合形成的孔样结构提示：中心的亲水性核心被细胞膜的蛋白分子所包围(图 31.4)。然而，这样完全聚合的孔样结构并不是形成可让离子、小分子通过的更小的孔所必需的。平坦的脂

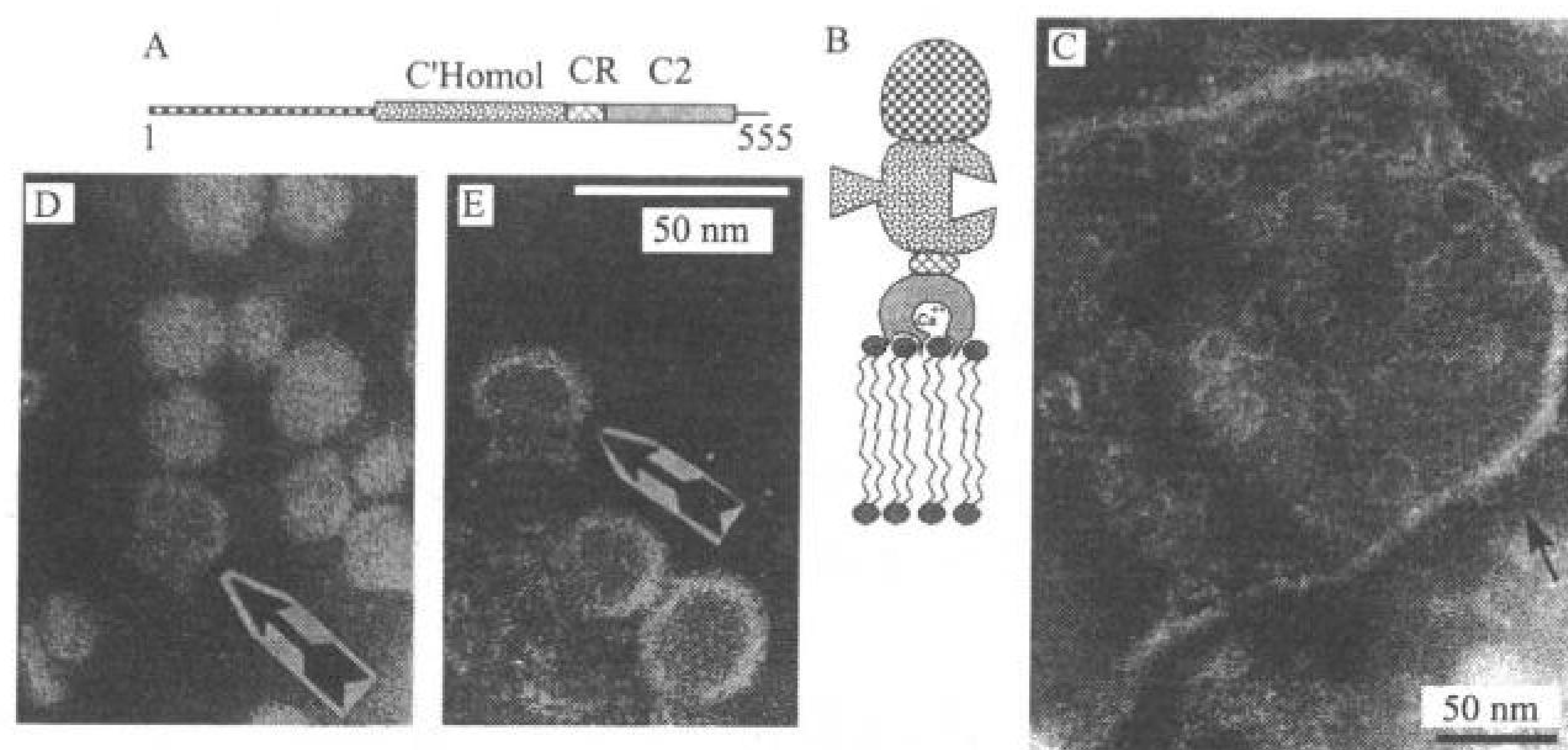


图 31.4　穿孔素序列和孔样结构。A：穿孔素蛋白序列示意图。分子的氨基端显示同数据库中的蛋白没有同源性。点状区(C Homol)显示同补体 C6、C7、C8a 和 C9 有显著的但较远的同源性，在其左端含有一个潜在的两性螺旋。其后紧接着一个短的富含 Cys 区(CR)，其作用尚不得而知。再其后是 C2 同源区，可能在钙依赖的磷脂相互作用中起作用。最后是 COOH 肽，它在颗粒贮存前就通过加工而被切除。B：在多聚化和插入膜之前以单体形式结合到膜上时，穿孔素结构域的推理性图解描述。C2 结构域结合着 Ca^{2+} 和磷脂头部。C 同源区显示含有能自身聚合的结构单元，因为 C9 形成多聚体，并且其他补体蛋白又结合其他同源蛋白以形成攻膜复合体。聚合和插入后膜作用区域仍不清楚。C：人大颗粒淋巴细胞以 ADCC 方式攻击的血影细胞表面的负染穿孔素孔样结构的电子显微镜图像[40]。以前已经描述了来自补体裂解红细胞的相似但稍小的结构[315]。箭头指向孔样结构的边缘，提示它们呈圆桶状埋在膜中。在这种 ADCC 系统中，以前有关这个系统的功能研究已说明释放的标志蛋白的一个孔样筛分行为[64]。本图来自 Robert Dourmashkin。D：在钙离子存在下用低浓度纯化穿孔素处理的小 unilamellar 溶酶体。在这种条件下，可溶性标志从这些溶酶体中释放出来。箭头示穿孔素孔样结构已经插入其膜中的溶酶体。这种溶酶体已经对暗负染是可穿透的。E：用高浓度纯化的穿孔素处理的溶酶体释放出高比例的标志。箭头示插入在脂质双层的孔样结构[60]。

质双分子层的电学研究发现,穿孔素孔导致不同尺寸的大离子通道形 成[39,62,63]。在检测标记大分子穿过用穿孔素处理过的细胞膜能力的研究中发现,穿孔素形成的功能性孔道可允许直径为 10~14nm 的蛋白以及右旋糖酐、100 kDa 以上的球蛋白通过[64,65]。这些估计与在 EM 中看见的内径为 14nm 的孔道相符。

当用于红细胞裂解或脂质体穿透活性分析时,在钙存在下穿孔素有强有力的裂解活性。穿孔素对有核细胞的裂解活性分析显示,需要 10~100 倍的穿孔素量才能达到同红细胞裂解一样的效果[66,67],这一现象也见于其他成孔分子[68]。如下所述,这可能是因为有核细胞中的修复机制。CTL 产生的穿孔素孔道似乎并不直接溶破有核靶细胞,而是穿透靶细胞,从而使颗粒酶对靶细胞产生效应。尽管补体和穿孔素通过一种胶体渗透机制使靶红细胞裂解,但这并不能解释它们对有核靶细胞的作用机制[69],该机制可能是形成的孔道可直接允许细胞内生存所必需分子溢出,而杀死细胞 。

穿孔素的一些特性有助于解释其在细胞毒性淋巴细胞中的功能。当 pH 值 <7 时,穿孔素的裂解活性会迅速下降[66],故它不能在酸性颗粒膜上形成小孔。穿孔素的活性可被疏水性物质如脂蛋白和膜等有效抑制。因此,在钙存在及中性 pH 值条件下增加的后分泌型两性分子可迅速插入邻近的任何疏水性表面。脂蛋白和邻近膜的存在确保了穿孔素分泌后的旁观者效应降到最低。这点也会在以后讨论 CTL 自我保护时谈到。

新合成的穿孔素通过高尔基体后进入颗粒的机制尚未弄清。此蛋白与颗粒酶、溶酶体蛋白一样,不与 6-磷酸甘露糖形成共价键。然而,溶酶体蛋白似乎利用一种特征不明的第二系统进行拣选分类,穿孔素可能也依赖于此种方式。现仍不清楚穿孔素的何种性质对于其与蛋白多糖、颗粒酶形成颗粒核心复合体是关键的,尽管该序列的阳离子区域可被鉴定。

颗粒酶

颗粒酶是存在于 CTL 颗粒中的丝氨酸蛋白酶,在其他部位或组织的颗粒中有少量表达[70]。其蛋白的序列与丝氨酸蛋白酶,包括经典丝氨酸蛋白酶体催化三联体的保守氨基酸,都有着明显的同源性[71]。基于序列的同源性,颗粒酶同肥大细胞、巨噬细胞和中性粒细胞的颗粒蛋白酶一起组成丝氨酸蛋白酶的亚家族[72]。这个亚家族的共同特征是在近 N 端有保守的 PYMPHSRA 序列。而通常“颗粒酶”仅被用来描述表达在淋巴细胞中的这个亚家族的成员。

尽管对颗粒酶的作用底物仍是一种猜测,但生物化学研究表明合成肽可作为一些颗粒酶的底物。表 31.1 小结了已知颗粒酶的特性。小鼠颗粒酶 A 和 B 仅在异种免疫后腹腔中的高溶胞活性的 CTL 中检测出,也可在体外 $CD8^+$ CTL 活化的数天内表达。有趣的是这两种蛋白酶有两种彼此明显不同且与多数其他颗粒酶也不同的裂解特性。颗粒酶 B 的底物识别特性同其他哺乳细胞丝氨酸蛋白酶不一样,因为它要求 P1 位氨基酸为天冬氨酸(即裂解后的 C 端为天冬氨酸)。现已普遍认为,颗粒酶 B 的这种特性将激发如下所述的靶细胞凋亡。颗粒酶 A 对赖氨酸苯甲酰硫酯赖氨酸(BLT)有高度的活性,在淋巴细胞匀浆中出现的这种活性仅限于 CTL。不过,在肥大细胞颗粒中发现相关的类胰蛋白酶。

1027

较长时期的体外培养后,$CD8^+$ CTL 增加表达其他的小鼠颗粒酶(C-G)。这些颗粒酶的有限的生化研究已经进行,它们的蛋白分解特异性仍然不确定。所有颗粒酶的研究表明酶裂解活性在中性 pH 值最大。因此,认为颗粒酶的功能性底物在颗粒内是不太可能的,因为它们经过胞吐后出现在中性 pH 值。

与许多其他的蛋白酶一样,新合成颗粒酶是静止的蛋白酶,必须经过蛋白分解才具有酶溶活性。所有已知的颗粒酶在单一序列之后,和与之一致的成熟酶 N 端序列 IIGG 之前均包含一活性二肽。用二肽基肽酶 I 将活性二肽移入颗粒中。已经提出颗粒酶的 PHSRPYM 基序与颗粒蛋白多糖相互作用,为二肽基肽酶执行的活化处理维持正确构型。

颗粒酶在中性 pH 值下是高正电荷的蛋白。尽管,这些电荷对其同颗粒蛋白多糖形成离子复合物结构非常重要,但是分泌后它们也可介导与胞外聚阴离子成分的连接。不像其他的分泌蛋白酶,颗粒酶不包含催化区以外的 其他蛋白结构域。

表 31.1 淋巴细胞颗粒酶

颗粒酶	分裂的 P1 氨基酸	表达部位	种类	其他特性
A	Lys/Arg	CD8 + CTL, NK, γδ	M, H, R	SS 二聚体
B	Asp	CD8 + CTL, NK, γδ	M, H, R	糖基化作用可变
C	?	CD8 + CTL 克隆	M, R	无糖基化
D	Lys/Arg	CD8 + CTL 克隆	M	高度糖基化
E	?	CD8 + CTL 克隆	M	高度糖基化
F	?	CD8 + CTL 克隆	M	高度糖基化
G	?	CD8 + CTL 克隆	M	
H	?	CD8 + CTL 克隆, NK	H	
Tryp-2	Lys/Arg	CD8 + CTL 克隆, NK	R.H	
Met-1	Met/Leu	NK	M, H, R	

二肽基肽酶 I(组织蛋白酶 C)

溶酶体酶二肽基肽酶 I(dipeptidyl peptidale I, DPPI)裂解前颗粒酶的 N 端二肽,产生成熟的、具有酶解活性的蛋白酶。功能和序列研究表明这种酶是半胱氨酸蛋白酶家族的一部分,与溶酶体组织蛋白酶相关,并且一起经历蛋白分解过程而活化。在非造血细胞中 DDPI 和颗粒酶共同表达,使具有酶溶活性的颗粒酶 A 和 B 表达[76],反之,任一种颗粒酶的单独表达均不能活化原始颗粒。

DPPI 的表达通过裂解疏水氨基酸酯和二肽,尤其是亮氨酸-亮氨酸甲基酯(leucine-leucine, methyl ester, LLOMe)。赋予细胞胞溶敏感性,这些膜渗透性弱的主要成分因为其 pH 值低而积聚在分泌颗粒中,并且 DDPI 催化肽的合成反应,从而导致较长疏水肽链的形成,它是细胞裂解去污剂[77]。因此,LLOMe 可以清除巨噬细胞、NK 细胞、CTL 前体的淋巴样细胞群,同时保留其他细胞[78]。虽然如此,DPPI 在其他组织包括肝的溶酶体中均有低水平的广泛表达[79]。

蛋白多糖

蛋白多糖在许多造血细胞的分泌颗粒中都有发现[80],且它的一个重要作用是连接其他颗粒成分形成不可溶的、可视化的复合物作为颗粒的核心。CTL 和 NK 颗粒蛋白多糖是异源分子,由一个 serglycin 蛋白主链和不同数量共价接合的葡糖胺聚糖链组成。serglycin 蛋白主链是一个 17 ~ 20 kDa 的蛋白,包含不同寻常的有重复序列$(Ser\text{-}Gly)_n$ 的内部区域(n = 9 ~ 24,依赖不同的物种而定)。50 ~ 85kDa 的硫酸软骨素代替丝氨酸形成高分子质量的蛋白多糖。硫酸软骨素的硫酸盐,甚至在颗粒内低 pH 值中仍能维持其负电荷,因此可以与阳离子颗粒酶形成离子复合物,同时以较低的力量连接穿孔素[81]。在低盐状态下分离颗粒中的一种不可溶蛋白,并在生理性 pH 值和盐浓度中将之分裂,证明这种蛋白多糖、颗粒酶和穿孔素共同组成的复合物的存在。同时在肥大细胞的颗粒中发现由蛋白多糖和颗粒蛋白酶组成的类似离子复合物[82]和小分子阳离子介体。

其他溶酶体酶

组织化学和生物化学的技术在细胞毒性淋巴细胞的颗粒中可检测到各种正常的溶酶体酶。这些酶赋予它分泌溶酶体的特性。同样,肥大细胞的颗粒、中性粒细胞的嗜天青颗粒、血小板颗粒以及成纤维细胞和内皮细胞中的溶酶体亚群均具有此特性[83]。具有经典外观的溶酶体是很少出现在 CTL 中的,它们正常的内部消化功能大都发生在分泌性颗粒中。因为溶酶体酶有最适宜的低 pH 值,而在中性 pH 值中不稳定,一般认为它们胞吐后不可能参与靶细胞的损伤,但是目前还没有证据。然而,早期 EM 研究 CTL-靶细胞之间相互关

1028

系显示它们的胞吐并提出这种可能[84]。至于为什么分泌区和溶酶体区在 CTL 等细胞中没有分开，尚不清楚，因为它们均不在造血细胞系中。组织蛋白酶 D 已经被定位于 CTL 颗粒的膜囊泡之间的皮质区，在此发现了内吞的牛血清白蛋白[85]。

颗粒膜蛋白

颗粒膜蛋白可以分为几类。溶酶体膜蛋白 LAMP1、LAMP2(CD107a 和 b)、CD63(granulophysin)以及阳离子依赖的甘露糖-6-磷酸盐受体，在囊泡和颗粒外膜的内表面均有发现[37]。LAMP1 和 LAMP2 经胞吐后暴露于细胞表面但又很快经内吞而移动[86]。颗粒膜蛋白的这种分类是假定这些颗粒大多数都有溶酶体的功能，但可能经胞吐暴露后在 CTL 的自我保护中很重要。

颗粒中膜蛋白的第二种分类由呈递在 CTL 颗粒皮质囊泡上的正常表面蛋白所组成，包括 TCR，CD8 和 MHCI[85]。它们的出现是复杂的胞吞出芽的结果，可能也是这些颗粒溶酶体功能的一部分。因为皮质颗粒囊泡是在靶细胞附近分泌的，并且推测可能通过 TCR 特异性地与靶细胞黏附，并参与对靶细胞的损害作用[87]。然而，它们内部是胞质，而不是颗粒，因此它们和靶细胞膜的融合不能被想像为转运被分泌颗粒的一种方法，并且目前没有明确的实验支持这些囊泡有这种功能。

被称为空泡型腺苷三磷酸酶的膜质子泵维持颗粒内低 pH 值[88]。这种泵可以选择性地被大环内酯类抗生素刀豆素 A(concanamycinA，ConA)阻断，这种抗生素中和 CTL 颗粒，并且激发颗粒内穿孔素而非颗粒酶的降解，同时伴随细胞毒性的丢失[89]。因为 Fas 途径并不包括颗粒，所以刀豆素为鉴别淋巴细胞细胞毒性的颗粒胞吐和 Fas 途径提供了一种有用的实验工具[30]。

TIA1 是 CTL 颗粒独特的一种蛋白质成分，定位于颗粒外膜，但有暴露于胞质的蛋白质结构域[90]。TIA1 也可以在位于一些颗粒外膜出芽形成的颗粒内囊泡的内部。蛋白以两种同型体形式表达，一种是 15kDa，另一种是 40kDa，前者含后者 C 端的 1/3。虽然 40kDa 蛋白结合 RNA，并同其他在各种不同物种中发现的 RNA 结合蛋白是同源的，15kDa 蛋白缺乏这种活性，但是 CTL 颗粒中的优势同型体为 15kDa 形式，虽然已经推测出 TIA1 在细胞毒性中的作用，但仍然有待证实[91]。

粒溶素(NK-溶素/519)

最近 CTL 颗粒中描述的一种小蛋白称之为粒溶素，是与猪 T 细胞和 NK 细胞颗粒中的 NK-粒溶素同源[93]。最开始认为粒溶素是 T 细胞特异的信使 RNA，T 细胞活化几天内就上调。粒溶素蛋白以两种形式出现：一个为 15kDa 形式，仅出现在未成熟颗粒中；另一个是被进一步加工过的 9kDa 形式，在对 TCR 交联应答时分泌，并在成熟和未成熟颗粒中均有。粒溶素在 4 小时分析方法中对肿瘤靶细胞有裂解活性，并对细菌也有溶素活性。9kDa 蛋白序列表明，与来源于溶组织内阿米巴的裂解蛋白的阿米巴孔家族以及前面所述的裂解蛋白 NK 溶素和两种脂质水解酶均同源。尽管 CTL 颗粒溶素功能的重要性尚不清楚，但据此可以推测这些蛋白质能同穿孔素相互作用从而使其插入到脂质膜内。

网硬蛋白

网硬蛋白是一种 46kDa 的酸性蛋白，也就是所谓的钙接合蛋白和表达在大多数细胞内质网(endoplasmic retiwlum，ER)上的分子伴侣，基于它在颗粒抽提物中同穿孔素共纯化已被鉴定为 CTL 颗粒的一种成分[94]。而且网硬蛋白之所以没有被 ER 糖苷酶处理，是由于它与穿孔素相连，至少部分是由于它的凝血素样功能与碳水化合物相连[95]。免疫定位研究表明，钙网硬蛋白位于 ER 中的 CTL 颗粒，在应答 TCR 的刺激时分泌。虽然钙网硬蛋白的钙连接能力可能发挥了重要作用，但是因为大多数的钙网硬蛋白的钙连接能力是低亲和力的，所以并不十分清楚这种连接是否与细胞中的颗粒有关。胞吐之后，钙网硬蛋白可能作为局部螯合剂而发挥作用。

颗粒胞吐细胞毒性机制中的功能性步骤

图 31.5 表明淋巴细胞毒性作用的颗粒胞吐机制的基本特性。包括几个不连续的步骤,并在各种不同水平的细节得到证明,详细介绍如下。这个过程被视作是循环的,通过反射式显微镜观察得知,细胞毒性淋巴细胞在几小时内可以杀伤多达 12 个以上的靶细胞,而其自身并没有明显的损害[19]。这种机制的本质特点是在胞吐步骤,分泌颗粒中形成的介质从极化的 CTL 中局部释放进入 CTL 和其周围的靶细胞间突触样间隙。细胞毒性途径中许多重要分子细节仍有待澄清,包括终末步骤中引起的裂解。尽管体外所有经过这种途径的短期靶细胞细胞毒性是依赖穿孔素的,但是很有可能重要的非细胞毒性介质通过颗粒胞吐途径分泌,它比其他需要蛋白合成的细胞毒性途径更迅速。

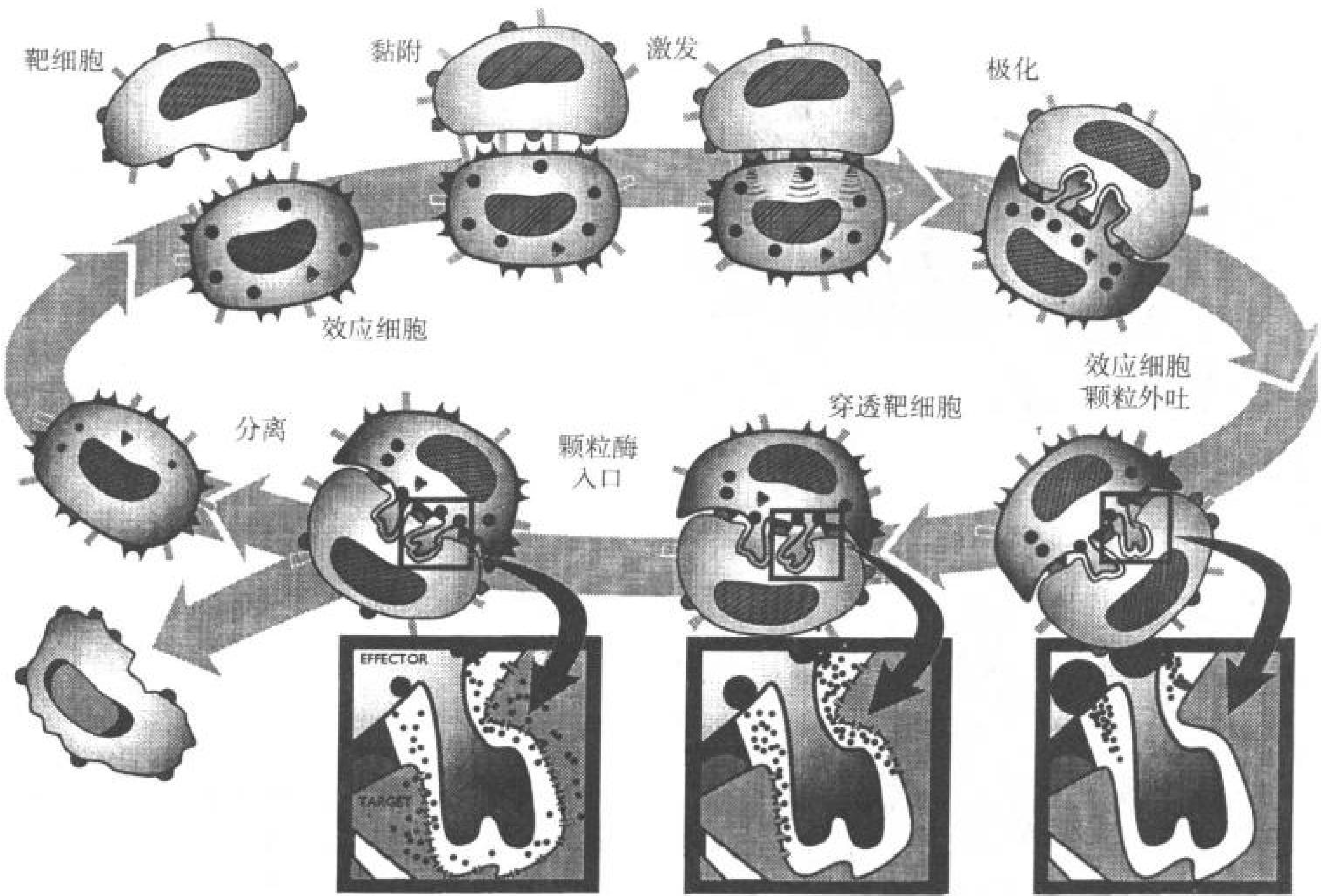


图 31.5　颗粒胞吐细胞毒机制,描述了这一过程的连续阶段。

1029

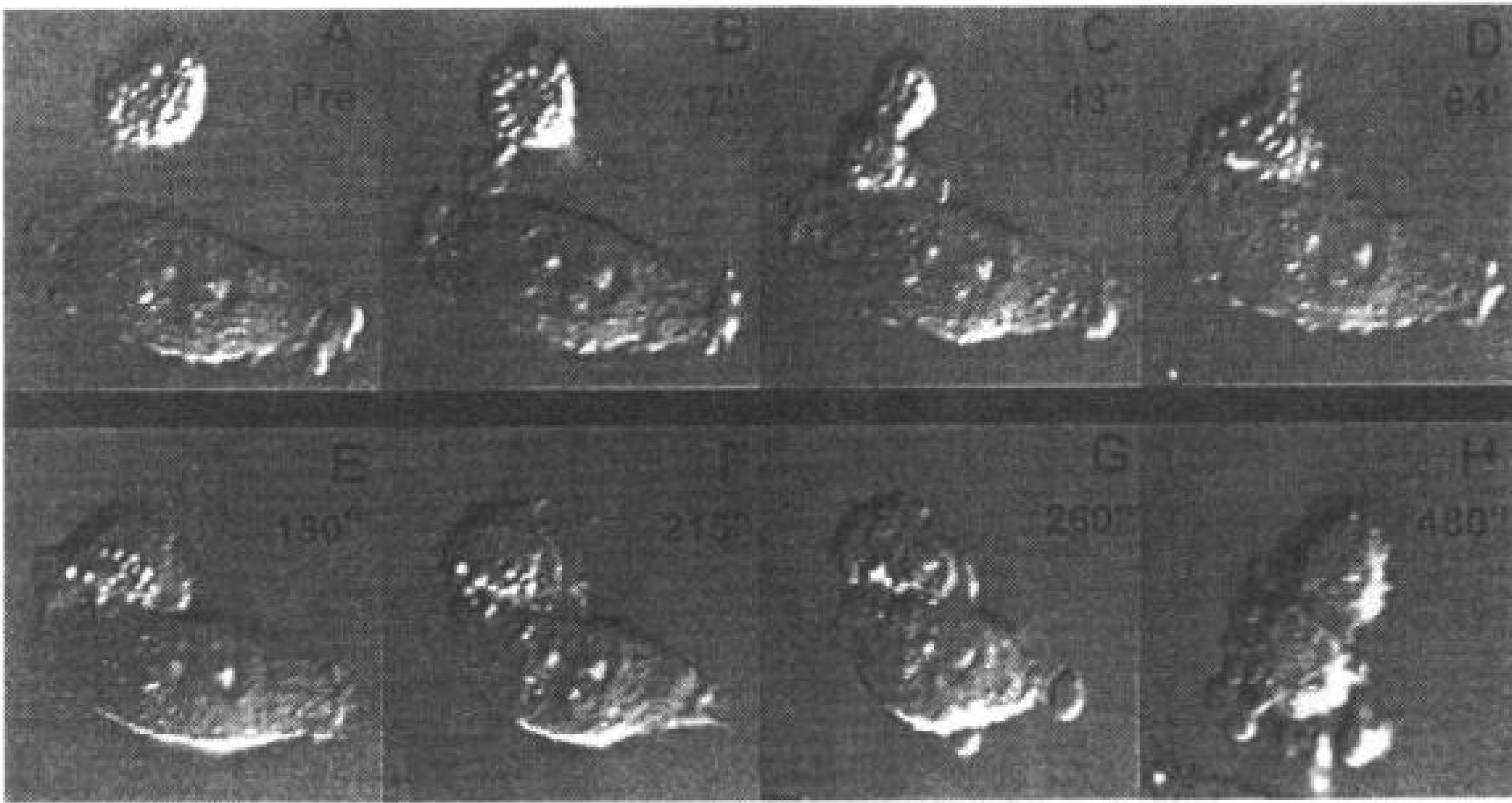
黏附

缩时电影术观察 CTL 与靶细胞间的相互作用,结果表明 CTL 在遭遇其他细胞之前以明显的随意运动移向底物[19,20,96,97]。当通过膜突起相互接触后更牢固的黏附,包括膜-膜接触随后迅速出现,CTL 沿典型的大细胞表面移动(图 31.6)。某些情况下靶细胞具有适当的特异性,CTL 不久便分离并恢复随意运动。其他情况下,这种黏附持续存在几个小时,直到观察到靶细胞损伤信号为止。电镜观察 CTL 与靶细胞的接合情况显示相当大面积的膜-膜紧密接触区,并在接触区中央有一个缝隙(图 31.7)。

1030

CTL 靶细胞之间的黏附作用已用分离结合物的方法进行了研究,这些结合物是 CTL 靶细胞群,它们在离心之后与非黏附性肿瘤肿瘤细胞接触,并且有轻度重悬[98]。通过改变 CTL 与靶细胞的比值,可以观察到含有一个以上的靶细胞或 CTL。分离的 1:1 的同种异体肿瘤靶细胞和体内有潜能的 CTL 之间的结合物的研究显示,靶细胞在进一步的 2 小时孵育中被杀死[21]。以前用经典的显微镜计数结合物,用预标记荧光标记物鉴定靶细胞,但最近双色流式细胞仪已经被用于此项研究[99]。因为有着可变背景的非特异性结合物不被裂解,所以当利用来自于注射同种异体肿瘤后的腹腔渗出液中的潜能 CTL 时,结合物形成的特异性通常反映了

图 31.6 干涉差显微镜观察成纤维靶细胞一个克隆的 MHCI 异种特异的 CD8⁺ CTL 细胞毒作用的微速摄影图。A:接触前 CTL 向靶细胞接近,可观察到随机的边缘波动和小菌皱的延伸扩展。B~H:如图所示,接触后数秒钟内的连续图像。一个大的菌皱联接 CTL 和靶细胞(B),随后是沿着靶细胞表面的膜-膜接触的延伸(C和D)。颗粒从开始的散乱排列向结合的靶细胞运动(D和G),接着颗粒消失(F~H)。膜出疱,这是靶细胞损伤的标志(G),并在 H 中变得更加明显。本图由 Klaus Hahn 博士提供,Scripps Clinic and Research Foundation[124]。



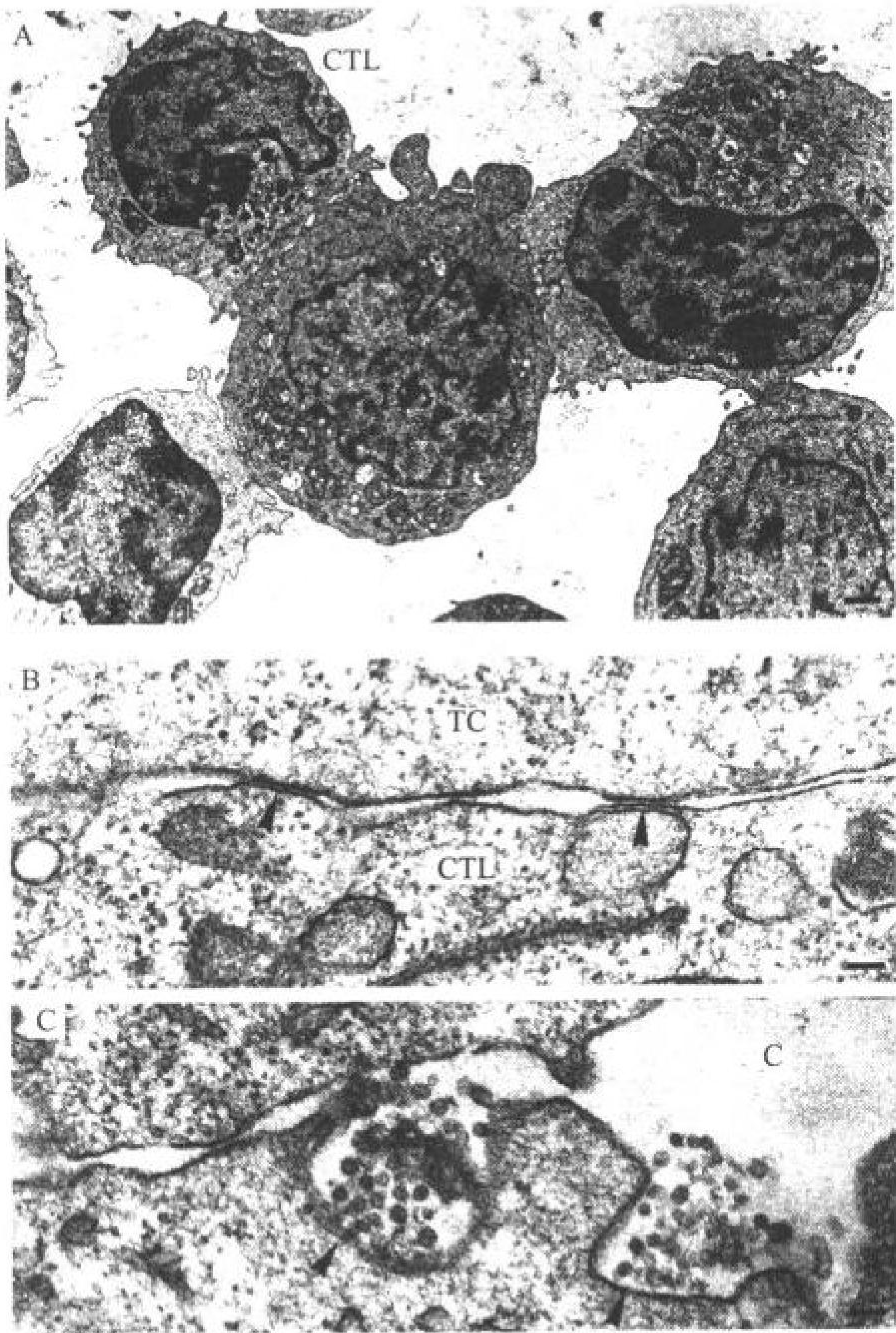


图 31.7 人 CTL 克隆由靶细胞所诱导的快速极化和胞吐.A;混合两种细胞后 1min 固定,显示 3 个 CTL 黏附到一个靶细胞(TC)上。极化只见于左上侧的 CTL(标示为 CTL)。大小标尺为 1μm。B:CTL—靶细胞接触面(高比例混合后 1min 固定),显示 CTL 和靶细胞质膜紧密并置的 2 个位点(箭头所指)。标尺为 0.1μm。C:CTL—靶细胞接触面,混合后 10min 固定,显示了含有膜小泡的颗粒胞吐。颗粒核心在本切片中未显示。标尺为 0.1μm。图来自 Utrecht 大学的 Peter Peters 博士[85]。

TCR 的识别。然而,当用长时间在体外环境生长的 CTL 克隆时,这种非特异性结合物形成可能占多数[100],显然是因为有更强的黏附分子(如 LFA1 和 CD2)在这种 CTL 上表达。

特异的 CTL-靶细胞结合物的形成需要 CTL-靶细胞接触后在 37℃孵育几分钟,以获得在分离所形成的剪切力中生存所必须的稳定性。在温度较低时这种黏附不会发生,被胞内能量产生的抑制剂所阻断,并且介质中需要镁离子[101]。后者的发生是由于 CTL 黏附分子 LFA1 与其靶细胞的配体——胞内黏附分子 ICAM1 或 ICAM2,这同样需要镁离子。改变破坏连接所需的剪切力,则可以检测特异的 CTL 靶细胞对黏附的温度敏感性增强[102]。

特殊的 CTL 靶细胞结合物的形成(除细胞毒性外)可以被抗黏附分子的抗体所阻断,并且这种方法可以鉴别两对非特异性黏附分子。CTL 细胞表面的 LFA1 与靶细胞表面的 ICAM 接触,而 CTL 表面的 CD2 则与靶

细胞表面的 LFA3 接触[103].依赖这种非特异性的黏附相互作用,成功的实现了 CTL 靶细胞间的相互作用[104]。

黏附加强

有关黏附分子最简单的观点是它们提供细胞膜间相互作用附加黏附力,因此允许特异性受体-配体间更为有效的相互作用。然而,目前有充足的证据证明 TCR-MHC 肽、CD8-MHC 以及 CTL 黏附分子与其配体间的相互作用有着更为复杂的系统。很显然黏附分子和 CD8 在 CTL 中产生信号,并且 TCR 的参与加强了 LFA-1-ICAM 相互作用的亲和力[105],同 CD8-MHC 相互作用一样[106]。因此,起初 CTL 黏附分子和靶配体间微弱的相互作用促使 TCR 和靶 MHC 肽间的相互作用。由此引起 LFA-1-ICAM 和 CD8-MHC 相互作用的进一步加强,两对黏附分子产生强黏附力。在这种相互作用中细胞骨架可能发挥作用,因为细胞松弛素可以阻断引起结合物形成的黏附。显然,尽管黏附分子可以产生胞内信号,但是仅此并不能说明需要 LFA1,因为增大 CTL 功能需要它与 TCR 交联剂的共同定位[107]。

1031

1032

用表面固定的纯化的 MHCI 类抗原激发 CTL 的研究显示了 CTLCD8 共受体的重要性[106]。在这一系统中,可溶性抗 CD3 抗体触发 CTL 的 CD8 与不相关 I 类分子连接,表明 TCR 发出信号通过尚不清楚的机制引起 CD8-MHC 连接增强。因为 CTL 靶细胞结合物在缺乏胞外钙时形成稳定黏附,所以 CTL 溶解过程中的黏附和黏附加强在功能上有用的定义是不依赖钙而依赖镁的过程。

触发致死性攻击

正面加强黏附分子-受体-共同受体间的相互作用触发进一步的功能性 CTL 胞溶机制。第二信使包括胞内钙的增加,伴随许多 T 细胞活化的例子[108]。用胞内钙敏感的荧光素染色的单细胞成像方法表明,CTL 与特殊的靶细胞衔接后经历了快速的胞质内钙增高的过程[109,110]。几分钟内静止 CTL 约 100nmol/L 的钙离子水平增至平均大约 500nmol/L,20 分钟后降至底线。有时可见 Ca_i 的多个循环增加[111]。如果胞外钙被移走,则抗原引起的增加是迟钝的和一过性的,暗示胞外钙通过浆膜内流是其主要途径。然而该通道阻滞剂维拉帕米(verapamil)却不能阻止它的增加,它是通过潜在的敏感钙通道的活化以应答胞内钙贮存的耗竭[112,113]。靶细胞引起 CTL 中的钙离子的增加与 CTL 机制中需要钙的致死打击阶段相关,这在前述的功能性检测中已述及

钙泵存在时蛋白激酶 C 激活剂 PMA 对 CTL 脱颗粒的强刺激效应[34]暗示,与其他 T 细胞一样,CTL 胞内信号也包含了蛋白激酶。抗 TCR 抗体刺激 CTL 引起一套不连续底物酪氨酸磷酸化,包括 $p56^{lck}$,CD8 连于 I 类分子后,紧接着另外的底物磷酸化[114]。这些结果显示,CD8 的介入经蛋白激酶提供共刺激信号,然而发现 TCR 引起蛋白激酶活化,在依赖 CD8 的 CTL 中比不依赖 CD8 的 CTL 要强[115]。在这一系统中,TCR 衔接增加 $p56^{lck}$ 和 CD8 的作用,并且募集 ZAP70 到 TCR 复合物中。通过靶细胞识别而活化的 CTL 中蛋白激酶的这些研究暗示在其他 T 细胞中有类似的 TCR 信号途径。然而,并不十分清楚从基因表达的信号中哪一点分离出胞质极化和脱颗粒的信号(如 Fas 配体和 γ 干扰素)。

极化效应器

显微镜研究 CTL 靶结合物表明 CTL 附着特异靶细胞时存在着显著性的极化,如图 31.6 和 31.7A 中所见。在有利的环境下,CTL 靶细胞接触 1 分钟内就可以观察到极化(图 31.7)。现在知道溶酶体酶与颗粒相关[116],并发现高尔基细胞器[117]和微管组织中心(microtubule organizing center,MTOC)[118]优先定向于靶细胞,它的出现是因为大多数的胞质细胞器在应答靶识别时被协调移动。以前与靶细胞相连极化的 CTL,通过受体的不对称表达可以引起这种极化,或者先前未极化的 CTL 作为靶连接的结果也可以引起。两种类型的研究表明后者是正确的。

用荧光显微镜分析 MTOC 和细胞骨架蛋白 talin 在胞内的定位,仅在靶细胞周围并引起具裂解的 CTL 或 NK 细胞克隆中观察到胞质极化[119]。当钙缺乏时形成 CTL 靶细胞结合物,CTL 没有极化,但是以后增加的钙

同样能引起不对称表达[120]。微管裂解药物可以阻断效应细胞的极化[121]。还发现CTL高尔基体和MTOC在其死亡之前继续朝向每一个周边的靶细胞,在单向杀伤CTL-CTL结合物中也有类似的发现[122]。基于对结合物的观察,其中一个效应细胞周边有多个靶细胞,以及两种互相拮抗的CTL混合,靶细胞裂解显示高度极化事件[98]。几种结果均表明CTL应答中接触靶细胞后,激烈而快速的触发CTL胞质的重组,对CTL胞质极化的观察为这些结果提供了力学相关性。

用Nomarski光学缩时电影术研究CTL杀伤机制支持引起极化的模型[96,124]。研究该信号发现沿着有活力的T细胞前导边缘,它们有更高的抗原敏感性,因为在此它们可能遭遇抗原呈递细胞(APC)[125]。另一方面,正常情况下CTL胞质颗粒定位于这些细胞的尾部[124]。如图31.6所示,当CTL靶细胞接触时,CTL颗粒通常远离靶细胞而定位,但是几秒钟内就可见颗粒快速协调地向靶细胞方向移动。颗粒移动是CTL完全极化的一部分,发生在CTL和靶细胞间增加膜接触后,如图31.6D和F所示。同样的CTL与对照细胞接触,不与TCR衔接,也就没有观察到类似的再定位[124]。

胞吐

颗粒膜和浆膜融合的结果是分泌,称之为胞吐,它使颗粒内部和胞外空间具有连续性。在细胞生物中可以发现许多极化分泌的例子,但是遵循快速诱导的极化,如细胞毒性淋巴细胞与靶细胞相连这种例子很少。重要胞吐过程的基础分子方面仍然是鲜为人知,尽管在不断取得进展[126]。高分辨率缩时电影术得到的图像研究细胞毒性显示CTL靶细胞接触之后将发生颗粒细胞[96,124]。在这些图像中发现,颗粒再定位后不久、明显靶损害之前,靠近CTL膜的可见颗粒消失。电镜影像(图31.7C)有力地暗示靠近周边靶细胞有CTL颗粒胞吐,类似的可见于NK细胞靶结合物[127,128]。其他EM研究效应细胞—靶细胞结合物已经显示,在此过程转移CTL溶酶体酸性磷酸化酶进入CTL和靶之间的间隙中[84],类似于NK溶酶体酶芳基硫酸盐的转移[129]。

1033

通过分析释放入基质的颗粒成分可以测量CTL和NK-细胞颗粒胞吐。因为它的敏感性,BLT-脂酶方法分析颗粒酶A(和类胰蛋白酶-2)的活性是最方便和广泛被使用的[130]。在靶细胞存在的培养物中、固定的抗TCR复合物的抗体或刺激性凝集素(如ConA)等情况下,几个小时内即可观察到CTL克隆脱颗粒。来自于LCMV感染小鼠纯化的脾细胞分泌的MHC限制性颗粒酶A,在应答靶细胞的病毒抗原时3h内即出现[131]。通过检测NK细胞在应答靶细胞时释放入培养基中的^{35}S标记的颗粒蛋白多糖,首次在人克隆NK细胞中检测到NK细胞膜颗粒。

同于大多数其他类型的调节分泌途径,移走胞外钙时可以阻断抗TCR抗体和抗原激发的CTL脱颗粒[131,134]。在与相同CTL分泌的γ干扰素相比较时,惊人地发现颗粒酶A的分泌不被RNA和蛋白合成抑制剂所阻断[34]。连接钙离子载体和蛋白激酶C激动剂佛波醇肉豆蔻基醋酸盐(phorbol myristyl acetate)可以在缺乏TCR交联的情况下激发脱颗粒[34]。

像其他的分泌颗粒一样,CTL颗粒通过胞质移向胞膜,并且由微管介导胞吐。在体外分离的颗粒已经表明经历了沿着微管依赖驱动蛋白的能动性[135]。

靶向穿透作用

EM观察细胞毒性大颗粒淋巴细胞和CTL攻击靶细胞,发现有补体样和孔样结构,表明补体和细胞毒性淋巴细胞引起的靶细胞死亡均会有类似的膜损害。进一步研究所提出的许多问题,迫使在不否认膜损害重要性的前题下,对范例进行有意义的修订。补体和分离的穿孔素在37℃[66,67],几分钟内就会引起有核靶细胞的死亡,但是CTL对CTL靶细胞致死性毁坏,从遭遇致死性损害到靶细胞裂解,平均需要1.7h[25]。已经证实有核细胞有一套胞质保护系统来对抗膜损伤。这一现象在研究补体和细胞膜物理损伤时均有发现,前者归功于钙依赖方式向基质中排出包含有微管结构的囊泡[68],后者则是由于钙依赖的内膜胞吐[136]。这种修复机制可以解释细胞的一种能力,即亚细胞溶素穿孔素浓度引起细胞渗透性增加,几分钟内即恢复[137,138],这种能力与在不同的通道形成剂中观察到胞溶的交叉保护一样[139]。

显微镜或通过 DNA 裂解可见大多数被 CTL 或 NK 细胞杀死的靶细胞都获得一种凋亡表型[140,141]，后面会加以详述。因为小孔形成因素包括纯化的穿孔素引起的非凋亡性死亡[142]，如果穿孔素孔是靶细胞重要的致死性损伤，那么颗粒胞吐模型就不能解释靶细胞凋亡表型（apoptotic target death phenotype）。如表 31.8 小结，研究非细胞裂解 RBL 肥大细胞瘤表明穿孔素对红细胞具有有效的胞溶活性，但是对肿瘤细胞却仅仅有温和的裂解活性，并不伴随 DNA 的裂解[143]。这些结果证明，不像哺乳动物红血球，有核细胞在防御系统正常的情况下，它可以修复因脱颗粒后穿孔素的局部高浓度引起小孔形成所造成的膜损害。然而，从穿孔素敲除小鼠的研究结果来看又很清楚，无 Fas 的细胞由 CTL 和 NK 细胞引起的快速致命性损害是绝对需要穿孔素[144]。以上讨论的是穿孔素形成的小孔允许大分子的通过，而以下讨论的是颗粒酶在靶细胞损害中的作用，很明显穿孔素的主要作用是穿透靶膜到颗粒酶，尽管其他解释也能成立[145]。

颗粒酶进入与内部蛋白降解

证明胞溶中颗粒酶的作用最有力的证据来自转染肥大细胞的实验，见图 31.8。与红细胞作为靶细胞不同的是（图 31.8A），为了获得与作用于肿瘤靶细胞的 CTL 类似的 RBL 细胞溶素活性，需要颗粒酶 A 和 B 与穿孔素共同表达（图 31.8B）[46,147]。分析转染体克隆表明作用于肿瘤靶细胞上的胞溶活性大多数与颗粒酶有关，而非穿孔素的表达水平（尽管也需要穿孔素的表达）[147]。

1034

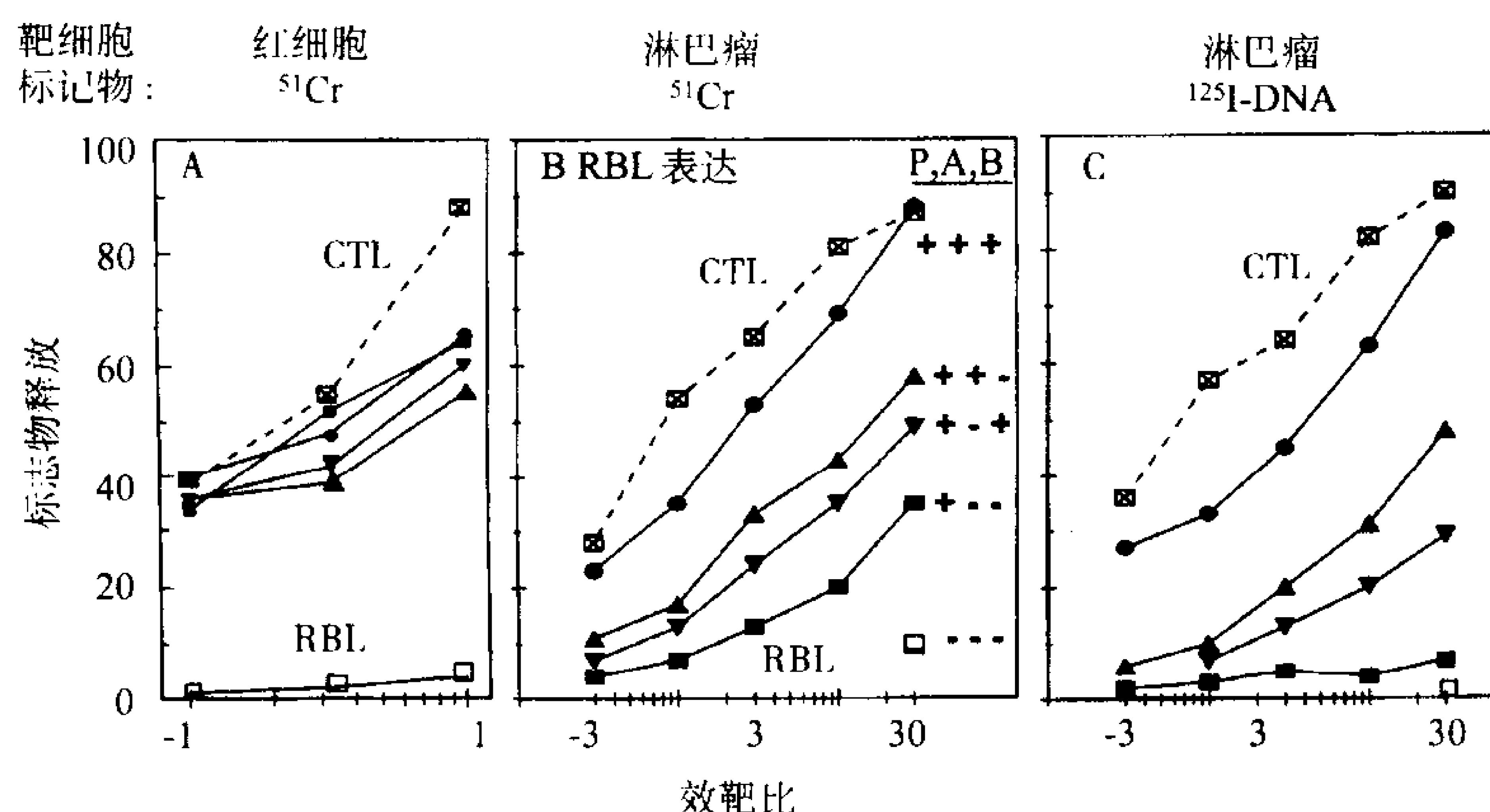


图 31.8 表达穿孔素、颗粒酶 A 和颗粒酶 B 的 RBL 肥大细胞的细胞毒活性。显示的数据是转染并表达颗粒酶 A 和 B（●）、穿孔素和颗粒酶（▲）、穿孔素和颗粒酶 B（▼）和穿孔素（■）的 RBL 肥大细胞瘤、未转染的亲本 RBL 细胞系（□）和 CTL 克隆（☒）的平均值。TNP 半抗原修饰的靶细胞的 RBL IgE FcR 激发是通过 IgE 抗 TNP 获得，CTL 的活性通过抗 CD3 × 抗 TNP 交联抗体而改变。数据显示了 4h 温育中标志物的释放。A：人红细胞裂解；B：EL-4 淋巴瘤细胞裂解；C：EL-4 淋巴瘤细胞的 DNA 释出。数据资料参看文献[143]。

研究颗粒酶功能的另一种方法是在基因敲除小鼠中检测 CTL 和 NK 细胞的功能。颗粒酶 B 缺陷小鼠显示 CTL 和 LAK 导致的靶溶正常，而 NK 的靶溶率减少 2 倍[148,149]。与对照组相比较，缺乏颗粒酶 B 的所有 3 种细胞毒性效应细胞，靶细胞 DNA 裂解明显滞后，但是仍然有明显的核损害。研究颗粒酶 A 敲除小鼠时，在体外 CTL 和 NK 效应细胞两者都不表现任何靶溶或 DNA 断裂的缺陷[150]。因此，颗粒酶基因敲除后的结果显示，对于高水平的体外靶细胞裂解，颗粒酶 A 和 B 都不是必须的，但并不是说其他颗粒蛋白酶可以取代这些颗粒酶基因敲除小鼠中颗粒酶的作用。

有几种可能性可以解释在 RBL 转染体研究中颗粒酶杀伤靶细胞的原因。颗粒酶可以在胞吐前或胞吐后蛋白水解处理穿孔素，以产生更有效的蛋白。蛋白酶抑制剂对穿孔素溶血活性的效应已支持这一模型[151]。然而，这种穿孔素的裂解没有被生物化学所证实，而且重组穿孔素的细胞毒性活性[52]也并不支持这点。另一种可能性是颗粒酶可以作用在靶细胞表面蛋白从而加强穿孔素的插入或孔的形成，然而没有证据证实，而且穿孔素渗透入脂质体和红细胞的潜力暗示这种可能是不必要的。

一种更大的可能性是颗粒酶进入靶细胞，并激发一条预先存在的凋亡途径。尽管目前没有直接证据证明颗粒酶进入靶细胞，但是颗粒酶抑制剂抑肽酶阻断表达颗粒酶的效应细胞所引起的胞溶和凋亡性损伤，具有高度说服力。当抑肽酶装载入靶细胞胞质[152]或者偶联在靶细胞膜上但不在介质中[153]，发现它可阻断胞溶，而且阻断并不见于只表达穿孔素的 RBL[152]。

可靠证据证明,颗粒酶可以激发靶细胞的凋亡性 核损害。图 31.8C 示没有颗粒酶,表达穿孔素的 RBL 细胞引起的限制性靶细胞裂解不伴随 DNA 裂解。然而单独表达任一颗粒酶均可产生一些核损伤,而两种共同表达产生达到接近裂解水平的靶 DNA 释放,如同 CTL 中见到的一样。已经发现,颗粒酶 A 在去污剂穿透的细胞中引起 DNA 裂解[154],而颗粒酶 A、B 和类胰蛋白酶 2 在经穿孔素的亚裂解剂量处理后的细胞中介导这种效应(有此效应的鼠源性颗粒酶称为 fragmentins)[155]。这些效应的机制已经被几个实验室追踪研究。研究已经显示,颗粒酶 A 裂解核蛋白核仁素[156],颗粒酶 B 连接在其侵入靶细胞的核,可以定位于异染色质上[157]。在有亚裂解剂量的穿孔素存在时,颗粒酶 A、B 和类胰蛋白酶 2 可激起肿瘤细胞的凋亡核损害,其中颗粒酶 B 效能最强[155]。颗粒酶 B 通过激发去磷酸化起作用,并最终活化细胞周期依赖蛋白激酶 $P34^{cdc2}$[158],这种作用正常情况下仅在细胞周期中有丝分裂前有活性。颗粒酶 B 引起的凋亡和 $P34^{cdc2}$ 激酶活性,二者均可被其过度表达的负面调节剂—weel 激酶所阻断[159]。尽管在此系统中颗粒酶 B 的功能性底物还没有确定,但是至少在一些细胞类型中 caspase 是需要的[160]。

最近一系列实验已提出这种可能性:颗粒酶 B 通过蛋白裂解加工并因此活化 caspases。而起作用,caspases 是一个胞质半胱氨酸蛋白酶家族,并是 *C. elegans* 死亡蛋白酶 ced-3 的哺乳动物的类似物。caspases 同颗粒酶 B 有着共同的不寻常的裂解特异性,即在 P1 氨基酸位置必须为 Asp,并且这种裂解显然是正常情况下出现在细胞中的 precaspases 的死亡相关活化所必需的。因此,已经证明纯化的颗粒酶 B 可以加工和活化 caspases 3、7、8、9 和 10,而不是 caspases 1 或 2。而且,CTL 已经显示可特异地诱导靶细胞中 caspase 3 的加工[161],而在缺失颗粒酶 B 的 CTL 中没有这种现象[162]。

在 CTL 诱导的细胞毒中,已经用 caspase 抑制剂来测试了 caspases 的作用,这种抑制剂可以在体内和体外的多个系统中阻断大多数凋亡[163]。以细胞穿透性肽为基础的 caspase 抑制剂和蛋白抑制剂杆状病毒 p35 均能有效地阻断在多种不同的靶细胞中由 CTL FasL/Fas 途径所诱导的裂解和凋亡性核损伤。利用颗粒外吐途径,CTL 诱导的靶细胞裂解不受任何一种 caspase 抑制剂所影响。然而,通过形态学或 DNA 碎裂方法检测的靶细胞核损伤可被完全阻断[164],这同颗粒酶 B 活化 caspase 而触发核损伤但不产生裂解的观念一致。这些结果同图 31.9 中的图示一致,其中 caspase 在通过 FasL/Fas 途径而不是在颗粒外吐途径所产生的细胞死亡中发挥重要作用。

CTL 颗粒胞吐途径能触发凋亡杀伤靶细胞吗?

观察 CTL 靶细胞中的凋亡形态学[140]和 DNA 裂解[141]提出一观点:CTL 激发靶细胞凋亡。尽管很清楚对激发靶细胞凋亡 FASL/FAS 途径十分有用,但是 caspase 抑制剂的实验却提出疑问——这是否正确描述了由颗粒胞吐途径导致的靶细胞死亡。其主要的问题就是缺乏凋亡的分子定义,常常功能性的定义为伴随死亡的核损害。因为 CTL 诱导的死亡,靶细胞双链 DNA 常裂解,但并不总是能被发现[12,165,166]。用去核胞质体实验证实了胞核在 CTL 引起靶细胞死亡中的作用。这种去核靶细胞 CTL 用颗粒酶胞吐和 FAS 死亡两条途径均能完全裂解,并且因为颗粒酶的表达,使得效应细胞能力增强 10 倍[167]。这些结果与其他凋亡诱导剂是平行的,同样不需要靶细胞核[168],这显示 CTL 引起的靶细胞裂解不需要颗粒酶激发的凋亡核损害。

尽管靶细胞通过颗粒酶胞吐途径死亡不需要胞核和 caspase,但是如果它的死亡途径的下游部分和如图 31.9 所示的凋亡途径合并,仍旧可认为是凋亡。解决这个问题需要进一步的实验。

1035

胞内蛋白 Bcl-2 家族已经显示,通过许多信号输入途径对凋亡细胞的死亡有着主要的影响。Bcl-2 家族的大多数成员,包括 Bcl-2 和 Bcl-X 均抑制淋巴细胞系和其他细胞系中的大多数凋亡[169],但是对 CTL 引起的死亡却没有定论。不同实验室已经相继报道,Bcl-2 抑制或不影响 CTL 的 FASL/FAS 和颗粒胞吐死亡途径[170~172]。不论是因为 Bcl-2 影响 CTL 杀伤效应依赖靶细胞的类型,还是因为这些相冲突的报告属于技术问题,还有待于进一步说明。

凋亡的另一种胞内调节剂是蛋白激酶 Bcr-abl,已经发现它在带有费城染色体(Philadelphia chromosome)的肿瘤细胞中过度表达[173]。从而,这种细胞可以抵制由各种各样输入(input)途径引起的死亡,尽管这些输入

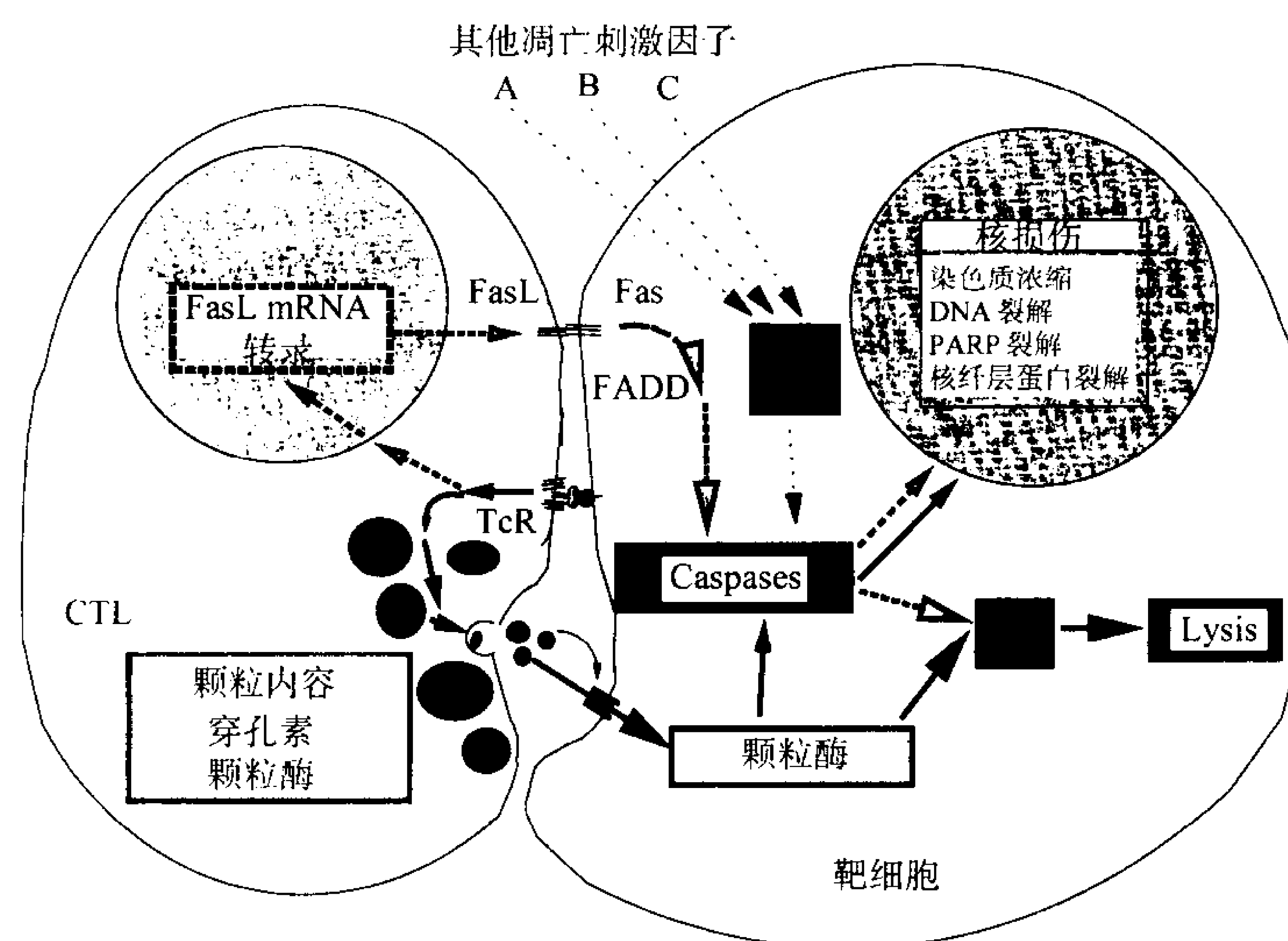


图 31.9 CTL 诱导的靶细胞死亡途径。FasL/Fas 途径用虚箭头表示，而颗粒胞吐途径用实心箭头表示。本图显示两条途径在 caspases 交汇。caspases 是 FasL/Fas 死亡途径的一部分，但它只参与颗粒胞吐途径的核损伤过程。

途径可以引起其他细胞的死亡[174]。Bcr-abl 过度表达的这种效应可能与 Ras 介导的 Bcl-2 上调有关。Bcr-abl 过度表达不影响 CTL 介导的两种不同转染细胞系的死亡，而是强烈保护其免受放射引起的死亡[176]。而且，来源于慢性骨髓性白血病患者的 K562 细胞内含费城染色体，可以抵制由放射和化疗引起的死亡。然而它们却是对人 NK 细胞敏感的经典靶细胞，NK 细胞可以引起它们凋亡[177]。如果假设颗粒酶触发的死亡途径经过 Bcr-abl 及 Bcl-2 可能用到的前 caspase 控制点，这些实验就与图 31.9 所示模型一致了。

CTL 脱离

缩时电影术观察 CTL 引起的细胞毒性表明，CTL 与靶细胞分离、移走而后杀伤更多的邻近靶细胞。这种分离的机制并不十分清楚。很难判断 CTL 是否仍然攻击靶细胞直至它裂解，或者是否在裂解之前致命性损伤发生之后才活化[178]。这种分离模型还需要进一步的实验证实[106]。

CTL 的自我保护

为什么效应细胞脱颗粒释放致命性介质后形成局部高浓度其自身并不裂解，这是颗粒胞吐面临的主要问题。显微镜研究已经确定，CTL 可以杀伤众多的靶细胞而其自身不遭受明显的损害。大量进一步的研究都指向一个问题——CTL 自身是不是其他 CTL 攻击的敏感细胞。早期研究发现，其他 CTL 使未克隆的 CTL 失活，并假定它们被杀伤。然而近期更多的研究表明，当其他的 CTL 使这种靶 CTL 失活时，它们并非必须被杀伤[179]。常常发现克隆的 CTL 被其他 CTL 识别后对裂解有高度抵抗性[179~182]。因此，CTL 对自身的致命性介质表现出永久的、普遍的抵制。CTL 还抵抗与其他淋巴细胞有关的穿孔素引起的裂解[183~185]。这种抵抗并不是绝对的，而且并不清楚 CTL 是否特异性地仅抵抗穿孔素的裂解，因为在非 CTL 靶细胞中有着广泛的抵抗。有人提出保护性膜蛋白负责这种 CTL 对穿孔素的抵抗，比如在膜插入之前或者在插入分子聚合物并且形成功能小孔之前与穿孔素分子结合[186]，但是它在 CTL 自我保护中的作用的满意的分子定义和功能性试验均尚未建立。对 CTL 穿孔素抵制的另一种解释是 CTL 有一种特殊的活化系统从它们的膜上移走前面所提及的功能性小孔。

实验表明，在胞质中装载入颗粒酶的抑制剂抑肽酶，可保护细胞免受 CTL 引起的裂解[187]，胞质是 CTL

自我保护的另一种潜在水平。颗粒酶 B 的 serpin 抑制剂已经证明存在于 CTL 和其他细胞中[188]，但是牵涉到这种胞内蛋白酶抑制剂在 CTL 自我保护中的关键试验仍待开展。

尽管以上证据支持 CTL 自我保护是一个整体系统，但是多种多样的研究表明，CTL 可以杀伤其他 CTL，指以上的抵抗是可以克服的。于是，体内来源的 CTL 富集细胞群被其他 CTL 裂解，半抗原特异性 CTL 克隆杀伤其他半抗原特异性 CTL 克隆，而且肽特异性克隆在肽存在时互相残杀[180,189,190]。为证明这些发现，对颗粒胞吐模型提出了挑战，并且表明 CTL 中有局部或暂时的保护系统存在，以避免它脱颗粒后自身破坏。因为颗粒膜组分在胞吐后局部掺入胞膜，这是一种可能；另一种可能是靶识别激起了短暂的总体保护。但是这些纯理论的推测很难用试验加以证明。因为在转染穿孔素和颗粒酶 A 之后，RBL 肥大细胞瘤杀伤靶细胞的同时没有可察觉的自身损害，由此可见自身保护的特性不仅仅属于 CTL[146]。

1036

颗粒细胞毒性递质的表达

调查正常组织中穿孔素 mRNA 或蛋白的表达表明，它在淋巴组织中专一表达，而且相近的实验还显示，它的表达与细胞毒性淋巴细胞密切相关。如在正常人的外周血，穿孔素蛋白在 > 95% 的 $CD56^+$ NK 细胞和 97% 的 γδT 细胞中表达[36]。这两群细胞均有胞溶活性。尽管血 $CD4^+$ T 细胞不表达穿孔素、不具有细胞毒性活性，但是具有记忆表型的 $CD8^+$ T 表现具有充实的细胞毒性活性、有大量的穿孔素表达。初始型和脐带血 $CD8^+$ T 细胞缺乏可检测的穿孔素表达[191,192]。在体外活化后的 $CD4^+$ T 细胞，仍然不表达穿孔素、不具有细胞毒性活性，然而对 $CD8^+$ T 细胞来说则两者均增加[36]。

颗粒酶 mRNA 和蛋白表达在静息的外周 T 淋巴细胞中不能测出，但是在静息 NK 细胞中则可以[74,193]。在体外活化则能增加 $CD4^+$ T 细胞、$CD8^+$ T 细胞以及 NK 细胞中的所有颗粒酶的表达。颗粒酶 A 和 B mRNA 的表达在未成熟胸腺细胞中即可查到，但仅限于 $CD4^+8^+$ 阶段[194]。$CD4^-8^+$ 胸腺细胞中可检测到颗粒酶 A mRNA 和酶活性。

由异种刺激诱导的腹膜渗出物中的淋巴细胞是高效能 CTL 的经典来源[98]。这些细胞表达穿孔素和颗粒酶，但是比在体外生长的 CTL 的表达水平低[195,196]。经体外 IL-2 培养后，这些 CTL 获得更高水平的颗粒介质[197]。

Metrial 腺在妊娠啮齿动物的胎盘附近发育，并且包括颗粒细胞，其功能已经清楚。这些细胞中的颗粒包括穿孔素和颗粒酶 A[198]，且分离的颗粒细胞有 NK 活性[199]，虽然对妊娠生理的重要意义尚不清楚。

细胞毒性的 FasL/Fas 途径

实验发现阻断颗粒胞吐和穿孔素裂解活性后，一些靶细胞在钙螯合情况下被 CTL 杀死，以此推断在体外除颗粒胞吐途径外，还存在其他的由淋巴细胞介导的细胞毒性途径[200~202]。研究 CTL 杂交瘤和腹膜渗出液中 CTL 表明，这种钙-非依赖性细胞毒性途径需要靶细胞上表达 FAS[203]，但是大多数情况下，对这种途径的完全激活，胞外钙是必需的，详情如下。T 淋巴细胞活化后，其上的 FAS 配体及其上调给这种细胞毒性途径做了更详尽的描述[204,205]。如图 31.1 所示利用缺乏穿孔素的细胞毒细胞、FasL 中的 *gld* 突变及 Fas 的 *lpr* 突变效应，分别在体外和体内研究了这种途径。尽管这种细胞毒性途径在体内长期被认为是有利于细胞毒性淋巴细胞，但是研究（*gld*/*lpr*）小鼠提示，FASL/FAS 的主要作用是调节免疫应答[206,207]。

颗粒胞吐途径和 FASL/FAS 途径最主要的不同是除细胞毒性淋巴细胞外，还有许多其他细胞类型也表达 FASL，并且在体外显示有作为效应细胞杀伤靶细胞的功能[208]。这些细胞包括巨噬细胞、树突细胞、中性粒细胞、神经元细胞和多种多样的肿瘤细胞。体内免疫调节和组织破坏中 FASL 表达的作用正在研究中。

细胞毒性 FasL/Fas 途径的分子机制

CTL 靶细胞之间相互作用，通过 FASL/FAS 途径引起死亡，此过程起始阶段的详细研究尚未完成。不过

似乎与颗粒胞吐途径完全相同。如图 31.1 所示，CTL 介导的两种死亡途径的启动均需要 TCR 的触发，而且获得这种活化需要镁一依赖性黏附，这在两种途径中也是完全一样的。尽管如此，有可能启动两种途径所需要的 TCR 抗原复合物的域值是不同的。

甚至 TCR 触发以后已经引起 FASL 的表达，为了 CTL 表面的 FASL 有效的交叉连接靶细胞的 FAS，FASL/FAS 途径可能还需要黏附分子。实验发现 CTL 克隆应答抗原时，EGTA 可以阻断依赖 FAS 的裂解功能，但不能阻断 FASL 的上调，从而证明 FASL 的单独表达是不够的[209]。

研究来源于体外，初次异种致敏的培养物中的 CTL 显示 FASL/FAS 途径可以分为两步[210]。第一阶段是 1~3h 的活化阶段，可以被抗原、抗 TCR 复合物抗体或者 PMA 和钙离子载体所激活。这一阶段需要胞外钙、RNA 和蛋白质合成，这些均是 FASL 表达所需[27]。这一阶段的出现说明靶细胞毒性中的动力学滞后，如图 31.2 所示。第二阶段是被 FASL 介导的与靶 FAS 的交联所启动，详情如下。将对这种主要来源于体外的异种 CTL 的其他研究与来自穿孔素缺乏、FASL 缺陷的 *gld* 小鼠的 CTL 活性相比较。钙螯合作用消除两种途径的细胞毒性活性，而蛋白质和 RNA 合成抑制剂可以阻断 FASL/FAS 途径，但不能阻断穿孔素依赖途径。

T 细胞克隆的 FasL/Fas 途径

当 $CD4^+$ Th1 克隆和杂交瘤在含带 FAS 的靶细胞的培养基中活化时，表现出通过 FASL/FAS 途径的细胞毒活性。不论靶细胞是否具有被 TCR 识别的配基，均可观察到细胞毒性，而且当这种克隆预活化后，也可发现此种旁观者细胞毒活性[211]。与最初的异种特异性 CTL 相似，$CD4^+$ T 细胞介导的细胞毒性需要蛋白质的合成和胞外钙，但是经预活化处理后的 Th1 细胞克隆介导的细胞毒性二者均不需要。

培养的 $CD8^+$ CTL 细胞系除外颗粒胞吐途径外，还使用 FASL/FAS 细胞毒性途径，并且研究 TCR 介导 FASL 上调的机制已经在这些细胞中完成。抑制剂研究已经涉及这种信号中的 src 样蛋白酪氨酸激酶、磷脂酰肌醇-3 激酶和钙调磷脂酶[205,212]。有趣的是了解 TCR 信号对 FasL mRNA 上调应答中如何介导不同的脱颗粒，后者又如何明显地被来自细胞因子的基因如 γ 干扰素所调节。

尽管一种可能性是性质完全相同的信号在潜在的不同阈值激发脱颗粒和 FasL 上调，也有可能是性质不同的信号。几个有关 $CD8^+$ CTL 克隆的研究均支持后者，其结果显示尽管用于产生这些 CTL 的初始肽可引起靶溶的颗粒胞吐和 FasL/Fas 两条途径，但是 FasL/Fas 可以选择性的被改变的肽配基激活[213~215]。这些结果与这种肽变异体引起 $CD4^+$ T 细胞不同应答的发现一致[216]。研究产生颗粒的流感 HA 特异性 $CD8^+$ CTL 克隆变异体。为两种细胞毒性途径是由不同的信号引起的提供了进一步的证据，这种变异体丧失了通过颗粒胞吐杀伤的能力，但发现它仍保持着通过 FasL/Fas 途径和分泌干扰素 γ 杀伤靶细胞的能力[217]。这些变异体克隆有非比寻常的高度静止的胞内钙水平，却很少或没有由 TCR 介导的钙离子增加。因此，可以推断两种细胞毒性途径需要不同的信号。

经 Fas 交联的靶细胞死亡

FasL/Fas 途径中靶细胞死亡开始于靶细胞表面的 Fas 与效应细胞表面的 FasL 交联。靶细胞死亡的这一阶段不需要大分子合成或胞内钙。因为 FasL 是三聚体[218]，使之有潜力交联 Fas，触发信号，引起靶细胞凋亡应答。如第 22 章所述，Fas 交联通过 FADD 引起胞内 caspase 活化。研究 caspase 抑制剂表明 CTL 通过 FasL/Fas 途径引起的靶溶和核损害是依赖于 caspase 的[164]。在这一死亡过程中，caspase 之后的事件并不清楚，但是推测与其他凋亡途径是共同的。

研究 Fas 交联引起的淋巴细胞死亡显示细胞表面表达 Fas 并不能保证靶细胞通过 Fas 交联死亡的敏感性，并且还有无法解释的影响敏感性的因素存在。因此，T 淋巴细胞活化后，尽管有足够的 Fas 表达，但是仍旧要抵御 Fas 引起的死亡一段时间[218,219]，并且细胞因子可以防御 Fas 交联引起的 B 淋巴细胞凋亡[220]。因为 Bcl-2 有效阻止 Fas 介导的死亡[221]，可能有其他影响灵敏度的因素发挥作用如 Bcl-x[222]。这些因素可以影响其他靶细胞通过 FasL/Fas 途径引起的死亡。

经 FasL/Fas 途径的旁路裂解

细胞毒途径依赖 TCR 参与后 FasL 表面表达和下调的极化和动力学,这种细胞毒性途径可以提高 Fas^+ 靶细胞的旁观者细胞裂解。如果 FasL 表面表达极化,以至仅仅出现在抗原靶细胞附近的结合区域,或者 FasL 表达高度短暂,以至当 CTL 与周边靶细胞分离时便下调,则可以得到最小的旁观者细胞裂解。用来源于穿孔素缺陷小鼠的长期 CTL 细胞系的一例研究,经 FasL/Fas 途径裂解的旁观者细胞达到最少[223]。然而,有些研究却检测到相当可观的经 FasL/Fas 途径的旁观者细胞裂解[18],基于以上研究认为,旁观者细胞裂解的发生依靠特殊的效应细胞和旁观者。

CTL 特性

经典 CTL 是通过其 TCR 识别靶细胞的 $CD8^+$ T 细胞

对异种免疫和病毒感染的大多数 CTL 应答,归功于 $CD8^+$ T 细胞,其中 αβTCR 识别肽抗原和 MHC Ⅰ类分子复合物从而激发细胞毒性。发现病毒特异性 CTL 识别靶细胞局限于 MHCI 类分子,为 TCR 识别的概念提供了基础[23]。事实上所有 CTL 机制的早期研究都是用这种 $CD8^+$ CTL。利用抗 $CD8^+$ 的单克隆抗体证明多数 CTL 效应细胞表达这种表面标志,并且宿主体内抗病毒防御需要 $CD8^+$ T 细胞[224]。

尽管正常情况下的 CTL 仅仅是 CTL 反应的很小一部分,但是它们在对特殊抗原应答中可能发挥重要作用。这些 CTL 可能有不寻常的特性[225],但是已经有报道是通过颗粒胞吐途径发挥作用[36]。

$CD4^+$ CTL

尽管大量的结果表明,在大多数活化情况下 $CD8^+$ T 细胞支配 CTL 反应,但是很清楚,$CD4^+$ T 细胞在某些情况下也可具有细胞毒性,特别是通过 FasL/Fas 途径。尽管如此,它们也有潜力发展颗粒胞吐途径。从一体外混合淋巴细胞培养的反应细胞群中移出 $CD8^+$ T 细胞,$CD4^+$ T 细胞具有了细胞毒性,应答异种刺激,并且这种细胞主要用颗粒胞吐途径[226]。同样,如果在体外病毒抗原呈递给 MHC Ⅱ类分子,而非 MHC Ⅰ类分子,$CD4^+$ T 细胞也可具有细胞毒性而应答,如,在 $β_2$ 微球蛋白敲除小鼠中仅仅产生极少量的 $CD8^+$ T 细胞。这种小鼠可用 $CD4^+$ T 细胞代替 $CD8^+$ T 细胞对 LCMV 和仙台病毒感染进行应答[227]。这些结果暗示了 $CD8^+$ T 细胞应答对 $CD4^+$ T 细胞分化为 CTL 有负向调节影响。

$CD4^+$ T 细胞与 TCR 交联后可以一过性表达 Fas 配体,并且对这条途径有利的大多数细胞毒活性与这种淋巴细胞亚群有关[228]。因为这种细胞毒性效应细胞有巨大潜能调节免疫应答,所以懂得正常 T 淋巴细胞中 FasL 调节的细节就显得尤其重要。常常发现 $CD4^+$ T 细胞克隆应答呈递于 MHC Ⅱ分子上的可溶性抗原时,对带有相应抗原的靶细胞,包括 APC,均有细胞毒性作用。在有 Th1 细胞因子的克隆中[228,229],发现许多都用 FasL/Fas 途径。

1038

$CD4^+$ CTL 可能通过杀伤其他淋巴细胞活化所需的 APC 而具有调节免疫应答的能力。已经证明 $CD4^+$ CTL 克隆识别来自可溶性蛋白载体的肽段,在体外能特异性减少基于这种蛋白载体的抗半抗原抗体的应答[230]。因此一些抑制性 T 细胞实际上可能是细胞毒性 T 细胞,它们可以裂解抗原呈递 T 细胞。同样,$CD4^+$ CTL 可能通过杀伤带有抗原肽-MHC Ⅱ复合物的 B 细胞而潜在地调节抗体应答。然而,抗原连于 B 细胞表面的免疫球蛋白 M 已经显示可以保护 B 细胞以逃避 FasL/Fas 细胞毒性途径,此时当 B 细胞被 CD40 配体刺激时未发现这样的效应[230]。这些实验证明 $CD4^+$ CTL 有潜能调节体内免疫应答。

CTL 能发现靶细胞上的小量肽-MHC 复合物

利用被特殊 CTL 克隆识别的肽-MHC 复合物的分子定义,估计靶识别并引起靶裂解所需这种复合物的量已经成为可能。群体活动法则预见了 CTL 克隆裂解靶细胞的能力,以及对中等度 TCR 的亲和力,TCR 亲

和力的产物与表位密度(每一细胞上肽-MHC复合物的量)是恒定不变的[232,233]。如果TCR亲和力高,达到最大限度,则靶细胞最大半数裂解需要的表位密度估计至少每个细胞需有10个肽-MHC复合物。可用高放射性标记肽研究靶溶的计量。用50%靶细胞裂解来滴定肽浓度,发现大多数细胞的表位密度是每个细胞<5个肽-MHC复合物,实验结果暗示,单独一个肽-MHC复合物就可以启动胞溶应答[234]。

用肽滴定的方法,与TCR激发的其他应答相比较,CTL细胞毒性应答有着特异的最低敏感度域值。因此,CTL克隆在10^{-11} mol/L肽浓度即有最大半数的细胞毒性反应产生,而对γ干扰素、CD3下调及Ca_i增加的应答最大半数浓度是10^{-8} mol/L[235]。其他研究估计,CTL克隆对γ干扰素的应答域值是APC靶细胞上3~5个肽-MHC复合物[236]。

上述对肽特异性CTL细胞毒性的研究并没有区分出颗粒胞吐和FasL/Fas途径,但有一种可能性必须考虑到,即两种途径可能有不同的TCR发出信号的域值。最近研究几种不同$CD4^+$ T细胞克隆识别同一种肽的结果暗示,不同T细胞应答TCR域值有一固定的分级[237]。TCR识别原始的和变异的肽段,通过颗粒胞吐途径杀伤的靶细胞是位于这种分级的敏感末端,胞溶只需要最低浓度的肽,而通过FasL/Fas途径的胞溶是位于那种分级敏感度最低的末端。有几种细胞因子分泌的域值是介于两种细胞毒性途径的中间阶段。因此,受体导致的脱颗粒信号域值可能比相同细胞中其他反应需要的转录活化域值要低。

CTL改变了的裂解

许多可以改变正常TCR识别靶细胞的方法已经发展起来[238]。最简单的方法是用连有外源性凝集素(如伴刀豆凝集素A或植物血凝素)的TCR,当靶细胞和TCR交联时外源性凝集素使之与CTL黏着。一个更好的方法是用带有IgG Fc受体的靶细胞(如经典CTL靶细胞——P815肥大细胞瘤)和抗CTL表面TCR复合物的IgG多克隆抗体。将这种抗体连接到靶细胞的FcR,使之被抗TCR抗体包被,后者与CTL上的这种受体交联。更改细胞毒性的更详尽的方法包括,通过化学交联抗受体和抗靶细胞的抗体建立连接TCR和靶细胞的双特异抗体[239]、制备一种V区抗体——可识别TCR和其他靶抗原的混合杂交瘤;或者用重组体技术制备单链双特异抗体[240]。

用更改细胞毒性技术,使CTL能够裂解一些简单细胞,如无核红细胞[241]、具有不适MHC抗原的其他细胞。除用作实验室技术外,这些方法,包括肿瘤特异的双功能抗体在内,均已用于体内肿瘤治疗[242]。

一些CTL通过非TCR的受体识别靶细胞

尽管TCR一般是靶细胞激发细胞毒性的主要方法,某些情况下其他受体也可发挥作用。例如,CD44可以改变一些人CTL的裂解[243],并且结合靶细胞上过表达的B7.1和ICAM启动非依赖TCR的裂解[244]。通过高IL-2水平培养经典TCR介导的MHC限制靶识别的CTL克隆,CTL细胞系变得杂乱无章,以至不管原始CTL特异性而杀伤许多肿瘤靶细胞。这种改变的识别方式类似于淋巴因子活化的杀伤细胞(LAK),后者产生于高浓度IL-2培养基中的NK细胞[245]。

CTL的产生

本章描述CTL涉及到在体内或体外已经分化为CTL效应细胞的T细胞。这种分化过程正常情况下发生在抗原应答中,并且代表着CTL和NK细胞之间的主要不同,这在初始淋巴组织的分化阶段可以发现。产生效应T细胞的分化阶段开始于初始CTL前体,还包括分泌性颗粒和蛋白成分的实质性发育,以及功能性TCR诱导产生的FasL表达的增加。$CD8^+$ T细胞群产生CTL显示与$CD4^+$细胞群的这种分化类似,对后者的研究主要是关于细胞因子分泌[246]。

体内

在体内小鼠异体移植的早期研究显示发生移植排斥反应后,淋巴器官中可以检测到异种特异性体外细

胞毒 CTL。在腹腔内异种肿瘤排斥后的腹腔渗出液中发现了特别富集、高度活化的异种反应性 CTL 细胞群[98]。估计这种 CTL 在这种细胞群中占接近 50%。测试渗出液中的淋巴细胞示肿瘤接种后这种 CTL 应答在 5~10 天快速增加,2 周后则缓慢下降,这与肿瘤的消失密切相关。这种 CTL 分化在体内系统很难研究。其他类型的异种移植在体内也产生 CTL,一般与移植排斥有关。然而,纯化侵入大多数移植器官的淋巴细胞很难,这阻碍了对它们的研究,因此引流淋巴结常常是活化 CTL 更方便的来源。有一个系统研究体内同种异体或者异种 CTL 非常有用,即海绵状基质移植物,其中塑料海绵包被外源成纤维细胞并植入小鼠。将海绵移出动物体内,浸润的淋巴细胞可以被挤出海绵并用于体外研究[247]。

感染某些病毒(如 LCMV 或小鼠缺肢病病毒)后的小鼠脾中,可以检测到鼠源性病毒特异性 CTL,并且这种应答一般与感染的消退密切相关[248]。人类感染 HIV 个体的血液中可检测到特异性 CTL[249]。然而,在大多数病毒感染的情况下,体外直接分析小鼠脾细胞或者人外周血淋巴细胞,不能检测到 CTL。也许在感染部位或者引流感染部位的局部淋巴结可以检测到[250]。可是,感染消退后,如果在体外再次刺激培养后测量 CTL 活性,则脾或血液中增强的 CTL 前体频率(CTLp)就可以检测。这种记忆性 CTL 在下文中将进一步说明。

病毒感染消退后,体外可直接检测到的效应 T 细胞减少,这是因为体内 CTL 的死亡。凋亡 $CD8^+$ T 细胞在体内可检测到,而且当 CTL 应答衰退时这种即将死亡的细胞数量达到峰值[251]。但现在已得到反对 CTL 死亡是通过 Fas/Fas 途径的证据,即 *lpr* 和 *gld* 小鼠被 LCMV 感染后发现 $CD8^+$ T 细胞凋亡水平正常,而 LCMV 特异 CTL 下降[252]。

最近发现 CTL 识别的蛋白和肽类抗原可用于诱导体内产生 pCTL。静脉内注射抗原的 MHC I-肽可以特异地激活脾 T 淋巴细胞,为下一步体外诱导抗肽段的 CTL 作准备[253]。体外混合树突细胞(DC)和蛋白抗原,然后注入小鼠足垫,在注射位点的淋巴结中产生活化的 CTL[254]。类似的肽和 DC 可以激活脾细胞,随后在体外诱导产生 CTL[255]或者诱导产生抗表达有此种肽段的肿瘤的 CTL[256]。

尽管传统的疫苗设计是刺激体内的抗体形成,最近已经重点集中在诱发 CTL 的疫苗。许多有前途的方法用不同形式的抗原和佐剂已经发展起来,这些将在第 41 章详细介绍。

体外

体外异体反应 CTL 的经典来源是短期混合培养淋巴细胞,其中照射过的脾细胞与有不同 MHC 单体型的脾细胞共同培养[257]。在这种培养物中,CTL 活性 3~4 天即可检测到,5~6 天达到高峰。活化的 CTL 是 $CD8^+$ 母细胞。进一步培养活性慢慢衰退,培养物中没有明显的可检测到的细胞死亡。静止后,细胞可以被再次刺激而获得更加富集的次级效应细胞群,并且在周期性 IL-2 的再刺激时这种培养物可以维持下去。用限制性稀释法,可获得细胞克隆,并可扩大、繁殖数年。

体外产生病毒特异性 CTL 培养物,经典方法是用病毒感染的小鼠体内预先激活的 T 细胞。随后在体外用表达同源感染的或转染细胞中的病毒抗原刺激,产生识别病毒抗原的 CTL。但用 DC 呈递抗原时,体外对病毒抗原的 CTL 初次应答可以产生[258]。

如上所述,肽免疫小鼠可以特异性的激发 T 细胞,而后在体外产生 CTL。CTL 也可以在体外直接由 MHC I-肽复合物诱导产生,特别是当用 DC 作为呈递细胞时[259,260]。

CTL 产生的细胞因子调节

当监测几种联合细胞因子增强 CTL 产生的能力时,将它们加入 MLR 培养物中,培养终止时测量 CTL 活性明显加强了。这些细胞因子包括 IL-2[261]、IL-4[262]、IL-7[263]、IL-10[264]、IL-12[265]和 IL-15[266]。虽然增加的限度依赖于特异抗原和所用的应答细胞群,但是 IL-2 在这些实验中是特别有潜能的细胞毒诱导剂。结合分化效应(包括相关基因的表达)和应答抗原的单个 CTL 克隆更有效的生长可以解释观察到的结果。其他细胞因子可能负面调节淋巴细胞细胞毒性的分化。例如,β 转化生长因子有能力阻断 IL-2 介导的体外细胞毒性的增强和颗粒蛋白上调[267]。

为了确定产生 CTL 时哪一种内源性细胞因子最重要，监测在这种培养物中加入抗细胞因子抗体后的效应，以及来源于选择性缺乏细胞因子的敲除小鼠的淋巴细胞。这些结果均表明，IL-2 是一非常重要的内源性细胞因子，因为 IL-2 缺陷小鼠的细胞体外无 CTL 产物[268]，加入抗 IL-2[269]或抗 IL-2R[270]抗体已经显示阻断 CTL 的产生。

从初始型前体细胞生成 CTL 需要共刺激

先纯化少量静止期的初始 $CD8^+$ T 细胞，然后确定要促使其分化为细胞毒性效应细胞需要什么条件，这是研究 CTL 产生的最简单的系统[271]。使用抗 CD3 抗体更改后的测量法检测，发现初始细胞群没有细胞毒性活性，或者其颗粒中介蛋白穿孔素和颗粒酶没有达到可检测的水平。当与被抗 CD3 抗体包被并带有 B7-1 的靶细胞共孵育时，6h 后可以检测到细胞毒性活性。这种慢性起始的细胞毒性活性与正常的 CTL 效应细胞相比较有几个特点：①依赖靶细胞上 B7-1 的表达；②被抗 CD28 的抗体所阻断；③被 RNA 和蛋白合成抑制剂抑制。因此，在这个系统中 CTL 应答 TCR 刺激和 CD28 共刺激的功能 CTL 在几小时内即可产生。是否需要共刺激是 nCTLp 和已分化的 CTL 效应细胞之间最明显的区别，这表明靶细胞识别无类似的需求。这种 $CD8^+$ nCTLp 与初始 $CD4^+$ T 细胞如此相似，二者的某些细胞因子应答均需要共刺激。然而，IL-2 不能克服 CTLp 分化需要共刺激[272]。体内和体外更复杂的检测 CTL 产生的系统已经进一步的证明为了从 CTLp 诱生 CTL 需要共刺激。用 CTLA4 Ig 与 CD28 牢固相连，阻断其与抗原所在细胞上相应的配体连接，从而阻断 CTL 的产生已经确定了在产生共刺激信号中 CD28 的重要性[273]。但其他受体-配体对也有能力辅助抗原共刺激 CTLp，促使其在一些试验系统中分化为 CTL。如表 31.2 所示，这些受体-配体对包括 CD2/LFA-3 和巨噬细胞上的热稳定抗原[275]。

1040

表 31.2 CTL/CTLp 附属分子

T 细胞受体/靶(APC)配体	黏附分子：CTL 效应细胞/靶细胞	共刺激分子：CTLp/APC
CD28/B7-1，B7-2	无	有
LFA-1/ICAM	有	有
CD2/LFA-3	有	有
X/HSA	无	有（？ CTL mem）
X/CD44	无	有
X/DNAM-1	有	？
CD8/MHC I	有	？

记忆 CTL

记忆 CTL 可以定义为经免疫后的动物体内的 T 细胞，接受再次刺激后可以产生 细胞毒免疫应答的子代 CTL。其形式是 CTLp 和 nCTLp 二者之一，但实际上 mCTL 与 nCTLp 相类似，因为它们的定义是根据抗原再刺激后其能产生胞溶活性效应 CTL 的能力定义的，尤其是在体外。CTLp 一般用限制稀释分析法分析，该方法中，T 细胞稀释在含有 APC 的培养孔中，一起培养 5～7 天，含有 CTL 活性的孔的频率通过将靶细胞加入到培养孔中而确定。在大多数系统中，未免疫动物只有很少一点或检测不出 CTLp 的频率，因此，任何对免疫应答的增加都可定义为 mCTL 群。例如，对于病毒特异的 CTLp，来自未免疫动物脾细胞通常含 nCTLp 的频率为 10^{-6}，而在病毒感染期间，如果将效应 CTL 包括在内，则升至 10^{-3}～10^{-2}，然后随着时间推移而降至 10^{-5}～10^{-4}[276]。感染后净增加的 10～100 倍的 CTLp 频率应包含 mCTL。这种增加至少可以部分解释对病毒全面增强的免疫记忆应答，使 CTL 应答在刺激后更快和更强。CTLp 频率从感染期间的峰值降到感染后所维持的稳定水平是由于凋亡性的死亡。

因为 LDA 不是直接分析 CTLp 的方法，其特点是通过再刺激培养前用抗体分选或去掉某些细胞而主要限定于分析其表面表型。病毒特异的 mCTL 是 $CD8^+$、$CD44^{high}$，而其 L 选择素和 CD25[250,277]的表达可变。现在还没有能鉴定功能上所定义的 mCTL 的特定表面标志，因为上述标志也存在于以前活化了的但不能分化成 CTL 的 T 细胞上。目前关于体内维持 mCTL 时是否需要抗原和细胞循环还存在相当大的争议[276,278]。现在发现对于 nCTLp，在体外从 mCTL 诱导出 CTL 需要 B7-1 共刺激[279]。

来自 nCTLp 的 mCTL 的分化途径在体外和体内都研究过。但是，关于 mCTL 是否来自 CTL 或直接来自一

种抗原应答的 CD8⁺ 祖细胞的基本问题仍是争论的[278,280]。没有区别 CTL 和 mCTL 的特异表面标志存在，最直接的实验证明是不可能的。因为 CTL 和 mCTL 都有记忆/活化标志如 CD44，而且在体外的 MLR 培养中 CTL 活性下降并不伴随可检测的细胞死亡，所以人们认为 CTL 产生了 mCTL[281]。然而，最近有关在缺少 CD28 介导的共刺激下检测针对流感病毒的记忆和效应 CTL 应答的诱导实验表明，当用抗原和更弱的 HAS 共刺激分子刺激时，可以从 nCTLp 中产生 mCTL，而此时并无可检测的 CTL 中间体出现[279]。

体内淋巴细胞的细胞毒性

虽然细胞毒性淋巴细胞是根据其体外活性定义的，但是由于它们在体内的潜在活性，所以人们对它们发挥作用的机制产生了极大的兴趣。然而，体内研究细胞死亡已经证明是非常困难的。在其他研究中预示存在较高细胞死亡率的地方，组织学研究方法却经常不能显示这些濒死细胞的存在。例如，大多数胸腺细胞在正常发育阶段死亡，直到出现灵敏的原位凋亡 DNA 片段检测技术[282]，在正常的胸腺组织区域中才显示存在细胞死亡。当认识到凋亡死亡的一个重要特性就是随后被组织巨噬细胞识别、吞噬之后，才解释了这种细胞死亡的难显示性。由于两条淋巴细胞细胞毒实施途径都导致靶细胞典型的凋亡，所以淋巴细胞细胞毒性似乎较难通过组织学方法观察。即使应用灵敏的 DNA 片段检测法，在确实可能发生 CTL 介导细胞死亡的地方，也只有少数未被巨噬细胞清除的凋亡细胞得以显示。通过 HBV 特异性 CTL 克隆的获得性过继免疫，研究这些 CTL 对肝的破坏作用，发现可以通过循环中肝酶学的检测对肝细胞的死亡进行探测[283]。在发生急性 CTL 介导细胞死亡的情况下，通过仔细的组织学检测，可以发现一些与 CTL 相关的凋亡肝细胞。

1041

将体外已经明确的淋巴细胞群过继转移入初始动物体内，并检测受者体内是否对其产生了应答，这是显示淋巴细胞体内功能的一种常用方法。但是，当关注于 CTL 和 NK 的细胞毒性时，这种方法存在着问题，由于这些过继的淋巴细胞自己可以分泌细胞因子，所以它们不仅介导细胞毒性，还有可能产生其他的潜在功能。其中一个显著问题是，CTL 和 NK 是 γIFN 的主要来源，而 γIFN 被认为可以刺激巨噬细胞产生细胞毒性。因此，过继方法虽然可以确定体内反应所需的淋巴细胞表型，但在确定效应细胞的属性和细胞死亡的机制上还存有缺陷。

在考虑过继转移的 CTL 效应时，由于体内检测细胞死亡的艰巨性，经常导致错误的结论。例如，在鼠乙型肝炎模型系统中，体内注射 CTL，产生可检测的肝细胞溶破以及病毒复制的清除[284]。但是抗 IFN-γ 和抗 TNF 抗体可以清除肝脏中病毒的复制，而这两者都不影响肝细胞的溶破[284]。进一步讲，穿孔素缺陷的 CTL 不能杀死肝细胞，但确实可以清除病毒复制。所以在这个系统中，抗病毒保护作用主要依赖于 CTL 诱导的细胞因子分泌，而不是依赖于细胞毒性[285]。更进一步讲，在一些病毒感染的情况下显示，CTL 诱导的细胞毒性在病毒感染的病理性后果中发挥重要作用[286]。

向患者过继转移肿瘤特异性细胞毒性淋巴细胞，是一种肿瘤免疫学治疗方法[287]。随着鉴定出更多的可被 CTL 识别的肿瘤抗原（第 36 章），使得设计可以产生肿瘤特异性 CTL 反应的疫苗随着变得更具吸引力。从肿瘤手术的标本中培养肿瘤浸润性淋巴细胞（tumor-infiltrating lymphocytes，TIL）的实验已经完成，并且可以体外扩增至 $>10^{11}$ 的细胞剂量回输患者体内进行治疗[288]。临床上黑色素瘤的消退非常常见，人们注意到，这种成功应答的可能性与体外抗同种肿瘤的细胞毒活性（和细胞因子分泌）相关[289]。

缺失细胞毒性递质小鼠的研究

如上所述，一些实验室通过靶向破坏在体内胚胎干细胞的基因，制备了穿孔素缺陷鼠，这些鼠为一些重要的体内研究提供了模型来源，同时也提供了在这些细胞中由颗粒胞吐途径残缺的 CTL 细胞。与之相似，FasL/Fas 途径缺陷的实验鼠可以揭示这种细胞毒途径在体内的功能，但是在这种情况下，免疫反应的其他控制环节（见下）也发生了变化，这使得这些实验的解释复杂化。体内 CTL 引起细胞死亡的主要生物学过程已经证实，除此之外，人们认为 CTL 介导的抗原反应 T 细胞和 APC 的死亡也可以调节免疫应答。对穿孔素或

FasL/Fas 细胞毒途径缺陷性鼠免疫应答的研究是评价体内 CTL 功能最有意义的方法。

对正常生理和免疫应答调节的影响

在实验室条件下,穿孔素缺陷性鼠具有正常的生殖能力和寿命[144]。尽管没有实验型感染的情况下,可能是由于亚临床细菌感染对免疫系统影响,使得穿孔素缺陷型鼠可以具有更活跃的巨噬细胞和更高的细胞因子水平,但是经分析淋巴细胞数量、表型及各种淋巴器官组织学表明其与正常免疫系统没有可检测到的差别。[223]。由异体抗原或病毒引发的 T 细胞活化,显示 $CD8^+$ T 细胞亚群可以正常增殖和扩增。穿孔素缺陷鼠中的颗粒酶含量和 TCR 诱导的胞吐作用也是正常的[223]。这些研究显示,穿孔素对整体的正常生理和大体的淋巴细胞内环境稳定并不起明显的作用。虽然并没有报道认为,穿孔素缺陷鼠体内由于负性调节活性而产生增强的免疫应答,但是与有限的 APC 进行共同培养的情况下,来源于这些鼠的 $CD8^+$ 而不是 $CD4^+$ 细胞在体外对抗原应答中,细胞的增殖和细胞因子的分泌有所增强[290]。此效应与颗粒胞吐途径对 APC 的杀伤有关。

在体内检测穿孔素 mRNA 表达的研究中惊奇地发现,妊娠鼠的 granular metrial 腺中表达穿孔素,而这个器官不存在于人体。该腺体的细胞显示 NK 样表面标志表型,而且已经被认为在正常的胚胎生理过程中发挥细胞毒作用。不过,虽然在穿孔素缺陷鼠和正常鼠的胎盘、子宫之间存在一些差别,但是穿孔素缺陷近交鼠正常的生育能力反驳了这种细胞毒活性具有明显的生理功能[226]。

Fas(*lpr*)和 FasL(*gld*)缺陷鼠是由自发突变发展而来,在明确这些突变的分子基础以前,它们就已经被应用于淋巴增殖性表型的研究[291]。多种考虑认为,以这些鼠 Fas/FasL 淋巴细胞细胞毒性途径的缺陷解释众多的结果时,要小心谨慎。FasL 不仅表达于细胞毒性淋巴细胞,还表达于其他细胞,而且认为这种表达可以改变免疫应答[208],并且 Fas 被认为除了细胞毒性之外还有其他功能[206]。随着年龄的增长,*gld* 和 *lpr* 鼠系的淋巴结病和脾大加剧,这是它们共同的表型特征。增大的淋巴器官成为无功能淋巴细胞的聚居地,使得这些鼠的实验用途复杂化。但是年轻 *gld* 和 *lpr* 鼠的淋巴细胞增殖性疾病轻微,这些动物好象更适合于检测 Fas/FasL 死亡途径功能的实验研究。但是由穿孔素敲除鼠和 *gld* 鼠交配产生的双重缺陷鼠显示具有更为显著和致命的自身免疫疾病,这使得它们在实验中应用非常困难[292]。

如果颗粒酶 A 和 B 的功能只局限于细胞毒性淋巴细胞颗粒中,那么通过靶向基因破坏而产生的颗粒酶 A 或 B 缺陷鼠就都应该具有正常的生育能力、寿命和淋巴样细胞发育,事实上确实如此[148,150]。

除了在体外细胞毒性中占主导地位的颗粒胞吐和 Fas/FasL 途径,TNF-α 和淋巴毒素(LT,TNF-γ)也是体内细胞毒性潜在的介导。虽然传统观点认为它们在体外对肿瘤细胞具有选择性细胞毒性,但在体内这些细胞因子对活化的 T 淋巴细胞[293,294]、可能还有其他的一些正常细胞均具有细胞毒性。抗 TNF 抗体的效应或 TNF/TNFR 缺陷鼠的应用都不能归因于 CTL 产生的 TNF,因为在体内巨噬细胞是 TNF 的主要来源。LT 已经被认为是 CTL 致死性中导分子的成员之一,但是研究表明 LT 缺陷鼠的 CTL 在体外有正常的功能,尽管其淋巴结结构存在巨大缺陷。

1042

体内的感染抵抗和感染诱导的免疫病理学

因为长期研究表明 CTLs 在体外能够溶解被病毒和胞内菌感染的细胞,所以用大量的病毒和细菌来检测穿孔素缺陷型小鼠抗感染的能力。以前发现静脉内注射非细胞病性病毒 LCMV 可以被 $CD8^+$ T 细胞清除,同时也引起免疫病理性肝炎[286]。在正常小鼠体内可以完全清除的静脉内 LCMV 注射剂量,而在穿孔素缺陷型鼠的体内则引起消耗性疾病并死亡,无肝炎发生。当构建穿孔素缺陷型小鼠表达大量的识别 LCMV 的 $CD8^+$ T细胞时,却不能证明这些细胞能够保护小鼠避免感染 LCMV,即便是以 LCMV 抗原激发也不能有效地克服这种功能缺陷[296]。正常小鼠大脑内注射 LCMV 则引起致命性的绒毛膜脑膜炎,且主要是由 $CD8^+$ T 细胞介导的,然而穿孔素缺陷型小鼠大脑内注射 LCMV 仅仅是伴随着体重的减轻,并不致命[144]。因此,这种免疫病理应答需要依赖穿孔素的处理过程。与穿孔素缺陷型小鼠相对照,*lpr* 和 *gld* 小鼠应答 LCMV 感染时,与对照相比较没有明显的可以检测到的改变,包括病毒防护和免疫病理[296]。

细胞病性病毒在其自身复制的同时，要杀伤宿主细胞，并且不能被淋巴细胞毒性作用所控制。穿孔素缺陷型小鼠感染细胞病性病毒——牛痘病毒、水疱性口炎病毒和 Semliki 森林病毒显示正常的保护水平[297]，当检测 gld 小鼠时得到同样的结果[297]。

几种胞内细菌感染的小鼠模型中，已知利斯特氏杆菌属主要是由 γ 干扰素活化的巨噬细胞控制。穿孔素缺陷型小鼠与对照组比较二者抵制利斯特氏杆菌感染的能力显示，高剂量的细菌时生存率没有不同，但在低剂量时前者从脾中而不是肝中清除细菌有适当的延迟。然而，当以亚致死感染剂量时，穿孔素缺陷型小鼠从脾和肝清除再次李斯特氏杆菌感染的能力分别减少 10 倍和 100 倍[298]。穿孔素缺陷型同 gld 一样已经检测其抵抗分枝杆菌感染的能力，并作为人结核杆菌研究的模型。同时应用非毒性牛型分枝杆菌和毒型结核分枝杆菌发现，不论是穿孔素缺陷型小鼠还是 gld 小鼠静脉注射分枝杆菌后，在肺、肝或脾均没有检测到细菌数量的不同[299]。因此，尽管研究 β2 微球蛋白缺陷小鼠时暗示 $CD8^+$ T 细胞提供保护，但是淋巴细胞介导的细胞毒性作用在正常的抵御这些感染时并没有发挥需要的作用[300]。

虽然颗粒酶 A 缺陷的 CTL 没有检测到细胞毒性功能缺陷[150]，但是仍然研究了其抵抗胞病性病毒-ectromeln 感染的能力[301]，以前研究显示这种抵抗由 $CD8^+$ T 细胞和 NK 细胞介导。尽管在正常和颗粒酶缺陷小鼠体内均可激起脾 T 细胞正常的病毒特异性 CTL 反应，但是病毒生长在颗粒酶 A 缺陷小鼠脾和肝要激烈得多，相比之下对照组并无致命危险。这些实验表明，颗粒酶 A 的非细胞毒性功能在体内的病毒保护中发挥重要作用，尽管有可能用于体外实验的靶细胞并不具有代表性。

异体移植排斥

穿孔素和 FasL/Fas 缺陷小鼠已经被用作器官供体和受体，以分析这些细胞毒性途径在以免疫为基础的排斥反应现象中是否有一定的作用。研究发现，不同 MHC I 或 MHC II 的同种异体型、完全同种异体型以及异种小鼠皮肤移植正常情况下均被穿孔素缺陷小鼠和 *gld* 小鼠排斥[302]。来源于同种异体 *lpr* 小鼠的皮肤移植物正常情况下也同样被排斥，因此，这种皮肤抑制排斥反应中，两种淋巴细胞介导的细胞毒性作用均不需要。

小鼠中移植胰岛细胞得到类似的结果。与对照受体完全一样，穿孔素缺陷受者小鼠完全排斥同种并体胰岛细胞移植物，然而同系移植物被接受。同种异体 *lpr* 供者的胰岛细胞正常情况下也被穿孔素缺陷受者小鼠所排斥[303]，表明无论是两种细胞毒性途径中的一种，还是两种的联合，在这种抑制排斥反应中均不需要。

带血管的完全异体心脏移植物被穿孔素缺陷小鼠和正常小鼠在 6d 内排斥，而且在二者排斥组织中均发现类似的单核浸润细胞[304]。正常小鼠应答这种移植物时产生不同特异性 CTL，而穿孔素缺陷受者小鼠中不产生。然而当这种心脏移植在只有 MHC I 类分子不同的小鼠中进行后，与对照小鼠相比较，穿孔素缺陷的受体小鼠表现为移植物存活时间延长，平均存活率由 31 天提高为 81 天[304]。用 *gld* 和 *lpr* 小鼠分别作为供者和受者，研究在这种心脏同种异体移植模型中 FasL/Fas 途径的作用[305]，发现正常小鼠，而非 *lpr* 小鼠的心肌细胞表达功能 Fas，并且 *gld* 受者则对心脏移植物有恒性排斥。然而，从这些结果中并不能确定 FasL/Fas 途径的作用，因为同种异体 *lpr* 小鼠的心脏像对照组一样被迅速排斥，而 *lpr* 受体小鼠则表现为延迟排斥。这些结果暗示，在这些突变小鼠体内的免疫无序可以说明观察到的对移植物排斥的不同，而不是淋巴细胞介导的细胞毒性 FasL/Fas 途径的特异性缺陷。这种心脏同种异体移植系统的模型穿孔素敲除的结果暗示，不同组织可能有不同的排斥机制。

Fas 阴性对 TNF 抵抗的同种异体肿瘤在正常情况下同样被穿孔素缺陷的小鼠排斥，尽管 CTL 在正常对照组中也如期出现[306]。因此，数据清楚地表明，大多数时候，依赖穿孔素的细胞毒性作用不是同种异体或异种组织排斥的主要介质，尽管这种途径在临床相关的某些模型如心脏移植中发挥着重要作用。

移植物抗宿主病

移植物抗宿主病(graft-versus-host disease，GVHD)是由于移植的外源性淋巴细胞对宿主产生免疫攻击，该

病已经利用两条主要的细胞毒性途径均缺陷的供体小鼠来做研究。来自完全异源小鼠或 MHC 匹配但 MHC 基因座不同小鼠的穿孔素缺失的 T 细胞诱导出了急性致死性 GVHD 的所有症状,但其动力学有所延迟[292,307]。与此相对照,当来自 gld 小鼠 T 细胞进行相似的移植时,尽管延迟但仍会出现完整的恶病质和致死性,也没有观察到特征性皮肤病理学变化证据[307]。同这种 GVHD 模型相关的 复杂的淋巴增生和 B 细胞功能缺陷在穿孔素缺陷小鼠中全部出现,而在 *gld* 小鼠中则无此现象[308]。这些结果显示,淋巴细胞的细胞毒性在 GVHD 病理中发挥主要作用,在体内模型中都利用了两种细胞毒性途径。

利用异源 T 细胞诱导的致死性 GVHD 鼠模型,检测了颗粒酶 B 在 GVHD 中的功能[309]。由 $CD8^+$ I 类不匹配 T 细胞所诱导的致死性疾病与正常 T 细胞相比,发现颗粒酶 B 缺陷细胞效力明显减少。但是,由 $CD4^+$ T细胞诱导的 GVHD 是正常的。为了在体内检测 NK 细胞颗粒酶 B 功能的作用,利用一个杂合子抵抗模型,即将双亲骨髓移植入 F_2 代杂合子。颗粒酶 B 缺陷宿主表现出对这些移植物的完全抵抗,尽管它们在体外会有 CTL 诱导的靶 DNA 损伤。

自身免疫性疾病

我们利用穿孔素缺陷小鼠构建胰腺 β 细胞上表达有 LCMV 糖蛋白的转基因模型来检测细胞毒淋巴细胞在自身免疫性糖尿病中所起的作用[310]。在正常的转基因小鼠中,这样的 LCMV 表达将引起 T 细胞反应,导致糖尿病迅速发展,但在穿孔素缺乏转基因小鼠,尽管 T 细胞浸润能引起显著的胰腺炎,却没有发生糖尿病。因此,在该模型中,自身免疫性糖尿病的发展需要利用穿孔素途径的细胞毒性 T 细胞的参与。有趣的是,利用同一模型系统,通过携带有 γ 干扰素一个缺陷基因的 LCMV 转基因小鼠来研究 γ 干扰素的作用[311]。虽然激活了抗 LCMV 的 CTL 活性,但在这些小鼠中也未观察到糖尿病的发生。在这一试验中,没有观察到 T 细胞浸润胰腺,也没有与炎症相联系的胰腺 MHC I 和 II 上向调节。因此,很明显还需要炎症的其他方面以除去功能性胰腺细胞。

另外一种鼠科糖尿病也可在非肥胖型糖尿病(nonobase diabetic, NOD)小鼠系中获得,这种小鼠有较高的自然糖尿病发生率。当 NOD 动物表达 *lpr* 缺陷型 Fas 时,它们并不会患糖尿病,并且,它们对注射来源于糖尿病小鼠的 $CD8^+$ T 细胞诱发的快速致糖尿病效果也有抵抗力[312]。这些数据强烈提示,在该模型中 FasL/Fas 途径参与到胰腺 β 细胞的破坏中,并且有可能不同的糖尿病小鼠模型有不同的效应途径。

肿瘤免疫

研究发现,穿孔素缺陷小鼠在注射了同系纤维肉瘤细胞后,具有高度肿瘤易患性,而在正常的鼠体内则可通过依赖 $CD8^+$ T 细胞的途径排斥。其他几种肿瘤也显示相似的结果,正常小鼠比穿孔素缺乏小鼠需要 10 倍甚至 100 倍的肿瘤细胞方可导致肿瘤。但是,在其他一些实验中发现穿孔素缺乏小鼠与正常小鼠一致[313],以及发现穿孔素缺陷小鼠对不表达 MHC I 类分子的肿瘤生长的控制有缺陷,在正常小鼠体内是由 NK 细胞介导的[314]。当预先给小鼠注射照射过的肿瘤细胞,小鼠将获得肿瘤免疫,对肿瘤生长有更强的免疫抵抗,但在某些试验中穿孔素缺陷小鼠却十分明显缺乏这种免疫[313]。

发现某些 Fas 转染的肿瘤细胞比其亲代细胞能更有效的 被排斥,所以 FasL/Fas 细胞毒途径在体内肿瘤保护方面发挥主要作用[313]。但是,某些表达 FasL 的肿瘤可能通过诱导识别肿瘤抗原的 Fas^+ 的淋巴细胞的死亡而损害免疫应答,提示这种途径在肿瘤免疫中的作用可能很复杂[208]。

化学致癌物和癌基因病毒处理小鼠,待及肿瘤发展一段时间后,小鼠可作为研究体内肿瘤监视的模型。已发现穿孔素缺陷小鼠对化学致癌物甲基胆蒽引发的肿瘤明显比普通小鼠敏感,表现在低剂量下,穿孔素缺陷小鼠有更高的肿瘤发生率,在同等剂量下,穿孔素缺陷小鼠更早发生肿瘤[313]。但是,化学致癌物 DMBA 和共致癌剂 TPA 诱发的皮肤乳头状瘤在穿孔素缺陷小鼠和普通小鼠间无明显差异,Moloney 肉瘤病毒诱发的肿瘤在这两种小鼠中也有类似的动力学,但排斥反应在穿孔素缺陷小鼠中要慢一些[313]。因此,细胞毒性淋巴

细胞利用依赖穿孔素途径参与到防止肿瘤发展的过程中去,至少在某些动物肿瘤监视模型中如此。

对穿孔素缺乏小鼠的这些研究更进一步说明了长期体外研究淋巴细胞细胞毒活性能够介导体内肿瘤的破坏,同时这些研究也支持基于 CTL 细胞毒活性的肿瘤治疗的不断进步。FasL/Fas 途径所扮演的角色是复杂的。它可能在抑制肿瘤免疫,当前的证据没有排斥细胞因子可能通过不同途径加强细胞毒活性。

摘要和结论

细胞毒 T 和 NK 淋巴细胞有能力在体外经两种不同的方式激发靶细胞的凋亡,二者均比由其他因素引起的的细胞凋亡要迅速得多。两种类型的细胞毒性淋巴细胞均具有胞质分泌颗粒,这些颗粒在颗粒胞吐细胞毒性途径中的应答靶细胞连接时分泌。Fas^{+} 的靶细胞也可以通过 FasL/Fas 途径被杀伤。

当靶细胞的结合引起 CTL 胞质的迅速极化,则启动颗粒胞吐途径,颗粒介质分泌入 CTL 和其周边的靶细胞之间的突触样连接区域。分泌的穿孔素在靶细胞膜上形成小孔,直接或非直接的共分泌颗粒酶进入靶细胞胞质。颗粒酶 B 处理和活化靶细胞 caspase 而触发核损害,但是 caspase 抑制剂并不能阻断靶溶。因此,靶细胞死亡的分子途径最后一步尚不清楚。

1044

CTL 杀伤靶细胞的 FasL/Fas 途径也可经 TCR 交联而启动,交联触发效应细胞中 Fas 配体的转录上调。效应细胞表面表达 Fas 配体从而允许靶细胞 Fas 与之有效交联。然后进入 FADD,并激活靶细胞胞浆中的 caspase 8。靶细胞裂解和通过此途径的细胞凋亡核损害均依赖 caspase。需要 Fas 配体从头合成,就表示通过 FasL/Fas 途径的靶细胞裂解会有延迟,但相对于其他细胞凋亡过程来说,这个途径迅速多了。

研究某些缺乏用体外功能命名的细胞毒途径的介质的小鼠表明:淋巴细胞的细胞毒性对许多体内免疫过程有重要意义。其他研究已经证实 CTL 效应细胞涉及的许多系统,穿孔素缺陷小鼠明显缺失。它们对非细胞病变性病毒 LCMV 感染的抵抗力下降,抵抗疫苗的对利斯特氏菌属感染的保护效应,抵抗表达 LCMV 的胰岛细胞导致的糖尿病,并且缺乏对移植瘤和化学致癌物导致的肿瘤的抵抗力。另一方面,穿孔素缺陷小鼠在其他也涉及到 CTL 细胞的相类似的现象中又表现正常。尤其是穿孔素缺乏小鼠在同种异体移植排斥反应也大致正常。因此,虽然依赖穿孔素细胞毒性是体内效应机制的一个因素,但是,对外源组织的破坏也可通过其他的途径。

FasL/Fas 途径在免疫调节现象中的作用使得其在体研究错综复杂。因为小鼠 FasL/Fas 途径的特异性缺陷时导致异常的免疫反应,所以很难对该途径在免疫效应机制中的重要性做出正确评价。

(倪　兵　赵婷婷 译)

参 考 文 献

1. Martz E. The 51Cr release assay for CTL-mediated target cell lysis. In: *Cytotoxic cells. Recognition, effector function, generation, and methods.* Boston: Birhauser, 1993:457–467.
2. Sanderson CJ. The uptake and retention of chromium by cells. *Transplantation* 1976;21:526–529.
3. Lichtenfels R, Biddison WE, Schulz H, Vogt AB, Martin R. CARE-LASS (calcein-release assay), an improved fluorescence-based test system to measure cytotoxic T lymphocyte cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1994;172:227–239.
4. Blomberg K, Hautala R, Lovgren J, Mukkala VM, Lindqvist C, Akerman K. Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand. *J Immunol Methods* 1996;193:199–206.
5. Zinkernagel RM, Haenseler E, Leist T, Cerny A, Hengartner H, Althage A. T cell-mediated hepatitis in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Liver cell destruction by H-2 class I-restricted virus-specific cytotoxic T cells as a physiological correlate of the 51Cr-release assay. *J Exp Med* 1986;164:1075–1092.
6. Kyburz D, Speiser DE, Battegay M, Hengartner H, Zinkernagel RM. Lysis of infected cells *in vivo* by antiviral cytolytic T cells demonstrated by release of cell internal viral proteins. *Eur J Immunol* 1993;23:1540–1545.
7. Russell JH, Masakowski V, Rucinsky T, Phillips G. Mechanisms of immune lysis. III. Characterization of the nature and kinetics of the cytotoxic T lymphocyte–induced nuclear lesion in the target. *J Immunol* 1982;128:2087–2094.
8. Matzinger P. The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J Immunol Methods* 1991;145:185–192.
9. Russell JH, Masakowski VR, Dobos CR. Mechanisms of immune lysis. I. Physiological distinction between target cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes and antibody plus complement. *J Immunol* 1980;124:1100–1105.
10. Russell JH, Dobos CR. Mechanisms of immune lysis. II. CTL-induced nuclear disintegration of the target begins within minutes of cell contact. *J Immunol* 1980;125:1256–1261.
11. Duke RC, Chervenak R, Cohen JJ. Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: An early event in cell-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:6361–6365.

12. Sellins KS, Cohen JJ. Cytotoxic T lymphocytes induce different types of DNA damage in target cells of different origins. *J Immunol* 1991;147:795–803.
13. Nishioka WK, Welsh RM. Susceptibility to cytotoxic T lymphocyte–induced apoptosis is a function of the proliferative status of the target. *J Exp Med* 1994; 179:769–774.
14. Bryant J, Day R, Whiteside TL, Herberman RB. Calculation of lytic units for the expression of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1992;146:91–103.
15. Cerottini JC, Nordin AA, Brunner KT. Specific *in vitro* cytotoxicity of thymus-derived lymphocytes sensitized to alloantigens. *Nature* 1970;228:1308–1309.
16. Fleischer B. Lysis of bystander target cells after triggering of human cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1986;16:1021–1024.
17. Burrows SR, Fernan A, Argaet V, Suhrbier A. Bystander apoptosis induced by CD8⁻ cytotoxic T cell (CTL) clones: implications for CTL lytic mechanisms. *Int Immunol* 1993;5:1049–1058.
18. Kuwano K, Arai S. Involvement of two distinct killing mechanisms in bystander target cell lysis induced by a cytotoxic T lymphocyte clone. *Cell Immunol* 1996; 169:288–293.
19. Rothstein TL, Mage M, Jones G, McHugh LL. Cytotoxic T lymphocyte sequential killing of immobilized allogeneic tumor target cells measured by time-lapse microcinematography. *J Immunol* 1978;121:1652–1656.
20. Sanderson CJ. The mechanism of T cell mediated cytotoxicity. II. Morphological studies of cell death by time-lapse microcinematography. *Proc R Soc Lond* 1976;192:241–255.
21. Zagury D, Bernard J, Thierness N, Feldman M, Berke G. Isolation and characterization of individual functionally reactive cytotoxic T lymphocytes: conjugation, killing and recycling at the single cell level. *Eur J Immunol* 1975;5: 818–822.
22. Thorn RM, Henney CS. Studies on the mechanism of lymphocyte mediate cytolysis. VI. A reappraisal of the requirement for protein synthesis during T cell–mediated lysis. *J Immunol* 1976;116:146–149.
23. Zinkernagel RM, Doherty PC. The discovery of MHC restriction. *Immunol Today* 1997;18:14–17.
24. Gillis S, Smith KA. Long term culture of tumor specific cytotoxic T cells. *Nature* 1977;268:154–156.
25. Martz E. Mechanism of specific tumor cell lysis by alloimmune T lymphocytes: resolution and characterization of discrete steps in the cellular interaction. *Contemp Top Immunobiol* 1977;7:301–361.
26. Golstein P, Smith ET. Mechanism of T-cell mediated cytolysis: the lethal hit stage. *Contemp Top Immunobiol* 1977;7:273–300.
27. Lowin B, Mattman C, Hahne M, Tschopp J. Comparison of Fas(Apo-1/CD95)– and perforin-mediated cytotoxicity in primary T lymphocytes. *Int Immunol* 1996;8:57–63.
28. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell–mediated cytotoxicity. *Science* 1994;265:528–530.
29. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 1994;370:650–652.
30. Kataoka T, Shinohara N, Takayama H, et al. Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contributed perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1996;156:3678–3686.
31. Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, et al. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 1997;276:1684–1687.
32. Ratner A, Clark WR. Role of TNF-α in CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte–mediated lysis. *J Immunol* 1993;150:4303–4314.
33. Burgess TL, Kelly RB. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol* 1987;3:243–293.
34. Fortier AH, Nacy CA, Sitkovsky MV. Similar molecular requirements for antigen receptor–triggered secretion of interferon and granule enzymes by cytolytic T lymphocytes. *Cell Immunol* 1989;124:64–76.
35. Isaaz S, Baetz K, Olsen K, Podack E, Griffiths GM. Serial killing by cytotoxic T lymphocytes: T cell receptor triggers degranulation, re-filling of the lytic granules and secretion of lytic proteins via a non-granule pathway. *Eur J Immunol* 1995;25:1071–1079.
36. Nakata M, Kawasaki A, Azuma M, et al. Expression of perforin and cytolytic potential of human peripheral blood lymphocyte subpopulations. *Int Immunol* 1992;4:1049–1054.
37. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 1991;173: 1099–1109.
38. Burkhardt JK, Hester S, Lapham CK, Argon Y. The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *J Cell Biol* 1990;111:2327–2340.
39. Young JD, Cohn ZA, Podack ER. The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological, and functional similarities. *Science* 1986;233:184–190.
40. Dourmashkin RR, Deteix P, Simone CB, Henkart PA. Electron microscopic demonstration of lesions on target cell membranes associated with antibody-dependent cytotoxicity. *Clin Exp Immunol* 1980;43:554–560.
41. Podack ER, Dennert G. Assembly of two types of tubules with putative cytolytic function by cloned natural killer cells. *Nature* 1983;302:442–445.
42. Dennert G, Podack ER. Cytolysis by H-2 specific T killer cells. Assembly of tubular complexes on target membranes. *J Exp Med* 1983;157:1483–1495.
43. Shinkai Y, Takio K, Okumura K. Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature* 1988;334:525–527.
44. Lowrey DM, Aebischer T, Olsen K, et al. Cloning, analysis, and expression of murine perforin 1 cDNA, a component of cytolytic T-cell granules with homology to complement component C9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:247–251.
45. Ishikawa H, Shinkai YI, Yagita H, et al. Molecular cloning of rat cytolysin. *J Immunol* 1989;143:3069–3073.
46. Lichtenheld MG, Olsen KJ, Lu P, et al. Structure and function of human perforin. *Nature* 1988;335:448–451.
47. Nalefski EA, Falke JJ. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* 1996;5:2375–2390.
48. Uellner R, Jones J, Griffiths GM. Perforin is activated by proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid binding domain. 1997 (*submitted for publication*).
49. Yagita H, Nakata M, Kawasaki A, Shinkai Y, Okumura K. Role of perforin in lymphocyte-mediated cytolysis. *Adv Immunol* 1992;51:215–242.
50. Peitsch MC, Amiguet P, Guy R, Brunner J, Maizel JV Jr, Tschopp J. Localization and molecular modelling of the membrane-inserted domain of the ninth component of human complement and perforin. *Mol Immunol* 1990;27:589–602.
51. Liu CC, Persechini PM, Young JD. Perforin and lymphocyte-mediated cytolysis. *Immunol Rev* 1995;146:145–175.
52. Liu CC, Persechini PM, Young JD. Characterization of recombinant mouse perforin expressed in insect cells using the baculovirus system. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201:318–325.
53. Liu CC, Persechini PM, Young JD. Expression and characterization of functionally active recombinant perforin produced in insect cells. *J Immunol* 1996;156: 3292–3300.
54. Esser AF. The membrane attack complex of complement. Assembly, structure and cytotoxic activity. *Toxicology* 1994;87:229–247.
55. Ponting CP, Parker PJ. Extending the C2 domain family: C2s in PKCs gamma, epsilon, eta, theta, phospholipases, GAPs, and perforin. *Protein Sci* 1996;5: 162–166.
56. Young JD, Damiano A, DiNome MA, Leong LG, Cohn ZA. Dissociation of membrane binding and lytic activities of the lymphocyte pore-forming protein (perforin). *J Exp Med* 1987;165:1371–1382.
57. Kuta AE, Reynolds CR, Henkart PA. Mechanism of lysis by large granular lymphocyte granule cytolysin: generation of a stable cytolysin-RBC intermediate. *J Immunol* 1989;142:4378–4384.
58. Kuta AE, Bashford CL, Pasternak CA, Reynolds CW, Henkart PA. Characterization of non-lytic cytolysin-membrane intermediates. *Mol Immunol* 1991;28: 1263–1270.
59. Tschopp J, Schäfer S, Masson D, Peitsch MC, Heusser C. Phosphorylcholine acts as a Ca^{2+}-dependent receptor molecule for lymphocyte perforin. *Nature* 1989;337:272–274.
60. Blumenthal R, Millard PJ, Henkart MP, Reynolds CW, Henkart PA. Liposomes as targets for granule cytolysin from cytotoxic LGL tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:5551–5555.
61. Damer CK, Creutz CE. Calcium-dependent self-association of synaptotagmin I. *J Neurochem* 1996;67:1661–1668.
62. Henkart P, Blumenthal R. Interaction of lymphocytes with lipid bilayer membranes: a model for the lymphocyte-mediated lysis of target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:2789–2793.
63. Young JD, Nathan CF, Podack ER, Palladino MA, Cohn ZA. Functional channel formation associated with cytotoxic T-cell granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:150–154.
64. Simone CB, Henkart P. Permeability changes induced in erythrocyte ghost targets by antibody-dependent cytotoxic effector cells: evidence for membrane pores. *J Immunol* 1980;124:954–963.
65. Sauer H, Pratsch L, Tschopp J, Bhakdi S, Peters R. Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis. *Biochim Biophys Acta* 1991;1063:137–146.
66. Henkart PA, Millard PJ, Reynolds CW, Henkart MP. Cytolytic activity of purified cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumors. *J Exp Med* 1984; 160:75–93.
67. Podack ER, Konigsberg PJ. Cytolytic T cell granules. Isolation, biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 1984;160:695–710.
68. Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery, and non-lethal effects. *Biochem J* 1989;264:1–14.
69. Kim SH, Carney DF, Papadimitriou JC, Shin ML. Effect of osmotic protection on nucleated cell killing by C5b-9: cell death is not affected by the prevention of cell swelling. *Mol Immunol* 1989;26:323–331.
70. Smyth MJ, O'Connor MD, Trapani JA. Granzymes: a variety of serine protease specificities encoded by genetically distinct subfamilies. *J Leukoc Biol* 1996;60: 555–562.
71. Jenne DE, Masson D, Zimmer M, Haefliger JA, Li WH, Tschopp J. Isolation and complete structure of the lymphocyte serine protease granzyme G, a novel member of the granzyme multigene family in murine cytolytic T lymphocytes. Evolutionary origin of lymphocyte proteases. *Biochemistry* 1989;28:7953–7961.
72. Lutzelschwab C, Pejler G, Aveskogh M, Hellman L. Secretory granule proteases is rat mast cells. Cloning of 10 different serine proteases and a carboxypeptidase A from various rat mast cell populations. *J Exp Med 1997;184:*

13–29.
73. Odake S, Kam C-M, Narasimhan L, et al. Human and murine cytotoxic T lymphocyte serine proteases: subsite mapping with peptide thioester substrates and inhibition of enzyme activity and cytolysis by isocoumarins. *Biochemistry* 1991; 30:2217–2227.
74. Garcia-Sanz JA, MacDonald HR, Jenne DE, Tschopp J, Nabholz M. Cell specificity of granzyme gene expression. *J Immunol* 1990;145:3111–3118.
75. Kummer JA, Kamp AM, Citarella F, Horrevoets AJG, Hack CE. Expression of human recombinant granzyme A zymogen and its activation by the cysteine proteinase cathepsin C. *J Biol Chem* 1996;271:9281–9286.
76. Smyth MJ, McGuire MJ, Thia KY. Expression of recombinant human granzyme B. A processing and activation role for dipeptidyl peptidase I. *J Immunol* 1995; 154:6299–6305.
77. Thiele DL, Lipsky PE. The action of leucyl-leucine methyl ester on cytotoxic lymphocytes requires uptake by a novel depeptide-specific facilitated transport system and dipeptidyl peptidase I–mediated conversion to membranolytic products. *J Exp Med* 1990;172:183–194.
78. Thiele DL, Lipsky PE. The immunosuppressive activity of L-leucyl-L-leucine methyl ester: selective ablation of cytotoxic lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 1986;136:1038–1048.
79. Kominami E, Ishido K, Muno D, Sato N. The primary structure and tissue distribution of cathepsin C. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992;373:367–373.
80. Kolset SO, Gallagher JT. Proteoglycans in haemopoietic cells. *Biochim Biophys Acta* 1990;1032:191–211.
81. Masson D, Peters PJ, Geuze HJ, Borst J, Tschopp J. Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T cells is dependent on pH. *Biochemistry* 1990;29:11229–11235.
82. Stevens RL, Kamada MM, Serafin WE. Structure and function of the family of proteoglycans that reside in the secretory granules of natural killer cells and other effector cells of the immune response. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989; 140:93–108.
83. Rodriguez A, Webster P, Ortego J, Andrews NW. Lysosomes behave as $Ca2^+$-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* 1997; 93–104.
84. David A, Bernard J, Thiernesse N, Nicolas G, Cerottini JC, Zagury D. Le processus d'exocytose lysosomale localisee est-il responsable de l'action cytolytique des lymphocytes T tuers? *C R Acad Sci* 1979;288:441–444.
85. Peters PJ, Geuze HJ, van der DH, et al. Molecules relevant for T cell–target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1989;19:1469–1475.
86. Kannan K, Stewart RM, Bounds W, et al. Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. *Cell Immunol* 1996;171:10–19.
87. Peters PJ, Geuze HJ, van der DH, Borst J. A new model for lethal hit delivery by cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Today* 1990;11:28–32.
88. Mellman I, Fuchs R, Helenius A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* 1986;55:663–700.
89. Kataoka T, Takaku K, Magae J, et al. Acidification is essential for maintaining the structure and function of lytic granules of CTL: effect of concanamycin A, an inhibitor of vacuolar type H^+-ATPase, on CTL-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1994;153:3938–3947.
90. Anderson P, Nagler-Anderson C, O'Brien C, et al. A monoclonal antibody reactive with a 15-kDa cytoplasmic granule-associated protein defines a subpopulation of $CD8^+$ T lymphocytes. *J Immunol* 1990;144:574–582.
91. Anderson P. TIA-1: structural and functional studies on a new class of cytolytic effector molecule. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;198:131–143.
92. Pena SV, Hanson DA, Carr BA, Goralski TJ, Krensky AM. Processing, subcellular localization, and function of 519 (Granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small lytic granule proteins. *J Immunol* 1997;158: 2680–2688.
93. Andersson M, Gunne H, Agerberth B, et al. NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterialo and antitumor activity. *EMBO J* 1995;14:1615–1625.
94. Dupuis M, Schaerer E, Krause KH, Tschopp J. The calcium-binding protein calreticulin is a major constitutent of lytic granules of cytolutic T lymphocytes. *J Exp Med* 1993;177:1–7.
95. Helenius A, Trombetta ES, Hebert DN, Simons JF. Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol* 1997;7:193–200.
96. Yannelli JR, Sullivan JA, Mandell GL, Engelhard VH. Reorientation and fusion of cytotoxic T lymphocyte granules after interaction with target cells as determined by high resolution cinemicrography. *J Immunol* 1986;136:377–382.
97. Waters JB, Oldstone MBA, Hahn KM. Changes in the cytoplasmic structure of CTLs during target cell recognition and killing. *J Immunol* 1996;157:3396–3403.
98. Berke G. Interaction of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *Prog Allergy* 1980;27:69–133.
99. Perez P, Bluestone JA, Stephany DA, Segal DM. Quantitative measurements of the specificity and kinetics of conjugate formation between cloned cytotoxic T-lymphocytes and splenic target cells by dual parameter flow cytometry. *J Immunol* 1985;134:478–485.
100. Martz E. LFA-1 and other accessory molecules functioning in adhesions of T and B lymphocytes. *Hum Immunol* 1987;18:3–37.
101. Martz E. Immune T lymphocyte to tumor cell adhesion. Magnesium sufficient, calcium insufficient. *J Cell Biol* 1980;84:584–598.
102. Hubbard BB, Glacken MW, Rodgers JR, Rich RR. The role of physical forces on cytotoxic T cell–target cell conjugate stability. *J Immunol* 1990;144:4129–4138.
103. Martz E, Davignon D, Kurzinger K, Springer TA. The molecular basis of cytolytic T lymphocyte function: analysis with blocking monoclonal antibodies. *Adv Exp Med Biol* 1982;146:447–468.
104. Springer TA, Davignon D, Ho M-K, Kurzinger K, Martz E, Sanchez-Madrid F. LFA-1 and Lyt-2,3, molecules associated with T lymphocyte-mediated killing; and Mac-1, an LFA-1 homologue associated with complement receptor function. *Immunol Rev* 1982;68:171–195.
105. Griffiths GM, Namikawa R, Mueller C, et al. Granzyme A and perforin as markers for rejection in cardiac transplantation. *Eur J Immunol* 1991;21:687–692.
106. Mescher MF. Molecular intereactions in the activation of effector and precursor cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Rev* 1995;146:177–210.
107. Berg NN, Ostergaard HL. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)–augmented degranulation by cytotoxic T cells. ICAM-1 and anti-CD3 must be co-localized for optimal adhesion and stimulation. *J Immunol* 1995;155:1694–1702.
108. Gartner P. Calcium and T lymphocyte activation. *Cell* 1989;59:15–20.
109. Poenie M, Tsien RY, Schmidt-Verhulst AM. Sequential activation and lethal hit measured by [Ca^{2+}] in individual cytolytic T cells and targets. *EMBO J* 1987;6: 2223–2232.
110. Gray LS, Gnarra JR, Engelhard VH. Demonstration of a calcium influx in cytolytic T lymphocytes in response to target cell binding. *J Immunol* 1987;138:63–69.
111. Gray LS, Gnarra JR, Sullivan JA, Mandell GL, Engelhard VH. Spatial and temporal characteristics of the increase in intracellular Ca^{2+} induced in cytotoxic T lymphocytes by cellular antigen. *J Immunol* 1988;141:2424–2430.
112. Gray LS, Gnarra JR, Russell JH, Engelhard VH. The role of K^+ in the regulation of the increase in intracellular Ca^{2+} mediated by the T lymphocyte antigen receptor. *Cell* 1987;50:119–127.
113. Densmore JJ, Haverstick DM, Szabo G, Gray LS. A voltage-operable current is involved in Ca^{2+} entry in human lymphocytes whereas ICRAC has no apparent role. *Am J Physiol* 1996;271:C1494–C1503.
114. Anel A, O'Rourke AM, Kleinfeld AM, Mescher MF. T cell receptor and CD8-dependent tyrosine phosphorylation events in cytotoxic T lymphocytes: activation of p56lck by CD8 binding to class I protein. *Eur J Immunol* 1996;26: 2310–2319.
115. Anel A, Martinez-Lorenzo MJ, Schmitt-Verhulst AM, Boyer C. Influence on CD8 of TCR/CD3-generated signals in CTL clones and CTL precursor cells. *J Immunol* 1997;158:19–28.
116. Thiernesse N, David A, Bernard J, Jeanesson P, Zagury D. Activitie phosphatasique acide de la cellule T cytolytique au cours du processus de cytolyse. *C R Acad Sci* 1977;285:713–715.
117. Bykovskaja SN, Rytenko AN, Rauschenbach MO, Mykovsky AF. Ultrastructural alteration of cytolytic T lymphocytes following their interaction with target cells. I. Hypertrophy and change of orientation of the Golgi apparatus. *Cell Immunol* 1978;40:164–174.
118. Geiger B, Rosen D, Berke R. Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J Cell Biol* 1982;95:137–130.
119. Kupfer A, Dennert G. Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol* 1984;133:2762–2766.
120. Kupfer A, Dennert G, Singer SJ. The reorientation of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in the cytotoxic effector cell is a prerequisite in the lysis of bound target cells. *J Mol Cell Immunol* 1985;2:37–49.
121. Kupfer A, Dennert G, Singer SJ. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:7224–7228.
122. Kupfer A, Singer SJ, Dennert G. On the mechanism of unidirectional killing in mixtures of two cytotoxic T lymphocytes. Unidirectional polarization of cytoplasmic organelles and the membrane-associated cytoskeleton in the effector cell. *J Exp Med* 1986;163:489–498.
123. Kupfer A, Singer SJ. Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples. *Annu Rev Immunol* 1989;7:309–337.
124. Hahn K, DeBiasio R, Tishon A, et al. Antigen presentation and cytotoxic T lymphocyte killing studied in individual, living cells. *Virology* 1994;201:330–340.
125. Negulescu PA, Krasieva TB, Khan A, Kerschbaum HH, Cahalan MD. Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* 1996;4:421–430.
126. Schneider SW, Sritharan KC, Geibel JP, Oberleithner H, Jena BP. Surface dynamics in living acinar cells imaged by atomic force microscopy: identification of plasma membrane structures involved in exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:316–321.
127. Henkart MP, Henkart PA. Lymphocyte mediated cytolysis as a secretory process. *Adv Exp Med Biol* 1982;146:227–242.
128. Frey T, Petty HR, McConnell HM. Electron microscopic study of natural killer cell–tumor cell conjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:5317–5321.

129. Zucker-Franklin D, Grusky G, Yang JS. Arylsulfatase in natural killer cells: its possible role in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:6977–6981.
130. Pasternack MS, Verret CR, Liu MA, Eisen HN. Serine esterase in cytolytic T lymphocytes. *Nature* 1986;322:740–743.
131. Welsh RM, Nishioka WK, Antia R, Dundon PL. Mechanism of killing by virus-induced cytotoxic T lymphocytes elicited *in vivo*. *J Virol* 1990;64:3726–3733.
132. Schmidt RE, MacDermott RP, Bartley G, et al. Specific release of proteoglycans from human natural killer cells during target lysis. *Nature* 1985;318:289–291.
133. MacDermott RP, Schmidt RE, Caulfield JP, et al. Proteoglycans in cell-mediated cytotoxicity. Identification, localization, and exocytosis of a chondroitin sulfate proteoglycan from human cloned natural killer cells during target cell lysis. *J Exp Med* 1985;162:1771–1787.
134. Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. Optimized conditions for antigen receptor triggered granule enzyme secretion. *J Immunol Methods* 1987;104:183–190.
135. Burkhardt JK, McIlvain JM, Sheetz MP, Argon Y. Lytic granules from cytotoxic T cells exhibit kinesin-dependent motility on microtubules *in vitro*. *J Cell Sci* 1993;104:151–162.
136. Miyake K, McNeil PL. Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. *J Cell Biol* 1995;131:1737–1745.
137. Bashford CL, Menestrina G, Henkart PA, Pasternak CA. Cell damage by cytolysin: spontaneous recovery and reversible inhibition by divalent cations. *J Immunol* 1988;141:3965–3974.
138. Allbritton NL, Verret CR, Wolley RC, Eisen HN. Calcium ion concentrations and DNA fragmentation in target cell destruction by murine cloned cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1988;167:514–527.
139. Reiter Y, Ciobotariu A, Jones J, Morgan BP, Fishelson Z. Complement membrane attack complex, perforin, and bacterial exotoxins induce in K562 cells calcium-dependent cross-protection from lysis. *J Immunol* 1995;155:2203–2210.
140. Sanderson CJ, Glaueret AM. The mechanism of T cell mediated cytotoxicity. V. Morphological studies by electron microscopy. *Proc R Soc Lond* 1977;198: 315–323.
141. Russell JH. Internal disintegration model of cytotoxic lymphocyte-induced target damage. *Immunol Rev* 1983;72:97–118.
142. Duke RC, Persechini PM, Chang S, Liu CC, Cohen JJ, Young JD. Purified perforin induces target cell lysis but not DNA fragmentation. *J Exp Med* 1989; 170:1451–1456.
143. Shiver JW, Henkart PA. A noncytotoxic mast cell tumor line exhibits potent IgE-dependent cytotoxicity after transfection with the cytolysin/perforin gene. *Cell* 1991;62:1174–1181.
144. Kagi D, Ledermann B, Burki K, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994;369:31–37.
145. Shi L, Mai S, Israels S, Browne K, Trapani JA, Greenberg AH. Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J Exp Med* 1997;185:855–866.
146. Shiver JW, Su L, Henkart PA. Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. *Cell* 1992; 71:315–322.
147. Nakajima H, Park HL, Henkart PA. Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by RBL mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. *J Exp Med* 1995;181:1037–1046.
148. Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 1994;76:977–987.
149. Shresta S, MacIvor DM, Heusel JW, Russell JH, Ley TJ. Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92: 5679–5683.
150. Ebnet K, Hausmann M, Lehmann-Grube F, Müllbacher A, Kopf M, Lamers M, Simon MM. Granzyme A–deficient mice retain potent cell-mediated cytotoxicity. *EMBO J* 1995;14:4230–4239.
151. Hudig D, Ewoldt GR, Woodard SL. Proteases and lymphocyte cytotoxic killing mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1993;5:90–96.
152. Nakajima H, Henkart PA. Cytotoxic lymphocyte granzymes trigger a target cell internal disintegration pathway leading to cytolysis and DNA breakdown. *J Immunol* 1994;152:1057–1063.
153. Wagner L, Avery RK, Bensinger L, Hibberd PL, Pasternack MS. Inhibition of cytotoxic T-lymphocyte–triggered apoptosis by target cell surface–coupled aprotinin. *Mol Immunol* 1995;32:853–864.
154. Hayes MP, Berrebi GA, Henkart PA. Induction of target cell DNA release by the cytotoxic T lymphocyte granule protease granzyme A. *J Exp Med* 1989;170: 933–946.
155. Shi L, Kam CM, Powers JC, Aebersold R, Greenberg AH. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J Exp Med* 1992;176:1521–1529.
156. Pasternack MS, Blier KJ, McInerney TN. Granzyme A binding to target cell proteins. Granzyme A binds to and cleaves nucleolin *in vitro*. *J Biol Chem* 1991; 266:14703–14708.
157. Pinkoski MJ, Winkler U, Hudig D, Bleackley RC. Binding of granzyme B in the nucleus of target cells-Recognition of an 80-kilodalton protein. *J Biol Chem* 1996;271:10225–10229.
158. Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 1994;263:1143–1145.
159. Chen G, Shi L, Litchfield DW, Greenberg AH. Rescue from granzyme B-induced apoptosis by Wee1 kinase. *J Exp Med* 1995;181:2295–2300.
160. Shi L, Chen G, MacDonald G, et al. Activation of an interleukin 1 converting enzyme-dependent apoptosis pathway by granzyme B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11002–11007.
161. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T cell–derived granzyme B. *Nature* 1995;377:446–448.
162. Darmon AJ, Ley TJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Cleavage of CPP-32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *J Biol Chem* 1996;271:21709–21712.
163. Henkart PA. ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death? [Review]. *Immunity* 1996;4:195–201.
164. Sarin A, Williams MS, Alexander-Miller MA, Berzofsky JA, Zacharchuk CM, Henkart PA. Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity* 1997;6:209–215.
165. Ucker DS, Obermiller PS, Eckhart W, Apgar JR, Berger NA, Meyers J. Genome digestion is a dispensable consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1992;12:3060–3069.
166. Nishioka WK, Welsh RM. Inhibition of cytotoxic T lymphocyte–induced target cell DNA fragmentation, but not lysis, by inhibitors of DNA topoisomerases I and II. *J Exp Med* 1992;175:23–27.
167. Nakajima H, Golstein P, Henkart PA. The target cell nucleus is not required for cell-mediated granzyme- or Fas-based cytotoxicity. *J Exp Med* 1995;181: 1905–1909.
168. Jacobson MD, Burne JF, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J* 1994;13:1899–1910.
169. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386–401.
170. Chiu VK, Walsh CM, Liu C-C, Reed JC, Clark WR. Bcl-2 blocks degranulation but not fas-based cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1995;154:2023–2032.
171. Lee RK, Spielman J, Podack ER. bcl-2 protects against fas-based but not perforin-based T cell–mediated cytolysis. *Int Immunol* 1996;8:991–1000.
172. Schroter M, Lowin B, Borner C, Tschopp J. Regulation of Fas(Apo-1/CD95)– and perforin-mediated lytic pathways of primary cytotoxic T lymphocytes by the protooncogene bcl-2. *Eur J Immunol* 1995;25:3509–3513.
173. Barton K, Westbrook CA. Chronic myelogenous leukemia: a model for the genetic and biochemical basis of neoplasia. In: *Biochemical and molecular aspects of selected cancers*. New York: Academic Press, 1994:1–17.
174. Cotter TG. BCR-ABL: an anti-apoptosis gene in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 1995;18:231–236.
175. Sanchez-Garcia I, Martin-Zanca D. Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras. *J Mol Biol* 1997;267:225–228.
176. Fuchs EJ, Bedi A, Jones RJ, Hess AD. Cytotoxic T cells overcome BCR-ABL–mediated resistance to apoptosis. *Cancer Res* 1995;55:463–466.
177. Roger R, Issaad C, Pallardy M, et al. BCR-ABL does not prevent apoptotic death induced by human natural killer or lymphokine-activated killer cells. *Blood* 1996;87:1113–1122.
178. Martz E. Overview of CTL–target adhesion and other critical events in the cytotoxic mechanism. In: *Cytotoxic cells. Recognition, effector function, generation, and methods*. Boston: Birkhauser, 1993:9–45.
179. Gorman K, Liu CC, Blakely A, Young JD, Torbett BE, Clark WR. Cloned cytotoxic T lymphocytes as target cells. II. Polarity of lysis revisited. *J Immunol* 1988;141:2211–2215.
180. Luciani MF, Brunet JF, Suzan M, Denizot F, Golstein P. Self-sparing of long-term *in vitro*–cloned or uncloned cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1986;164: 962–967.
181. Bensussan A, Leca G, Corvaïa N, Boumsell L. Selective induction of autocytotoxic activity through the CD3 molecule. *Eur J Immunol* 1990;20:2615–2619.
182. Kranz DM, Eisen HN. Resistance of cytotoxic T lymphocytes to lysis by a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:3375–3379.
183. Verret CR, Firmenich AA, Kranz DM, Eisen HN. Resistance of cytotoxic T lymphocytes to the lytic effects of their toxic granules. *J Exp Med* 1987;166: 1536–1547.
184. Shinkai Y, Ishikawa H, Hattori M, Okumura K. Resistance of mouse cytolytic cells to pore-forming protein–mediated cytolysis. *Eur J Immunol* 1988;18: 29–33.
185. Persechini PM, Young JD, Almers W. Membrane channel formation by the lymphocyte pore-forming protein: comparison between susceptible and resistant target cells. *J Cell Biol* 1990;110:2109–2116.
186. Müller C, Tschopp J. Resistance of CTL to perforin-mediated lysis: Evidence for a lymphocyte membrane protein interacting with perforin. *J Immunol* 1994;153. 2470–2478.
187. Williams MS, Henkart PA. Apoptotic cell death induced by intracellular proteolysis. *J Immunol* 1994;153:4247–4255.
188. Sun J, Bird CH, Sutton V, et al. A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *J Biol Chem* 1996;271:27802–27809.
189. Schick B, Berke G. The lysis of cytotoxic *T lymphocytes and their blasts by cyto-*

toxic T lymphocytes. *Immunology* 1990;71:428–433.
190. Su MW-C, Walden PR, Eisen HN. Cognate peptide-induced destruction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes is due to fratricide. *J Immunol* 1993;151:658–667.
191. Berthou C, Legros-Maida S, Soulie A, et al. Cord blood T lymphocytes lack constitutive perforin expression in contrast to adult peripheral blood T lymphocytes. *Blood* 1995;85:1540–1546.
192. Azuma M, Cayabyab M, Phillips JH, Lanier LL. Requirements for CD28-dependent T cell–mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1993;150:2091–2101.
193. Smyth MJ, Browne KA, Kinnear BF, Trapani JA, Warren HS. Distinct granzyme expression in human CD3- CD56+ large granular and CD3- CD56+ small high density lymphocytes displaying non–MHC-restricted cytolytic activity. *J Leukoc Biol* 1995;57:88–93.
194. Ebnet K, Levelt CN, Tran TT, Eichmann K, Simon MM. Transcription of granzyme A and B genes is differentially regulated during lymphoid ontogeny. *J Exp Med* 1995;181:755–763.
195. Nagler-Anderson C, Lichtenheld M, Eisen HN, Podack ER. Perforin mRNA in primary peritoneal exudate cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1989;143: 3440–3443.
196. Munger WE, Berrebi G, Henkart PA. Granule exocytosis by cytotoxic T lymphocytes generated *in vivo*. *Ann Inst Pasteur Immunol* 1987;138:301–304.
197. Berke G, Rosen D. Highly lytic *in vivo* primed cytolytic T lymphocytes devoid of lytic granules and BLT-esterase activity acquire these constituents in the presence of T cell growth factors upon blast transformation *in vitro*. *J Immunol* 1988; 141:1429–1436.
198. Zheng LM, Ojcius DM, Liu CC, Kramer MD, Simon MM, Parr EL, Young JD. Immunogold labeling of perforin and serine esterases in granulated metrial gland cells. *FASEB J* 1991;5:79–85.
199. Croy BA, Reed N, Malashenko B-A, Kim K, Kwon BS. Demonstration of YAC target cell lysis by murine granulated metrial gland cells. *Cell Immunol* 1991; 133:116–126.
200. Tirosh R, Berke G. T-Lymphocyte–mediated cytolysis as an excitatory process of the target. I. Evidence that the target cell may be the site of Ca^{2+} action. *Cell Immunol* 1985;95:113–123.
201. Trenn G, Takayama H, Sitkovsky MV. Exocytosis of cytolytic granules may not be required for target cell lysis by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1987;330: 72–74.
202. Ostergaard HL, Kane KP, Mescher MF, Clark WR. Cytotoxic T lymphocyte mediated lysis without release of serine esterase. *Nature* 1987;330:71–72.
203. Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. Fas involvement in Ca^{2+}independent T cell–mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1993;177:195–200.
204. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 78:1169–1178.
205. Anel A, Buferne M, Boyer C, Schmitt-Verhulst A-M, Golstein P. T cell receptor–induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *Eur J Immunol* 1994; 24:2469–2476.
206. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today* 1995;16:569–574.
207. Abbas AK. Die ane let live: Eliminating dangerous lymphocytes. *Cell* 1996;84: 655–657.
208. Walker PR, Saas P, Dietrich PY. Role of Fas Ligand (CD95L) in immune escape. The tumor cell strikes back. *J Immunol* 1997;158:4521–4524.
209. Glass A, Walsh CM, Lynch DH, Clark WR. Regulation of the fas lytic pathway in cloned CTL. *J Immunol* 1996;156:3638–3644.
210. Vignaux F, Vivier E, Malissen B, Depraetere V, Nagata S, Golstein P. TCR/CD3 coupling to Fas-based cytotoxicity. *J Exp Med* 1995;181:781–786.
211. El-Khatib M, Stanger BZ, Dogan H, Cui H, Ju ST. The molecular mechanism of FasL-mediated cytotoxicity by CD4+ Th1 clones. *Cell Immunol* 1995;163: 237–244.
212. Anel A, Simon AK, Auphan N, et al. Two signaling pathways can lead to Fas ligand expression in CD8+ cytotoxic T lymphocyte clones. *Eur J Immunol* 1995;25: 3381–3387.
213. Cao W, Tykodi SS, Esser MT, Braciale VL, Braciale TJ. Partial activation of CD8+ T cells by a self-derived peptide. *Nature* 1995;378:295–298.
214. Brossart P, Bevan MJ. Selective activation of Fas/Fas ligand–mediated cytotoxicity by a self peptide. *J Exp Med* 1996;183:2449–2458.
215. Kessler BM, Bassanini P, Cerottini JC, Luescher IF. Effects of epitope modification on T cell receptor–ligand binding and antigen recognition by seven H-2kD–restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a photoreactive peptide derivative. *J Exp Med* 1997;185:629–640.
216. Sloan-Lancaster J, Allen PM. Altered peptide ligand–induced partial T cell activation: Molecular mechanisms and role in T cell biology. *Annu Rev Immunol* 1996;14:1–27.
217. Esser MT, Krishnamurthy B, Braciale VL. Distinct T cell receptor signaling requirements for perforin- or FasL-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1996; 183:1697–1706.
218. Suda T, Tanaka M, Miwa K, Nagata S. Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand. *J Immunol* 1996;157:3918–3924.
219. Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 1993;5:625–630.
220. Rothstein TL. Signals and susceptibility to programmed death in b cells. *Curr Opin Immunol* 1996;8:362–371.
221. Memon SA, Moreno MB, Petrak D, Zacharchuk CM. Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma. *J Immunol* 1995;155:4644–4652.
222. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL. *Immunity* 1995;3:87–98.
223. Kojima H, Shinohara N, Hanaoka S, et al. Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1994;1: 357–364.
224. Leist TP, Cobbold SP, Waldmann H, Aguet M, Zinkernagel RM. Functional analysis of T lymphocyte subsets in antiviral host defense. *J Immunol* 1987;138: 2278–2281.
225. Bluestone JA, Khattri R, Sciammas R, Sperling AI. TCRgammaδ cells: a specialized T-cell subset in the immune system. *Annu Rev Cell Biol* 1995;11: 307–353.
226. Williams NS, Engelhard VH. Identification of a population of CD4+ CTL that utilizes a perforin- rather than a Fas ligand–dependent cytotoxic mechanism. *J Immunol* 1996;156:153–159.
227. Muller D, Koller BH, Whitton JL, LaPan KE, Brigman KK, Frelinger JA. LCMV-specific, class II–restricted cytotoxic T cells in beta 2-microglobulin–deficient mice. *Science* 1992;255:1576–1578.
228. Hahn S, Gehri R, Erb P. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev* 1995;146:57–79.
229. Yagita H, Hanabuchi S, Asano Y, Tamura T, Nariuchi H, Okumura K. Fas-mediated cytotoxicity—a new immunoregulatory and pathogenic function of Th1 CD4- T cells. *Immunol Rev* 1995;146:223–239.
230. Shinohara N, Huang Y, Muroyama A. Specific suppression of antibody responses by soluble protein-specific, class II–restricted cytolytic T lymphocyte clones. *Eur J Immunol* 1991;21:23–27.
231. Rothstein TL, Wang JK, Panka DJ, et al. Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells. *Nature* 1995;374: 163–165.
232. Sykulev Y, Cohen RJ, Eisen HN. The law of mass action governs antigen-stimulated cytolytic activity of CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11990–11992.
233. Schodin BA, Tsomides TJ, Kranz DM. Correlation between the number of T cell receptors required for T cell activation and TCR–ligand affinity. *Immunity* 1996; 5:137–146.
234. Sykulev Y, Joo M, Vturina I, Tsomides TJ, Eisen HN. Evidence that a single peptide–MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity* 1996;4:565–571.
235. Valitutti S, Müller S, Dessing M, Lanzavecchia A. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J Exp Med* 1996;183:1917–1921.
236. Brower RC, England R, Takeshita T, et al. Minimal requirements for peptide mediated activation of CD8+ CTL. *Mol Immunol* 1994;31:1285–1293.
237. Hemmer B, Stefanova I, Vergelli M, Germain RN, Martin R. The activating properties of TCR agonists and partial agonists reflect hierarchical effector response thresholds of the T-cell and the potency and signal induction quality of the ligand. 1997 (*submitted for publication*).
238. Segal DM, Jost CR, George AJT. Targeted cellular cytotoxicity. In: *Cytotoxic cells. Recognition, effector function, generation, and methods*. Boston: Birkhauser, 1993:96–110.
239. Fanger MW, Marganelli PM, Guyre PM. Bispecific antibodies. *Crit Rev Immunol* 1992;12:101–124.
240. Kurucz I, Titus JA, Jost CR, Jacobus CM, Segal DM. Retargeting of CTL by an efficiently refolded bispecific single-chain Fv dimer produced in bacteria. *J Immunol* 1995;154:4576–4582.
241. Lanzavecchia A, Staerz UD. Lysis of nonnucleated red blood cells by cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1987;17:1073–1074.
242. Beun GDM, Van de Velde CJH, Fleuren GJ. T-cell based cancer immunotherapy: direct or redirected tumor-cell recognition. *Immunol Today* 1994;15:11–15.
243. Gagliardi MC, De Petrillo G, Salemi S, et al. Presentation of peptides by cultured monocytes or activated T cells allows specific priming of human cytotoxic T lymphocytes *in vitro*. *Int Immunol* 1995;7:1741–1752.
244. Nishio M, Spielman J, Lee RK, Nelson DL, Podack ER. CD80 (B7.1) and CD54 (intracellular adhesion molecule-1) induce target cell susceptibility to promiscuous cytotoxic T cell lysis. *J Immunol* 1996;157:4347–4353.
245. Brooks CG, Holscher M. Cell surface molecules involved in NK recognition by cloned cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* 1987;138:1331–1337.
246. Swain SL, Croft M, Dubey C, Haynes L, Rogers P, Zhang X, Bradley LM. From naive to memory T cells. *Immunol Rev* 1997;150:143–167.
247. Ascher NL, Chen S, Hoffman RA, Simmons RL. Maturation of cytotoxic T cells within sponge matrix allografts. *J Immunol* 1983;131:617–621.
248. Zinkernagel RM, Doherty PC. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol* 1979;27: 51–177.
249. Rosenberg ZF, Fauci AS. The immunopathogenesis of HIV infection. *Adv*

Immunol 1989;47:377–431.

250. Doherty PC. Cytotoxic T cell effector and memory function *in* viral immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;206:1–14.
251. Razvi ES, Jiang Z, Woda BA, Welsh RM. Lymphocyte apoptosis during the silencing of the immune response to acute viral infections in normal, lpr, and Bcl-2–transgenic mice. *Am J Pathol* 1995;147:79–91.
252. Lohman BL, Razvi ES, Welsh RM. T-lymphocyte downregulation after acute viral infection is not dependent on CD95 (Fas) receptor–ligand interactions. *J Virol* 1996;70:8199–8203.
253. Carbone FR, Bevan MJ. Induction of ovalbumin-specific cytotoxic T cells by *in vivo* peptide immunization. *J Exp Med* 1989;169:603–612.
254. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens *in vitro* can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells *in situ*. *J Exp Med* 1990;172:631–640.
255. Porgador A, Gilboa E. Bone marrow–generated dendritic cells pulsed with a class I–restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1995;182:255–260.
256. Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 1996;183:283–287.
257. Berke G, Sullivan KA, Amos DB. Tumor immunity *in vitro*: destruction of a mouse ascites tumor through a cycling pathway. *Science* 1972;177:433–434.
258. Macatonia SE, Taylor PM, Knight SC, Askonas BA. Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses *in vitro*. *J Exp Med* 1989;169:1255–1264.
259. Carbone FR, Moore MW, Sheil JM, Bevan MJ. Induction of cytotoxic T lymphocytes by primary *in vitro* stimulation with peptides. *J Exp Med* 1988;167:1767–1779.
260. De Bruijn ML, Nieland JD, Schumacher TN, Ploegh HL, Kast WM, Melief CJ. Mechanisms of induction of primary virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *Eur J Immunol* 1992;22:3013–3020.
261. Hefeneider SH, Conlon PJ, Henney CS, Gillis S. *In vivo* interleukin 2 administration augments the generation of alloreactive cytolytic T lymphocytes and resident natural killer cells. *J Immunol* 1983;130:222–227.
262. Widmer MB, Acres RB, Sassenfeld HM, Grabstein KH. Regulation of cytolytic cell populations from human peripheral blood by B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4). *J Exp Med* 1987;166:1447–1455.
263. Alderson MR, Sassenfeld HM, Widmer MB. Interleukin 7 enhances cytolytic T lymphocyte generation and induces lymphokine-activated killer cells from human peripheral blood. *J Exp Med* 1990;172:577–587.
264. Chen WF, Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol* 1991;147:528–534.
265. Pardoux C, Asselin-Paturel C, Chehimi J, Gay F, Mami-Chouaib F, Chouaib S. Functional interaction between TGF-beta and IL-12 in human primary allogeneic cytotoxicity and proliferative response. *J Immunol* 1997;158:136–143.
266. Kanai T, Thomas EK, Yasutomi Y, Letvin NL. IL-15 stimulates the expansion of AIDS virus–specific CTL. *J Immunol* 1996;157:3681–3687.
267. Smyth MJ, Strobl SL, Young HA, Ortaldo JR, Ochoa AC. Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes: inhibition by transforming growth factor-β. *J Immunol* 1991;146:3289–3297.
268. Gately MK, Warrier RR, Honasoge S, et al. Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN-gamma *in vivo*. *Int Immunol* 1994;6:157–167.
269. Gillis S, Gillis AE, Henney CS. Monoclonal antibody directed against interleukin 2. I. Inhibition of T lymphocyte mitogenesis and the *in vitro* differentiation of alloreactive cytolytic T cells. *J Exp Med* 1981;154:983–988.
270. Leist TP, Kohler M, Eppler M, Zinkernagel RM. Effects of treatment with IL-2 receptor specific monoclonal antibody in mice. Inhibition of cytotoxic T cell responses but not of T help. *J Immunol 1989;143:628–632*.
271. Azuma M, Lanier LL. The role of CD28 costimulation in the generation of cytotoxic T lymphocytes. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;198:59–74.
272. Guerder S, Carding SR, Flavell RA. B7 costimulation is necessary for the activation of the lytic function in cytotoxic T lymphocyte precursors. *J Immunol* 1995;155:5167–5174.
273. Harding FA, Allison JP. CD28-B7 interactions allow the induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the absence of exogenous help. *J Exp Med* 1993;177:1791–1796.
274. Parra E, Wingren AG, Hedlund G, Kalland T, Dohlsten M. The role of B7-1 and LFA-3 in costimulation of CD8⁻ T cells. *J Immunol* 1997;158:637–642.
275. De Bruijn ML, Peterson PA, Jackson MR. Induction of heat-stable antigen expression by phagocytosis is involved in *in vitro* activation of unprimed CTL by macrophages. *J Immunol* 1996;156:2686–2692.
276. Zinkernagel RM, Bachmann MF, Kündig TM, Oehen S, Pirchet H, Hengartner H. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 1996;14:333–367.
277. Razvi ES, Welsh RM, McFarland HI. *In vivo* state of antiviral CTL precursors: Characterization of a cycling cell population containing CTL precursors in immune mice. *J Immunol* 1995;154:620–632.
278. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996;272:54–60.
279. Liu Y, Wenger RH, Zhao M, Nielsen PJ. Distinct costimulatory molecules are required for the induction of effector and memory cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1997;185:251–262.
280. Mullbacher A, Flynn K. Aspects of cytotoxic T cell memory. *Immunol Rev* 1996;150:113–127.
281. Cerottini J-C, MacDonald HR. The cellular basis of T-cell memory. *Annu Rev Immunol* 1989;7:77–89.
282. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994;372:100–103.
283. Ando K, Guidotti LG, Wirth S, et al. Class I–restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells *in vivo*. *J Immunol* 1994;152:3245–3253.
284. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996;4:25–36.
285. Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol* 1996;8:478–483.
286. Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis *in vivo*. *Annu Rev Immunol* 1996;14:207–232.
287. Melief CJM. Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Adv Cancer Res* 1992;58:143–176.
288. Yannelli JR, Hyatt C, McConnell S, et al. Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: summary of a 5-year experience. *Int J Cancer* 1996;65:413–421.
289. Schwartzentruber DJ, Hom SS, Dadmarz R, et al. *In vitro* predictors of therapeutic response in melanoma patients receiving tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2. *J Clin Oncol* 1994;12:1475–1483.
290. Sad S, Kagi D, Mosmann TR. Perforin and Fas killing by CD8⁺ T cells limits their cytokine synthesis and proliferation. *J Exp Med* 1996;184:1543–1547.
291. Cohen PL, Eisenberg RA. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Ann Rev Immunol* 1991;9:243–269.
292. Braun MY, Lowin B, French L, Acha-Orbea H, Tschopp J. Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J Exp Med* 1996;183:657–661.
293. Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 1995;377:348–351.
294. Sarin A, Conan-Cibotti M, Henkart PA. Cytotoxic effect of tumor necrosis factor and lymphotoxin on T lymphoblasts. *J Immunol* 1995;155:3716–3718.
295. De Togni P, Goellner J, Ruddle NH, et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 1994;264:703–707.
296. Tanaka M, Suda T, Haze K, et al. Fas ligand in human serum. *Nature Med* 1996;2:317–322.
297. Kagi D, Seiler P, Pavlovic J, et al. The roles of perforin- and Fas-dependent cytotoxicity in protection against cytopathic and noncytopathic viruses. *Eur J Immunol* 1995;25:3256–3262.
298. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Hengartner H, Zinkernagel RM. CD8⁺ T cell–mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur J Immunol* 1994;24:3068–3072.
299. Laochumroonvorapong P, Wang J, Liu CC, et al. Perforin, a cytotoxic molecule which mediates cell necrosis, is not required for the early control of mycobacterial infection in mice. *Infect Immun* 1997;65:127–132.
300. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR. Major histocompatibility complex class I–restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:12013–12017.
301. Mullbacher A, Ebnet K, Blanden RV, et al. Granzyme A is critical for recovery of mice from infection with the natural cytopathic viral pathogen, ectromelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5783–5787.
302. Selvaggi G, Ricordi C, Podack ER, Inverardi L. The role of the perforin and Fas pathways of cytotoxicity in skin graft rejection. *Transplantation* 1996;62:1912–1915.
303. Ahmed KR, Guo TB, Gaal KK. Islet rejection in perforin-deficient mice: the role of perforin and Fas. *Transplantation* 1997;63:951–957.
304. Schulz M, Schuurman H-J, Joergensen J, et al. Acute rejection of vascular heart allografts by perforin-deficient mice. *Eur J Immunol* 1995;25:474–480.
305. Seino K, Kayagaki N, Bashuda H, Okumura K, Yagita H. Contribution of Fas ligand to cardiac allograft rejection. *Int Immunol* 1996;8:1347–1354.
306. Clark WR, Walsh CM, Glass AA, Huang MT, Ahmed R, Matloubian M. Cell-mediated cytotoxicity in perforin-less mice. *Int Rev Immunol* 1995;13:1–14.
307. Baker MB, Altman NH, Podack ER, Levy RB. The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Exp Med* 1996;183:2645–2656.
308. Baker MB, Riley RL, Podack ER, Levy RB. Graft-versus-host-disease–associated lymphoid hypoplasia and B cell dysfunction is dependent upon donor T cell–mediated Fas-ligand function, but not perforin function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1366–1371.
309. Graubert TA, Russell JH, Ley TJ. The role of granzyme B in murine models of acute graft-versus-host disease and graft rejection. *Blood* 1996;87:1232–1237.

310. Kagi D, Odermatt B, Ohashi PS, Zinkernagel RM, Hengartner H. Development of insulitis without diabetes in transgenic mice lacking perforin-dependent cytotoxicity. *J Exp Med* 1996;183:2143–2152.
311. van Herrath MG, Oldstone MB. Interferon-gamma is essential for destruction of beta cells and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1997;185:531–539.
312. Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Janeway CA, Matis LA. The role of Fas in autoimmune disease. *Cell* 1997;89:17–24.
313. van den Broek M, Kagi D, Ossendorp F, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 1996;184:1781–1790.
314. van den Broek MF, Kagi D, Zinkernagel RM, Hengartner H. Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control *in vivo*. *Eur J Immunol* 1995; 25:3514–3516.
315. Humphrey JH, Dourmashkin RR. The lesions in cell membranes caused by complement. *Adv Immunol* 1969;11:75–115.

第32章　炎　　症

Helene F. Rosenberg and John I. Gallin①

历史回顾及概述

炎症是富含血管的组织在局部损伤后发生的一种生理反应。在此过程中,各种可溶性介质及炎性细胞以系统的形式一同发挥作用,以消除引起机体损伤的因素。炎症好比一把双刃剑:一方面,炎症过程对于保护机体免受外来物质损伤是相当重要的;另一方面,若该过程控制不好,可造成大块组织损伤,对机体不利。 *1051*

早在公元1世纪,Cornelius Celsus 发现了炎症这一现象,并描述其主要表现为局部发红、肿胀、发热、疼痛。另一位早期对该领域有贡献的人物 John Hunter(1793)认为炎症属于宿主的防御反应,而不是疾病过程[1]。在19世纪,Julius Cohnheim 描绘了炎症过程的微观形态。Paul Ehrlich 通过观察发现并证实了抗体的存在及其重要的生物学作用[2];不久 Elie Metchnikoff 观察到了吞噬现象,这些发现使得人们对于炎症有了更全面的认识,1908年这两位学者获得了诺贝尔奖。其他重要发现还有:Wright 等描述了包裹及接合外源物质的血浆蛋白可引起吞噬细胞的吞噬;Dale 和 Laidlaw 证实了组胺的血管活性[3]。近来,许多研究者观察到可溶性递质如细胞因子(包括化学因子、白细胞介素、干扰素和集落刺激因子)以及其特异性受体在调节炎症反应的每一特征性事件中发挥了重要作用。

---

① H.F. Rosenberg and J. I. Gallin: Laboratory of Host Defenses, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892-1504.

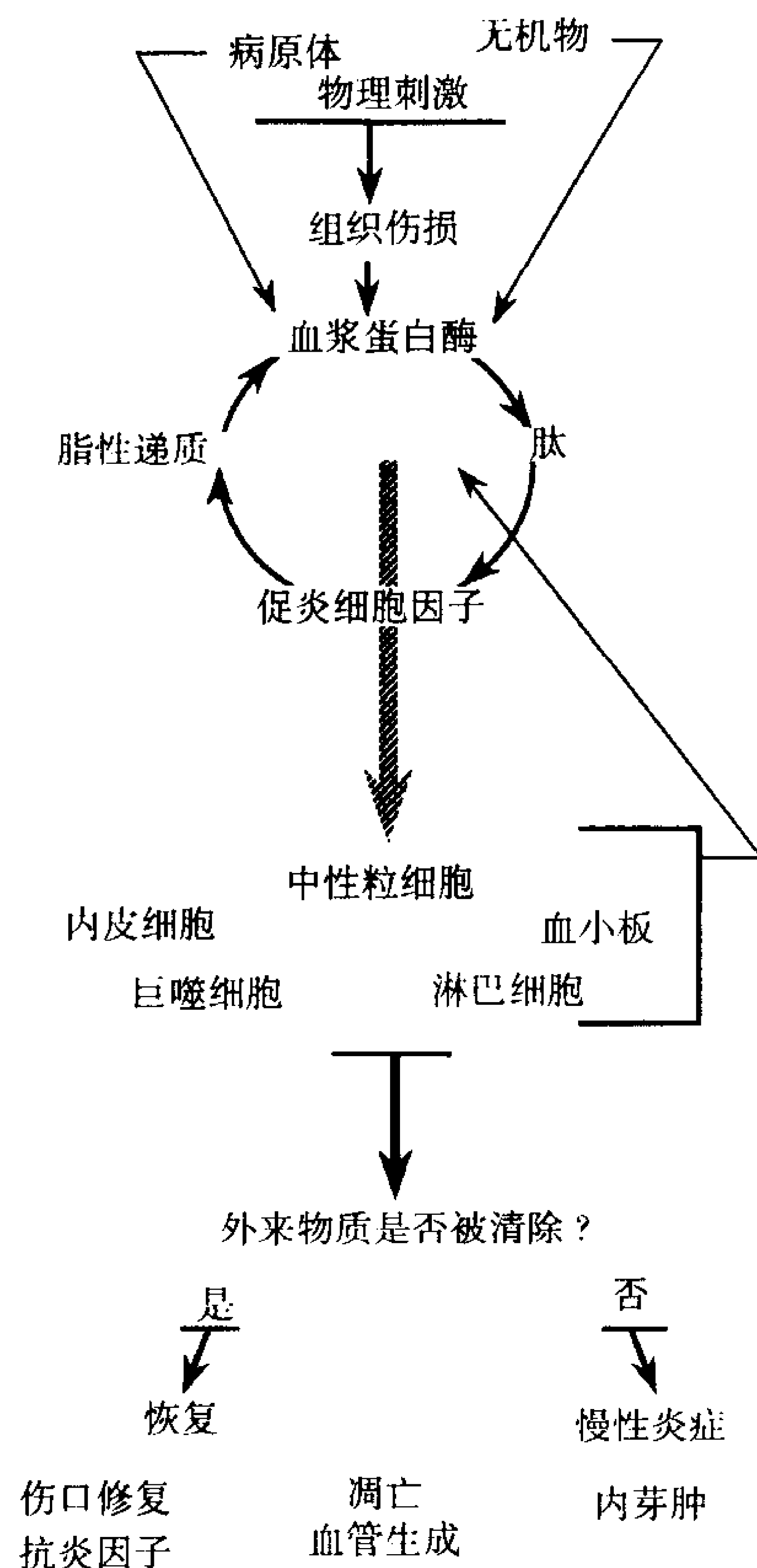


图 32.1　炎症反应中的分子和细胞事件。

1052

1053

炎症通常分为急性和慢性反应。急性炎症是指急性损伤后机体迅速地、短期内(数分钟到数天)发生的以体液和血浆蛋白渗出及中性粒细胞游走、聚集为特征的炎性反应。相反,慢性炎症持续时间较长,以淋巴细胞和巨噬细胞的浸润及结缔组织增生为特征。有关急慢性炎症反应的主要特征性事件如图 32.1 所示,详细内容将在本章全面阐述[4]。

当致炎因素入侵或破坏基础屏障(由上皮或内皮细胞及其特化结构组成),会引发急性炎症。这些致炎因素包括病原体(如细菌、病毒、寄生虫等)、外源性异物(如石棉)或内源性异物(如尿酸盐晶体、免疫复合物),还有物理或化学因素。

组织损伤引发一系列分子变化,产生可溶性促炎递质,促进炎症特征产生:血流加速、血管通透性增加、外周血白细胞向炎症组织浸润以及白细胞活化并清除异物。可溶性递质包括血浆蛋白酶系统、脂性递质、激肽及细胞因子。另外,活化的白细胞可分泌其他一些递质,以直接或间接方式延长炎症反应。

当异物被清除后,机体依靠抗炎递质使炎症过程减退,避免炎症周围组织受到不必要及过度的破坏。若急性过程不能完全清除异物,炎症会持续存在并继续产生炎性递质及细胞组分,迁延为慢性炎症。

本章从细节上描述了急慢性炎症时机体、细胞及分子水平的变化,并介绍了个别有关炎症反应缺陷或紊乱的临床疾病,最后我们围绕一种可望用于抵抗过度炎症反应性损伤的新型治疗药剂进行讨论。

急性炎症反应的初始阶段

炎症过程开始的方式部分取决于异物种类及其入侵的途径,在一定程度上,还取决于个体特征及其所处环境。病原体可通过多种不同的独特机制诱发炎症,包括通过细菌胞壁降解产物的作用使血浆蛋白酶系统活化和(或)通过分泌毒素直接激活炎症反应[5]。受损细胞可释放降解产物,继而引发一种或多种血浆蛋白酶的级联反应,还可通过上调促炎因子的表达促进炎症过程。

急性损伤后的机体反应

不论是何种致炎因素,机体伴随急性炎症发生的生理变化表现为 4 个主要特征。

血管扩张

血管扩张(之前常伴有短暂的血管收缩)是急性组织损伤后发生的最早生理变化之一。最先累及细动脉,接着是毛细血管床开放,使得局部血流加速。加速的血流导致炎症局部发热、发红。

血管通透性增加

正常情况下,血管内皮细胞有半透膜的功能,将血浆蛋白限制在血管内。在炎性刺激后,小静脉内皮细

胞收缩，扩大细胞间连接，产生缝隙，可让血浆蛋白自由通过[6]。更加严重的损伤往往伴随内皮细胞的坏死及血浆蛋白和血细胞的渗漏增加。

中性粒细胞聚集与活化

急性炎症早期最重要的反应之一是白细胞（主要是中性粒细胞）从血流（最终从骨髓）向炎症局部募集。该过程的第一步是白细胞靠边，即中性粒细胞缓慢地贴近血管壁滚动；紧接着中性粒细胞黏着在内皮细胞表面，然后通过增大的内皮细胞间隙及基底膜进入组织中。在可溶性趋化因子的作用下，中性粒细胞向着炎症部位移动并聚集形成炎性渗出液如脓液。中性粒细胞在炎症部位发生吞噬作用，通过胞内的氧化剂和蛋白水解酶，杀伤及降解病原体。

发热

发热一直是急性炎症反应中最难弄清的现象。致热源如细菌内毒素，在白细胞受到特定刺激后被释放出来。致热源通过视丘下部的体温调节中枢发挥作用。一些可溶性促炎因子（将在下面及第22章讨论）也参与该过程，包括白细胞介素-1（IL-1），肿瘤坏死因子（TNF）及前列腺素。发热对于急性炎症反应到底有何益处，目前尚不清楚。

急性炎症反应的分子递质

炎症过程的生理特征表现为从炎症早期、中期，直到消退均受一些可溶性炎症递质的调节。这些递质部分以无活性状态存在，被急性炎症产物活化为效应形式；其他一些由细胞合成和（或）释放，它们同样可作用于急性炎症产物或另外一些炎症递质。尽管这些递质独立存在，但它们彼此交错、彼此调节、相互增强生物学功能。

血浆蛋白酶

血浆中有3个相互关联的蛋白系统，它们是炎症反应中的重要递质。通过这些血浆蛋白的活化，许多主要的可溶性炎症递质才得以产生。

补体

最早基于对抗体杀菌作用的辅助效应，证实了一组血浆蛋白——补体的存在。目前认为有9种蛋白组分参与补体级联反应，有关细节问题将在第29章阐述。在蛋白酶的连续裂解下，补体活化，通过与外源生物体结合、增强吞噬作用（C3b和C4b），增强血管通透性，作为炎性细胞的趋化因子（C3a和C5a）产生溶细胞的蛋白复合体（C5b-9），促进炎症反应[7~11]。补体经典途径的激活物质主要是IgG和IgM类抗体与相应抗原形成的复合物。第一补体组分C1通过自身接触性分裂产生C1s，后者特异性催化C4裂解为C4b和C4a；C4b与靶抗原结合，C4a与C2a（即C2被C1s裂解的产物）结合生成C3特异性蛋白酶。补体替代途径由其他物质（如细菌内毒素）激活，与经典途径不同之处在于C3的裂解；另外，来自细菌及受损组织的蛋白酶和纤溶系统产生的纤维蛋白溶酶可催化C3的裂解。其裂解产物C3b继续裂解C5，经连续的蛋白水解完成C6至C9的活化。

1054

补体系统中个别成分遗传性缺失，可造成感染易感性增加、风湿性疾病或血管瘤。不同补体成分缺陷性疾病已被确认[12,13]，其中最常见的是C2缺失。C2缺失的个体不能利用补体活化的经典途径，这种常染色体隐性疾病使个体更易患化脓性感染和风湿性疾病。补体调节蛋白C1抑制剂的缺失可导致遗传性血管瘤等疾病[14,15]。有关补体缺失及其相关性疾病的详尽介绍见第29章。

激肽

激肽是一组血清蛋白，其最终产物是缓激肽，后者能引起平滑肌收缩、血管收缩及小血管通透性增

加[16~20]。激肽级联反应由若干组织损伤副产物(胶原质、软骨及基底膜)、内毒素与一些可活化凝血因子Ⅻ(又叫 Hageman 因子——参与纤凝级联)等物质启动。Ⅻ因子介导激肽释放酶原裂解为激肽释放酶,后者不仅可活化更多的Ⅻ因子,还裂解酶原激肽原生成缓激肽。Ⅻ因子代表着一个重要的交叉点,因为它既可被血纤维蛋白溶酶(纤溶蛋白的蛋白酶裂解产物)活化,又可被激肽释放酶(激肽家族的另一组蛋白)活化。

纤凝及纤溶蛋白

纤凝及纤溶蛋白除了在止血中发挥作用外,还通过直接活化Ⅻ因子显著扩大炎症反应。由活化的Ⅻ因子引起的蛋白水解最终导致纤维蛋白原裂解为纤维蛋白和更小的纤维蛋白肽,该裂解产物可作为炎症调节因子。活化的Ⅻ因子可产生血浆蛋白酶,从而激活纤维蛋白降解系统。与Ⅻ因子相似,血浆蛋白酶是三种蛋白酶系统的重要交汇点,因为它能通过几种途径发挥作用:血浆蛋白酶可产生作为炎症调节因子的纤维裂解碎片;但更重要的是血浆蛋白酶活性不仅能促进活化的Ⅻ因子产生,还可通过对 C3 因子的蛋白酶降解作用而直接激活补体途径[21~26]。

脂性递质

脂性递质是一组参与扩大炎症反应的化学复合物,包括前列腺素、白三烯、血小板活化因子及一组新发现的成员如脂毒素[27]。

前列腺素

前列腺素是花生四烯酸的氧化衍生物,介导炎症主要的征候如发热、疼痛及血管通透性改变等[28~33]。急性炎症中前列腺素的主要来源包括单核巨噬细胞、内皮细胞及血小板。炎症中一系列刺激因素如细菌内毒素、免疫复合体、补体 C3a、缓激肽及 IL-1 等可使前列腺素的合成增加。前列腺素的合成可通过不同机制上调:包括脂肪酸底物活性增加、磷脂酶活性增加及环氧化酶活性增加。前列腺素通过靶细胞上特异受体而发挥促炎效应,如促发疼痛、发热以及水肿等。

白三烯

白三烯是花生四烯酸的氧化产物,由中性和嗜酸性粒细胞合成并释放。LTA4 及其合成产物 LTB4、LTC4 由这些细胞合成并释放;LTA4 可被红细胞、血小板及内皮细胞摄取并转化为 LTB4 和 LTC4。LTD4 与 LTE4 是 LTC4 的另一种代谢产物。虽已证实了白三烯特异性受体的存在,但这些受体还不为我们所了解。总之,白三烯介导了一系列促炎效应:包括血管收缩、血管通透性增加、内皮黏附性增加以及中性粒细胞趋化与活化[34~37]。最近,白三烯因可应用于水肿病理生理学的研究而受到重视[38~42]。

血小板活化因子

PAF[43~47]是磷酸甘油的替代衍生物,存在于血循环及细胞中。在内皮细胞中,PAF 的细胞内形式可增强中性粒细胞与内皮细胞的黏附活性。现已证实 PAF 特异性受体存在于中性粒细胞上[48],它的许多拮抗剂也已被证实[49~53]。

肽与胺

组织胺与血管活性胺

组胺,为组氨酸脱羧基衍生物,由肥大细胞和嗜碱性粒细胞合成并储存,是早期炎症反应的可溶性炎性介质之一[54~57]。一系列物理或化学刺激可促使肥大细胞及嗜碱性粒细胞释放组胺,组胺迅速分布于组织与血流中,导致血管舒张、血管通透性增加并作用于外周神经系统,促使急性炎症反应发生。和其他多数炎性递质一样,组胺被其特异性受体 H1、H2 与 H3 识别[58~66]。血管活性胺,为色氨酸衍生物,储存于血小板、肥

1055

大细胞和胃肠道的嗜铬细胞中，在细胞脱颗粒作用后释放出来。与组胺类似，血管活性胺也有受体介导的血管活性，但它在急性炎症中的具体作用机制还不甚清楚[54,67]。

神经肽

神经肽是一组联系神经系统与炎症反应的活性介质，在局部组织受损的情况下，神经肽从神经细胞中释放出来。这组递质包括P物质、血管活性肠肽、生长激素抑制素与降血钙素基因相关肽[68~73]。尽管这组递质表现出显著的免疫调节活性，但其确切的生理作用及对整体的影响还待进一步研究。另外，神经肽降解酶（如表达于中性粒细胞表面的中性肽链内切酶）的具体功能尚未弄清[74~76]。

氮氧化物

尽管已证实氮氧化物具有神经递质活性及维持血液动力学稳定性的功能，但其在人类宿主防御反应中的作用颇具争议[77~82]。在最初的研究中，用脂多糖、γ干扰素（IFN-γ）、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CST）、肿瘤坏死因子（TNF-α）或热致死的细菌刺激人巨噬细胞，未能诱导其产生氮氧化物[83]，但在鼠科动物试验中获得了相反的结论[84]。近来许多研究证实，用TNF-α、GM-CST与灭毒菌株一起刺激人巨噬细胞，可使细胞产生亚硝酸盐。其他实验室也证实人巨噬细胞在特定刺激下可合成高水平的氮氧化物[85~87]。关于其分子基础是目前的研究热点。

促炎细胞因子

目前有关可溶性炎症介质的研究已成为较活跃的领域[88~90]。新的细胞因子不断被发现，已知细胞因子不断显露出新的功能。要探讨单个细胞因子的生理学活性较为困难，因为细胞因子间的相互作用及其细胞靶点是很复杂的。现将这些递质在炎症反应中的主要作用及相互影响，做一个简要综述。第22章将更详细地探讨各促炎细胞因子的生物学活性。

白细胞介素-1（IL-1）

IL-1是一种主要的炎症因子，由单核细胞和活化的巨噬细胞分泌[91~99]。有活性的IL-1由2个多肽亚单位（IL-1α和IL-1β）组成，这2个多肽由2号染色体上的2个不同基因编码而成。淋巴细胞及成纤维细胞表达IL-1的高亲合力受体。IL-1显示了对局部及系统活跃的促炎活性，包括增强局部血液流速，产热，诱导其他可溶性介质产生以及上调黏附因子的表达。IL-1还有一个特殊的性质，即它有一个天然存在的拮抗剂IL-1RA，表达于中性粒细胞与单核细胞中[100,101]。

白细胞介素-4（IL-4）

IL-4是与过敏性炎症密切相关的活性递质，它能刺激嗜碱性粒细胞发育增殖，对嗜酸性粒细胞具趋化作用，促进B细胞表达IgE受体[102~108]。IL-4也参与肉芽肿形成相关的细胞融合，还具有抗炎活性。

白细胞介素-6（IL-6）

IL-6由T淋巴细胞、内皮细胞、单核细胞和成纤维细胞产生，对于T和B淋巴细胞、巨噬细胞有广泛作用，包括促进单核细胞分化、增加血循环中血小板数目及促进肝中急性时相反应蛋白（包括纤维蛋白原）的合成[102,109~113]。

白细胞介素-8（IL-8）

IL-8可被多种细胞（单核细胞、淋巴细胞与中性粒细胞）在IL-1α、IL-1β或TNF刺激下合成。IL-8活性似乎仅限于中性粒细胞，它可增强其趋化性与脱颗粒反应。在分子水平，IL-8可上调细胞表面各种黏附分子的表达，诱导中性粒细胞NADPH氧化酶活化[114~121]。

肿瘤坏死因子(TNF)

TNF[122~128]由活化的巨噬细胞产生，TNF-α 和 TNF-β 是两种不同但又密切相关的多肽。TNF 与产热有关，并促进其他炎性递质的表达，在诱导细胞坏死中表现出显著的活性[129~131]。

γ 干扰素(IFN-γ)

IFN-γ[132~137]是 T 细胞与自然杀伤细胞(NK)的产物。最初 IFN-γ 被看作是一种抗病毒因子，但事实上，它有着广泛的生物学活性，其中最显著的特性是能增加活性氧如超氧化物阳离子和过氧化氢的产生，改变巨噬细胞表面抗原，促使它们清除入侵病原体，可介导内皮细胞及中性粒细胞活性。IFN-γ 对于免疫功能下降或细胞内感染的患者具有保护作用[135]。对分枝杆菌高度易感性体家族的研究表明，IFN-γ 受体在该病的发病细胞中发挥了一定作用[138,139]。

1056

白细胞介素-12(IL-12)

IL-12 是由巨噬细胞与 B 淋巴细胞产生的异型二聚体，其功能在于增加 IFN-γ 的合成，刺激 NK 细胞、Th1 细胞及细胞毒性 T 细胞(CTL)的增殖。有关 IL-12 在宿主抗细胞内细菌感染中的作用将在第 40 章介绍。

炎症的模型系统

现已有两种模型被用来观察人类炎症各种过程的瞬时表观及炎症递质的重要作用。其一是将少量内毒素脂质 A 衍生物行人静脉注射，继而观察外周血中炎症递质聚集的情况[140]；其二是皮肤水疱行穿刺抽水后，观察局部炎症递质聚集的情况[141,142]。

内毒素静脉注射后机体的反应

静脉注射内毒素后，可观察到体温与外周血白细胞计数会发生明显变化。体温在注射后 1 小时开始上升，于 4 小时后达到峰值。在注射 30 分钟后，由于大量中性粒细胞和单核细胞黏附于肺与脾血管内皮细胞上，白细胞计数显著下降；在 4 小时后出现以幼稚粒细胞为特征的白细胞增多症，这种状况可持续 24 小时，在 48 小时后恢复正常。外周血白细胞增多主要是因为骨髓中的幼稚粒细胞发生动员。炎症反应的主要表现如发热、血管中中性粒细胞附壁及骨髓中幼稚粒细胞动员等，均与血循环中某特定炎症递质的水平发生显著变化有关。例如，TNF-α 水平在注射后 2 小时内达到峰值[143]，是引起发热反应的主要热原质。血浆中趋化因子 IL-8 在注射后早期开始增加，在 4 小时达到峰值。早期 IL-8 增加与中性粒细胞附壁有关。在动物实验中发现静脉内趋化因子主要引起中性粒细胞迅速减少，其原因是这些趋化因子使中性粒细胞上的黏附因子受体(CR3)表达上调[144]。但是内毒素行人静脉注射后却检测不到血浆 C5a 与 LTB4 显著增加，进一步证实了 IL-8 在中性粒细胞附壁过程中的重要作用。血浆 IL-6 浓度在注射后 2~4 小时也开始增加。另外，内毒素静脉注射后，除了血浆 C5a、LTB4 或 IL-1 测不到增加外，IL-2、IL-3、IL-4、IFN-γ、生长转移因子 β(TGF-β)或硝酸盐-亚硝酸盐也不增加，强调了反应的特异性。Kuhns 与其同事[145]报道了一个周期性细菌感染的患者由于信号传导缺陷而对内毒素和 IL-1 反应减弱。尽管内毒素活性确切的分子基础还不甚清楚，但已证实内毒素可与吞噬细胞表面抗原 CD14 发生作用[146,147]，继而调节核因子 κB(NF-κB)的表达，后者可促进许多促炎递质转录[148]。

水疱中液体成分可溶性递质的瞬时分析

在健康志愿者皮肤上诱生出的水疱局部可检测到炎症递质的聚集[141]。在炎症反应发生 3~5 小时，可在局部检测到的炎症递质包括 C5a、LTB4、IL-8 及 IL-6；8 小时后，才可检测到 IL-1β、GM-CSF 和 TNF-α。尽管

Kuhns 及其同事研究认为 IFN-γ 是皮肤水疱局部早期出现的介质，但在后来的研究（D B Kuhns 与 J I Gallin）中却未得到相同的结论。可检测到少量的 IL-4 在皮肤水疱局部聚集，但检测不到 IL-2 与 IL-1α。因此，炎症的内毒素模型与水疱模型证实了参与系统性炎症和局部炎症反应的递质有明显不同。

急性炎症反应的细胞递质

将中性粒细胞招募到受损组织局部，可加强炎症前期反应的递质网络联系。中性粒细胞是一种专职噬菌细胞，它们在炎症递质的作用下迁移到受损组织局部，摄取并清除入侵的病原体以及坏死组织，最终使损伤组织得以修复。在诱生皮肤水疱及 Rebuck 皮肤开窗术后均能观察到白细胞（中性粒细胞、单核细胞与嗜酸性粒细胞）向炎症中心迁移的现象。其他参与急性炎症反应的细胞组分还包括血小板、淋巴细胞和内皮细胞。

中性粒细胞

中性粒细胞对于免疫反应和炎症反应而言均很重要，长期中性粒细胞减少可因无法抵抗感染而导致死亡[149~151]。正常人的血循环中白细胞有 40%～50%是中性粒细胞，血涂片经瑞氏染色后通过细胞大小、特征性分叶核以及胞质中染出的颗粒性物质（图 32.2），可容易地将它们识别出来。初级与次级颗粒所含的炎症递质是不同的（见下文）。

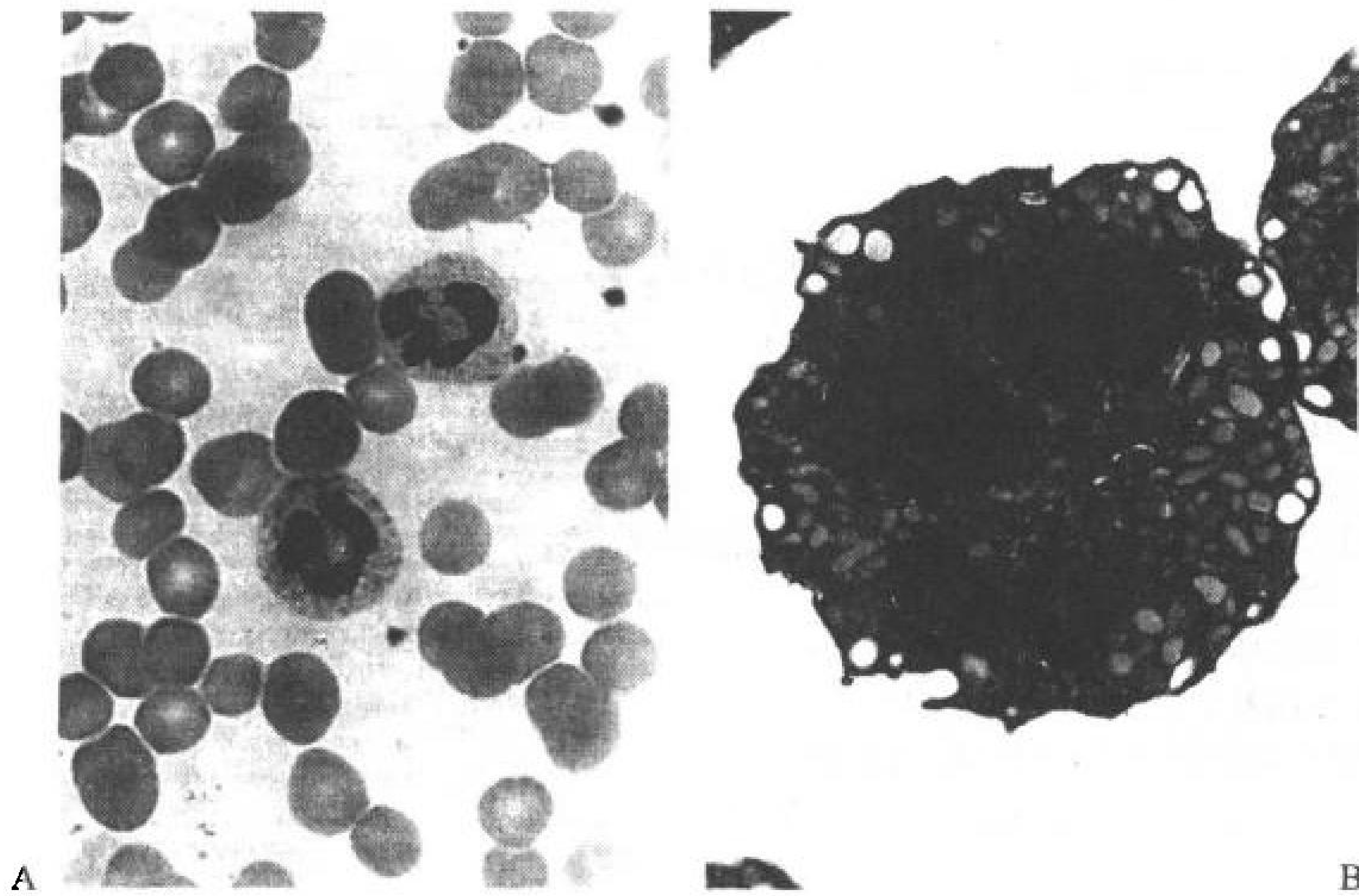


图 32.2　A：人外周血成熟中性粒细胞的光镜照片；B：人外周血成熟中性粒细胞的电镜照片。

中性粒细胞在骨髓中的发育过程

中性粒细胞由骨髓中的前体细胞发展而来[152]。原始粒细胞是粒细胞系统中最早的可以形态学上辨认的前体细胞，以后依次是早幼粒细胞、中幼粒细胞、晚幼粒细胞及杆状核细胞，后者直接发育为成熟的中性粒细胞（图 32.3）。一些活化 T 细胞的产物如 GM-CSF、IL-3 及粒细胞克隆刺激因子（G-CSF）通过与粒细胞前体细胞上相应受体作用，参与中性粒细胞成熟过程。中性粒细胞一旦成熟后便释入循环血液，在前述可溶性促炎因子的影响下，进入炎症部位发挥作用。中性粒细胞减少与化疗药物、自身抗体或感染有关。但这种减少是可逆的；周期性中性粒细胞减少与家族性中性粒细胞减少等遗传性疾病已被证实[153~157]。

1057

中性粒细胞活化与预激（priming）

血循环中静止的中性粒细胞具有介导广泛炎症活性的潜能，只有中性粒细胞活化后才能发挥这种潜能[158,159]，许多因素可引起中性粒细胞活化（表 32.1）。一些活化因子通过与细胞表面特异性受体作用传递中性粒细胞活化信号[149,158~164]，另一些可与细胞内成分作用如 G 蛋白，G 蛋白可促进三磷酸鸟嘌呤（GTP）水

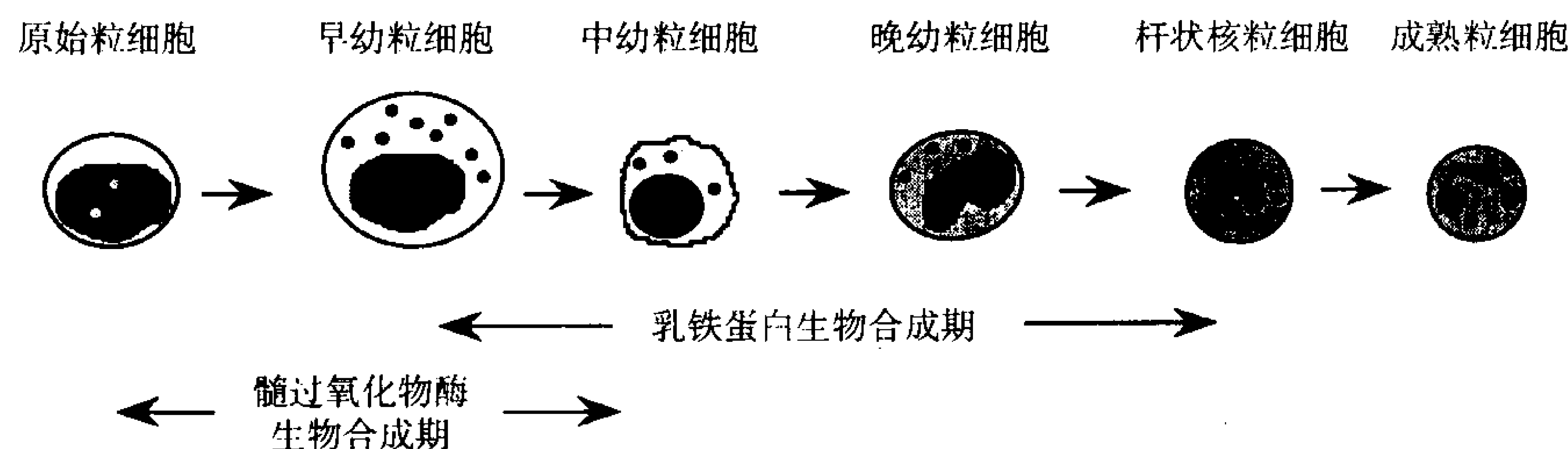


图 32.3　中性粒细胞在骨髓中从原始粒细胞发展为成熟中性粒细胞的各阶段。图中的黑色大圆圈表示初级颗粒，暗阴影表示次级颗粒。图中箭头所指阶段为促炎递质髓过氧物酶和乳铁传递蛋白的合成阶段。

解成二磷酸鸟嘌呤(GDP)和无机磷酸盐，其间可启动一系列事件包括磷脂酶 C 的活化、钙流动以及膜去极化。一旦活化，中性粒细胞便可黏附于内皮细胞上，通过内皮屏障迁移到周围炎症组织，摄取并清除病原体、异物和坏死组织残渣。中性粒细胞活化的另一个有趣方面是存在预激现象，即中性粒细胞被一些活化因子(内毒素、IL-1、f-Met-Leu-Phe、GM-CSF)短暂预激后，表现出对后续刺激增强的反应性，包括预激后短期的细胞形状、氧化与吞噬能力改变，以及长期反应(如延长生存能力)。总之，预激现象提示中性粒细胞活化分为两步，需要一种从非可接受态到可接受态的初始转化，这种转化的分子基础正待研究。

表 32.1　促进中性粒细胞活化的因子

因子	效应
LTB4	趋化效应；增强其与内皮细胞的黏附作用；促脱颗粒作用以及 NADOH 氧化活性
补体片段 C5a	趋化效应；诱导脱颗粒及黏附作用
PAF	诱导聚集、黏附作用；趋化及脱颗粒作用
组织胺	在诱导趋化效应及脱颗粒作用时呈浓度依赖性变化
IFN-γ	增强抗体依赖性细胞毒效应
G-CSF	增强抗体依赖性细胞毒效应，增强吞噬作用；刺激骨髓中粒细胞的成熟
GM-CSF	引发粒细胞反应；刺激骨髓成熟
TNF-α	趋化效应，增强吞噬以及抗体依赖性细胞毒作用
IL-8	趋化效应；诱导脱颗粒作用及 NADPH 氧化酶活性
fMet-Leu-Phe	趋化效应；诱导聚集、脱颗粒作用及 NADPH 氧化酶活性

中性粒细胞黏附

1058

为能有效参与炎症过程，中性粒细胞必须最终离开血流，迁移至周围组织中。该过程的第一步即中性粒细胞黏附于血管内皮。中性粒细胞的黏附分为两步，一类细胞表面分子选择素(seleetin)参与了第一步[165~173]，选择素可在中性粒细胞发生滚动或流速减慢时介导其黏附于内皮细胞上。选择素可分为三类：L 选择素，表达于所有白细胞上；E 选择素，表达于活化的内皮细胞上；P 选择素，表达于内皮细胞和血小板上。选择素借助黏附细胞上碳水化合物配体发挥功能。内皮细胞 E 选择素的配体是涎酸化 Lewis-X 抗原，发现于中性粒细胞，若该配体缺失，则导致显著的免疫缺陷状态。

黏附过程的第二步是由整合素(integrin)介导的[174~180]。白细胞整合素是介导细胞间、细胞与胞外环境广泛作用的蛋白质家族中的一个亚族。白细胞整合素——LFA-1(CD11a/CD18)、Mac(CD11b/CD18)和 p150,95(CD11c/CD18)是由不同的 α、β 多肽链组成的异型二聚体，其中已证实 Mac1 在炎症过程中有重要作用。Mac1 储存于中性粒细胞次级颗粒中，并被带到细胞表面参与中性粒细胞活化。另外 Mac1 介导特异性黏附，参与吞噬、趋化及活性氧的生成(见下文)。细胞间黏附分子 1[181]，为一种表达于内皮细胞的表面蛋白质分子，已证实是 Mac1 的配体。

现已发现遗传性中性粒细胞黏附缺陷包括白细胞黏附缺陷Ⅰ(LAD Ⅰ)与白细胞黏附缺陷Ⅱ(LAD Ⅱ)两种形式。前者是由于白细胞黏附分子共享的β链——CD18遗传性生物合成缺陷所引起的[182~184],此缺陷是常染色体隐性遗传性疾病,定位于人类染色体22q22.3上。患者会发生经常性、周期性的皮肤及软组织感染,伤口迁延不愈及严重的牙周组织疾病。相反,LAD Ⅱ是由于糖基化缺陷,导致E-P选择素的涎酸化-路易斯X碳水化合物配体生物合成受阻[185,186],最终导致中性粒细胞不能滚动及附壁,该病患者会经常发生严重的细菌感染。

中性粒细胞的趋化性

作为活化过程中的一部分,中性粒细胞对表32.1中所列活化因子的浓度梯度具感应性,可观察到中性粒细胞朝着吸引剂浓度较高的区域移动。在亚细胞水平,中性粒细胞运动性依靠由肌动蛋白丝组成的细胞骨架发生变化,尽管细胞骨架信号传导的确切机制还不甚清楚,但已证实一些肌动蛋白结合蛋白(包括G肌动蛋白结合蛋白、cofilin,凝胶溶素)与肌动蛋白丝结构改变有关,使细胞可以对趋化因子浓度梯度产生反应性移动[187~189]。

中性粒细胞的吞噬作用

吞噬异物和坏死组织是炎症防御过程中极其重要的一环,将在第30章做详细介绍[190,191]。中性粒细胞伸出伪足将颗粒性物质包围,随后伪足延伸,并发生融合,形成由细胞质膜包裹吞噬颗粒的泡状小体,即吞噬体(phagosome)。包裹了免疫球蛋白的颗粒(或经调理素化)可被中性粒细胞表面的Fc受体识别并与之结合,故更易被吞噬。被补体降解产物调理后的颗粒也可通过CR1、CR3参与的特异性受体介导方式被中性粒细胞吞噬。

中性粒细胞的脱颗粒作用

中性粒细胞的初级和次级颗粒里含有许多不同的效应蛋白(表32.2)。由细胞质膜包裹的颗粒与吞噬体融合,使中性粒细胞颗粒中的效应蛋白直接与被摄取的物质发生作用。初级颗粒(如嗜天青颗粒)中最重要的物质包括溶解酵素(可消化绝大多数细菌胞壁肽聚糖组分)、组织蛋白酶G、防御素及细菌增透性蛋白(BPI),具有内在的抗菌活性。Goldman及其同事[192]发现,人β防御素-1在胞囊纤维化的个体中是无活性的,这与细菌感染的致病机制有关。髓过氧物酶是其中作用最为显著的成分,它可将由NADPH氧化酶产生的氢过氧化物和盐酸转化为次氯酸(另一种抗生素)。

表32.2　中性粒细胞中初级颗粒及次级颗粒的主要内容物

初级颗粒	次级颗粒
髓过氧化物酶	乳铁传递蛋白
防御素	白明胶酶
BPI	胶原酶
组织蛋白酶G	维生素B_{12}结合蛋白
溶解酵素	溶解酵素
弹性蛋白酶	细胞色素b558
碱性磷酸酶	fMLP受体
蛋白酶3	CD11b/CD18,CD11c/CD18(整合素)
β葡(萄)糖苷酸酶	补体受体3(CR3)
α海藻糖酶	组织胺
磷脂酶A2、C、D	血纤维蛋白溶酶原
α-甘露糖酶	

1059

次级(或特异性)颗粒包含的蛋白质在炎症反应中所起的作用还未完全弄清。其中的乳铁传递蛋白(lactoferrin)是一种具抗菌活性的铁结合蛋白[193]。次级颗粒中储存有CR3及其他一些中性粒细胞活化因子的受体,还含NADPH氧化酶的膜组分。

切-东二氏综合征(Chediak-Higashi syndrome)是一种中性粒细胞形态异常、趋化功能异常及脱颗粒缺陷性疾病,该病患者常反复发生严重的细菌及真菌感染。已有三个实验小组报道此综合征是由于人类染色体1q42-43发生基因缺失[194~196]所致。中性粒细胞性疾病的病因是特异性颗粒缺陷,常因为次级颗粒缺失,或有颗粒,但其中功能性蛋白[197~199]及髓过氧化物酶[200~202]缺乏。

NADPH 氧化酶

酶复合体 NADPH 氧化酶在中性粒细胞发挥宿主防御过程中起关键作用(图 32.4)[203~210]。酶体聚集在吞噬体膜上,从 2 个膜固有组分(gp91-phox 与 p22-phox)和 3 个胞质成分(p47-phox、p67-phox 与 rac)到催化氧分子和自由电离子生成超氧化物;超氧化物歧化酶可将超氧化物转化为有毒性的代谢产物——过氧化氢,超氧化物还可被初级颗粒中髓过氧物酶转化成次氯酸。

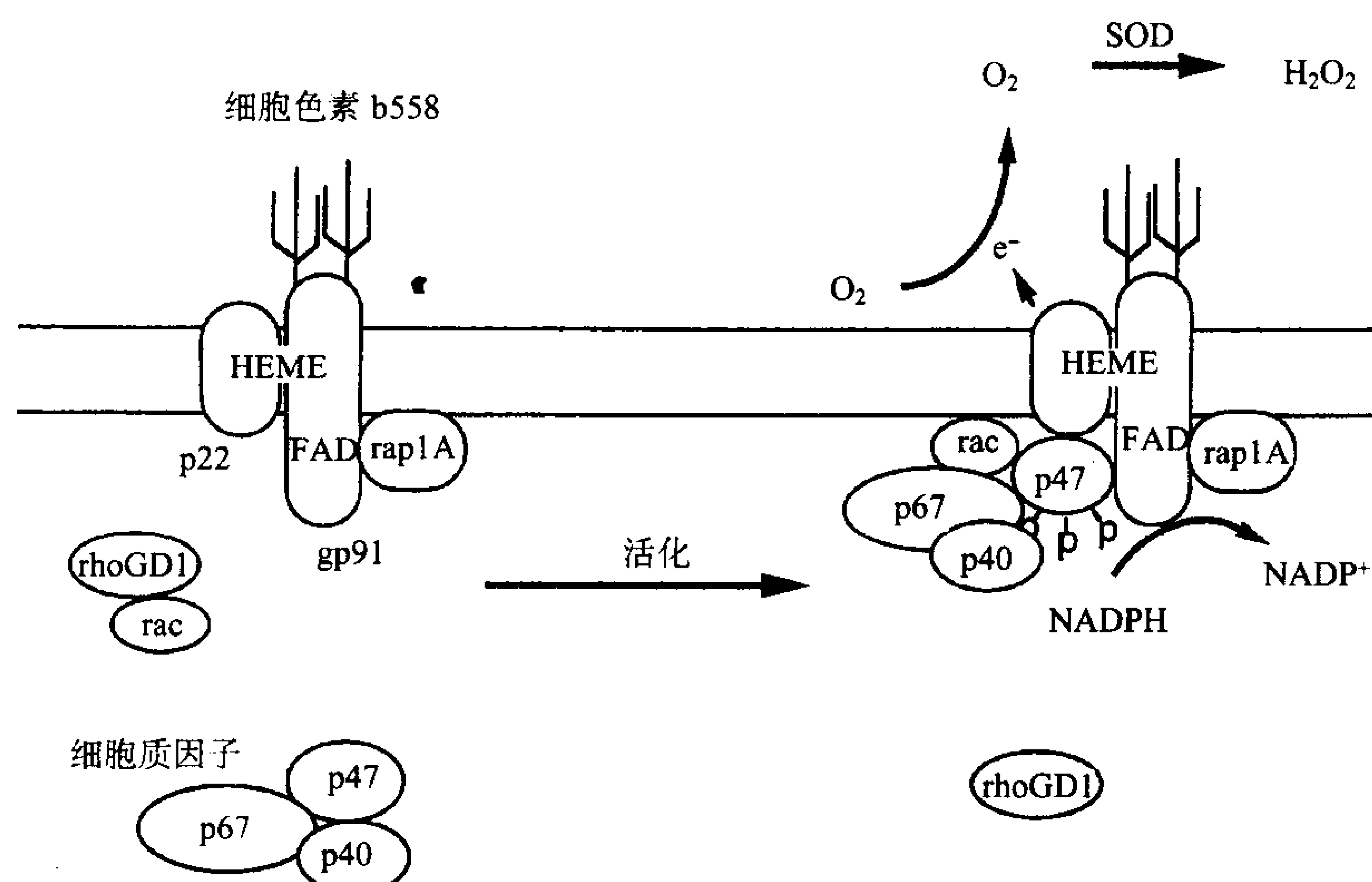


图 32.4 噬菌细胞 NADPH 氧化酶的蛋白成分示意图。胞质成分 rac、p67、p47 及 p40 被运转至细胞膜,组成催化复合体,该复合体可催化氧分子转化为过氧化物,后者可在超氧化物歧化酶的(SOD)作用下转变成有毒的氧代谢物(H_2O_2)。该蛋白通过特异性识别位点如 ref 中的 SH3 结构域发挥作用[301~303]。

机体产生毒性氧代谢产物的能力对于宿主防御功能尤为重要,这些物质表现出了炎症这把双刃剑最锋利的一面。超氧化物阴离子易通过膜扩散,在吞噬体外转化为毒性代谢产物。这些氧自由基可造成炎症中心组织损坏扩大,因此增强并远远超过了最初损害引起的炎症反应。同样,心血管疾病、肿瘤、关节炎及神经损伤性疾病的发病机制也与氧损伤有关。慢性肉芽肿性疾病是一种遗传性疾病,该病患者由于中性粒细胞丧失生成毒性氧代谢产物的功能[207,211~213],致使机体在细菌和真菌感染后不能产生防御反应,从而发生反复的严重感染。4 种氧化酶中任何一种遗传性缺失均能引起酶复合体功能丧失,导致疾病。治疗这类疾病可使用预防性抗体及炎症调节因子 IFN-γ[214,215]。

蛋白质的生物合成

尽管通常中性粒细胞被看作是终末阶段的细胞,但近来许多研究显示,中性粒细胞实际上还具有显著的生物合成功能。中性粒细胞表达的蛋白包括 NADPH 氧化酶、特异性膜受体与抗原。活化的中性粒细胞可释放一些炎症因子,如 IL-1、TNF-α、IL-6、IL-8、GM-CSF、G-CSF 和血浆酶原激活剂[149,211~215]。Kuhns 和 Gallin[216] 发现渗出的中性粒细胞合成 IL-8 的能力十分活跃。这些递质可反作用于机体,增强整体的免疫应答。

单核细胞与巨噬细胞

1060

单核细胞也属于专职吞噬细胞,它们可像中性粒细胞一样迁移至组织中[217~223]。巨噬细胞活化后,也具有吞噬细菌、释放抑菌蛋白和炎症递质的功能。巨噬细胞一方面可辅助中性粒细胞在急性炎症反应中发挥防御功能,另一方面它们在慢性炎症反应中发挥了更关键的作用。本书第 15 章详细介绍了巨噬细胞的生物

学与生理学特点。

嗜酸性粒细胞

嗜酸性粒细胞是最初被募集至急性炎症中心的粒细胞，它们在呼吸道、胃肠道、皮肤过敏反应及肠道寄生虫感染中表现得较为活跃[224~228]。与中性粒细胞相似，嗜酸性粒细胞源于骨髓，它们也具有针对特异性活化因子(包括 RANTES、MIP-1α 及嗜酸性粒细胞活化趋化因子)的受体介导性反应功能，另外还含有富集氧化阳离子蛋白的胞质颗粒。与中性粒细胞不同的是，嗜酸性粒细胞的吞噬及将颗粒内容物释放至胞外的能力较弱。有趣的是，嗜酸性粒细胞的毒性作用是其较明确的特性，尤其在反应性气道疾病中更为明显[229~231]，而对嗜酸性粒细胞在炎症反应中的有利方面却知之甚少。

血小板与淋巴细胞

血小板通过多种不同机制发挥其炎症防御功能[236~247]。血小板储存并释放多种炎症递质，包括纤维蛋白、血浆酶原、血浆蛋白酶系统的其他组分、脂质与血管活性胺。一些由血小板释放的递质可直接活化中性粒细胞；相反，由活化的中性粒细胞释放的递质(氧代谢产物、颗粒蛋白、脂质)可改变血小板功能。血小板与淋巴细胞接触并提供合成前列腺素的反应物。血小板同样也可与成纤维细胞作用，在炎症消退期刺激胶原质与纤维素的合成。

T 及 B 淋巴细胞复杂的生物学活性和它们在特异性免疫应答中的作用已在第 6、7、10 及 11 章详细介绍；免疫球蛋白在增强炎症反应和中性粒细胞吞噬功能中的作用也已在前面讨论过。仍需强调的是，由活化 T 淋巴细胞产生的可溶性递质(白细胞介素、IFN-γ)，将作为抗炎递质中成员在下文详细阐述。

内皮细胞

我们已经阐述过内皮细胞是中性粒细胞黏附的基础。最近研究发现，内皮细胞还能合成并释放许多促炎递质[236~247](另参见有关选择素、整合素的参考文献)。

过敏与炎症

过敏，即速发型超敏反应也属于炎症反应，将在第 35 章详细阐述。IgE、嗜碱性粒细胞和肥大细胞上的 IgE 受体及由这些细胞释放的组胺是参与此型超敏反应中的关键成分。过敏反应在宿主防御中所起的作用仍是现在争论的焦点，该焦点主要集中于 IgE 及黏膜肥大细胞在宿主抗肠道寄生虫防御反应中的作用[248~250]；而有关过敏的大量文献报道则关注于它的毒性作用。

急性炎症反应的消退

急性炎症反应的缓解与下调方式是目前研究较为活跃的领域。促进炎症消退的递质将作为治疗药物用来限制急性炎症有害的一面。

细胞衰老与坏死

细胞坏死与程序性死亡是近来倍受关注的问题，它是细胞受到某种特殊刺激后，在最终死亡前发生的形态学改变(核固缩、DNA 分解)。粒细胞坏死作为一种缓解炎症反应的手段，已成为近来研究的热点[251~257]。现已证实，在体外一些细胞因子如 TNF-α、类花生酸类物质、IL-10 及抗氧化剂等[258~262]可调节中性粒细胞坏死，它们在急性炎症消退中的作用有待研究(第 23 章)。

抗炎递质

一些可溶性递质的抗炎效应已被证实，但还有其他有类似作用的递质有待进一步研究(第 22 章)。

白细胞介素-4

前面已经阐述了 IL-4 的促炎效应，现已证实它还能下调 IL-6 的生成，与下调中性粒细胞中过氧化物生成有关[263]。

转移生长因子-β(TGF-β)

TGF-β 促进一系列抗炎效应，包括抑制造血功能，减少促炎因子的生成及抑制白细胞黏附[264~269]。TGF-β1 基因敲除的小鼠体内往往会发生多种组织的严重炎症反应，提示了 TGF-β 是一种主要抗炎递质[270,271]。TGF-β可由多种细胞产生，包括血小板、巨噬细胞、T 和 B 淋巴细胞。

白细胞介素-10(IL-10)与白细胞介素-13(IL-13)

1061 IL-10 由巨噬细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞产生，具有抑制特异性巨噬细胞亚群活化的作用，包括抑制促炎因子生成、干扰巨噬细胞的抗原呈递作用等。在宿主抗 Epstein-Bar 病毒与人类免疫缺陷病毒感染中同样证实了 IL-10 的免疫抑制作用。研究发现，IL-13 可诱导 IL-4-非依赖的 IgE 合成及由 CD40 配体介导的 B 细胞活化、增殖及分化[277~279]。

视丘-垂体-肾上腺皮质轴

有关中枢神经系统、肾上腺皮质与炎症消退之间的联系已逐渐成为研究的热点[280~284]。这是由于实验发现肾上腺皮质产生的糖皮质激素具有免疫抑制作用，可下调急性炎症反应。在许多实验动物体系的研究中发现 IL-1、IL-6 和 TNF-α 可显著增强下丘脑的刺激，导致血清中 ACTH 和肾上腺酮增加；环前列腺素也参与了该过程。

伤口修复与血管再生

人们已经准确描述过伤口修复的一些形态学特征[264~268]。中性粒细胞与巨噬细胞一起完成最初的清创过程，包括去除外源性异物和细胞碎片。在多种炎症递质的作用下，成纤维细胞、上皮细胞及内皮细胞开始生长、分割，形成新的组织并赋予其功能。血管起源是指新生组织中血管再生的过程，血管形成经历了一系列形态学上的事件，包括作为起源的小静脉或毛细血管舒张、先前存在的基底膜被去除、内皮细胞迁移并增殖以及新的腔道形成等。许多可溶性递质可促进这些事件的发生，如表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、TNF-α、TGF-β和一些细胞递质(巨噬细胞、血小板、角化细胞、内皮细胞与肥大细胞)[285~289]。

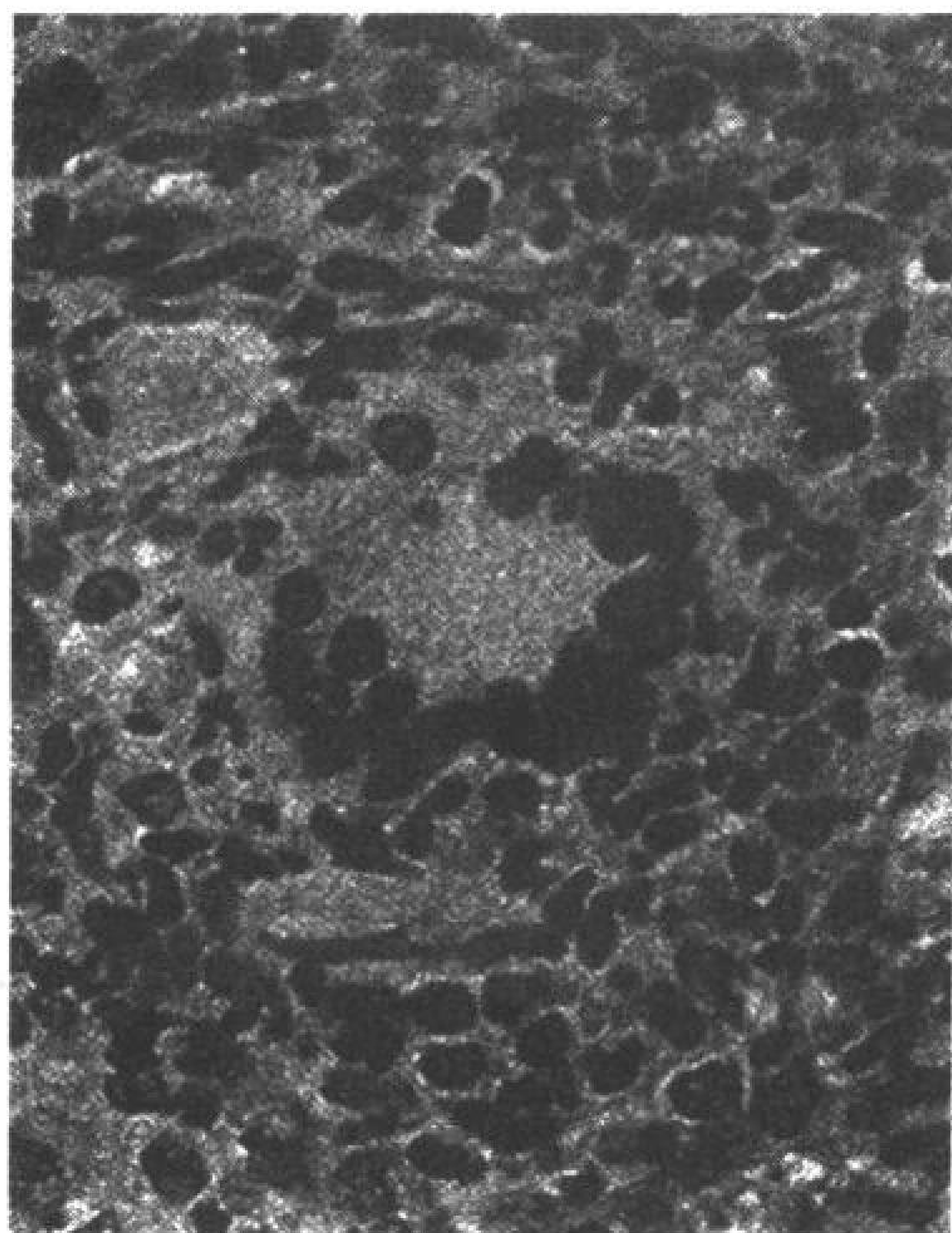


图 32.5 来自 CGD(p47 phox 基因敲除)小鼠模型的肉芽肿组织的光镜照片[304]。淋巴细组成中央核心，巨噬细胞围绕在该核心周围。

慢性炎症

若最初的炎症中心未被完全清除或者多种急发事件在同一部位发生会导致急性炎症持续，最终迁延为慢性炎症。与以中性粒细胞聚集为特征的急性炎症不同，组织学研究发现慢性炎症以巨噬细胞与淋巴细胞聚集以及成纤维细胞与血管组织增生为特征。纤维细胞与血管组织增生致使组织瘢痕形成，常见于迁延不愈和反复发作的炎症反应部位。

最有意思的慢性炎症结局之一是形成组织肉芽肿[290~296]。巨噬细胞与淋巴细胞等炎症细胞聚集起来，最终被纤维化隔离带包裹从而形成肉芽肿，这是针对持续性刺激而引发的炎症反应。肉芽肿中存在一些特征性的细胞，包括由巨噬细胞转化而来的类上皮细胞，以及由类上皮细胞和巨噬细胞融合而成的多核巨细胞(图32.5)。尽管肉芽肿形成及消退的确切机制仍不甚清楚，但已证实致敏的特异性T细胞及其分泌的可溶性递质(如TNF-α和IFN-γ)在它们活化期参与形成及维持肉芽肿。一些条件使机体易于形成肉芽肿，尤其是在机体内存在细胞内细菌(如肺结核，见第40章)或无机抗原(例如铍中毒)的情况下。

近来许多有关慢性炎症分子机制的研究集中于NF-κB的生物学功能上，最初人们认为NF-κB是一种调节鼠科动物κ轻链表达的转录因子，其活性与内毒素、细胞因子、病毒及氧化剂有关，NF-κB还可调节黏附分子、E选择素和大量趋化因子的表达[297~299]。

展望：抗炎新疗法

抗炎治疗的目的是消除炎症这把双刃剑的有害面即过度的组织破坏。同时，抗炎治疗是短期的、和(或)有选择性的过程，因此可避免造成宿主免疫失能。现已认为一些普通的抗炎制剂(如糖皮质激素、非类固醇药物)具有广谱抗炎疗效。在更应谨慎控制的炎症反应中，特殊抗炎制剂可能显得更为有效。

亲免素结合剂

环孢菌素(cyclosporine，CsA)与FK506(免疫抑制剂)是此类普通抗炎药中最为通用的[305~310]。CsA与FK506在结构上无相关性，它们均可通过干扰一些细胞因子的转录，选择性地抑制T细胞活性。最近有关其分子机制的研究发现，CsA及FK506与不同的细胞内结合蛋白[如亲免素(immunophilin)，可能具有与免疫抑制效应无关的酶活性]作用，亲免素结合复合物形成后可干扰钙调磷酸酶介导的转录活化，因而抑制编码促炎因子IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-8及INF-γ的基因转录，该复合物还可抑制T细胞增殖。CsA与FK506最初在器官移植中被用作辅助治疗药物，现已用于治疗风湿性关节炎及肠炎[311~314]。

1062

实验抗炎制剂

一些实验室已将一些可特异性阻断各促炎递质[315~337]及其作用途径[333~337]的制剂用于实验研究，包括一些特殊细胞因子及受体的拮抗剂。另一抗炎方法源于亲免素-结合复合物的活性，现有的技术路线已能使亲免素-结合复合物有效发挥对一种或几种促炎递质转录的调控功能[337,338]。在不久的将来，一旦复杂的免疫功能紊乱性疾病的基因基础得到证实并阐明，基因替代疗法将成为抗炎治疗的新选择。

(王　莉译)

参考文献

1. Hunter J. *A treatise of the blood inflammation, and gunshot wounds.* vol I. London: J. Nicoll, 1794.
2. Cohnheim J. *Lectures in general pathology.* vol I. London: New Sydenham Society, 1889. McKee AD, translator, from the German edition.
3. Dale HH, Laidlaw PP. The physiologic action of b-imidazolyethylamine. *J Physiol* 1911;41:318–344.
4. Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992.
5. Musher D, Cohen M, Baker C. Immune responses to extracellular bacteria. In: Rich RR, Fleisher TA, Schwartz, BD, Shearer WT, Strober W, eds. *Clinical immunology.* vol I. St. Louis: Mosby–Year Book, 1996:479–502.
6. Robbins SL, Cotran RS. Inflammation and repair. In: *Pathologic basis of disease.* 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1979:59–63.
7. Ward PA. Role of complement, chemokines, and regulatory cytokines in acute lung injury. *Ann NY Acad Sci* 1996;796:104–112.
8. Goldstein IM. Complement: biologically active products. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992: 63–80.
9. Kozel TR. Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:34–46.
10. Muller-Eberhard HJ. Complement: chemistry and pathways. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:33–62.
11. Holers VM. Complement. In: Rich RR, Fleisher TA, Schwartz BD Shearer WT, Strober W, eds. *Clinical immunology: principles and practice.* St. Louis: Mosby–Year Book, 1996:363–391.
12. Holers VM. Complement. In: Rich, RR, Fleisher TA, Schwartz BD, Shearer WT, Strober W, eds. *Clinical immunology: principles and practice.* St. Louis: Mosby–Year Book, 1996:363–391.
13. Ratnoff WD. Inherited deficiencies of complement in rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 1996;22:75–94.
14. Ono H, Kawaguchi H, Ishii N, Nakajima H. A point mutation in exon 7 of the C1-inhibitor gene causing type I hereditary angioedema. *Hum Genet* 1996;98: 452–453.

15. Ernst SC, Circolo A, Davis AE, Gheesling-Mullis K, Fliesler M, Strunk RC. Impaired production of both normal and mutant C1 inhibitor proteins in type I hereditary angioedema with a duplication in exon 8. *J Immunol* 1996;157: 405–410.
16. Busse R, Fleming I. Molecular responses of endothelial tissue to kinins. *Diabetes* 1996;45[Suppl 1]:S8–S13.
17. Gepetti P, Bertrand C, Ricciardolo FL, Nadel JA, Ricciardolo FL. New aspects on the role of kinins in neurogenic inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:843–847.
18. Margolius HS. Kallikreins and kinins. Molecular characteristics and cellular and tissue responses. *Diabetes* 1996;45[Suppl 1]:S14–S19.
19. Margolius HS. Kallikreins and kinins. Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. *Hypertension* 1995;26:221–229.
20. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:679–705.
21. Carmeliet P, Collen D. Gene targeting and gene transfer studies of the biological role of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost* 1995;74:429–436.
22. Altieri DC. Inflammatory cell participation in coagulation. *Semin Cell Biol* 1995;6:269–274.
23. Esmon CT, Fukudome K. Cellular regulation of the protein C pathway. *Semin Cell Biol* 1995;6:259–268.
24. Esmon CT. Inflammation and thrombosis: the impact of inflammation on the protein C anticoagulant pathway. *Haematology* 1995;80[Suppl 2]:49–56.
25. Salgado A, Boveda JL, Monasterio J, et al. Inflammatory mediators and their influence on haemostasis. *Haemostasis* 1994;24:132–138.
26. Benedict CR, Pakala R, Willerson JT. Endothelial-dependent procoagulant and anticoagulant mechanisms. Recent advances in understanding. *Tex Heart Inst J* 1994;21:86–90.
27. Brady HR, Serhan CN. Lipoxins: putative braking signals in host defense, inflammation and hypersensitivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996;5:20–27.
28. Davies P, MacIntyre DE. Prostaglandins and inflammation. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:123–138.
29. Wallace JL, Tigley AW. New insights into prostaglandins and mucosal defense. *Aliment Pharmacol Ther* 1995;9:227–35.
30. Vane JR, Botting RM. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res* 1995;44:1–10.
31. Goetzl EJ, An S, Smith WL. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J* 1995;9:1051–1058.
32. Seibert K, Masferrer J, Zhang Y, et al. Mediation of inflammation by cyclooxygenase-2. *Agents Actions Suppl* 1995;46:41–50.
33. Ashby B. Interactions among prostaglandin receptors. *Receptor* 1994;4:31–32
34. Lam BK, Austen KF. Leukotrienes: biosynthesis, release, and actions. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:139–148.
35. Ford-Hutchinson AW. Regulation of leukotriene biosynthesis. *Cancer Metastasis Rev* 1994:13:257–267.
36. Henderson WR Jr. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med* 1994;121:684–697.
37. Obata T, Yamashita N, Nakagawa T. Leukotriene and thromboxane antagonists. *Clin Rev Allergy* 1994;12:79–93.
38. Busse WW. The role of leukotrienes in asthma and allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 1996;26:868–879.
39. Spector SL. Leukotriene inhibitors and antagonists in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;75:463–470.
40. Dahlen B, Dahlen SE. Leukotrienes as mediators of airway obstruction and inflammation in asthma. *Clin Exp Allergy* 1995;2:50–54.
41. Harris RR, Carter GW, Bell RL, Moore JL, Brooks DW. Clinical activity of leukotriene inhibitors. *Int J Immunopharmacol* 1995;17:147–156.
42. Israel E. Moderating the inflammation of asthma: inhibiting the production or action of products of the 5-lipoxygenase pathway. *Ann Allergy* 1994;72:279–284.
43. Kingsnorth AN. Platelet-activating factor. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 219:28–31.
44. Bussolino F, Camussi G. Platelet-activating factor produced by endothelial cells. A molecule with autocrine and paracrine properties. *Eur J Biochem* 1995;229: 327–337.
45. Pinckard RN, Woodard DS, Showell HJ, Conklyn MJ, Novak MJ, McManus LM. Structural and (patho)physiological diversity of PAF. *Clin Rev Allergy* 1994;12: 329–359.
46. Snyder F. Metabolic processing of PAF. *Clin Rev Allergy* 1994;12:309–327.
47. Zimmerman, GA, Prescott SM, McIntyre TM. Platelet-activating factor: a fluid-phase and cell-associated mediator of inflammation. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. 2nd ed. *Inflammation.* New York: Raven Press, 1992:149–176.
48. Dent G, Ukena D, Chanez P, Sybrecht G, Barnes P. Characterization of PAF receptors on human neutrophils using the specific antagonist, WEB 2086. *FEBS Lett* 1989 244:365–368.
49. Hilger RA, Koller M, Konig W. Inhibition of leukotriene formation and IL-8 release by the PAF-receptor antagonist SM-12502. *Inflammation* 1996;20:57–70.
50. Catalan RE, Martinez AM, Aragones MD, Lombardia M, Garde E. PCA-4248, a PAF receptor antagonist, inhibits PAF-induced phosphoinositide turnover. *Eur J Pharmacol* 1995;290:183–188.
51. Canz MJ, Weg VG, Walsh DT, Williams TJ, Nourshargh S. Differential effects of the PAF receptor antagonist UK-74, 505 on neutrophil and eosinophil accumulation in guinea-pig skin. *Br J Pharmacol* 1994;113:513–521.
52. Yokota Y, Inamura N, Asano M, et al. Effect of FR128998, a novel PAF receptor antagonist on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. *Eur J Pharmacol* 1994;258:239–246.
53. Underwood SL, Lewis SA, Raeburn D. RP 59227, a novel PAF receptor antagonist: effects in guinea pig models of airway hyperreactivity. *Eur J Pharmacol* 1992;210:97–102.
54. Atkinson TP, White MV, Kaliner MA. Histamine and serotonin. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:193–210.
55. MacDonald SM. Histamine-releasing factors. *Curr Opin Immunol* 1996;8: 778–783.
56. Raud J, Thorlacius J, Xie X, Lindbom L, Hedqvist P. Interactions between histamine and leukotrienes in the microcirculation. Aspects of relevance to acute allergic inflammation. *Ann NY Acad Sci* 1994;744:191–198.
57. Greaves MW, Sabroe RA. Histamine: the quintessential mediator. *J Dermatol* 1996;23:735–740.
58. Gothert M, Garbarg M, Hey JA, Schlicker E, Schwartz JC, Levi R. New aspects of the role of histamine in cardiovascular function: identification, characterization and potential pathophysiological importance of H3 receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:558–564.
59. Du Buske LM. Clinical comparison of histamine H1-receptor antagonist drugs. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:S307–S318.
60. Roberts DJ. A preclinical overview of ebastine. Studies on the pharmacological properties of a novel histamine H1 receptor antagonist. *Drugs* 1996;S1:8–14.
61. Nielsen HJ. Histamine-2 receptor antagonists as immunomodulators: new therapeutic views? *Ann Med* 1996;28:107–113.
62. Leurs R, Vollinga RC, Timmerman H. The medicinal chemistry and therapeutic potentials of ligands of the histamine H3 receptor. *Prog Drug Res* 1995;45: 107–165.
63. Leurs R, Smit MJ, Timmerman H. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther* 1995;66:413–463.
64. Zingel V, Leschke C, Schunack W. Developments in histamine H1-receptor agonists. *Prog Drug Res* 1995;44:49–85.
65. Arrang JM, Drutel G, Garbarh M, Ruat M, Traffort E, Schwartz JC. Molecular and functional diversity of histamine receptor subtypes. *Ann NY Acad Sci* 31995; 757:314–323.
66. Arrang JM. Pharmacological properties of histamine receptor subtypes. *Cell Mol Biol* 1994;40:275–281.
67. Cazzola M, Matera MG, D Amato G, Rossi F. Effects of serotonin on airways: recent developments. *Allergy* 1995;50:1–10.
68. Chancellor-Freeland C, Zhu GF, Kage R, Beller DI, Leeman SE, Black PH. Substance P and stress-induced changes in macrophages. *Ann NY Acad Sci* 1995; 771:472–484.
69. Hanesch U. Neuropeptides in dural fine sensory nerve endings—involvement in neurogenic inflammation? *Prog Brain Res* 1996;113:299–317.
70. Reubi JC, Laissue J, Waser B, Horisberger U, Schaer JC. Expression of somatostatin receptors in normal, inflamed and enoplastic human gastrointestinal tissues. *Ann NY Acad Sci* 1994;733:122–137.
71. Said SI. Vasoactive intestinal peptide and nitric oxide: divergent roles in relation to tissue injury. *Ann NY Acad Sci* 1996;805:379–387.
72. Weinstock JV. Vasoactive intestinal peptide regulation of granulomatous inflammation in murine Schistosomiasis mansoni. *Adv Neuroimmunol* 1996;6:95–105.
73. Reichlin S. Neuroendocrine-immune interactions. *N Engl J Med* 1993;329: 1246–1253.
74. Matsumura T, Kugiyama K, Sugiyama S, et al. Neutral endopeptidase 24.11 in neutrophils modulates protective effects of natriuretic peptides against neutrophil-induced endothelial cytotoxicity. *J Clin Invest* 1996;97:2192–2203.
75. Painter RG, Aiken ML. Regulation of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptor recycling by surface membrane neutral endopeptidease-mediated degradation of ligand. *J Leukoc Biol* 1995;58:468–476.
76. Fagny C, Marchant A, De Prez E, Goldman M, Deschodt-Lanckman M. Lipopolysaccharide induced upregulation of neutral endopeptidase 24.11 on human neutrophils: involvement of the CD14 receptor. *Clin Sci* 1995;89:83–89.
77. Denis M. Human monocytes/macrophages: NO or no NO? *J Leukoc Biol* 1994; 55:682–684.
78. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002–2012.
79. Schoedon G, Schneemann M, Walter R, Blau N, Hofer S, Schaffner A. Nitric oxide and infection: another view. *Clin Infect Dis* 1995;21[Suppl 2]:S152–S157.
80. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1995;82:1598–1610.
81. Granger DL, Hibbs JB Jr. High-output nitric oxide: weapon against infection? *Trends Microbiol* 1996;4:46–47.
82. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994;120:227–237.
83. Schneemann M, Schoedon G, Hofer S, Blau N, Guerrero L, Schaffner A. Nitric oxide syntase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis* 1993;167:1358–1363.

84. Denis M. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Myocbacterium avium: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates.* J Leukoc Biol 1991;49:380–382.
85. Hibbs JB, Westenfelder C, Taintor R, et al. Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 1992;89:867–877.
86. Bukrinsky M, Schmidtmayerova H, Zybarth G, Dubrovsky L, Sherry B, Enikolopov G. A critical role of nitric oxide in human immunodeficiency type 1-induced hyperresponsiveness of cultures monocytes. *Mol Med* 1996;2:460–468.
87. Zembala M, Siedlar M, Marcinkiewicz J, Pryjma J. Human monocytes are stimulated for nitric oxide release in vitro by some tumor cells but not by cytokines and lipopolysaccharide. *Eur J Immunol* 1994;24:435–439.
88. Howard OM, Ben-Baruch A, Oppenheim JJ. Chemokines: progress toward identifying molecular targets for therapeutic agents. *Trends Biotechnol* 1996;14:46–51.
89. Murphy PM. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:47–64.
90. Prieschl EE, Kulmburg PA, Baumruker T. The nomenclature of chemokines. *Int Arch Allergy Immunol* 1995:107:475–483.
91. Estrov Z, Kurzrock R, Talpaz M. Interleukin-1 and its inhibitors: implications for disease, biology and therapy. *Cancer Treat Res* 1995;80:51–82.
92. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist. *Nutrition* 1995;11:492–494.
93. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87: 2095–2147.
94. Fantuzzi G, Dinarello CA. The inflammatory response in interleukin-1 beta deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. *J Leukoc Biol* 1996;59:489–493.
95. Saklatvala J. Intracellular signalling mechanisms of interleukin 1 and tumour necrosis factor: possible targets for therapy. *Br Med Bull* 1995;51:402–418.
96. Kupper TS, Groves RW. The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 1995;105:62S–66S.
97. Burger D, Dayer JM. Inhibitory cytokines and cytokine inhibitors. *Neurology* 1995;45:S39–S43.
98. Dinarello CA. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw* 1994;5:517–531.
99. van der Meer JW, Vogels MT, Kullberg BJ. Interleukin-1 and related proinflammatory cytokines in the treatment of bacterial infections in neutropenic and non-neutropenic animals. *Biotherapy* 1994;7:161–167.
100. Mantovani A, Muzio M, Ghezzi P, Colotta F, Introna M. Negative regulators of the interleukin-1 system: receptor antagonists and a decoy receptor. *Int J Clin Lab Res* 1996;26:7–14.
101. Lennard AC. Interleukin-1 receptor antagonist. *Crit Rev Immunol* 1995;15: 77–105.
102. Kopf M, Le Gros G, Coyle AJ, Kosco-Vilbois M, Brombacher F. Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6 deficient mice. *Immunol Rev* 1995;148:45–69.
103. Puri RK. Structure and function of interleukin-4 and its receptor. *Cancer Treat Res* 1995;80:143–185.
104. Schroeder JT, Kagey-Sobotka A, MacGlashan DW, Lichtenstein LM. The interaction of cytokines with human basophils and mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:79–81.
105. Tepper RI. The anti-tumor and proinflammatory actions of IL-4. *Res Immunol* 1993;144:633–637.
106. Ryan JJ, McReynolds LJ, Keegan A, et al. Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor. *Immunity* 1996;4:123–132.
107. Pernis A, Witthuhn B, Keegan AD, et al. Interleukin 4 signals through two related pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7971–7975.
108. Keegan AD, Johnston JA, Tortolani PJ, et al. Similarities and differences in signal transduction by interleukin 4 and interleukin 13: analysis of Janus kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7681–7685.
109. Sehgal PB. Interleukin-6-type cytokines in vivo: regulated bioavailability. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;213:238–247.
110. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 and the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg* 1996;224: 647–664.
111. Baatout S. Interleukin-6 and megakaryocytopoeisis: an update. *Ann Hematol* 1996;73:157–162.
112. Paquet P, Pierard GE. Interleukin-6 and the skin. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109:308–317.
113. Luheshi G, Rothwell N. Cytokines and fever. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109:301–307.
114. Harada A, Mukaida N, Matsushima K. Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases. *Mol Med Today* 1996;2: 482–489.
115. Hoch RC, Schraufstatter IU, Cochrane CG. In vivo, in vitro, and molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors. *J Lab Clin Med* 1996; 128:134–145.
116. Kunkel SL, Lukacs N, Streiter RM. Chemokines and their role in human disease. *Agents Actions Suppl* 1995;46:11–22.
117. Baggiolini M, Loetscher P, Moser B. Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol* 1995;17:103–108.
118. Ben-Baruch A, Michiel DF, Oppenheim JJ. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem* 1995;270:11703–11706.
119. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matusushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 1994;56:559–564.
120. Horuk R. The interleukin-8-receptor family: from chemokines to malaria. *Immunol Today* 1994;15:169–174.
121. Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of a complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 1991;253:1280–1283.
122. Lynch DH. The role of FasL and TNF in the homeostatic regulation of immune responses. *Adv Exp Med Biol* 1996;406:135–138.
123. Barbara JA, van Ostade X, Lopez A. Tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha): the good, the bad and the potentially very effective. *Immunol Cell Biol* 1996;74: 434–443.
124. Riches DW, Chan ED, Winston BW. TNF-alpha-induced regulation and signalling in macrophages. *Immunobiology* 1996;195:477–490.
125. Douni E, Akassoglou K, Alexopoulou L, et al. Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. *J Inflamm* 1995-6;47:27–38.
126. Gruss HJ, Duyster J, Hermann F. Structural and biological features of the TNF receptor and TNF ligand superfamilies. *Ann Oncol* 1996;4:19–26.
127. Cosman D. A family of ligands for the TNF receptor superfamily. *Stem Cells* 1994;12:440–455.
128. Beutler B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Invest Med* 1995;43:227–235.
129. Cleveland JL, Ihle JN. Contenders in the FasL/TNF death signalling. *Cell* 1995; 81:479–482.
130. Ware CF, VanArsdale S, VanArsdale TL. Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families. *J Cell Biochem* 1996;60:47–55.
131. Baker SJ, Reddy EP. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 1996;12:1–9.
132. Young HA. Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 1996;16:563–568.
133. Billiau A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol* 1996;62:61–130.
134. Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol* 1995;58:373–381.
135. Gallin JI, Farber JM, Holland SM, Nutman TB. Interferon-gamma in the management of infectious diseases. *Ann Intern Med* 1995;123:216–224.
136. Appelberg R. Protective role of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in mycobacterium tuberculosis and M. avium infections. *Immunobiology* 1994;191:520–525.
137. Vilcek J, Oliveira IC. Recent progress in the elucidation of interferon-gamma actions: molecular biology and biological functions. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;104:311–316.
138. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996; 335:1941–1949.
139. Holland SM, Gerstberger SM, Pitha-Rowe IF, et al. Interferon gamma receptor deficiency in disseminated mycobacterium avium complex (DMAC) infection. *J Invest Med* 1997;45:199A.
140. Brown CC, Malech HL, Gallin JI. Intravenous endotoxin recruits distinct subset of human neutrophils, defined by monoclonal antibody 3108, from bone marrow to the peripheral circulation. *Cell Immunol* 1989;123:294–306.
141. Zimmerli W, Gallin JI. Monocytes accumulate on Rebuck skin window coverslips but not in skin chamber fluid. *J Immunol Methods* 1987;96:11–17.
142. Kuhns DB, DeCarlo E, Hawk DM, Gallin JI. Dynamics of the cellular and humoral components of the inflammatory response elicited in skin blisters in human. *J Clin Invest* 1992;89:1734–1740.
143. Martich GD, Danner RL, Ceska M, Suffredini AF. Detection of interleukin-8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effects of anti-inflammatory agents. *J Exp Med* 1991;173:1021–1024.
144. Kishimoto TK, Anderson DC. The role of integrins in inflammation. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:353–406.
145. Kuhns DB, Long Priel DA, Gallin JI. Endotoxin and IL-1 hyporesponsiveness in a patient with recurrent bacterial infections. *J Immunol* 1997;158:3959–3964.
146. Haziot A, Tsuberi BZ, Goyert SM. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor alpha in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 1993;150:5556–5565.
147. Frey EA, Miller DS, Jahr TG, et al. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1992;176:1665–1671.
148. Muller JM, Loms Ziegler-Heitbrock HW, Bauerle PA. Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology* 1993;187:233–256.
149. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 1994;56:672–686.
150. Edwards SW. *Biochemistry and physiology of the neutrophil.* Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
151. Domachowske JB, Malech HL. Phagocytes. In: Rich RR, Fleisher TA, Schwartz BD, Shearer WT, Strober W, eds. *Clinical immunology: principles and practice.*

BD. Shearer WT, Strober W, eds. *Clinical immunology: principles and practice.* St. Louis: Mosby–Year Book, 1996:392–407.
152. Bainton DF. Developmental biology of neutrophils and eosinophils. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:303–324.
153. Sievers EL, Dale DC. Non-malignant neutropenia. *Blood Rev* 1996;10:95–100.
154. Kim SK, Demetri GD. Chemotherapy and neutropenia. *Hematol Oncol Clin North Am* 196;10:377–395.
155. Bernini JC. Diagnosis and management of chronic neutropenia during childhood. *Pediatr Clin North Am* 1996;43:773–792.
156. Welte K, Dale D. Pathophysiology and treatment of severe chronic neutropenia. *Ann Hematol* 1996;72:158–165.
157. Souid AK. Congenital cyclic neutropenia. *Clin Pediatr* 1995;34:151–155.
158. Cohen MS. Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. *Clin Infect Dis* 1994:18[Suppl 2]:S170–S179.
159. Downey GP, Fukushima T, Fialkow L, Waddell TK. Intracellular signaling in neutrophil priming and activation. *Semin Cell Biol* 1995;6:345–356.
160. Sengelov H. Complement receptors in neutrophils. *Crit Rev Immunol* 1995;15: 107–131.
161. Edwards SW. Cell signalling by integrins and immunoglobulin receptors in primed neutrophils. *Trends Biochem Sci* 1995;20:362–367.
162. Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 1994;12:593–633.
163. Wells TN, Lusti-Narasimhan M, Chung CW, et al. The molecular basis of selectivity between CC and CXC chemokines: the possibility of chemokine antagonists as anti-inflammatory agents. *Ann NY Acad Sci* 1996;796:245–256.
164. Hoch RC, Schraufstatter IU, Cochrane CG. In vivo, in vitro, and molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors. *J Lab Clin Med* 1996; 128:134–145.
165. Symon FA, Wardlaw AJ. Selectins and their counter receptors: a bitter sweet attraction. *Thorax* 1996;51:1155–1157.
166. Crockett-Torabi E, Fantone JC. The selectins: insights into selectin-induced intracellular signalling in leukocytes. *Immunol Res* 1995;14:237–251.
167. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259–3287.
168. Vestweber D. Ligand-specificity of the selectins. *J Cell Biochem* 1996;61: 585–591.
169. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995;9:866–873.
170. Rosen SD, Bertozzi CR. The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:663–673.
171. McEver RP. Role of selectins in leukocyte adhesion to platelets and endothelium. *Ann NY Acad Sci* 1994;714:185–189.
172. McEver RP. Selectins. *Curr Opin Immunol* 1994;6:75–84.
173. Furie B, Furie BC. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand PSGL-1. *Thromb Haemost* 1995;74:224–227.
174. Gille J, Swerlick RA. Integrins: role in cell adhesion and communication. *Ann NY Acad Sci* 1996;797:93–106.
175. Mazzone A, Ricevuti G. Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica* 1995;80:161–175.
176. Edwards SW. Cell signalling by integrins and immunoglobulin receptors in primed neutrophils. *Trends Biochem Sci* 1995;20:362–367.
177. Luscinskas FW, Lawler J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J* 1994;8:929–938.
178. Kishimoto TK, Rothlein R. Integrins, ICAMs and selectins: role and regulation of adhesion molecules in neutrophil recruitment to inflammatory sites. *Adv Pharmacol* 1994;25:117–169.
179. Patarroyo M. Adhesion molecules mediating recruitment of monocytes to inflamed tissue. *Immunobiology* 1994;191:474–477.
180. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84:2068–2101.
181. van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 1996;74:13–33.
182. Anderson DC, Schmalsteig FC, Finegold MJ, et al. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis* 1988; 152:668–689.
183. Anderson DC, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency and inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150, 95 glycoproteins. *Ann Rev Med* 1987;175–194.
184. Kishimoto TK, Hollander N, Roberts TM, Anderson DC, Springer TA. Heterogeneous mutations in the beta subunit common to the LFA-1, Mac-1 and p150, 95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency. *Cell* 1987;50:193–202.
185. Etzioni A, Frydman M, Pollack S, et al. Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N Engl J Med* 1992;327: 1789–1792.
186. Etzioni A, Phillips LM, Paulson JC, Harlan JM. Leukocyte adhesion deficiency (LAD) II. *Ciba Found Symp* 1995:189:51–58.
187. Brown SS. Structure and function of profilin. *Cell Motil Cytoskeleton* 1990;17: 71–75.
188. Southwick FS, Stossel TP. Contractile proteins in leukocyte function. *Semin Hematol* 1984;30:305–310.
189. Stossel TP. The mechanical responses of white blood cells. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:459–476.
190. Wright SD. Receptors for complement and the biology of phagocytosis. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:477–496.
191. Allen LA, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol* 1996; 8:36–40.
192. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997;88:553–560.
193. Lonnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr* 1995;15:93–110.
194. Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, et al. Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nat Genet* 1996;14:307–311.
195. Barbosa MD, Nguyen QA, Tchernev VT, et al. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature* 1996;382:262–265.
196. Barrat FJ, Auloge L, Pastural E, et al. Genetic and physical mapping of the Chediak-Higashi syndrome on chromosome 1q42-43. *Am J Hum Genet* 1996;59: 625–632.
197. Gallin JI. Neutrophil specific granule deficiency. *Annu Rev Med* 1985;36: 263–274.
198. Rosenberg HF, Gallin JI. Neutrophil specific granule deficiency includes eosinophils. *Blood* 1993;82:268–273.
199. Lomax KJ, Gallin JI, Rotrosen D, et al. Selective defect in myeloid cell lactoferrin gene expression in neutrophil specific granule deficiency. *J Clin Invest* 1989; 83:514–519.
200. Parry MF, Root RK, Metcalf JA, Delaney KK, Kaplow LS, Richar WJ. Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 1981;95:293–301.
201. Nauseef WM, Brigham S, Cogley M. Hereditary myeloperoxidase deficiency due to a missense mutation of arginine 569 to tryptophan. *J Biol Chem* 1994;269: 1212–1216.
202. Nauseef WM, Cogley M, McCormack S. Effect of R569W missense mutation on the biosynthesis of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 1996;271:9546–9549.
203. DeLeo FR, Quinn MT. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of the oxidase proteins. *J Leukoc Biol* 1996;60:677–691.
204. Leusen JH, Verhoeven AJ, Roos D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family. *J Lab Clin Med* 1996;128: 461–476.
205. Wientjes FB, Segal AW. NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin Cell Biol* 1995;6:357–365.
206. Henderson LM, Chappel JB. NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1996;1273:87–107.
207. Segal AW. The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Mol Med Today* 1996;2:129–135.
208. Jones OT. The regulation of superoxide production by the NADPH oxidase of neutrophils and other mammalian cells. *Bioessays* 1994;16:919–923.
209. Bokoch GM. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:212–218.
210. Mardiney MM, Jackson SH, Spratt SK, Li F, Holland SM, Malech HL. Enhanced host defense after gene transfer in the murine p47-phox-deficient model of chronic granulomatous disease. *Blood* 1997;89:2268–2275.
211. Lloyd AR, Oppenheim JJ. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today* 1992;13:169–172.
212. Granelli-Piperno A, Vassalli JD, Reich E. Secretion of plasminogen activator by human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1977;149:284–289.
213. Shirafuji N, Matsuda S, Ogura H, et al. Granulocyte colony-stimulating factor stimulates human mature neutrophilic granulocytes to produce interferon-alpha. *Blood* 1990;75:17–19.
214. Tiku K, Tiku ML, Skosey JL. Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* 1986;136:3677–3685.
215. Hughes V, Humphreys JM, Edwards SW. Protein synthesis is activated in primed neutrophils: a possible role in inflammation. *Biosci Rep* 1987;7:881–889.
216. Kuhns DB, Gallin JI. Increased cell-associated IL-8 in human exudative and A23187-treated peripheral blood neutrophils. *J Immunol* 1995;154:6556–6662.
217. van Furth R. Development and distribution of mononuclear phagocytes. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:325–340.
218. Adams DO, Hamilton TA. Macrophages as destructive cells in host defense. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:637–662.
219. Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:655–677.
220. Cavaillon JM. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother* 1994;48: 445–453.
221. Thepen T, Kraal G, Holt PG. The role of alveolar macrophages in regulation of lung inflammation. *Ann NY Acad Sci* 1994;725:200–206.
222. Seljelid R, Busund LT. The biology of macrophages: II. Inflammation and

tumors. *Eur J Haematol* 1994;52:1–12.

223. Nielsen BW, Mukaida N, Matsushima K, Kasahara T. Macrophages as producers of chemotactic proinflammatory cytokines. *Immunol Ser* 1994;60:131–142.
224. Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. Eosinophils. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992: 663–700.
225. Spry CJF. *Eosinophils: a comprehensive review and guide to the scientific and medical literature.* Oxford: Oxford University Press, 1988.
226. Martin LB, Kita H, Leiferman KM, Gleich GJ. Eosinophils in allergy: role in disease, degranulation and cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;109: 207–215.
227. Makino S, Fukuda T. *Eosinophils: biological and clinical aspects.* Boca Raton, FL: CRC Press, 1993.
228. Wardlaw AJ. Eosinophils in the 1990s: new perspectives on their role in health and disease. *Postgrad Med J* 1994;70:536–552.
229. Makino S, Fukuda T. Eosinophils and allergy in asthma. *Allergy Proc* 1995;16: 13–21.
230. Seminario MC, Gleich GJ. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Immunol* 1994;6:860–864.
231. Reed CE. The importance of eosinophils in the immunology of asthma and allergic disease. *Ann Allergy* 1994;72:376–380.
232. Weksler BB. Platelets. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:727–746.
233. de Sousa JR, Palma-Carlos AG. Platelets and hypersensitivity. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1995;5:12–17.
234. Herd CM, Page CP. Pulmonary immune cells in health and disease: platelets. *Eur Respir J* 1994;7:1145–1160.
235. Nash GB. Adhesion between neutrophils and platelets: a modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thromb Res* 1994;74:S3–S11.
236. Tonnel AB, Gosset P, Molet S, Tillie-Leblond I, Jeannin P, Joseph M. Interactions between endothelial cells and effector cells in allergic inflammation. *Ann NY Acad Sci* 1996;796:9–20.
237. Kubes P, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells. *Cardiovasc Res* 1996;32:699–708.
238. Malik AB, Lo SK. Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation. *Pharmacol Rev* 1996;48:213–229.
239. Luscinskas FW, Gimbrone MA Jr. Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment. *Annu Rev Med* 1996;47:413–421.
240. Garcia JG, Pavalko FM, Patterson CE. Vascular endothelial cell activation and permeability responses to thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995;6:609–626.
241. Chen CC, Manning AM. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: a dominant role for NF-kappa B. *Agents Actions Suppl* 1995;47: 135–141.
242. Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med* 1994;45:361–378.
243. Vane JR, Botting RM. Mediators from the endothelial cell and their participation in inflammation. *Int J Tissue React* 1994;16:19–49.
244. Varani J, Ward PA. Mechanisms of neutrophil-dependent and neutrophil-independent endothelial cell injury. *Biol Signals* 1994;3:1–14.
245. Korthuis, RJ, Anderson DC, Granger DN. Role of neutrophil-endothelial cell adhesion in inflammatory disorders. *J Crit Care* 1994;9:47–71.
246. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation. Modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994;55:662–675.
247. Benedict CR, Pakala R, Willerson JT. Endothelial-dependent procoagulant and anti-coagulant mechanisms. Recent advances in understanding. *Tex Heart Inst J* 1994;21:86–90.
248. Jarrett EEE, Bazin H. Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection. *Nature* 1974;251:541–543.
249. Jarrett E. Stimuli for the production and control of IgE in rats. *Immunol Rev* 1978;41:52–76.
250. Hussain R, Ottesen EA. IgE responses in human filiariasis. 3. Specificities of IgE and IgG antibodies compared by immunoblot analysis. *J Immunol* 1985;135: 1415–1420.
251. Anderson GP. Resolution of chronic inflammation by therapeutic induction of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci* 1996;17:438–442.
252. Savill J, Haslett C. Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol* 1995;6:385–393.
253. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrsion DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1995;6:3–16.
254. Savill J. Apoptosis in disease. *Eur J Clin Invest* 1994;24:715–723.
255. Haslett C, Savill JS, Whyte MK, Stern M, Dransfield I, Meagher LC. Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* 1994;345:327–333.
256. Simon HU, Yousefi S, Blaser K. Tyrosine phosphorylation regulated activation and inhibition of apoptosis in human eosinophils and neutrophils. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:338–339.
257. Liles WC, Klebanoff SJ. Regulation of apoptosis in neutrophils—Fas track to death? *J Immunol* 1995;155:3289–3291.
258. Cox G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol* 1996;27:L566–L571.
259. Gelrud AK, Carper HT, Mandell GL. Interaction of tumor necrosis factor-alpha and granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil apoptosis, receptor expression, and bactericidal function. *Proc Assoc Am Physicians* 1996;108: 455–456.
260. Gon S, Gatanaga T, Sendo F. Involvement of two types of TNF receptor in TNF-alpha induced neutrophil apoptosis. *Microbiol Immunol* 1996;40:463–465.
261. Hebert MJ, Takano T, Holthofer H, Brady HR. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. *J Immunol* 1996;157:3105–3115.
262. Oishi K, Machida K. Inhibition of neutrophil apoptosis by antioxidants in culture medium. *Scand J Immunol* 1997;45:21–27.
263. Abramson SL, Gallin JI. Interleukin-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1990;144:625–630.
264. Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw* 1996;7:363–374.
265. Kolodziejczyk SM, Hall BK. Signal transduction and TGF-beta superfamily receptors. *Biochem Cell Biol* 1996;74:299–314.
266. Markowitz SD, Roberts AB. Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:93–102.
267. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994;8:133–146.
268. Serra R, Moses HL. Tumor suppressor genes in the TGF-beta signaling pathway? *Nat Med* 1996;2:390–391.
269. Derynck R. TGF-beta-receptor-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 1994; 19:548–553.
270. Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, et al. Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *J Clin Invest* 1996;98:2109–2119.
271. Dang H, Geiser AG, Letterio JJ, et al. SLE-like autoantibodies and Sjogren's syndrome-like lymphoproliferation in TGF-beta knockout mice. *J Immunol* 1995; 155:3205–3212.
272. Moore KW, O Garra A, deWaal Malefyt R, Viera P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165–190.
273. Hoiden I, Moller G. CD8+ cells are the main producers of IL-10 and IFN gamma after superantigen stimulation. *Scand J Immunol* 1996;44:501–505.
274. Klein SC, Kube D, Abts H, Diehl V, Tesch H. Promotion of IL-8, IL-10, TNF-alpha and TNF-beta production by EBV infection. *Leuk Res* 1996;20:633–636.
275. Schuitemaker H. IL-4 and IL-10 as potent inhbitors of HIV-1 replication in macrophages in vitro. A role for cytokines in the in vivo virus host range? *Res Immunol* 1994;145:588–592.
276. Mosmann TR. Properties and functions of interleukin 10. *Adv Immunol* 1994;56: 1–26.
277. McKenzie AN, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulated human monocyte and B-cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3735–3739.
278. de Vries JE, Punnonen J, Cocks BG, de Waal Malefyt R, Aversa G. Regulation of the human IgE response by IL-4 and IL-13. *Res Immunol* 1993;144:597–601.
279. Mossman T. Cytokines and immune regulation. In: Rich RR, Fleisher TA, Schwartz BD, Shearer WT, Strober W, eds. *Clinical immunology: principles and practice.* St. Louis: Mosby-Year Book, 1996:217–230.
280. Sternberg EM. Neuroendocrine factors in susceptibility to inflammatory disease: focus on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Horm Res* 1995;43: 159–161.
281. Buckingham JC, Loxley HD, Christian HC, Philip JG. Activation of the HPA axis by immune insults: roles and interactions of cytokines, eicosanoids and glucocorticoids. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54:285–298.
282. Derjik R, Sternberg EM. Corticosteroid action and neuroendocrine-immune interactions. *Ann NY Acad Sci* 1994;746:33–41.
283. Cunningham ET, de Souza EB. Interleukin-1 receptors in the brain and endocrine system. *Immunol Today* 1992;14:171–173.
284. Munck A, Guyre PM. Glucocorticoids and immune function. In: Ader R, Felton DL, Cohen N, eds. *Psychoneuroimmunology.* New York: Academic Press, 1991: 447–474.
285. Martin P. Wound healing— aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276:75–81.
286. Davidson JM. Wound repair. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:809–820.
287. Folkman J, Brem H. Angiogenesis and inflammation. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1992: 821–840.
288. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Kunkel SL. The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. *Shock* 1995;4:155–160.
289. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H. Angiogenesis: an update. *Histol Histopathol* 1994;9:807–843.
290. Boros DL. The role of cytokines in the formation of the schistosome egg granuloma. *Immunobiology* 1994;191:441–450.
291. Wynn TA, Cheever AW. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Curr Opin Immunol* 1995;7:505–511.
292. Stadecker M. The shrinking schistosomal egg granuloma: how accessory cells control T cell-mediated pathology. *Exp Parasitol* 1994;79:198–201.
293. Mornex JF, Leroux C, Greenland T, Ecochard D. From granuloma to fibrosis in interstitital lung diseases: molecular and cellular interactions. *Eur Respir J 1994;*

294. Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW. Th1 and Th2 responses regulate experimental lung granuloma development. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1996;13:120–128.
295. Hansch HC, Smith DA, Mielke ME, Hahn H, Bancroft GJ, Ehlers S. Mechanisms of granuloma formation in murine Mycobacterium avium infection: the contribution of CD4+ T cells. *Int Immunol* 1996;8:1299–1310.
296. Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, Lincoln P, Kunkel SL. Cytokine function during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Local and regional participation of IFN-gamma, IL-10, and TNF. *J Immunol* 1995;154:5969–5976.
297. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor kappa-B—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066–1071.
298. Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 1993;14:436–441.
299. Saatcioglu F, Claret FX, Karin M. Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. *Semin Cancer Biol* 1994;5:347–359.
300. Rosenberg HF, Gallin JI. Neutrophils. In: Frank MM, Austen KF, Claman HN, Unanue ER, eds. *Samter's immunologic diseases.* 5th ed. Boston: Little, Brown and Company, 1995:247–250.
301. Leto TL, Adams AG, deMendez I. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10650–10654.
302. deMendez I, Garrett MC, Adams AG, Leto TL. The role of p67-phox SH3 domains in assembly of the NADPH oxidase system. *J Biol Chem* 1994;269: 16326–16332.
303. Sathyamoorthy M, deMendez I, Adams AG, Leto TL. P40 phox down-regulated NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem* 1997;272:9141–9146.
304. Jackson SH, Gallin JI, Holland SM. The p47 phox mouse knockout model of chronic granulomatous disease. *J Exp Med* 1995;182:751–758.
305. Marks AR. Cellular functions of immunophilins. *Physiol Rev* 1996;76:631–649.
306. Yocum DE. Cyclosporine, FK-506, rapamycin and other immunomodulators. *Rheum Dis Clin North Am* 1996;22:133–154.
307. Lee JI, Canafax DM. Cyclosporine pharmacology. *Transplant Proc* 1996;28: 2156–2158.
308. Khanna A, Li B, Sharma VK, Suthanthiran M. Immunoregulatory and fibrogenic activities of cyclosporine: a unifying hypothesis based on transforming growth factor-beta expression. *Transplant Proc* 1996;28:2015–2018.
309. Stiller CR. An overview of the first decade of cyclosporine. *Transplant Proc* 1996;28:2005–2012.
310. High KP. The anitmicrobial activities of cyclosporine, FK-506 and rapamycin. *Transplantation* 1994;57:1689–1700.
311. Emery P, van de Putte LB. New perspectives on controlling progression of severe rheumatoid arthritis—a summary of the potential role of cyclosporin. *Br J Rheumatol* 1996;35[Suppl 2]:1–3.
312. Yocum DE. Combination therapy with cyclosporin in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1996;35[Suppl 2]:19–23.
313. Forre O. Cyclosporine in rheumatoid arthritis: an overview. *Clin Rheumatol* 1995;14[Suppl 2]:33–36.
314. Yocum DE, Torley H. Cyclosporine in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1995;21:835–844.
316. Weckmann AL, Alcocer-Varela J. Cytokine inhbitors in autoimmune disease. *Semin Arthritis Rheum* 1996;26:539–557.
317. Feldmann M, Brennan FM, Williams RO, Elliott MJ, Maini RN. Cytokine expression and networks in rheumatoid arthritis: rationale for anti-TNF alpha therpay and its mechanism of action. *J Inflamm* 1995-6;47:90–96.
318. Sasayama S, Matsumori A. Vesnarinone: a potential cytokine inhbitor. *J Card Fail* 1996;2:251–258.
319. Maini RN. A perspective on anti-cytokine and anti-T cell-directed therapies in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13[Suppl 12]:S35–S40.
320. Bartalena L, Marcocci C, Pinchera A. cytokine antagonists: new ideas for the management of Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81: 446–448.
321. Ferrara JL. Cytokine inhibitors and graft-versus-host disease. *Ann NY Acad Sci* 1995;770:227–236.
322. Richardson CE, Emery P. Innovative treatment approaches for rheumatoid arthritis. New cyclo-oxygenase and cytokine inhibitors. *Baillieres Clin Rheumatol* 1995;9:731–758.
323. Elliott MJ, Maini RN. Anti-cytokine therapy in rheumatoid arthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 1995;9:633–652.
324. Schwiebert LA, Beck LA, Stellato C, Bickel CA, Bochner BS, Schleimer RP. Glucocorticosteroid inhibition of cytokine production: relevance to antiallergic actions. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:143–152.
325. Feldmann M, Brennan FM, Elliott MJ, Williams RO, Maini RN. TNF-alpha is an effective therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci* 1995; 766:272–278.
326. Border WA, Noble NA, Ketteler M. TGF-beta: a cytokine mediator of glomerulosclerosis and a target for therapeutic intervention. *Kidney Int Suppl* 1995;49: S59–S61.
327. Devos R, Plaetinck G, Cornelis S, Guisez Y, van der Heyden J, Tavernier J. Interleukin-5 and its receptor: a drug target for eosinophilia associated with chronic allergic disease. *J Leukoc Biol* 1995;57:813–819.
328. Firestein GS. Cytokine networks in rheumatoid arthritis: implication for therapy. *Agents Actions Suppl* 1995;47:37–51.
329. Klein B, Brailly H. Cytokine-binding proteins: stimulating antagonists. *Immunol Today* 1995;16:216–220.
330. Tartour E, Lee RS, Fridman WH. Anti-cytokines: promising tools for diagnosis and immunotherapy. *Biomed Pharmacother* 1994;48:417–424.
331. Enayati P, Fong Y. Cytokine neutralizing strategies in experimental sepsis. *Prog Clin Biol Res* 1994;388:295–306.
332. Kinoshita T. Protection of host from its own complement by membrane-bound complement inhibitors: C3 convertase inhibitors vs. membrane attack complex inhibitors. *Res Immunol* 1996;147:100–103.
333. Mouthon L, Kaveri SV, Spalter SH, et al. Mechanisms of action of intravenous immune globulin in immune-mediated diseases. *Clin Exp* Immunol 1996; 104[Suppl 1]:3–9.
334. Ryan US. Complement inhibitory therapeutics and xenotransplantation. *Nat Med* 1995;1:967–968.
335. Smiley JD, Talbert MG. Southwestern Internal Medicine Conference: high-dose intravenous gamma globulin therapy: how does it work? *Am J Med Sci* 1995;309:295–303.
336. Corral LG, Muller GW, Moreira AL, et al. Selection of novel analogs of thalidomide with enhanced tumor necrosis factor alpha inhibitory activity. *Mol Med* 1996;2:506–515.
337. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes: IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 1995; 270:9558–9563.
338. Pahl HL, Krauss B, Schulze-Osthoff K, et al. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappa B. *J Exp Med* 1996;183:1829–1834.

第七篇　临床免疫的机制基础

第33章　系统性自身免疫

Philip L. Cohen[①]

由于以下两方面的原因，系统性自身免疫病的研究引起许多免疫学家兴趣：第一，人类系统性自身免疫病是遭受痛苦和缩短生命的主要病因之一；第二，针对各种自身抗原的自身反应性的紊乱发生机制将是理解自我、非我识别基础的关键。 *1067*

系统性自身免疫由自身抗体和自身反应性T细胞两者介导。人类自身免疫血清及结合自身抗原单克隆抗体的获得，使人们对自身抗体的本质及它们与抗原的结合有了深入的了解。研究自身抗体形成的细胞学基础，尤其是辅助性T细胞参与这些应答的机制是非常困难的。在一定程度上反映了体内研究的困难性，相对于血清学而言，尤其困难的是细胞学的研究以及动物模型的缺乏。尽管下面的讨论似乎表明反应性T细

① P.L.Cohen: Departments of Medicine and Microbiology/Immunology, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599-7280.

胞介导的直接损伤是许多自身免疫疾病的一个重要部分，但目前对 T 细胞介导系统性自身免疫病的特异性和调节还了解不多。

有众多数量的病因学来解释系统性自身免疫病。似乎不可能用一个单一的解释就是以说明本章描述的各种不同的现象，然而尽管激发因素不同，它们有自身反应性免疫应答的共性。本讨论涉及到的自身免疫病的总体机制可能不适用于所有的疾病或模型，但本章倾向于将系统性自身反应放到基础免疫学的背景中，集中讨论关于机制的未来构想。

总体概述

系统性自身免疫，包括自身反应性不局限于单个器官或器官系统的自身免疫状况。这一定义将包括系统性红斑狼疮（SLE）、系统性硬化（硬皮病）、类风湿性关节炎（RA）、慢性移植物抗宿主病（GVHD）及各种形式的血管炎，难以给出真正令人满意的定义。证实自身免疫是病因很困难，需要通过较多抗体或淋巴细胞复制疾病的表现。由于这种资料难以收集，一个疾病是自身免疫的推断常基于自身抗体的出现和抗体、补体、T 淋巴细胞在病变组织的定位。

1068

除人类疾病外，有一些动物模型对验证关于人类疾病的假设及获得对疾病基础机制的了解是有帮助的；其中一些模型可能就是人类疾病的再现。

系统性自身免疫病的某些特征可作为病因学的线索，首先是它们在人与人之间（甚至近交系的小鼠之间）变化多端的病程，以及他们随着疾病严重性的进展而逐渐衰弱的倾向。在一个单一的个体，疾病的活动性可从威胁生命到无症状，甚至无需临床干预，这提示通过某种操作可以下调自身免疫反应的程度。

多数系统性自身疾病情况的第二个特征是女性高度的易感性[1]，例如女性患 SLE 的可能性至少高出 10 倍[2]，在多数动物模型自身免疫病中，雌性占多数，仅有少数例外。理解女性倾向于发展成自身免疫病机制的努力尚未取得完全成功，但激素的影响起主要作用，已有内分泌学异常的报道[3,4]。

自身免疫病的第三个特征是重叠性，在单个患者出现多种系统性自身免疫病的特征[5]。这导致分类学的混乱。例如，有一种称为混和性结缔组织病的自身免疫病患者，具有 SLE、硬皮病和多肌炎的特征[6]。

似乎自相矛盾的是，患自身免疫病的人和动物尽管存在高水平免疫球蛋白和自身抗体，但对外源性抗原免疫的应答微弱，好像他们的免疫系统预先被针对自身抗原的应答占据[7]。细胞介导的免疫尤其被削弱[8]，可能反映了 SLE 淋巴细胞减少的特征，但也见于其他疾病[9]。临床上抑制自身抗体形成的治疗反而进一步加剧这种免疫抑制，免疫抑制导致的感染是系统性自身免疫病患者不幸的常见特征[10]。

历史回顾

对于早期的免疫学家，存在自身抗体或自身反应细胞的概念遇到了相当的抵制。例如曾观察到，用混和的自身和外源红细胞免疫动物，仅产生了针对来自其他个体红细胞的抗体。Ehrlich 和其他人提出，自身抗体形成的后果是如此之严重（恐怖的自身毒性）以致于免疫系统严格地禁止它产生[11]。虽然早期 Donath 的研究观察到抗自身凝集素的明显证据，但接受自身抗体能够导致免疫损伤的概念起自 Harrington 在人特发性血小板减少性紫癜（ITP）上进行的令人信服的实验[1,2]，其中转输患者血清的办法能够在研究者及其同事中再现 ITP 患者的低血小板计数；此外还有来自 Rose 和 Witebsky 在兔实验性甲状腺炎中的开创性工作[13]。那个时代的智慧人物 F.M.Burnet 演绎出了克隆选择学说，推测了自身反应性抗体产生细胞的消失[14]。

非病理性系统性自身免疫耐受和自身免疫病

自身免疫病一定要区别于多数情况下免疫系统的非病理性的自身识别。这包括已经分离出的自身Ⅱ类

反应性 T 淋巴细胞[15]和正常个体低水平的、针对某些自身蛋白的自身抗体[16]。像 ELISA 这样的结合实验的应用使自身抗体的定义进一步复杂化,因为低滴度、低亲和力的自身抗体能被很迅速地用任何一种足够敏感的实验系统在正常个体血液中检测到。尽管阈值效价的设置可以排除低滴度的阳性者,抗核抗体和类风湿因子(RF)也在少数但有显著意义数目的正常人群存在[17],而且更常见于上了年纪的和住院患者中[18]。

针对一些自身蛋白的自身抗体可能具有重要的生理学功能。RF,针对 IgG 的抗体,很好地说明了这一点。RF 主要是 IgM,大部分产生 IgM 的淋巴细胞表达这种特异性[19]。用外源性抗原免疫后 RF 的水平迅速上升[20,21],抗体通常在慢性感染患者的血清中观察到[22]。RF 的作用可能是消除免疫复合物,它与单价 IgG 的亲和力较低,但与复合物中存在的多价 IgG 的亲和力较高。RF 与复合物的结合似乎可通过单核 - 吞噬细胞系统加速它们从循环中的去除。

产生 RF 的 B 细胞也通过结合抗原 - 抗体复合物在呈递外源性抗原中发挥重要功能[23]。表达人 RF 的转基因小鼠产生较少的循环 RF,它们产生 RF 的 B 细胞位于初级 B 细胞滤泡和二级脾滤泡的外膜区[24]。这些 RF 转基因小鼠的脾细胞高效率地呈递人 IgG 抗破伤风类毒素免疫复合物。T 细胞辅助的结果可能对扩大免疫应答有帮助,其随后的下调可能与许多 RF 产生细胞的缺失有关[25]。

如图 33.1 描绘,在未免疫的动物观察到针对其他自身抗原的低亲和力 IgM 抗体[16,26~30]。这些抗体特异性的功能尚不确定,可能含有塑造谱系使之针对外源性抗原的功能。胎儿谱系富含此类抗体,它们源于一些有限类型 VH 和 VL 基因及有限的体细胞突变[31]。

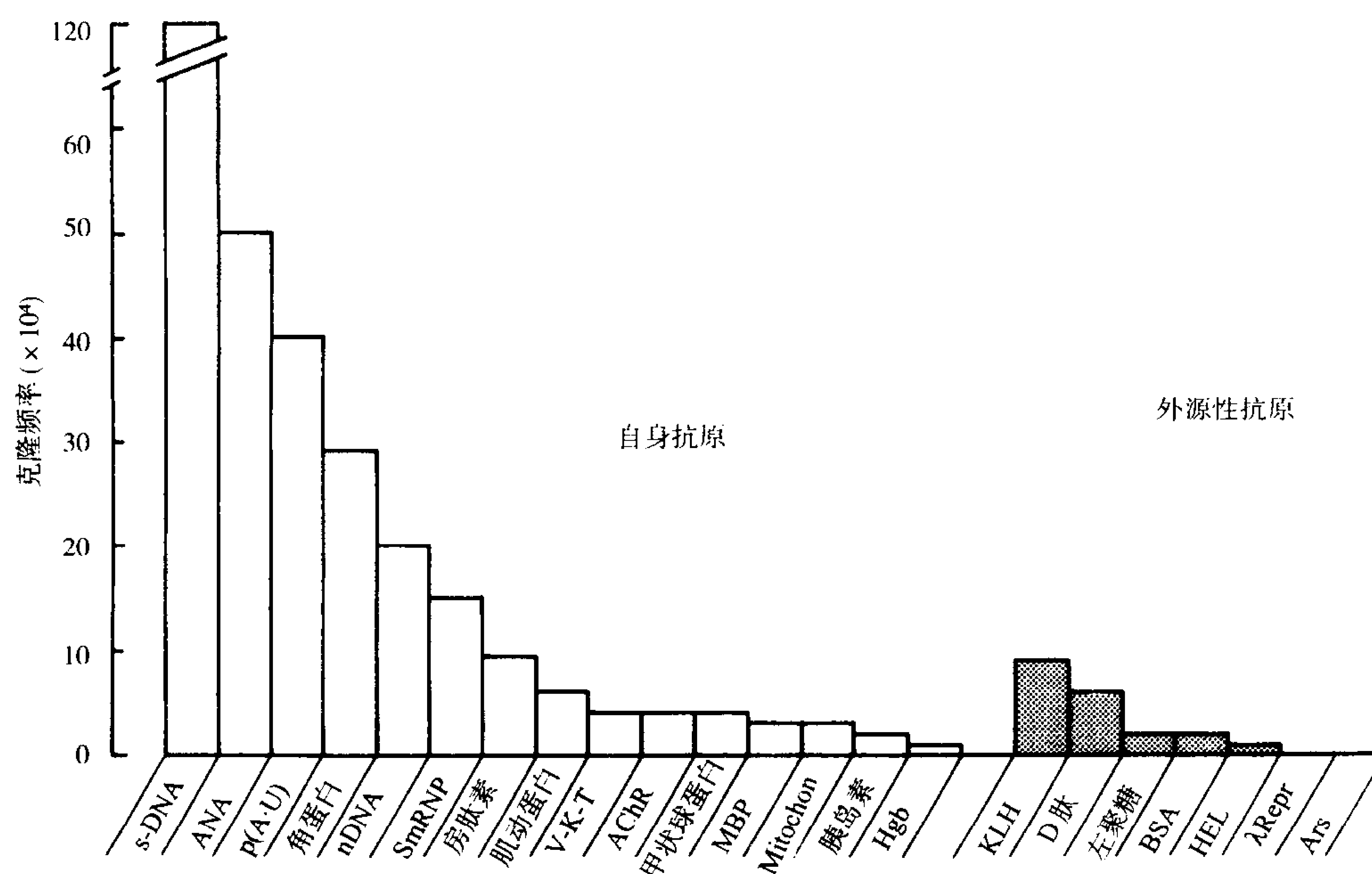


图 33.1 正常小鼠的天然自身抗体谱。抗体由 118 000 株杂交瘤产生,来自未免疫的 6 周龄 A/J 小鼠脾 B 细胞,对针对一系列自身抗原和外来抗原的抗体进行反应性扫描。注意到针对核及细胞骨架抗原的抗体的高频率。(摘自 Souroujon M. White-Scharff, ME, Andre-schwarz. J. Gefter ML. Schwartz RS. Pre ferential autoantibody reactivity of the preimmune B cell repertoire in normal mice. J Immunol, 1988; 140: 4173 ~ 4179. With permission。)

B_1 亚型的 B 淋巴细胞在啮齿类聚集于腹膜腔,其首要的功能[32]可能是产生 IgM 自身抗体,例如 RF。在小鼠,抗体细胞自身抗体可能由 B_1 细胞产生[33],但在 *lpr* 模型它们不是抗染色质抗体或 RF 的来源[34],它们在 GVHD 也不产生这些抗体[35]。在 SLE 患者,B_1 和 B_2 均产生抗 DNA 抗体,但高亲和力自身抗体源于 B_2 细胞[36]。

针对独特型的自身抗体是另一类非病理性的体液自身免疫，抗独特型产生于免疫以后，这表明在一些系统调节性T细胞可介导体液应答的负和正反馈[37~39]

耐受和自身免疫病

1069 免疫耐受的建立和维持是免疫系统的关键特征，已在其他地方详细讨论。自身免疫的发生可能反映了在T细胞和B细胞库发育过程中耐受的不完美性。非常相似的是，在成年个体中，需要外周的耐受机制预防自身免疫的出现。至今为止尚未发现胸腺内耐受缺陷导致的自身免疫紊乱，且自身免疫病一般不出现于新生儿期。

资料表明，胸腺内耐受对建立针对核抗原的耐受具有重要意义[40]。在一些自身免疫病模型中，B细胞对蛋白抗原的耐受可能是异常的[41,42]。

自身免疫病的特点不是全体耐受的丢失，而是有一个选择性的、首先针对细胞内的自身抗原，尤其是核成分的自身免疫应答[43]。

T细胞在系统自身免疫病中的作用

在正常个体不难发现T细胞针对Ⅱ类主要组织相容性复合体（MHC）抗原的自身反应的证据[44]。与对MHCⅡ类分子本身的反应性相比，对自身多肽自我反应的程度难以确定。也许与期望的相反，自身Ia反应性T细胞在人类和小鼠系统性自身免疫中并不为多[45]，且这种缺陷可能随疾病的活动而变。另一方面，自身反应T细胞克隆在一些模型中与疾病的诱导相关。它们引起炎症性皮肤病扁平苔癣的典型损害[46]，且出现于 *lpr* Fas 基因突变的，小鼠高增殖性T细胞中[47]。尚不清楚此类自身反应细胞是否参与辅助自身抗体的产生。

除作为辅助细胞外，T细胞在系统性自身免疫中也可以引起细胞损伤。在慢性GVHD，表达CD4和CD8的T细胞在皮肤、肠及其他地方引起炎症性浸润[48]。有证据表明，在系统性狼疮中T细胞是自发性活化的，判断的理由是活化抗原表达的上升[49,50]。在炎性皮肤损伤处发现T淋巴细胞[51]，这可能解释了疾病的非肾性表现[52,53]。然而大体上看，直接由T细胞介导的自身免疫与其说具有系统性自身免疫病的特征，不如说具有器官特异性自身免疫病的特征，例如实验性变应性脑脊髓炎（EAE）。

因此通常系统性自身免疫的主要问题是B细胞产生自身抗体，而T细胞在自身抗体应答中的作用很难验证。在SLE模型，切除胸腺可能导致疾病的加剧或缓解[54]，人免疫缺陷病毒感染的SLE患者，$CD4^+$ T耗竭细胞，导致SLE活动性的缓解[55,56]，支持T细胞对SLE自身抗体的辅助作用。系统性自身免疫病的一些特征强烈提示辅助性T淋巴细胞的参与。自身抗体应答是高亲和力IgG应答[57]，似乎经历了需要T细胞的亲和力成熟的过程。许多抗核抗体所针对的蛋白抗原，推测需要T淋巴细胞的辅助才能诱导抗原的产生，因为它们不具备多数T细胞非依赖性抗原特征性的重复决定簇。一些针对SLE的治疗似乎首先针对T细胞，如环孢素A和环磷酰胺。

1070

即使在有高滴度自身抗体的患者，也很难证实针对核自身抗原的T细胞增殖。然而，有一些得到较好证实的例子表明，SLE患者的T细胞能对重组形式的SLE相关核糖体蛋白自身抗原应答。但在相同的情况下却对破伤风类毒素应答微弱，提示尽管是泛化的无功能T细胞也可发生对自身抗原特异性的应答[58]。在另一个例报道中，针对重组SnRNP蛋白的$CD4^+$ T细胞高频率的出现（1/4000～1/25 000），但这未出现于正常个体[59]。相反SnRNPA蛋白反应性T细胞在正常个体和患者中均能分离出[60]。

在系统性自身免疫中，对T辅助细胞特异性最深入的研究来自对SLE T细胞克隆的分析，该细胞为抗DNA提供辅助。这些细胞在T细胞受体（TCR）CDR3S有荷电（charged）的基序，推测它们可以与抗体的荷电的DNA结合核蛋白质分解酵素蛋白（高移动组和组蛋白）中的肽结合。抗DNA特异性的B细胞可能结合DNA附带吸附的蛋白，内在化并将它们加工呈递给$CD4^+$ T细胞[61]。已有报道，至少一些可为抗核抗体的产生提供辅助的SLE T细胞缺少CD4和CD8分子且表达αβTcR[62]。

SLE 小鼠模型的建立使通过在体实验确定 T 细胞作用成为可能。用抗 Thy1 或 CD4 抗体治疗 NZB/NZW 小鼠防止了自身抗体的产生和肾病[63]。另一方面,将动物的胸腺切除导致自身免疫加剧,反映生命早期复杂的 T 细胞相互作用。在 *lpr* 模型中[64],如果在出生 72 小时内切除胸腺则可防止疾病发生[65]。用抗体消除 T 细胞可阻止自身抗体的产生和淋巴样增生[66]。

即使在这些相对明确的遗传模型,T 细胞的确切作用以及辅助自身抗体的非特异性相对于特异性程度仍不甚清楚。NZB/NZW 小鼠的 T 细胞谱中尽管含有自身抗原特异性的 T 细胞,却表现为多克隆而不是寡克隆 T 细胞活化[67]。提供正常 T 细胞的 MRL/*lpr* 小鼠则没有发生疾病,其中 *lpr* T 细胞已被消除,提示 T 细胞提供的不仅是细胞因子或非特异性的辅助,它们作为辅助细胞积极参与辅助 B 细胞产生抗体[68]。通过表达 TCRβ 转基因极端限制 TCR 谱则导致 MRL/*lpr* 小鼠自身抗体水平的降低和存活率的上升[69],再次提示自身抗体的产生需要自身抗原特异性 T 细胞的辅助。

因为 TcR 转基因研究可能由于小鼠表达内源性 α 或 β 链而背景不均一,故有人通过转染 TCR 基因到 TCRα 和 β 敲除小鼠构建了鸽细胞色素 c 杂交瘤 α/β 链 MRL/*lpr* 转基因鼠[70]。这些动物仅表达转基因 TCR。尽管缺少自身抗原特异性 T 细胞的辅助,却产生过多血丙种球蛋白和针对 IgG、DNA 和 SnPRNP 自身抗体。该小鼠没有发生淋巴结,肾,唾液和皮肤病变,提示这些表现需要更特异的 T 细胞辅助。这些研究提示,完全发展成 MRL/*lpr* SLE 综合征需要抗原特异性和非特异性的 T 细胞辅助。在这方面,用可以分析 T、B 相互作用的同类系动物构建的 *lpr* 小鼠进行的嵌合研究表明,自身抗体产生所需的 T 细胞辅助是 MHC 分子限制性的,换言之,为了辅助产生自身抗体,T 细胞必须与自身反应性 B 细胞拥有共同的 MHC Ⅱ 类决定簇[71]。

在 MRL/*lpr* 小鼠,通过观察 γδT 细胞缺陷动物的自身免疫和自身免疫病表现评价了 γδT 细胞的功能[72]。在有缺陷的后者,小鼠发展成一个更加严重的自身免疫综合征,提示 γδT 细胞的调节作用。相反,缺陷 αβT 细胞的小鼠仅有减弱的 SLE 综合征,提示 γδT 细胞辅助自身抗体产生的作用远较 αβT 细胞弱。

自身抗原反应性 T 细胞的功能已在小鼠模型得到研究,MRL 小鼠有产生针对 SnRNP 复合体的抗体的倾向,经纯化的 SnRNP 免疫后在引流淋巴结能检测出 SnRNP 反应性 T 细胞[73]。而正常小鼠能产生对外源性 SnRNP 反应的 T 细胞,仅 MRL 小鼠和表达某一类型 MHC 等位基因的小鼠能识别小鼠源的 SnRNP[74]。正常小鼠经外源性核抗原免疫后招募 T 细胞对自身抗原反应的现象可能反映了表位的漂移。自身交叉反应性 B 细胞呈递自身抗原的结果便是招募自身肽反应性 T 细胞对自身肽反应。

T 细胞对交叉重叠的核心组蛋白肽的反应已在具有 SLE-倾向的 SWR × NZB F_1 小鼠得到研究[75]。这些抗原性的决定簇在完整的染色质明显地得到保护,因为检测不到对整个组蛋白的应答。有趣的是,这些组蛋白 T 细胞免疫原性区与抗组蛋白自身抗体识别的决定簇存在交叉。T 细胞对自身抗体的辅助也可能由具有自身抗体分子可变区特异性的 T 细胞介导。

NZB/NZW 小鼠产生识别抗 DNA 抗体可变区肽的 T 细胞[76]。推论认为呈递给 T 细胞的肽源自 B 细胞对自身免疫球蛋白的加工。结果辅助性 T 细胞能特异性辅助自身抗体的产生,已有报道干预它们的作用能对自身免疫病起到改善作用。

CD40 的配体(CD40L)可以在 SLE 自身抗体的产生中起关键作用。在 SLE 患者尤其在那些患活动性疾病者,这种 T 细胞活化相关的分子表达上调,而且也出现在一些 SLE B 淋巴细胞上[77]。一些观察到的现象也可用 SLE 抗体的 T 细胞相对非依赖性来解释。用针对 CD40L 的抗体处理 NZB × SWRF_1 小鼠阻止了自身免疾病的发生[78],CD40L 遗传性缺陷的 MRL/*lpr* 相反,产生了针对核抗原的自身抗体,但这些抗体向 IgM 型倾斜,提示类别转换的削弱[79],在这些小鼠中肾病似乎消失了。

抗原的作用

与有意免疫引起的免疫应答不同,自身免疫被自身抗原启动、维持的机制不是那么明显。还可以考虑其他一些已经被认真研究的机制。例如脂多糖(LPS)介导的弥散的 B 细胞活化导致有限的系统性自身免疫(主要是针对 DNA 和 RF 的 IgM 抗原),同时这可能是一个很好的伴随某些感染(如 EB 病毒和支原体[80])的

1071

自身免疫模型。或许独特型—抗独特型网络的紊乱就能导致自身免疫而不需要自身抗原作为免疫原。但相当多的证据支持自身抗原作为免疫原导致自身抗体应答的观点。

针对核蛋白复合物如 SnRNP 剪接体的自身免疫,针对的或许是自身抗原的多种成分,或许是针对完整粒子的免疫应答[81]。这些应答良好的特异性及具有的一个高亲和力抗原介导的应答所具有的表现[82,83]进一步揭示了其复杂性。在一些情况下,用核抗原进行免疫可能导致自身抗体的形成和疾病[84],但抗原需要与佐剂一起重复免疫,结果通常表现为抗体应答的复杂性大大减少。

有报道称用一些特定自身抗原的小肽片段免疫兔和小鼠,可以产生不仅针对免疫原表位而且针对同一抗原上的其他表位,甚至针对其他核抗原的自身抗体,以及 SLE 的临床表现[85]。这可能反映了表位漂移(如,招集 T 细胞对自身抗原上的额外表位反应)。由于耐受通常不涵盖所有这类"隐蔽性"表位,一种可以募集逐渐增多的自身反应性 T 细胞的机制可能打破任何起初的耐受。这种应答的原动力一定来自用其他种属自身抗原进行的免疫,伴随着针对外源抗原抗体的产生[86]及引发 T 细胞针对真正的外源决定簇的辅助。产生与自身决定簇交叉反应抗体的 B 细胞可以选择性地摄取自身抗原,加工它们,表达包括隐蔽性表位的自身抗原性肽。许多自身抗原的物理联系,如 Ro 和 La[87]或 SnRNP 复合物的许多成分能够导致由针对单一抗原耐受的打破而启动进一步多样化的自身免疫应答。对于 La 核抗原,已经用肽片段鉴定法鉴定了不同的,具有引发完全自身免疫应答潜力的免疫原性隐性表位[88]。

用哺乳动物 DNA 免疫动物通常不引起自身抗体,除非 DNA 与阳离子蛋白如甲基化的牛血清白蛋白[89]形成复合物。遭受紫外线或反应性活性氧类损害的 DNA 较未改变的 DNA 更具免疫原性,这可能与紫外线诱导的 SLE 加剧有关[90]。细菌 DNA 活化 B 细胞及通过哺乳动物没有的 CpG 基序激起自身免疫应答的潜能引起研究者的兴趣[91],暴露于细菌 DNA 也可促进有遗传倾向的 NZB/NZW 小鼠的自身免疫病[92]。虽然微生物 DNA 在 SLE 作为免疫原是可能的,但 SLE 中小量散在的循环 DNA 已表明具有人源性,且主要以小复合物的形式结合到组蛋白上[93,94]。

如果核抗原作为免疫原,它们如何与免疫系统相互作用?最可能的答案是它们由衰老的细胞释放,或由已消化这些碎片的吞噬细胞呈递在细胞表面。已表明经历凋亡的细胞表达一些重要的 SLE 核抗原[95],且可能是自身免疫原的重要来源。似乎可疑的是凋亡细胞能否胜任作为这些分子的抗原呈递细胞。相反,似乎更像是专职的 APC 细胞呈递这些凋亡相关的核抗原,或许是同一 APC 细胞贪婪地吞噬凋亡细胞。

从Ⅰ类和Ⅱ类 MHC 分子洗脱的肽进一步提供了核自身抗原可以被呈递到免疫系统的证据。在啮齿类和人类,已发现细胞表面 MHC 分子上含有从核抗原如组蛋白来源的肽。可假设为核碎片加工所致[96]。也有可能是这些肽来自正常抗原呈递细胞内,通过Ⅱ类途径加工的自身抗原,虽然这类"由内向外"型类加工并不常见[97]。

调节性 T 细胞异常

众多证据表明,T 细胞能发挥对自身抗体产生的决定性影响,及对自身免疫的调节[98]。在一些体系中,切除正常动物的胸腺导致或系统性或器官特异性的自身免疫[99]。裸鼠产生自身抗体和免疫复合物肾病,被动输注 T 细胞可逆转这一过程[100,101]。这些研究暗示,调节性 T 细胞可以控制抗核抗体的产生。在人和动物的 SLE 都有众多体外调节性 T 细胞功能异常的报道[102]。借助现在的分类概念得以更好地理解众多 20 世纪 70 年代的关于抑制细胞的文献,辅助细胞和细胞毒细胞根据它们的细胞因子表型分成 Th1,Th2,Tc1 和 Tc2 亚类[103]。一些现象能代表这些 T 辅助细胞亚群来源的细胞因子的作用,例如,γ 干扰素,白细胞介素-10,白细胞介素-4 对体液免疫应答的特征和程度发挥强有力的影响。

将用同种骨髓免疫重建的大鼠用环孢素 A 处理可以诱导自身免疫和 GVHD 样综合征[104],这是干扰调节性 T 细胞功能的一个重要例子。动物变得有免疫力时,却由于上述处理导致的 T 细胞不平衡引发自身免疫病。

自身免疫病中的细胞因子

多种细胞因子的异常与系统性自身免疫病及模型相关。其中一些细胞因子只出现在疾病的后期,或许

不是病因性的，而其他一些可能积极参与了免疫应答的调节及失调。总的说，IL-2水平和IL-2受体的表达在人和小鼠SLE及一些相关的自身免疫紊乱中降低[105]。然而循环IL-2R可能上升，与其他循环受体水平平行[106]，基于辅助细胞表型鉴定SLE与Th1还是与Th2相关的努力遇到了困难，但IL-10与IL-6在人和鼠SLE中似乎上升了。IL-10和IFN-γ分泌细胞的比率在SLE外周血中是上升的，暗示循环中Th2细胞占多数[107]。资料显示一些IL-4转基因鼠产生SLE样抗核抗体、溶血性贫血和免疫相关性肾病[108]支持Th2细胞在促进自身免疫中的重要性。

1072

已有一些关于小鼠SLE模型产生细胞因子情况的研究，如在慢性GVHD已观察到一个Th2谱[109]。然而对NZB/NZW和MRL/*lpr*，有增强的IL-6、IL-4和IL-10产生[110]，是一个不符合Th1或Th2存在的复合模式。α肿瘤坏死因子(TNF-α)表达可能也是升高的，已有资料表明这一位点的等位基因多态性与SLE有关[111,112]。

系统性自身免疫病中的凋亡异常

*lpr*和*gld*小鼠的自身免疫和淋巴增殖综合征是源于Fas凋亡受体及其配体的突变，这一认识使人们推测凋亡的减弱可能导致其他自身免疫病。因为凋亡存在多种途径，潜在的损伤也存在多种可能性。在人类SLE中，自发性的淋巴细胞凋亡表现为升高[113]。bcl-2的表达似乎被上调了，这在T细胞尤其明显[115]。与期望获得的结果相反用小鼠研究，发现Fas的表达也被上调[116]，且通过Fas分子的凋亡明显是正常的[117]。Fas配体的表达和功能在SLE中的作用尚不清楚，已出现矛盾的资料。然而非常有意义的是，已经鉴定出一个SLE患者具有突变的Fasl[118]。

Canale-Smith综合征，又称自身免疫和淋巴增殖综合征(ALPS)，是一种罕见的疾病，表现为淋巴结增大及血液免疫细胞减少[119,120]。在一些家系，这种紊乱来自一个重要的非功能性的Fas分子。像*lpr*和*gld*小鼠一样，小儿产生双阴性T细胞和高球蛋白血症。而与小鼠的突变不同，患者很少产生抗核抗体或狼疮样肾病。有意义的是，在少数的此类患者，已注意到上升的恶变易感性。

在*lpr*小鼠，人们深入研究了突变Fas分子导致的凋亡抵制现象。胸腺选择在*lpr*小鼠是正常的，表现为能去除IE和乳房肿瘤病毒反应性T细胞。但是也有证据表明，在*lpr*小鼠有异常的胸腺T细胞发育，包括在未处理小鼠和转基因小鼠。胸腺T细胞上有稠密的Fas表达[121]，然而在*lpr*和*gld*小鼠有微弱的胸腺选择缺陷，这有点自相矛盾。

如果胸腺缺失是完整的，Fas凋亡缺陷如何导致自身免疫？可能的解释是外周T细胞的耐受强烈依赖Fas/Fasl系统，就像从鸽细胞色素c TCR转基因*lpr*小鼠进行的耐受研究中推断的一样。将Fas缺陷强加给这些转基因鼠导致它们不能在脾和淋巴结形成耐受。外周的Fas/Fasl维持耐受这一观点另外的证据是发现活化诱导的外周*lpr* T细胞死亡是不正常的[123]。Fas/Fasl相互作用似乎作为一个重要的机制来清除出现问题的自身反应性胸腺后T细胞。在*lpr*小鼠延迟发生自身免疫可能反映了这种自身反应性T细胞的逐渐出现和克隆扩张。

实验表明，在*lpr* T或B细胞与正常细胞形成嵌合或四倍体情况下，为了产生自身免疫，B细胞也必须缺陷Fas表达；在*lpr*和*gld*小鼠有B细胞凋亡缺陷的直接证据[126]。应用转基因自身反应性抗体进行的体内耐受研究表明，在正常小鼠和*lpr*小鼠之间惊人地相似。在HEL-抗HEL系统，多数B6/*lpr*小鼠在生命早期维持耐受，极少数在5个月及以后打破耐受并产生自身抗体[42]。这些结果暗示其他的机制可以有效地代替Fas/Fasl系统来维持耐受[127]。当放在一个特殊的无病原体的地方，耐受则是完全的，提示微生物影响的重要作用(见上文)。

在研究凋亡和自身抗体形成的关系时发现，SLE相关的核抗原如Ro和La出现在凋亡细胞表面大泡中[95]。这些资料结合其他观察到的SLE血清含有针对表达在凋亡细胞上的蛋白的抗体的现象[108]，使人们认为凋亡的作用可能在于将自身抗原暴露到免疫系统的传入支。凋亡减弱，凋亡小体被快速吞噬和处理，也可呈递自身抗原到免疫系统，激发T和B细胞自身反应性。

在其他常用的自身免疫小鼠模型中，已有报道，NZB、NZB/NZW 和 BXSB 的 B 细胞存在凋亡抵制现象，可能解释了这些模型中疾病的表现[128]。

环境对系统性自身免疫的影响

系统性自身免疫病可能被各种环境因素如饮食、药物、感染或毒素等激发或加剧[129]。UV-B 放射可激起 SLE 的征兆，明显的例子是炎性皮肤损伤常局限于光暴露的区域。

服用某种药物与 SLE 综合征发病存在明确的相关性[130,131]。与自发性的 SLE 不同的是，这类 SLE 很少累及肾和中枢神经系统，在中断药物后综合征即消失。广泛用于治疗室性心律失常的普鲁卡因酰胺是研究最多的，能够诱发 SLE 的药物，但肼苯哒嗪、氯丙嗪、大仑丁和其他药物也能引起 SLE 样综合征，主要特征是胸膜心包炎、关节炎、肺浸润和发热。给予普鲁卡因酰胺的患者仅有大约 10% 产生临床上明显的疾病，但抗核抗体出现在大多数长期服用药物的患者。抗体主要针对组蛋白，且有不同的特异性和同种型[132,133]。普鲁卡因酰胺乙酰化与 SLE 产生无关。在动物复制这种综合征的偿试是很不成功的。推测普鲁卡因酰胺是通过使 DNA 去甲基化发挥作用，结果是 T 淋巴细胞上 LFA-1 过表达，导致自身反应性 T 细胞辅助功能增强[134]。

1073

感染性因素与系统性自身免疫的关系仍是一个活跃的研究领域。目前较为清楚的是系统性自身免疫可能是 EBV 和支原体以及其他为病毒感染的直接结果[135,136]。感染性单核细胞增多症中的抗核抗体存在时间短且可能是无害的。系统性自身免疫也可能在严重微生物感染的过程中间产生，如心内膜炎和骨髓炎。偶尔可见皮肤和肾损伤，提示免疫复合物沉积或许与 RF 有关[137]。

血管炎（后面将详细讨论）可伴随脑膜炎球菌、立克次氏体、螺旋体和许多其他细菌感染。系统性自身免疫有时也是 HIV 感染的一个特征，可能与辅助 T 细胞亚类的失衡有关[138]。各种细胞性超抗原也介入了与感染有关的自身免疫现象，如血管炎[139]。病因不清的 Kawaskai 病可以引起严重的血管和 TCR V_β 表型的改变，提示有超抗原的作用[140]。

感染对 SLE 发展的影响尚不清楚。无菌环境下的 NZB 小鼠仍产生抗红细胞自身抗体[141]；然而，无菌环境下的 NZB 小鼠产生了低水平的 IgG 和抗核抗体及较轻的肾病。用细菌 DNA 免疫 NZB/NZW 小鼠引起肾病[92]，用异十八烷处理后，在常规环境中生长的小鼠比生活在无病原环境中的小鼠有高的自身抗体产生率和肾病发生率。而 MRL/*lpr* 小鼠相反，在无菌环境中与常规环境相比产生同样水平的自身抗体。

某些毒素能够诱导系统性自身免疫病。氯化亚汞是研究最多的与自身免疫相关的重金属。动物给予 $HgCl_2$ 后产生抗核抗体和免疫复合物肾炎。这需要 T 细胞的辅助，且基因背景是重要的决定自身抗体特异性的因素[117,142,143]。

自身免疫相关的系统性硬皮病和相应的纤维变性的疾病可能很少被毒素引起。暴露于聚氯乙烯的工人有产生硬皮病样综合征的危险[144]，炎症性和纤维变性的硬皮病样疾病与油菜籽油的食入有关[145]。一种嗜酸浸润性疾病由 L-色氨酸制剂的污染引起[146]。存有很大争议的是乳房硅置入与产生硬皮病和其他类风湿病的关系，这方面尽管有一些研究，但未能证实真正的联系[147,148]。

系统性自身免疫病的遗传学

SLE 的易感性明显地受遗传学的影响。在同卵双生子中，有报道 SLE 同时发生率在 28% ~ 57% 之间[149,150]。多种基因参与决定 SLE 易感性，即使是在近交系小鼠模型。遗传学是复杂的，有多达 12 个基因的作用[151]。而且不能直接引发疾病的基因可以与其他基因相互作用导致疾病的发生。例如，NZB 或 NZW 亲本均不能产生肾病或抗天然 DNA 抗体，而交配所得杂交 F_1 代产生严重 SLE 样肾病和抗天然 DNA 抗体。因为杂交导致 SLE 小鼠最重要的 NZW 基因与 MHC 或许是 MHCⅡ类基因连锁。NZB 提供一个对肾炎非常重要的 4 号染色体连锁基因，但报道至少还有 7 种其他基因参与其中。奇怪的是，决定肾炎易感性的 4 号染色体

基因不影响抗 DNA、抗组蛋白和抗染色质的水平[152]。

用微卫星标记技术对患 SLE 的一对双胞胎进行研究分析，发现 1 号染色体的一个区域与疾病易感性相关[152]。这一区域可能与小鼠 1 号染色体的肾病和 NZB 小鼠死亡率相关的一个区域连锁。靶基因包括那些 Fc 受体 γ2 和 γ3，然而这一区域较大，仍需要进一步确定。以前的人类流行病学研究表明黑人 SLE 患者肾炎与 Fc 受体等位基因连锁[154]。

补体的遗传性缺陷导致 SLE 患病危险性增高[155]。C2 缺陷个体发生 SLE 的危险性特别高，其他还有 C8 和 C5 的遗传性缺陷；C4 无效等位基因的遗传也是一个危险因素[156]。MHC 对 SLE 易感性的影响较 RA、胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)及其他器官特异性自身免疫病[157]更难确定一些。对北美黑人，研究发现没有总体的 DR 相关，两种相关的亚群是根据临床证据来分的[158]。疾病相关的自身抗体抗 Ro 和抗 La 的产生似乎与 DR 和 DA 两基因相关[159]。

系统性自身免疫病中自身抗体的本质

系统性自身免疫疾病的抗体特征是高滴度的 IgG 抗体[160]，仅有少数例外。自身抗体的遗传基础在小鼠得到很好的研究，其中杂交瘤对序列分析是非常有用的[161]。已有一些关于在 NZB/NZW 和 MRL/*lpr* 小鼠中抗核抗体的资料；在单一小鼠，抗 DNA 和由杂交瘤回收的其他自身抗体似乎与克隆性相关[162]。有证据表明，与胚系序列相比抗 DNA 和抗 SM 存在广泛的突变，且其克隆系能被推断[163]。许多克隆显示双反应性，暗示这些特异性抗体至少部分有一个共同祖先[164]。抗核自身抗体的结合位点既不由 V_H 也不由 V_L 决定，而通常由二者联合决定[165]。抗 DNA 抗体可能来自针对外源性抗原的抗体超过变区的点突变[166]。S107 对肺炎球菌多糖应答，一个致病性的抗 DNA 抗体可产生于仅如此一个位点突变[167]。尚不清楚这种由正常免疫应答转向异常免疫应答的机制存在的广泛程度。

已测序足够多的来自自身免疫小鼠的杂交瘤自身抗体，对 V_H 和 V_L 基因作用可以做出全面的概括。早期的工作显示 3′VH 基因的高频率应用，但后来发现存在适当程度的偏向，如 VH558 组是最经常用的基因家族，例如针对外源性抗原的抗体[168]。 *1074*

已对许多抗核抗体进行了广泛的表位鉴定研究，在多数情况下，显示抗体识别多种构象依赖的，非连续性的核蛋白表位[169,170]。它们常结合核蛋白活性位点，因而某些酶和其他自身抗原的功能可以被含自身抗体的血清抑制。抗 RNA 抗体常与抗 snRNP 颗粒蛋白成分的抗体一起发现，且常出现于含抗其他 RNA 结合蛋白抗体的血清中[171]。系统性自身免疫疾病的自身抗体通常与源自同一种属的抗原有较强的亲合力，表明它们根源于亲和力的成熟，同时它们可能源自自身蛋白的免疫。

从 IgM 到 IgG 的同种型类别转换出现于一些但不是所有的自身抗体，NZB/NZW 小鼠的抗 DNA 抗体及人血清某些特定系列的样品经历这个过程[172]，而 MRL/*lpr* 抗-SM 血清或转换的过快不能检测到或 IgG 处于初期[173]，有趣的是，在人和小鼠 SLE 自身抗体主要是高度 T 细胞依赖性的 IgG 亚类(IgG1 小鼠 IgGa 和 IgGa2)，或许反映了它们的 T 细胞依赖性[174,175]。

尚未清楚的是为什么某些蛋白抗原在系统性自身免疫疾病中成为自身抗体的靶分子。自身抗原几乎都是细胞内或细胞表面蛋白(RF 是一个明显的例外)，且核抗原是多数自身免疫原性的靶分子。为什么仅选择某种核蛋白尤其令人迷惑不解。这不是一个含量高低的问题，例如，Ro 和 La 远非最大量的核蛋白，却是特征性的 SLE 自身抗原[176]。

人们将注意力集中到核抗原自身的某些方面上。经常患自身免疫病的个体有针对亚细胞颗粒多种成分的自身抗体，如核糖体蛋白、核仁或 snRNP[177]，暗示这些粒子本身的免疫原性。自身抗体倾向于直接针对那些在经历增殖的细胞中大量出现的核抗原。例如，增殖细胞核抗原(PCNA)、着丝粒蛋白及核有丝分裂工具蛋白 NuMaL 等以快速上升的浓度出现于细胞周期的 S 和 G_2 期[178]。在这期间核抗原是较易获得的免疫原。

抗核抗体的水平非常的高。在个别的患者 30%或更多的总抗体库能直接针对单一特异性[179]。某些自

身抗体水平随疾病活动性而波动(抗天然 DNA 是最好的已知例子),但通常抗体水平相对固定。

SLE 和 SLE 模型的自身抗体产生于弥散性多克隆 B 细胞活化的中期。针对半抗原如 DNP 的抗体及针对病毒抗原的抗体以 5~10 倍的速度递增[180,181]。相反特异性自身抗体的水平,如针对 SnRNP 或 Ro,La 的抗体的水平与多克隆 B 细胞活化不成比例地抬高,而且较正常对照血清中发现的微弱结合力相比,有不寻常的上千倍或百万倍的增强(图 33.2)。

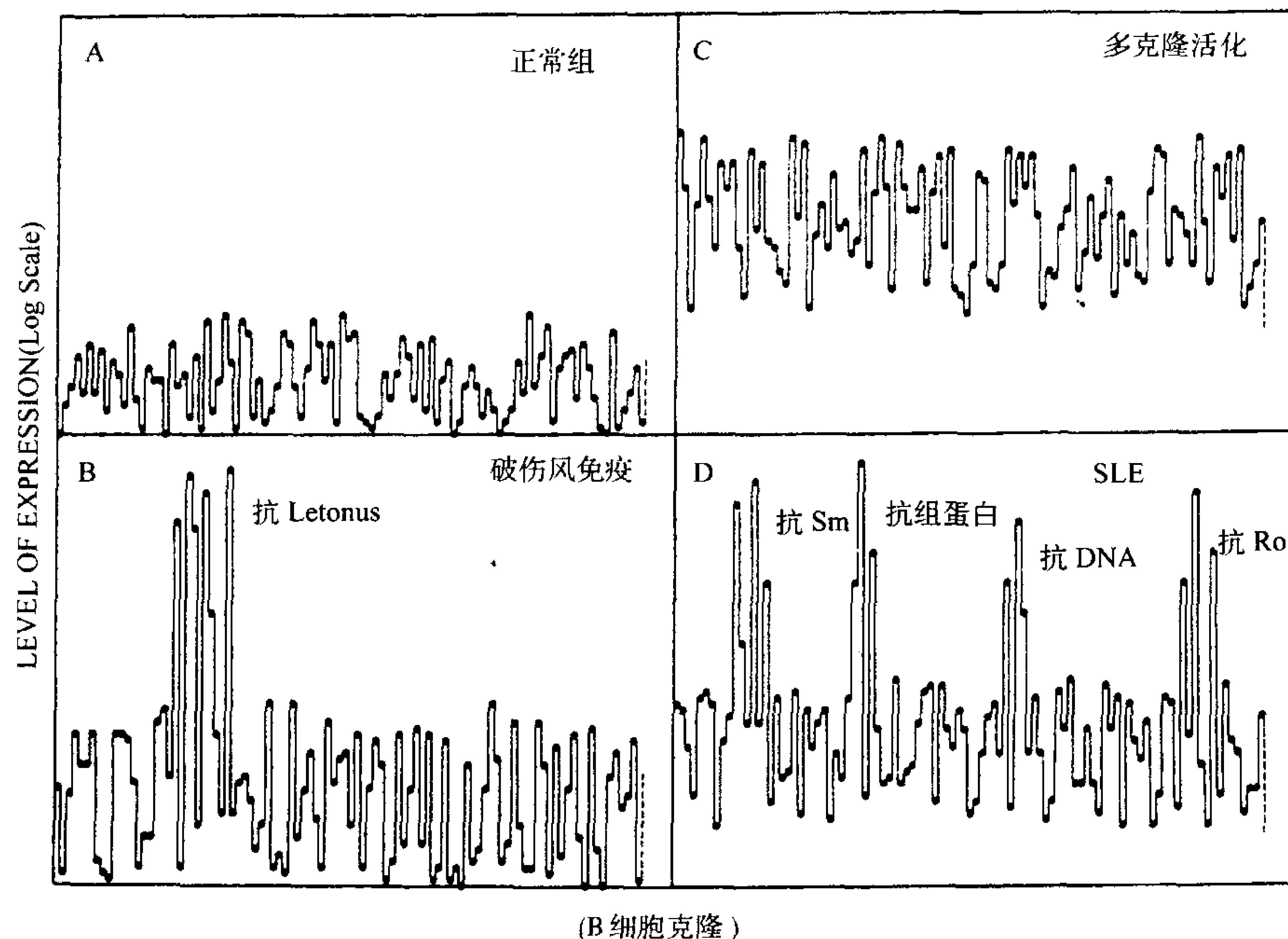


图 33.2 SLE 中自身抗体产生的本质。A:正常个体多种 B 细胞克隆产生的抗体。B:破伤风类毒素免疫,显示激发一组破伤风特异性的 B 细胞克隆,伴随适当程度的多克隆活化。C:暴露于细菌脂多糖导致的弥散性多克隆活化及其他多克隆活化的效应。D:说明在 SLE 和其他系统性自身免疫病中的一般情况,即多克隆 B 细胞活化的背景及大量源于特异性明确的、数目分散的克隆的自身抗体。(经允许摘自:Eisonberg, RA. Cohen. PL. Mechanism soof autoantidody production in systemic cupus erythematosus clin Asp. Autoimmun. 1988,2:11。)

某些 SLE 血清学特异性表现为多样性的自身免疫和炎症性疾病,不具有诊断学特异性,例如抗组蛋白和抗 DNA 抗体。而其他自身抗体,如抗双链 DNA,抗 Sm 和抗 Ro,对诊断 SLE 具有高度特异性且断定通过某种途径与致病机制相关(表 33.1)。

1075

一些标志性的抗体有良好的诊断相关性:硬皮病(抗拓扑异构酶或 Scl-70[180]),肌炎(抗组氨酰 tRNA 合成酶[183]),Sjogren 综合征(抗 Ro 和抗 La)。这些自身抗体中的一些对它们的自身抗原是灵敏特异的,想通过特意免疫兔子或其他实验动物诱导产生都很难[87,184]。

个别 SLE 患者倾向于有不同的自身抗体谱,它们在疾病的整个过程中保持稳定。而患者与患者之间的抗体谱变异性无疑部分源于遗传学多样性。奇怪的是,甚至在遗传学上同种的近交系小鼠中,它们自身抗体的特异性也存在非常明显的不同。研究 MRL/*lpr* 的抗-Sm 应答对认识 SLE 自身抗体特异性的起源可能有帮助。除去群落因素,仅有大约 25%的这种小鼠产生抗 Sm。抗体的水平显示一个真实的双峰分布,即与正常小鼠相比,抗 Sm 阴性 MRL/*lpr* 小鼠有微不足道量的抗 Sm 抗体,当追踪抗 Sm 抗体阳性小鼠的谱系及微环境时,遗传学或环境的累积并不可以解释自身抗体出现在某些小鼠而不出现于其他小鼠。仅在少数小鼠产生抗 Sm 特异性抗体不是因为用了一个不寻常的 V 基因,也不是由于不正常的基因重排。这些发生在 MRL/*lpr* 小鼠的,或许适用于抗核糖体 P 和抗 Su 抗体的发现,已被解释为个体自身抗体库随机受影响的结果,人们对

SLE 及其他自身免疫病实验室及临床表现的个体变异性仍缺乏了解[185]。

表 33.1 系统性自身免疫病中的抗核抗体

特异性	识别的抗原	相关疾病
Sm	U1, U2, U4～6, snRNPs	SLE
RNP	U1 snRNP	SLE, MCTD
Ro(SS-A)	60kDaRNA 结合蛋白	SLE, Sjögren 综合征
La (SS-B)	50kDaRNA 结合蛋白	SLE, Sjögren 综合征
组蛋白	H1, H2a, H2b, H3(天然)	SLE
Jo-1	组氨酰 tRNA 合成酶	肌炎
Scl-70	DNA 拓扑异构酶 I	硬皮病
PCNA(细胞周期蛋白)	DNA 聚合酶 δ	SLE
Alu	信号识别粒子	SLE, 肌炎
PL-7	苏氨酰-tRNA 合成酶	肌炎
tRNA-1	丙氨酰-tRNA 合成酶	SLE, 肌炎, JRA
RNA 聚合酶 I		硬皮病
DNA(天然)	双链 DNA	SLE
DNA(变性)	单链 DNA	SLE, RA, 炎症
着丝粒	CENP A, B, C	Raynaud 综合征, CREST

系统性红斑狼疮

SLE 是最常殃及年轻女性的系统性免疫紊乱。关节炎、皮疹、中枢神经系统功能丧失及肾病是最常见的临床表现[186]。疾病的严重性明显地随时间波动，为药物治疗研究带来困难。该病存在相当高的发病率和主要由肾病引起的高死亡率，治疗的原则主要是延长存活期[10]。

免疫学家对 SLE 的兴趣追溯到 20 世纪 40 年代，当时人们注意到 γ 球蛋白水平的上升，且注意力集中于骨髓 tart 细胞。体内观察到中性粒细胞对核物质自发性的吞噬作用，且该现象可通过加入患者血清在正常的 buffy coat 细胞诱导。这些资料使人们认识到抗核物质的抗体具有重要作用。这引发许多对 SLE 抗核因子的研究，它们被证实是 IgG，且产生了一个高敏感的、对 SLE 普遍适用的检验方法，即荧光抗核抗体检验(FANA)[187]。>95%的 SLE 患者 FANA 阳性，而且荧光染色模式与单个 SLE 患者血清中出现的抗核抗体相关[188]。例如，弥散性染色是显示组蛋白及其他 DNA 结合蛋白的抗体，周边染色是显示抗天然 DNA 抗体，斑点模式反映针对拼接工具成分的抗体，如 snRNP。一些用更特异性方法如双向免疫扩散或 ELISA，检测到的抗体，是 SLE 特异性的(如抗 Sm，抗 Su，抗 Ro，抗 La 及抗天然 DNA)。

虽然对 SLE 一系列抗核抗体了解最多，其他针对自身成分的抗体也有详细的描述。除 IgG 外，抗原倾向于是细胞结合形式(如针对淋巴细胞、血小板、红细胞、中性粒细胞和基底膜的抗体)。对于 IgG 和凝血因子，真正的自身抗体的靶抗原可能是细胞结合型的，或以免疫复合物形式或以活化的凝血因子形式。

尽管对 SLE 自身抗体有足够的认识，有意义的是发现其中仅有很少部分参与了疾病的致病过程。SLE 肾病归因于抗 DNA-DNA 复合物在肾小球内皮和上皮的沉积，推测可以激发补体介导的血管损伤性炎症[189]。患者循环补体的水平和抗 DNA 抗体水平与肾病活动性呈负相关关系。在 SLE 肾小球洗脱液中发现浓集的 DNA-抗 DNA 复合物支持这一机制[190](图 33.3)。然而这种免疫复合物是否参与肾病所有的病理类型仍存在争议。

1076

虽然推测 SLE 的非肾性表现是自身抗体介导的，但仅各种血细胞减少症有较好的免疫学基础。尽管针对 Ro 和 La 的抗体可能具有重要意义[191]，但炎症性皮肤病似乎是由 T 细胞介导的(图 33.4)。SLE 患者的新

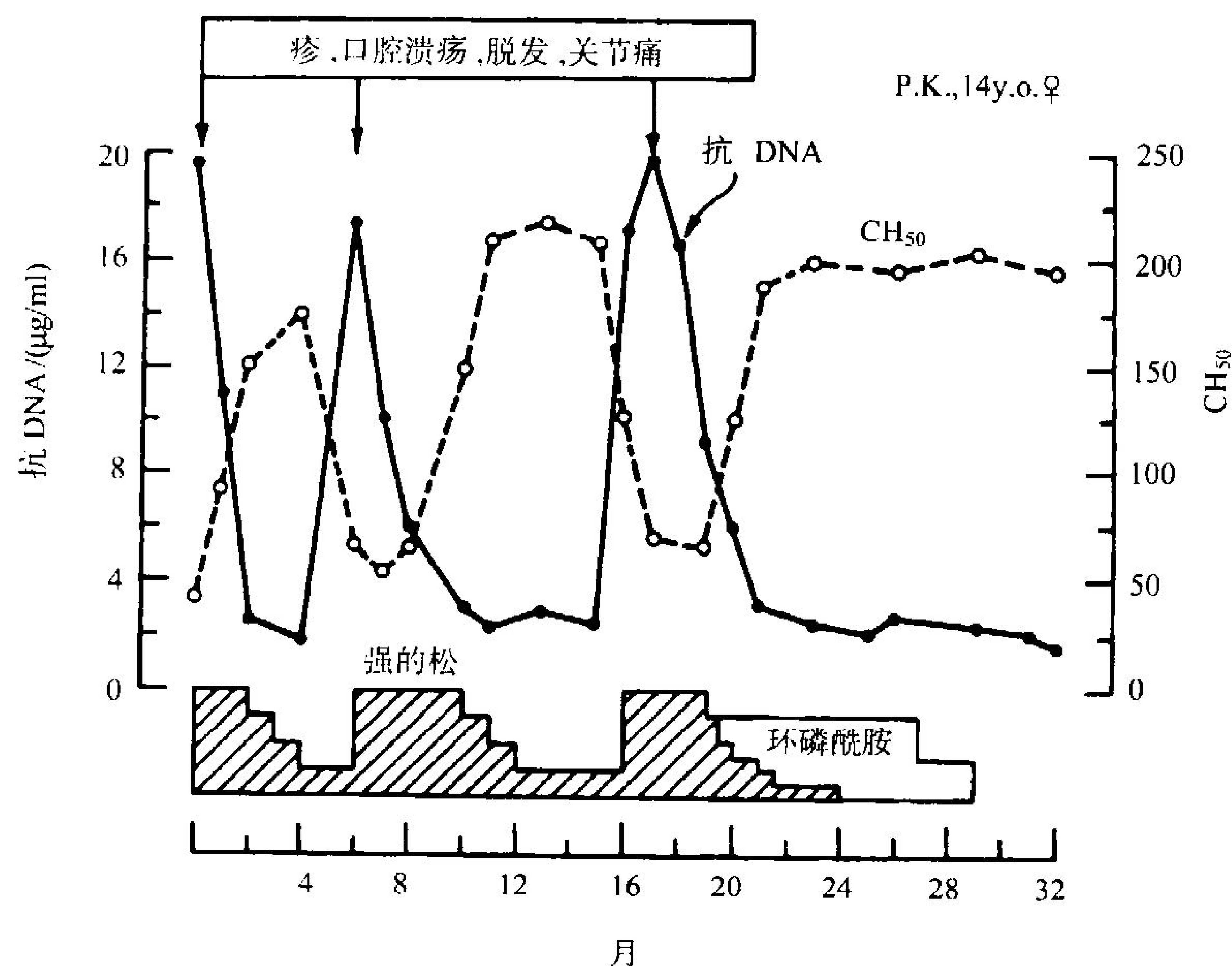


图 33.3 系统性红斑狼疮患者的临床病程。注意抗 DNA 自身抗体水平的“镜像”模式及血清中补体 50%溶血。疾病的加剧恶化(垂直箭头)与抗 DNA 抗体水平的上升一致。



图 33.4 SLE 患者光敏性皮疹。注意红斑及疹的鳞屑状特征,它们横穿鼻梁形成“蝴蝶状”通常衣服遮盖的地方不见皮疹。

生儿偶尔具有血小板减少症和亚急性皮肤 SIE 的典型损伤,同时具有典型的 Ro 和 La 抗体[192]。IgG 自身抗体经胎盘途径由母体传给胎儿,症状与母体抗体自发性消退一致可以解释新生儿疾病。推测抗 Ro 阳性母亲所生新生儿常见的心脏阻塞可能是由于发育中的心脏受到损害。

一些其他的 SLE 表现很难与免疫过程相联系。累及中枢神经系统能导致精神病、癫痫发作及神经病学的衰弱性表现[193]。神经系统组织通常没有免疫球蛋白沉积或细胞的浸润,常见的仅有微血管改变,对于关节炎和胸膜心包炎症的免疫学研究较少,且其免疫学基础只能来自推测。

类风湿性关节炎(RA)

RA 是一种常见的、遍布于全世界的慢性炎症性的多关节炎症,男女比例为 1:3,高发期为 40 多岁,强烈的炎症产生于滑液关节外,以致正常纤细的滑膜浸润了单核-吞噬细胞、淋巴细胞及中性粒细胞[194]。炎症性液体通常由发炎的滑膜渗出。患者除了疼痛和关节活动性丧失外,还经常产生系统性的表现,即贫血、皮下结节、胸膜炎、心包炎、间质性肺病及血管炎的表现,如神经坏死、皮肤损伤及巩膜炎症。RA 的病程是可变的,但患者通常产生进行性的关节周围软骨和骨的功能丧失,导致活动性丧失。

虽然 RA 的病因尚不清楚,一些特征提示其在病因学上为一种自身免疫病,关节连接处的病理提示一种 T 细胞介导的慢性炎症反应[195,196]。在有 DR4 单倍体的个体,这一超变区的 OKRAA 基序使它们对 RA 的易

感性显著提高，提示一种自身抗原呈递的作用[197]。大多数患者（>80%）产生 RF[19]，主要由骨髓产生，发炎的滑膜产生的量更为显著[198]。滑液内免疫复合物的出现及补体成分水平的降低暗示 RF 参与了局部的病理过程[199]。而最近 T 细胞和单核吞噬细胞在关节处的浸润引起了研究者的兴趣。由于存在选择性扩增某种 V_β 亚型的证据，这使一些学者提出超抗原的作用[200]，T 细胞或许是多克隆活化的[187]。用胸导管引流消除 T 细胞[201]或用免疫抑制药物如环孢素可导致好转，提示 T 细胞在炎症过程中的重要作用[202]。而许多关于滑液内细胞因子方面的研究指出，单核吞噬细胞是首要的驱动炎症过程的因素[203]。

1077

RA 中滑液主要包括单核细胞来源的细胞因子，如 IL-1、IL-6、INF-α。IL-1 受体拮抗剂也在多数液体中检测到。相反，IL-2、IFN-γ 和其他 T 细胞细胞因子通常少剂量存在，IL-17 可能是个例外。用 T 细胞耗竭性的单克隆抗体治疗 RA 的努力遭到失败[204]。相反，加入针对 INF-α 的单克隆抗体则可导致炎症明显减轻[205]。有报道抗 IL-6 的抗体加 IL-1 受体拮抗剂也可引起适当的缓解。

明确 RA 病原学基础的努力遭到挫折。有未被证实的报道显示大量病毒、支原体及其他感染性病原体的参与在啮齿类动物实验性的抗胶原免疫导致 RA 样综合征[206]，提示在 RA 存在相似的自身免疫。尽管有报道发现 RA 中存在低水平的抗胶原抗体和反应性 T 细胞，但抗胶原免疫参与这一疾病的报道较少[207]。

在 RA，关节炎症导致软骨和骨质侵蚀的机制尚未完全了解[208]，并不像是中性粒细胞或单核吞噬细胞源的蛋白溶解酶渗漏到软骨所致。细胞因子如 IL-1，IL-6 通过软骨基质扩散，可能通过作用于软骨细胞和破骨细胞引起骨和软骨的破坏。从功能上讲，骨和软骨的破坏比关节炎症更具灾难性。

反应性关节炎及脊柱关节炎

类风湿病的特征是多涉及大关节，在慢性病例偏爱骶髂关节，经常伴随某种有机物感染或伴随牛皮癣或炎症性肠病[209]。这些疾病具有一种倾向，即快速的成纤维细胞增殖以使炎症愈合，随后是新骨的形成。它们不同于 RA 的是，关节周围的软骨损伤及骨质减少不是特征性的。这种疾病的明显特征是它们与 HLA-B27MHC Ⅰ类等位基因的联系。Reiter 病，一种常包括泌尿生殖器、口腔黏膜、眼葡萄膜及皮肤炎症的反应性关节炎，接近 90% 的患者有 B27 单倍型，而正常人群这一比例为 7%[210]。资料显示 Reiter 病患者大量爆发于 HLA-B27 细胞阳性个体受导致流行性腹泻的菌感染之后（图 33.5）。

尚不清楚是否有自身免疫介入这种形式的慢性关节炎的发病机制[211]。针对 IgG 的自身抗体是缺如的，抗核抗体和其他自身抗体也未见报道。有证据表明致病微生物感染（衣原体、耶尔森氏菌、沙门氏菌和志贺氏菌）能产生与自身抗原交叉反应的抗体或细胞介导的免疫，但这种疾病的致病机制是非常不清楚的[212]。与 I 类分子的相关性使人们推测 CD8T 细胞在介导自身反应性方面起重要作用。在伴随有严重的 CD_4/CD_8 计数比例下降的 HIV 感染个体通常产生比较严重的 Retert 病，支持这一推测[213]。

高拷贝表达 HLA-B27 的转基因大鼠产生了关节炎、炎症性肠病和皮肤损伤[214]。在无菌环境下生成的动物症状没那么严重，提示微生物菌群的作用。疾病的产生需要 T 细胞。人为将 HLA-B27 转基因到缺乏Ⅰ类 MHC 分子的小鼠也产生了 Reiter 样关节炎综合征[215]。

系统性血管炎

血管系统对损伤的易感性是大量紊乱的基础，这些损伤包括免疫复合物在血管壁的沉积或血管内的细胞介导的损伤，其多种多样的表现取决于累及的剧烈程度及受影响血管的特征[216]。图 33.6 显示累及的典型的中等大小动脉，在某些情况下，其机制是针对外源性抗原应答形成的免疫复合物，如对病毒（尤其是 B 型或 C 型肝炎病毒）和药物[217]；在另一些情况下，则是由自身抗体和针对尚未鉴定出的环境性致病因子的抗体介导。

1078

自身免疫血管炎可以单独出现或与 SLE 及其他风湿样疾病一起出现。图 33.7 证实一名 SLE 伴血管炎患者一个发炎的小动脉腔内有 C3 沉积。有证据表明 DNA-抗 DNA 和 IgG 复合物的沉积，其后还包括有补体参与的损伤[218]。偶尔也有报道显示，临床疾病与血清低于体温条件下复合物的冷沉淀作用相关。血管炎的

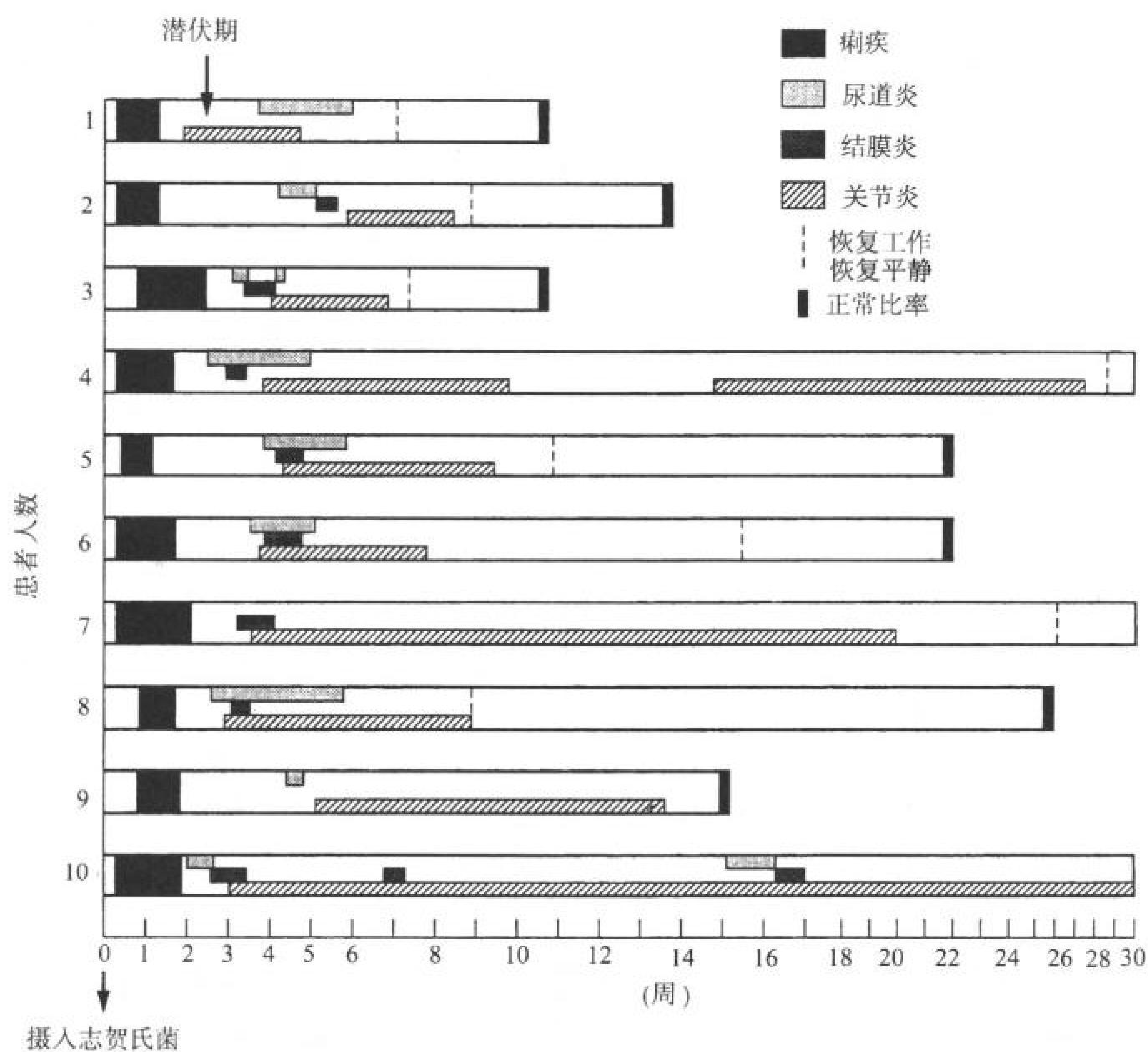


图 33.5 军舰船员在志贺氏菌痢流行后一次反应性关节炎爆发。在超过 600 名产生腹泻的船员中，仅 11 名产生 Heiter 综合征的特征。其中 5 名海员被追踪 10 年，后发现其中 4 人是 HLA-B27 阳性（摘自 Noer HR An experimental epidemic of Reiter/s syndrome JAMA 1966;198;693～698）。



图 33.6 系统性坏死性动脉炎。显示的是一严重腹部疼痛和肠梗阻的 65 岁患者节段性肠系膜动脉的一部分。注意管道内弹性层的破坏，壁内血栓和白细胞的浸润。该患者对皮质类固醇和环磷酰胺有良好的反应。

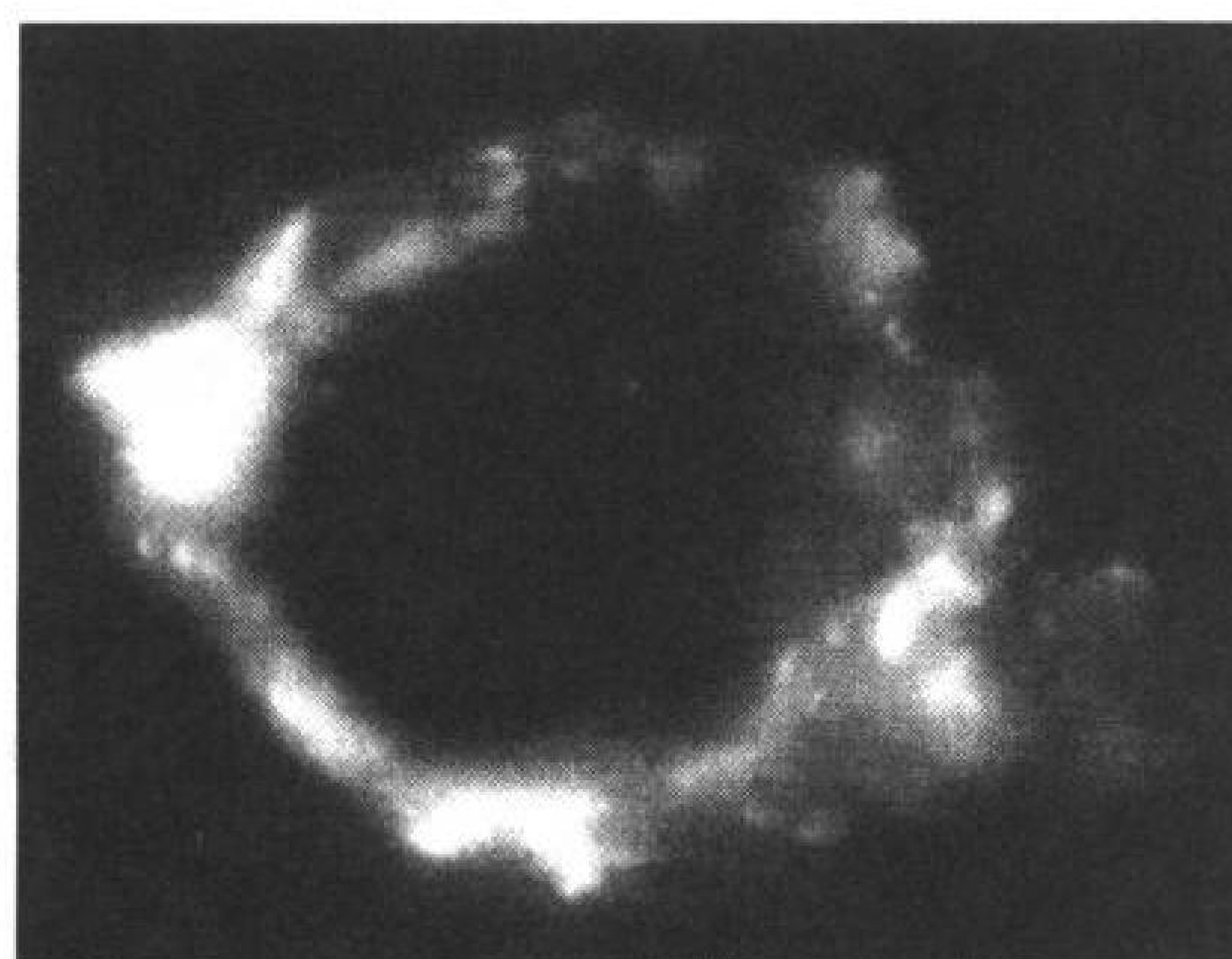


图 33.7 SLE 患者的血管炎，注意到在该动脉壁用抗人 C3 抗体检测到补体的存在。

一个特例是混合的冷球蛋白血症[219]，其中一个单克隆抗体IgG(单个的异常B细胞克隆产物)与针对IgG(如RF活性)的自身抗体形成大的循环复合体，沉积在小动脉及中等动脉管壁上，引起皮肤、神经、肾的缺血和梗死。

血管炎的表现可从仅有皮肤损害(小管径血管炎)到致命的器官缺血如肾、心、脑和肝。已努力从病原学上对已知与未知的类风湿性和非类风湿性血管炎进行分类。图33.8显示了不同管径血管炎症所累及的类型。

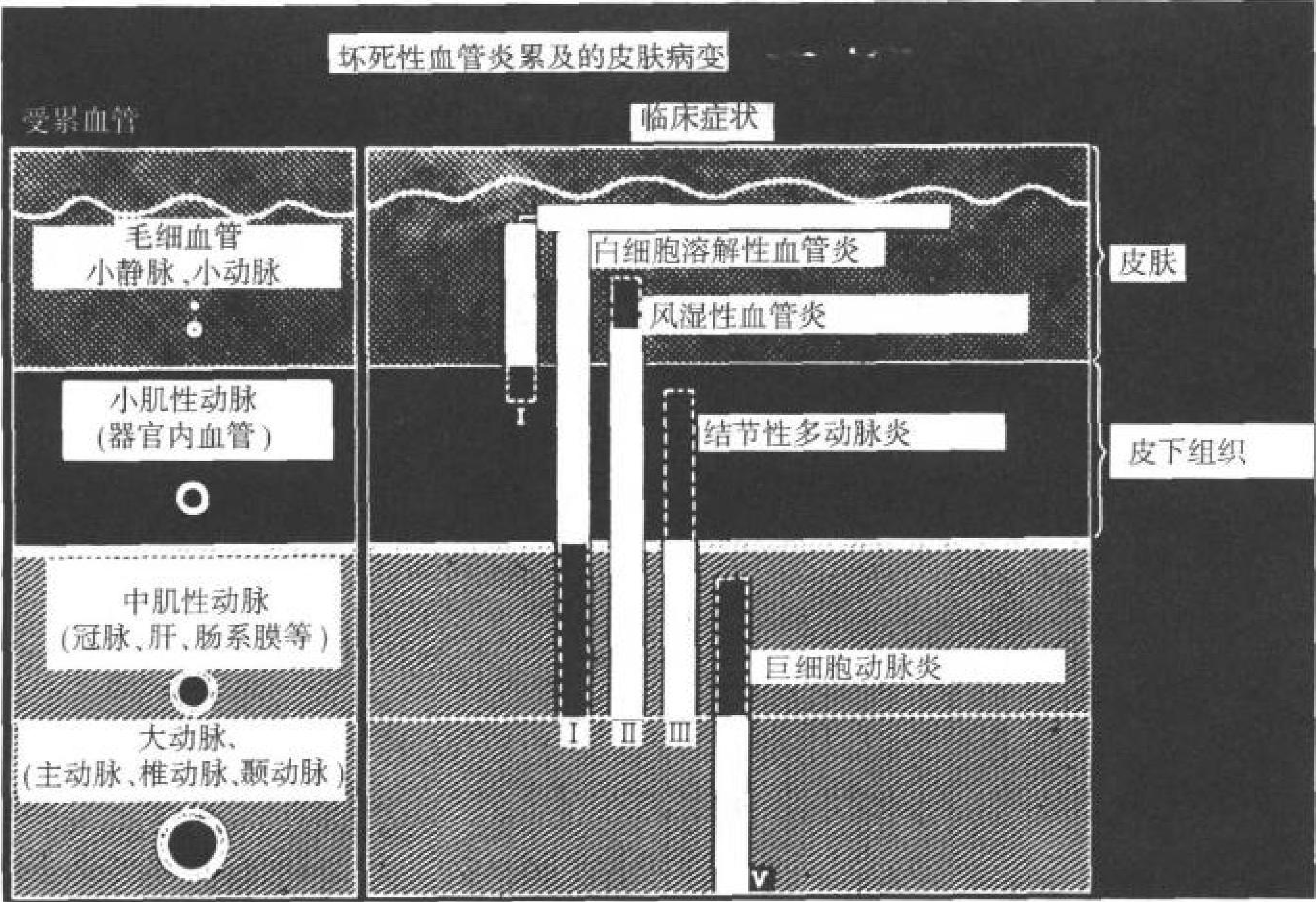


图33.8 血管炎谱。血管炎的表现取决于累及血管的管径，这也反过来反映沉积的复合物的大小、容量或其他物理特征，注意到疾病结果取决于发炎管径的大小。(经James A Gilliam M P允许引用。)

Wegener肉芽肿病是一种罕见的血管炎，特征是围绕血管形成肉芽肿，严重者累及肺和肾[220]。多数此类患者存在抗蛋白酶3(c-ANCA)抗体，这引出一种假设，即ANCA诱导的中性粒细胞活化是导致T细胞和巨噬细胞活化的关键事件[221]。

Sjogren综合征

这一淋巴增殖和自身免疫紊乱以一种原发的形式出现，与类风湿病无关，不是RA、SLE或硬皮病的并发症。患者外分泌腺出现活化的多克隆$CD4^+$ T细胞的浸润，主要是唾液腺和泪腺，伴随高γ球蛋白血症、自身抗体及有时的血管炎[222]。淋巴细胞浸润可扩展到分泌腺以外，涉及肺、肝及其他内脏。原发性Sjogren综合征与HLA-DR3、Ro和La的抗体相关，淋巴恶变，主要是B细胞淋巴瘤的易感性上升。一种非常像Sjogren综合征的实例见于HIV感染，表现为$CD8^+$而不是$CD4^+$细胞浸润到外分泌腺[223]。

慢性移植物抗宿主病

在针对Ⅱ类决定簇产生GVHD的动物，表现为一种系统性SLE样特征性的自身免疫综合征：产生抗核抗体、免疫复合物肾病和免疫白细胞减少症[224]。临床表现随基因背景及株间遗传差异而不同：IE的不同产生较高水平的抗核抗体，而IA的不同导致更多的肾病。在小鼠慢性GVHD中，可导越过MHCⅡ类障碍，T和B细胞以一种同源MHC限制性的方式相互作用，提示一种特异性的T细胞辅助而不是非特异性过量细胞因子对B细胞的影响[225]。

“同源疾病”发生于遭受慢性GVHD的小鼠，产生非常广泛的像硬皮病的硬化性的内脏损伤[226]。在接受

骨髓移植的人类,慢性 GVHD 综合征是一个主要的临床难题,导致纤维变性及皮肤病变的自身抗体。这种综合征甚至出现在自体骨髓接受者中,尽管轻微[227]。

硬皮病(系统性硬化)

这种疾病以炎症为标志,随后伴随某种抗核抗体在皮肤和内脏的沉积[228]。早期损伤包含 T 淋巴细胞的作用,且有证据表明具有 T 细胞库的倾斜[229]。由于拓扑异构酶Ⅰ(SCKL-70)的抗体与内脏损伤相关,而针对着丝点抗原的抗体意味着有一个较好的预后[230]。硬皮病的特征是明显的血管异常,其中最具戏剧性的是外周动脉灌注的零星减少(常由低温引起),又称为 Raynaud 现象。循环减弱可引起疼痛、感染和手指远端的缺血性骨折。由于其上覆盖皮肤的增厚可引起的手指灵活性丧失,造成一定的活动能力丧失。

患严重的硬皮病,又称进行性系统性硬化患者,可产生严重的皮肤、肾、肺和胃肠道损伤。治疗通常无效。尽管有明确的血清学的自身免疫证据,但内脏和皮肤损害的自身免疫基础仅是推测,致病机制尚不得而知。有报道一个株系的鸡产生了带有明显硬皮病样特征的病[231]。

系统性自身免疫病常用的动物模型

一些自发性的小鼠模型被广泛用来研究 SLE 的致病机制及其治疗。

lpr 和 *gld* 小鼠

Fas 凋亡基因的常染色体隐性 *lpr* 突变引起明显的进行性淋巴结病(图 33.9),多种 SLE 样自身抗体和高γ球蛋白血症[232]。与其他小鼠 SLE 模型一致(见下),疾病的实验室和临床表现在很大程度上依赖于其他知之甚少的背景基因[233]。因而,MRl/*lpr* 小鼠是这一研究最好的株系,它们产生严重的肾小球肾炎和血管炎,且有明显可预期的寿命,而 C57B6LPr(B6/*lpr*)小鼠显示症状轻微,几乎为正常寿命。*gld* 基因在相似的背景下也导致本质上相同的综合征。



图 33.9　MRL/*lpr* 小鼠(年龄 4 个月),注意由于 CD4⁻ CD8⁻ T 细胞浸润而形成的大量淋巴结和脾的增大。(经 Robert Eisenberg 同意使用。)

Fas/FasL 系统消除自身反应性胸腺外 T 细胞的失败能够解释 CD4⁻ CD8⁻ 无反应 T 细胞的大量聚集,在没有消除的情况下,这些不正常的表型明显地可以作为功能下调的第二种解释。Fas 的突变也表达在 B 细胞,结果是不能消除自身抗体形成细胞,但这不导致类似 T 细胞的淋巴增殖[234]。

淋巴结病和自身抗体的产生均需要 T 细胞,在缺失 MHC Ⅱ类基因[235]或缺少 CD4 分子的[236] *lpr* 小鼠,自身抗体均不能产生,而产生了淋巴结病;相反,CD8 或 β2 微球蛋白的缺如[237]导致自身抗体水平的微小变化而淋巴结病明显降低。下面的研究支持这样一种观点,*lpr* 异常的双阴性 T 细胞源于 CD8 前体,作为进化的一部分丢失掉 CD8 分子变成无反应细胞。另一方面,为自身抗体提供辅助的 T 细胞起初是含 CD4 的,能识别位于自身Ⅱ类 MHC 之中的抗原(推测是自身抗原)。

NZB 和 NZB/NZW F_1 小鼠

NZB 小鼠产生自身免疫性溶血性贫血,抗核抗体和生命后期淋巴网状内皮增生[238]。这株和近乎正常的 NZW 小鼠的 F_1 代会出现更加爆发性的 SLE 样综合征,导致弥散增殖性肾小球肾炎、高滴度抗核抗体及早期的死亡(尤其雌性)。NZB × SWR F_1 小鼠是另一种研究较深入的产生肾病的模型,这提供了独特的优势,即

SWR 双亲没有内源性逆转录病毒,同时也没有明显的额外的免疫病理[239]。NZB 杂交中 SLE 的遗传背景是复杂的,这点在别处讨论。SLE 样疾病的特征是甚至在胎儿期 B 和 T 细胞两者均缺陷,明显的 B 细胞高活性,同时自身抗体和疾病的发生均需要 T 细胞[240]。

BXSB 小鼠

这种动物产生一种年龄依赖性的 SLE 样综合征,由于涉及染色体基因(Yaa)而在雄性更为严重[241]。与 *lpr* 突变至少激发一定程度上的自身免疫不同,Yaa 仅在植入到自身免疫小鼠的基因组中才导致自身免疫的加速,表现为高滴度的抗核抗体和免疫复合物肾炎,及在雄性导致早期死亡。用 B6-Yaa 嵌合小鼠进行的研究表明,主要是 T 淋巴细胞介导了自身免疫病,消除 T 细胞而不是 B 细胞后,嵌合体的疾病减少。研究提示这株小鼠的基础缺陷涉及增强的 T—B 细胞相互作用,原因可能是异常的黏附作用的结果;功能性 I-E 分子的存在减轻了血清学及临床的表现,可能是通过 IA 元件呈递 IE 肽所致[242]。

1081

在小鼠中通过注射异十八烷诱导系统性狼疮样综合征

异十八烷是烷烃的一个分支,广泛应用产生腹膜炎症,用此预处理小鼠可为以后的杂交瘤植入做准备。偶然发现仅异十八烷就可导致一种进行性的自身免疫综合征,其标志为产生 SLE 样自身抗体,包括抗 Sm 和高度特异的抗体[243]。也观察到 SLE 样肾小球的改变,伴有免疫球蛋白和补体的沉积。综合征的血清学特征取决于小鼠遗传学背景,其中 H2 占有优势地位,例如,$H2^S$ 小鼠产生抗核糖体蛋白的自身抗体,而表达 $H2^b$ 的 C57BL 小鼠的自身抗体滴度则较低[244]。

输注独特型抗体诱导的系统性自身免疫

给予人 16/6 的独特型抗体后,小鼠出现一种以抗核抗体、血细胞减少症和免疫介导的肾病为特征的综合征[245],该抗体出现在某些抗 DNA 的人 IgM 单克隆抗体中。疾病的发生可被针对 16/6 独特型的抗体提前,提示有包括 T 细胞在内的一系列异常独特型——抗独特型网络相互作用的结果,因为 SLE 的表现也能被源于独特型免疫后小鼠的 T 细胞诱导[246]。已报道这些小鼠具有抗心脂质抗体及止血的异常。

能存活的衰败小鼠

研究表明,致死的 Motheaten(me)和有活力的 Motheaten(me^v)表型导致严重的新生儿自身免疫综合征伴高 γ 球蛋白血症和针对 DNA 和红细胞的自身抗体,是由于造血细胞表达的酪氨酸激酶突变所致[247]。实质上所有这些小鼠 B 细胞是 B1 亚类,且明显死于自身免疫和炎症性疾病发生后 3 周。这种激酶缺陷导致自身反应性的机制尚不清楚,但推测它控制了 B 细胞群分化的基础。

敲除和转基因小鼠严重的自身免疫疾病

纯合缺失转化生长因子基因的小鼠发生严重的爆发性的自身免疫病,其表现是多器官炎症性疾病并于 3 周内死亡。这种紊乱由 T 淋巴细胞介导且能被动性地转移到 MHC 相容的正常小鼠[248]。显然,缺乏 TGF-β 的免疫抑制和抗炎效应引起不受调控的自发性的炎症。相似的状况发生在没有 CTLA-4 功能的小鼠。缺乏正常由该分子介导的 T 细胞负性调节也导致严重的新生儿自身免疫和炎症性疾病[249]。

缺失 IL-2[250]、IL-4[250]及 TCR 基因[252]的小鼠遭受自身免疫病,尤其累及肠道,但也有血液病学和其他系统的表现。在一定程度上,炎症性疾病取决于小鼠的微生学环境及株的背景,且也与细胞因子失衡有关。

表达在 B 细胞上的 bcl-2 癌基因转基因小鼠产生了某些 SLE 样自身抗体[253]。联合 bcl-2 凋亡缺陷和 *lpr* Fas 突变导致小鼠进一步的淋巴增生,但自身抗体不再上升,提示由 *lpr* 突变引起的凋亡削弱导致产生最大程度的自身抗体[254]。

紧皮小鼠

tsk 突变是 2 号染色体上主要的突变，纯合突变是致死性的[225]。这种小鼠进行性地皮肤紧缩，伴随肺纤维化及心肌病。已检测到针对拓扑异构酶和 RNA 聚合酶 I 的抗体。缺乏 CD4 细胞的小鼠不产生皮肤损伤，但有心脏异常；缺乏 CD8 细胞对疾病几乎没有影响[257]。

类风湿性关节炎模型

一些啮齿类 RA 模型已被广泛应用[258]。注射肽聚糖多糖于大鼠可产生慢性多关节炎，伴有广泛的关节破坏[259]。这取决于大鼠的遗传背景(Lewis 是易感株的原型；Buffalo 则耐受)，部分由于 MHC 基因，且需要 T 淋巴细胞。相当多的证据提示炎症性疾病是由于细菌碎片的持续存在，在已早期注射肽聚糖—多糖的动物，关节内的细菌 LPS 可诱导疾病复发。

通常采用的一种慢性炎症性关节炎，由 II 型胶原加佐剂诱导生成[261]。虽然可以检测到抗体并可以引起一些损伤。胶原性关节炎主要由于 T 细胞对 II 型胶原的免疫，在这种病中 MHC 及 T 细胞寡克隆的影响有重要作用[262]。仅单纯注射完全佛氏佐剂在可以大鼠而不是在小鼠引起慢性关节炎。这已被用来评价抗炎药效果。

近来，最有意义的 RA 模型之一是 T 细胞白血病病毒 I 型(HTLV-1)tax 转基因小鼠的炎症性关节炎[263]。这些动物产生慢性侵蚀性关节炎伴随滑液的增生及 RA 样的病理改变。它们产生抗胶原抗体、RF 及抗热休克蛋白抗体，也提示 T 细胞对胶原和热休克蛋白的免疫。在这些动物中还报道有一种 Sjogren 样自身免疫外分泌病[264]。这些发现具有特殊意义，因为感染 HTLV 的人类也能单独或在出现脊髓病的情况下产生炎症性关节炎[265]。

TNF-α 转基因鼠也产生自发性侵蚀性的关节炎，推测是由于这种细胞因子的前炎症作用[266]。这些研究支持 INF-α 在 RA 中的关键作用。

系统性自身免疫病中的免疫损伤

1082

Gell 和 Coombs 的分类框架仍是一种有效的、细分系统性自身免疫损伤机制的方法。I 类损伤由 IgE 介导，在这类紊乱中不占主要地位。相反，直接结合自身抗体到靶组织引发的组织损伤具有重要意义，尤其在器官特异性自身免疫病，但在很大程度上也存在于针对细胞和基底膜、纤维黏连蛋白和其他固定的组织蛋白的系统性自身免疫病中。抗体结合到自身组织后，可以通过一系列包括补体和凝血途径在内的复杂事件导致炎症，导致中性粒细胞和单核细胞的趋化作用、吞噬作用及炎症介质的局部释放。血小板聚集、血管平滑肌扩张、肥大细胞活化均是 II 型损伤中自身抗体结合组织后引发的系列事件中的一部分；这一问题在本书的其他地方有详细讨论。引发这些变化的自身抗体可能包括抗胶原抗体和抗肾小球基底抗体。图33.10描绘

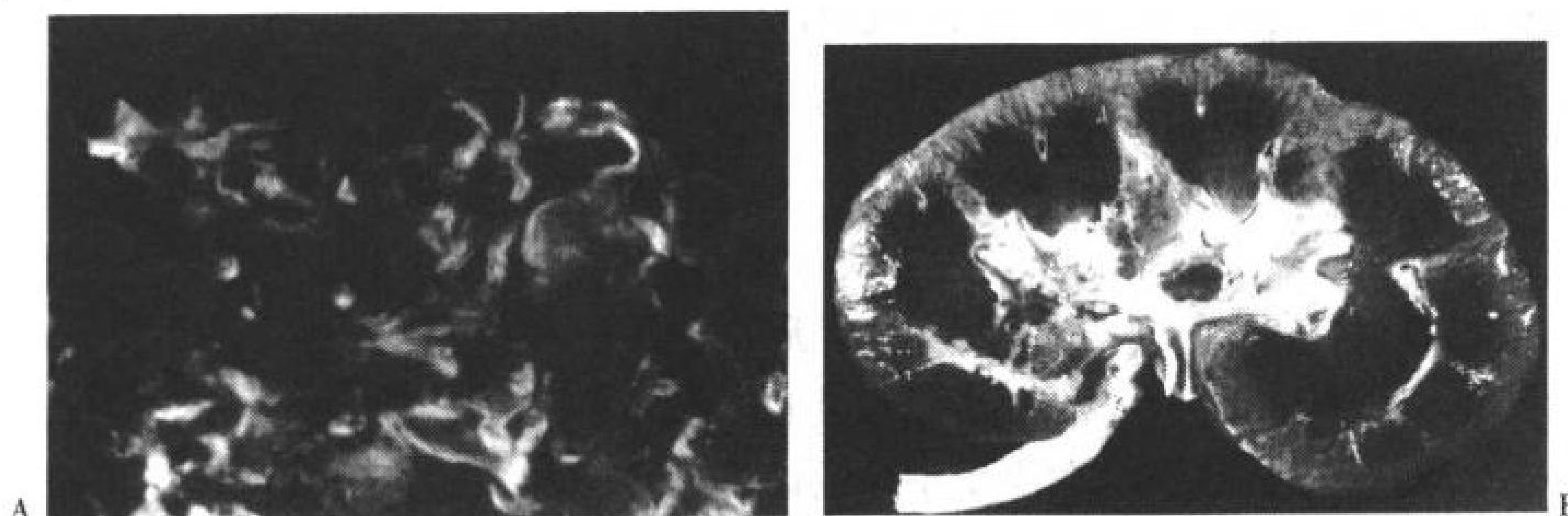


图 33.10 II 型免疫介导的损伤。A：用荧光标记的抗人 IgG 抗体显示了一Goodpasture 综合征患者线形沉积的，针对出现于肾小球基底膜抗原的 IgG，相同的变化也见于肺中。B：从该患者的解剖病理样本中可见出血性变化。(经 William.J.Yount.M.D 同意使用。)

了 Goodpasture 综合征的病理变化，该综合征是由于抗体直接针对两器官共有的基底膜蛋白而引起的肺和肾的出血性损伤。

Ⅲ型损伤由免疫复合物介导，能解释许多自身免疫病的病理变化，尤其是 SLE 和血管炎。在 NZB/NZW 小鼠，用单克隆抗体封闭 C5 减轻了肾炎症状且提高了存活率，支持经典途径活化在这种免疫复合物病中的作用[267]。免疫复合物具有变化多端的特征，表现在能从少数几个抗原抗体分子到巨大复合物后者包括抗体包被的或交联的整个细胞，这解释了Ⅲ型损伤中遇到的病理变化的多样性。确定 SLE 和相关疾病损伤性免疫复合物中的致病抗原引起研究者的兴趣，但没有确切的结果。SLE 恶化常伴随或预兆有溶血性补体的下降及抗天然(双链)DNA 抗体水平的升高。这些抗体集中于 SLE 肾病患者的肾小球内(图 33.11)，与 DNA-抗 DNA 复合物可能沉积在 SLE 肾及激发炎症的观点一致[268]。虽然 DNA-抗 DNA 在 SLE 肾病中是一重要的抗体系统，但其他类型的自身抗体也似乎参与了肾小球损伤[189]，例如抗染色质抗体形成的免疫复合物可能定位于肾小球基底膜。最近的研究集中在这类抗体的容量、大小、抗原性特征及其结合与损伤肾小球的关系上。

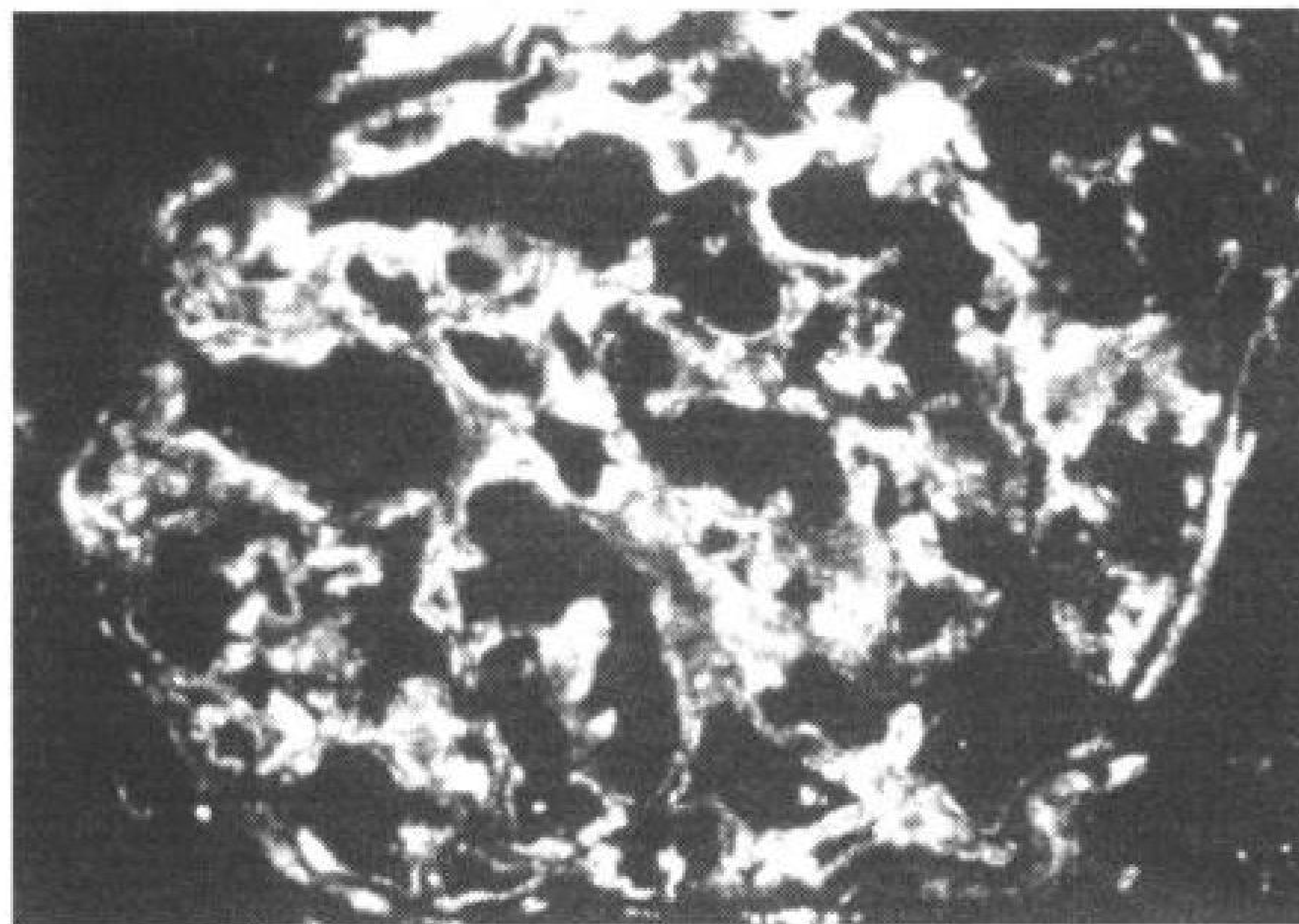


图 33.11 -SLE 肾活检样品中的Ⅲ型(免疫复合物)损伤，该患者有蛋白尿及血尿。注意用人 C3 抗体染色部分中有免疫沉积的颗粒(也称作“结块碰撞”)分布。

Ⅳ型损伤是由 T 淋巴细胞、巨噬细胞及其他可能的浸润组织的细胞介导，有时可引起肉芽肿。一些系统性自身免疫病主要由Ⅳ型损伤介导，例如 Wegener 肉芽肿；而Ⅳ型损伤与Ⅱ型及Ⅲ型损伤共同存在也是常见的。例如 SLE 常伴由 T 淋巴细胞主导的破坏性及炎症性皮肤损伤；相似的是，多肌炎破坏性的炎症性皮肤损伤与抗合成酶抗体及其他自身免疫一起发生。也许有一些细胞介导的免疫参与了 SLE 肾病，但在 MRL/*lpr* 小鼠发生肾炎并不需要 I 类分子及Ⅱ类分子的表达[269]。

自身抗体也可通过影响凝血系统而产生损伤作用。抗磷脂综合征的标志性特征为动静脉的血栓形成，这可能导致中风、心肌梗死及血栓栓塞。它们是单独或作为 SLE 的一个特征而存在的，因为针对磷脂结合蛋白的抗体主要是 β2 糖蛋白，而不是由于真正的抗磷脂抗体[270]。通过一种尚未完全理解的机制，这些抗体增强血小板的凝集和活化，促进血栓形成，但在体外却自相矛盾地延长部分(促)凝血酶原激酶时间，后者为凝血的一种标志。这种体外的现象被称为“狼疮抗凝血现象，”而且在少数 SLE 患者及其他没有鉴别出何种疾病的个体中出现。它是早期自发性小产的主要原因，且可能是群体中造成血栓形成性疾病的重要原因。

1083

针对中性粒细胞胞质抗原的抗体(ANCA)也可介导组织损伤。这些起初由免疫荧光检测到的抗体，根据染色模式被分为核周(p-ANCA)及胞质(c-ANCA)抗体。p-ANCA 直接针对髓过氧化酶，而 c-ANACA 特异性地针对蛋白酶 3[221]。这些自身抗体是血管炎，是包括 Wegener 肉芽肿、微量免疫坏死、微量免疫肾小球肾炎及结节性多动脉炎的有用标志，且它们的滴度与疾病的严重性相关。针对胞浆抗原的抗体导致血管损伤和炎症的机制并不完全清楚，可能包括活化的中性粒细胞表达蛋白酶 3 和髓过氧化物酶，且可能有游离蛋白酶 3 的释放。针对这些分子的反抗体可能激发增强的中性粒细胞趋化和黏附，及启动呼吸爆发。这可能导致 T 细胞和巨噬细胞活化及坏死性肉芽肿形成达到顶峰。

治疗系统性自身免疫病的探索

总体而言，对人体系统性的自身免疫病的处理仅是经验性的，并不令人满意。免疫抑制药物如皮质类固醇广泛应用于各种严重的自身免疫和炎症性紊乱；在稍轻的情况下，作用于类花生酸类物质代谢的抗炎药物

就足以满足需要。

除皮质类固醇外，还有其他的免疫抑制剂用于系统性自身免疫病的治疗。环磷酰胺是一种烷化剂，能引起 T、B 淋巴细胞的大量消除并大大削弱细胞免疫。它被用于治疗 SLE 肾炎，尤其对肉芽肿性血管炎及结节性多动脉炎有效。它的应用引发了免疫抑制的危险，伴随上升的淋巴网状内皮恶变率。硫唑嘌呤及密切相关的 6-巯基嘌呤但也适用于同样的情况，效果虽稍差一些，但毒性也小一些。

环孢素、免疫抑制剂和 mmcophenolate mofetil 是特异地抑制 T 淋巴细胞的天然产物，它们已被成功地用于治疗 SLE、RA 和某些血管炎、肌炎。除免疫抑制效应外，它们具有明显的肾脏毒性。

氨甲蝶呤在 RA 中是广泛应用的"一线"药物，主要目的是减缓疾病的进展。它也用于多肌炎及其他结缔组织病。它的作用机制存在争议，可能与其对腺苷受体的作用而不是与其更熟悉的抗代谢作用有关。

可以乐观地认为，当它们的机制更加清楚的时候，自身免疫更特异的治疗将会出现。口服耐受可望成为一种吸引免疫抑制性 T 淋巴细胞到活动的免疫病理位点及通过 TGF-β[271] 的旁观者效应抑制炎症的一种方式，其他正在探索中的治疗手段是单克隆抗体，目的是封闭细胞因子的作用或消除淋巴细胞[204]。除在 RA 中抗 INF-α 抗体有一定效果外[205]，其他结果均令人失望。

结论

系统性自身免疫病的机制是多种多样的，目前尚未完全了解。但有几点值得重视。控制正常免疫应答的规则似乎适用于自身免疫应答：所用的免疫球蛋白或 TCR 基因，它们重排或多样化的方式几乎无例外地需要抗原来启动应答。细胞因子及其他介质的产生及对细胞因子的反应都与针对外源性抗原的应答相似，且 T 和 B 细胞以 MHC 限制性的方式相互协作。转基因及基因敲除小鼠的获得以及在基因组研究方面的不断进展，为理解系统性自身免疫紊乱的机制开创了一个新的有光明前景的探索之路。

（韩根成 译）

参 考 文 献

1. Lahita RG. The connective tissue diseases and the overall influence of gender. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1996;41:156–165.
2. Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Medicine* 1993;72:113–124.
3. Lahita RG. Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1987;30:241–248.
4. Ahmed SA, Penhale WJ, Talal N. Sex hormones, immune responses, and autommune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol* 1985;121: 531–551.
5. Lorber M, Gershwin ME, Shoenfeld Y. The coexistence of SLE with other autoimune diseaes: the kaleidoscope of autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* 1994;24:105–113.
6. Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR. Mixed connective tissue disease—an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med* 1972; 52:148–159.
7. Gottlieb AB, Lahita RG, Chiorazzi N, Kunkel HG. Immune function in systemic lupus erythematosus: impairment of in vitro T-cell proliferation and in vivo antibody response to exogenous antigen. *J Clin Invest* 1979;63:885–892.
8. Hahn BH, Bagby MK, Osterland CK. Abnormalities of delayed hypersensitivity in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1973;55:25–31.
9. Winfield JB, Winchester RJ, Kunkel HG. Association of cold-reactive anti-lymphocyte antibodies with lymphopenia in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1975;18:587–594.
10. Estes D, Christian CL. The natural history of systemic lupus erythematosus by prospective analysis. *Medicine* 1971;50:85–95.
11. Ehrlich P, Morgenroth J. On haemolysis: third communication. In: *The collected papers of Paul Ehrlich.* F. Himmelweit, ed. vol 2. London: Pergamon, 1957: 205–212.
12. Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. 1951. *J Lab Clin Med* 1990;115:636–645.
13. Rose NR, Witebsky E. Studies on organ specificity: V. Changes in the thyroid glands of rabbits following acute immunization with rabbit thyroid extracts. *J Immunol* 1956;76:417–423.
14. Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust J Sci* 1957;20:67–69.
15. Kakkanaiah VN, Seth A, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Autoreactive T cell clones isolated from normal and autoimmune-susceptible mice exhibit lymphokine secretory and functional properties of both Th1 and Th2 cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1990;57:148–162.
16. Grabar P. Autoantibodies and the physiological role of immunoglobulins. *Immunol Today* 1983;4:337–339.
17. Hooper B, Whittingham S, Mathews JD, Mackay IR, Curnow DH. Autoimmunity in a rural community. *Clin Exp Immunol* 1972;12:79–87.
18. Hawkins BR, O'Connor KJ, Dawkins RL, Dawkins B, Rodger B. Autoantibodies in an Australian population. I. Prevalence and persistence. *J Clin Lab Immunol* 1979;2:211–215.
19. Chen PP, Fong S, Carson DA. Rheumatoid factor. *Rheum Dis Clin North Am* 1987;13:545–568.
20. Nemazee DA, Sato VL. Induction of rheumatoid antibodies in the mouse: regulated production of autoantibody in the secondary humoral response. *J Exp Med* 1983;158:529–545.
21. Welch MJ, Fong S, Vaughan J, Carson D. Increased frequency of rheumatoid factor precursor B lymphocytes after immunization of normal adults with tetanus toxoid. *Clin Exp Immunol* 1983;51:299–304.
22. Bonfa E, Llovet R, Scheinberg M, de Souza JM, Elkon KB. Comparison between autoantibodies in malaria and leprosy with lupus. *Clin Exp Immunol* 1987;70: 529–537.
23. Roosnek E, Lanzavecchia A. Efficient and selective presentation of antigen-antibody complexes by rheumatoid factor B cells. *J Exp Med* 1991;173:487–489.
24. Tighe H, Heaphy P, Baird S, Weigle WO, Carson DA. Human immunoglobulin (IgG) induced deletion of IgM rheumatoid factor B cells in transgenic mice. *J Exp Med* 1995;181:599–606.
25. Tighe H, Chen PP, Tucker T, et al. Function of B cells expressing a human immunoglobulin M rheumatoid factor autoantibody in transgenic mice. *J Exp Med* 1993;177:109–118.

26. Chau V, Tobias JW, Bachmair A, et al. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 1989;243:1576–1583.
27. Klinman DM, Banks-S, Hartman A, Steinberg AD. Natural murine autoantibodies and conventional antibodies exhibit similar degrees of antigenic cross-reactivity. *J Clin Invest* 1988;82:652–657.
28. Hartman AB, Mallett CP, Srinivasappa J, Prabhakar BS, Notkins AL, Smith-Gill SJ. Organ reactive autoantibodies from non-immunized adult BALB/c mice are polyreactive and express non-biased VH gene usage. *Mol Immunol* 1989;26: 359–370.
29. Oldstone MBA. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 1987;50: 819–820.
30. Kieff E, Dambaugh T, Heller M, et al. The biology and chemistry of Epstein-Barr virus. *J Infect Dis* 1982;146:506–517.
31. Chen PP. From human autoantibodies to the fetal antibody repertoire to B cell malignancy: it's a small world after all. *Int Rev Immunol* 1990;5:239–251.
32. Casali P, Notkins AL. Probing the human B-cell repertoire with EBV: polyreactive antibodies and CD5+ B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1989;7:513–535.
33. Murakami M, Tsubata T, Okamoto M, et al. Antigen-induced apoptotic death of Ly-1 B cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice. *Nature* 1992;357:14–15.
34. Reap EA, Sobel ES, Cohen PL, Eisenberg RA. Conventional B cells, not B-1 cells, are responsible for producing autoantibodies in *lpr* mice. *J Exp Med* 1993; 177:69–78.
35. Reap EA, Sobel ES, Jennette JC, Cohen PL, Eisenberg RA. Conventional B cells, not B1 cells, are the source of autoantibodies in chronic graft versus host disease. *J Immunol* 1993;151:7316–7323.
36. Casali P, Burastero SE, Balow JE, Notkins AL. High-affinity antibodies to ssDNA are produced by CD-B cells in systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol* 1989;143:3476–3483.
37. Rajewsky K, Takemori T. Genetics, expression, and function of idiotypes. *Annu Rev Immunol* 1983;1:569–607.
38. Bona CA, Heber-Katz E, Paul WE. Idiotype-anti-idiotype regulation. I. Immunization with a levan-binding myeloma protein leads to the appearance of auto-anti-(anti-idiotype) antibodies and to the activation of silent clones. *J Exp Med* 1981;153:951–967.
39. Uner AH, Knupp CJ, Tatum AH, Gavalchin J. Treatment with antibody reactive with the nephritogenic idiotype, IdLNF1, suppresses its production and leads to prolonged survival of (NZB × SWR) F1 mice. *J Autoimmun* 1994;7:27–44.
40. Oukka M, Colucci-Guyon E, Tran PL, et al. CD4 T cell tolerance to nuclear proteins induced by medullary thymic epithelium. *Immunity* 1996;4:545–553.
41. Goldings EA. Defective B cell tolerance induction in New Zealand black mice I. Macrophage independence and comparison with other autoimmune strains. *J Immunol* 1983;131:2630–2634.
42. Rathmell JC, Goodnow CC. Effects of the *lpr* mutation on elimination and inactivation of self-reactive B cells. *J Immunol* 1994;153:2831–2842.
43. Staudt LM, Singh H, Sen R, Wirth T, Sharp PA, Baltimore D. A lymphoid-specific protein binding to the octamer motif of immunoglobulin genes. *Nature* 1986;323:640–643.
44. Nagarkatti PS, Snow EC, Kaplan AM. Characterization and function of autoreactive T-lymphocyte clones isolated from normal, unprimed mice. *Cell Immunol* 1985;94:32–48.
45. Sakane T, Steinberg AD, Arnett FC, Reinertsen JL, Green I. Studies of immune functions of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1979; 22:770–776.
46. Saito K, Tamura A, Narimatsu H, Tadakuma T, Nagashima M. Cloned auto-Ia-reactive T cells elicit lichen planus-like lesion in the skin of syngeneic mice. *J Immunol* 1985;137:2485–2495.
47. Weston KM, Yeh ET, Sy MS. Autoreactivity accelerates the development of autoimmunity and lymphoproliferation in MRL/Mp-*lpr/lpr* mice. *J Immunol* 1987;139:734–742.
48. Deeg HJ. Graft-versus-host disease: host and donor views. *Semin Hematol* 1993;30:110–117.
49. Erkeller-Yusel F, Hulstaart F, Hannet I, Isenberg D, Lydyard P. Lymphocyte subsets in a large cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1993;2:227–231.
50. Wigfall DR, Sakai RS, Wallace DJ, Jordan SC. Interleukin-2 receptor expression in peripheral blood lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients: relationship to clinical activity. *Clin Immunol Immunopathol* 1988;47:354–362.
51. Furukawa F, Tokura Y, Matsushita K, et al. Selective expansions of T cells expressing V beta 8 and V beta 13 in skin lesions of patients with chronic cutaneous lupus erythematosus. *J Dermatol* 1996;23:670–676.
52. Groen H, Aslander M, Bootsma H, van der Mark TW, Kallenberg CG, Postma DS. Bronchoalvelolar lavage cell analysis and lung function impairment in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 1993;94: 127–133.
53. Alcocer-Varela J, Aleman-Hoey D, Alarcon-Segovia D. Interleukin-1 and interleukin-6 activities are increased in the cerebrospinal fluid of patients with CNS lupus erythematosus and correlate with local late T-cell activation markers. *Lupus* 1992;1:111–117.
54. Zandman-Goddard G, Lorber M, Shoenfeld Y. Systemic lupus erythematosus and thymoma—a double-edged sword. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;108: 99–102.
55. Molina JF, Citera G, Rosler D, et al. Coexistence of human immunodeficiency virus infection and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1995;22:347–350.
56. Byrd VM, Sergent JS. Suppression of systemic lupus erythematosus by the human immunodeficiency virus. *J Rheumatol* 1996;23:1295–1296.
57. Eisenberg RA, Winfield JB, Cohen PL. Subclass restriction of anti-Sm antibodies in MRL mice. *J Immunol* 1982;129:2146–2149.
58. Crow MK, DelGiudice-Asch G, Zehetbauer JB, et al. Autoantigen-specific T cell proliferation induced by the ribosomal P2 protein in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1994;94:345–352.
59. Okubo M, Yamamoto K, Kato T, et al. Detection and epitope analysis of autoantigen-reactive T cells to the U1-small nuclear ribonucleoprotein A protein in autoimmune disease patients. *J Immunol* 1993;151:1108–1115.
60. Hoffman RW, Takeda Y, Sharp GC, et al. Human T cell clones reactive against U-small nuclear ribonucleoprotein autoantigens from connective tissue disease patients and healthy individuals. *J Immunol* 1993;151:6460–6469.
61. Desai-Mehta A, Mao C, Rajagopalan S, Robinson T, Datta SK. Structure and specificity of T cell receptors expressed by potentially pathogenic anti-DNA autoantibody-inducing T cells in human lupus. *J Clin Invest* 1995;95:531–541.
62. Wen L, Pao W, Fong FS, et al. Germinal center formation, immunoglobulin class swiching, and autoantibody production driven by "non-alpha/beta" T cells. *J Exp Med* 1996;183:2271–2282.
63. Fujitsu T, Sakuma S, Seki N, Senoh H, Mori J, Kikuchi H. Effect of auranofin on autoimmune disease in a mouse model. *Int J Immunopharmacol* 1986;8: 897–910.
64. Hang L, Theofilopoulos AN, Balderas RS, Francis SJ, Dixon FJ. The effect of thymectomy on lupus-prone mice. *J Immunol* 1984;132:1809–1813.
65. Steinberg AD, Roths JB, Murphy ED, Steinberg RT, Raveche ES. Effects of thymectomy or androgen administration upon the autoimmune disease of MRL/Mp-*lpr/lpr* mice. *J Immunol* 1980;125:871–873.
66. Wofsy D, Ledbetter JA, Roubinian JR, Seaman WE, Talal N. Thymic influences on autoimmunity in MRL-*lpr* mice. *Scand J Immunol* 1982;16:51–58.
67. Rozzo SJ, Drake CG, Chiang B-L, Gershwin ME, Kotzin BL. Evidence for polyclonal T cell activation in murine models of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1994;153:1340–1351.
68. Sobel ES, Cohen PL, Eisenberg RA. *Lpr* T cells are necessary for autoantibody production in *lpr* mice. *J Immunol* 1993;158:4160–4167.
69. Mounty JD, Zhou T, Johnson L. Production of transgenic mice and application to immunology and autoimmunity. *Am J Med Sci* 1990;300:322–329.
70. Peng SL, Fatenejad S, Craft J. Induction of nonpathologic, humoral autoimmunity in lupus-prone mice by a class II-restricted, transgenic alpha beta T cell. Separation of autoantigen-specific and -nonspecific help. *J Immunol* 1996;157: 5225–5230.
71. Sobel ES, Kakkanaiah VN, Kakkanaiah M, Cheek RL, Cohen PL, Eisenberg RA. T-B collaboration for autoantibody production in *lpr* mice is cognate and MHC-restricted. *J Immunol* 1994;152:6011–6016.
72. Peng SL, Madaio MP, Hughes DPM, et al. Murine lupus in the absence of alpha-beta T cells. *J Immunol* 1996;156:4041–4049.
73. Bernard NF, Eisenberg RA, Cohen PL. Response of MRL/Mp-+/+ mice to mouse Sm: non-H-2-linked genes determine T cell recognition. *J Immunol* 1985; 134:1422–1425.
74. Bernard NF, Eisenberg RA, Cohen PL. H-2 linked If gene control of the T cell recognition of the Sm nuclear autoantigen and the aberrant response of autoimmune MRL/Mp-+/+ mice. *J Immunol* 1985;134:3812–3818.
75. Mohan C, Adams S, Stanik V, Datta SK. Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. *J Exp Med* 1993;177: 1367–1381.
76. Ebling FM, Tsao BP, Singh RR, Sercarz E, Hahn BH. A peptide derived from an autoantibody can stimulate T cells in the (NZB × NZW)F1 mouse model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993;36:355–364.
77. Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody formation. *J Clin Invest* 1996;97:2063–2073.
78. Mohan C, Shi Y, Laman JD, Datta SK. The interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. *J Immunol* 1995;154: 1470–1480.
79. Ma J, Xu J, Madaio MP, et al. Autoimmune *lpr/lpr* mice deficient in CD40 ligand: spontaneous Ig class switching with dichotomy of autoantibody responses. *J Immunol* 1996;157:417–426.
80. Dziarski R. Preferential induction of autoantibody secretion in polyclonal activation by peptidoglycan and lipopolysaccharide: II. In vivo studies. *J Immunol* 1982;128:1026–1030.
81. Fisher DE, Reeves WH, Conner GE, Blobel G, Kunkel HG. Pulse labeling of small nuclear ribonucleoproteins in vivo reveals distinct patterns of antigen recognition by human autoimmune antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81: 3185–3189.
82. Rokeach LA, Jannatipour M, Haselby JA, Hoch SO. Mapping of the immunoreactive domains of a small nuclear ribonucleoprotein-associated Sm-D autoantigen. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;65:315–324.
83. Reeves WH, Pierani A, Chou CH, et al. Analysis of the assembly, DNA binding,

and antigenicity of the Ku autoantigen using recombinant vaccinia viruses. *Mol Biol Rep* 1991;15:115.
84. Rosario MO, Fox OF, Koren E, Harley JB. Anti-Ro (SS-A) antibodies from Ro (SS-A)-immunized mice. *Arthritis Rheum* 1988;31:227–237.
85. James JA, Gross T, Scofield RH, Harley JB. Immunoglobulin epitope spreading and autoimmune disease after peptide immunization: Sm B/B'-derived PPPGM-RPP and PPPGIRGP induce spliceosome autoimmunity. *J Exp Med* 1995;181: 453–461.
86. Lin RH, Mamula MJ, Hardin JA, Janeway CA. Induction of autoreactive B cells allows priming of autoreactive T cells. *J Exp Med* 1991;173:1433–1439.
87. Slobbe RL, Pruijn GJM, van Venrooij WJ. Ro (SS-A) and La (SS-B) ribonucleoprotein complexes: structure, function and antigenicity. *Ann Med Interne* 1991; 142:592–600.
88. Reynolds P, Gordon TP, Purcell AW, Jackson DC, McCluskey J. Hierarchical self-tolerance to T cell determinants within the ubiquitous nuclear self-antigen La (SS-B) permits induction of systemic autoimmunity in normal mice. *J Exp Med* 1996;184:1857 1870.
89. Fuchs S, Mozes E, Stollar BD. The nature of murine immune response to nucleic acids. *J Immunol* 1975;114:1287–1291.
90. Cooke MS, Mistry N, Wood C, Herbert KE, Lunec J. Immunogenicity of DNA damaged by reactive oxygen species—implications for anti-DNA antibodies in lupus. *Free Radic Biol Med* 1997;22:151–159.
91. Krieg AM, Yi AK, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995;374:546–549.
92. Gilkeson GS, Ruiz P, Pippen AM, Alexander AL, Lefkowith JB, Pisetsky DS. Modulation of renal disease in autoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J Exp Med* 1996;183:1389–1397.
93. Rumore PM, Steinman CR. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest* 1990;86:69–74.
94. Li JZ, Steinman CR. Plasma DNA in systemic lupus erythematosus. Characterization of cloned base sequences. *Arthritis Rheum* 1989;32:726–733.
95. Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schliessel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1624–1629.
96. Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991;353: 622–627.
97. Nygard NR, Bono C, Brown LR, et al. Antibody recognition of an immunogenic influenza hemagglutinin-human leukocyte antigen class II complex. *J Exp Med* 1991;174:243–251.
98. Asherson GL. Antigen-specific T-helper and -suppressor factors in the control of the immune response. *Immunol Suppl* 1988;1:53–56.
99. Bonomo A, Kehn PJ, Shevach EM. Post-thymectomy autoimmunity: abnormal T-cell homeostasis. *Immunol Today* 1995;16:61–67.
100. Monier JC, Costa O, Souweine G, Rigal D. Lupus-like syndrome in some strains of nude mice. *Thymus* 1980;1:241–255.
101. Morse III HC, Steinberg AD, Schur PH, Reed ND. Spontaneous "autoimmune disease" in nude mice. *J Immunol* 1974;113:688–696.
102. Sy MS, Benacerraf B. Suppressor T cells, immunoglobulin and Igh restriction. *Immunol Rev* 1988;101:133–148.
103. Moller G. Do suppressor T cells exist? *Scand J Immunol* 1988;27:247–250.
104. Urdahl KB, Pardoll DM, Jenkins MK. Cyclosporine A inhibits positive selection and delays negative selection in alpha beta TCR transgenic mice. *J Immunol* 1994;152:2853–2859.
105. Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D. Longitudinal study on the production of and cellular response to interleukin-2 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 1995;15:57–63.
106. Spronk PE, ter Borg EJ, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CG. Changes in levels of soluble T-cell activation markers, sIL-2R, sCD4 and sCD8, in relation to disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus: a prospective study. *Ann Rheum Dis* 1994;53:235–239.
107. Hagiwara E, Gourley MF, Lee S, Klinman DM. Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increased ratio of interleukin-10-interferon gamma-secreting cells in the peripheral blood. *Arthritis Rheum* 1996;39:379–385.
108. Erb KJ, Rueger B, von Brevern M, Ryffel B, Schimpl A, Rivett K. Constitutive expression of interleukin (IL)-4 in vivo causes autoimmune-type disorders in mice. *J Exp Med* 1997;185:329–339.
109. Rus V, Svetic A, Nguyen P, Gause WC, Via CS. Kinetics of Th1 and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-versus-host disease. Regulatory role of donor CD8+ T cells. *J Immunol* 1995;155:2396–2406.
110. Handwerger BS, Rus V, da Silva L, Via CS. The role of cytokines in the immunopathogenesis of lupus. *Springer Semin Immunopathol* 1994;16:153–180.
111. Jacob CO, Fronek Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1233–1237.
112. Jacob CO, Hwang F. Definition of microsatellite size variants for TNFa and Hsp70 in autoimmune and nonautoimmune mouse strains. *Immunogenetics* 1995;36:182–188.
113. Emlen W, Niebur J, Kadera R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes form patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1994;152: 3685–3692.
114. Gatenby PA, Irvine M. The bcl-2 proto-oncogene is overexpressed in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 1994;7:623–631.
115. Aringer M, Wintersberger W, Steiner CW, et al. High levels of bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, but not B lymphocytes, of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994;37:1423–1430.
116. Amasaki Y, Kobayashi S, Takeda T, et al. Up-regulated expression of Fas antigen (CD95) by peripheral naive and memory T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): a possible mechanism for lymphopenia. *Clin Exp Immunol* 1995;99:245–250.
117. Jiang Y, Moller G. In vitro effects of HgCl2 on murine lymphocytes. I. Selective activation of T cells expressing certain V beta TCR. *Int Immunol* 1996;8: 1729–1736.
118. Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 1996;98:1107–1113.
119. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1994;81:935–946.
120. Drappa J, Vaishnaw AK, Sullivan KE, Chu JL, Elkon KB. Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med* 1996;335:1643–1649.
121. Drappa J, Brot N, Elkon KB. The Fas protein is expressed at high levels on CD4-CD8- thymocytes and activated mature lymphocytes in normal mice but not in the lupus-prone strain, MRL *lpr/lpr*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10340–10344.
122. Singer GG, Abbas AK. The Fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1994;1: 365–371.
123. Russell JH, Wang R. Autoimmune *gld* mutation uncouples suicide and cytokine/proliferation pathways in activated, mature T cells. *Eur J Immunol* 1993;23:2379–2382.
124. Perkins DL, Glaser RM, Mahon CA, Michaelson J, Marshak-Rothstein A. Evidence for an intrinsic B cell defect in *lpr/lpr* mice apparent in neonatal chimeras. *J Immunol* 1990;145:549–555.
125. Katagiri T, Azuma S, Toyoda Y, et al. Tetraparental mice reveal complex cellular interactions of the mutant, autoimmunity-inducing *lpr* gene. *J Immunol* 1992; 148:430–438.
126. Reap EA, Leslie D, Abrahams M, Eisenberg RA, Cohen PL. Apoptosis abnormalities of splenic lymphocytes in autoimmune *lpr* and *gld* mice. *J Immunol* 1995;154:936–943.
127. Rubio CF, Kench J, Russell DM, Yawger R, Nemazee D. Analysis of central B cell tolerance in autoimmune-prone MRL/*lpr* mice bearing autoantibody transgenes. *J Immunol* 1996;157:65–71.
128. Casiano CA, Tan EM. Recent developments in the understandng of antinuclear autoantibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;111:308–313.
129. Yoshida S, Gershwin ME. Autoimmunity and selected environmental factors of disease. *Semin Arthritis Rheum* 1993;22:399–419.
130. Yung RL, Richardson BL. Drug-induced lupus. *Rheum Dis Clin North Am* 1994;20:61–86.
131. Blomgren SE, Condemi JJ, Vaughan JH. Procainamide-induced lupus erythematosus. *Am J Med* 1972;52:338–348.
132. Rubin RL, Nusinow SR, Johnson AD, Rubenson DS, Curd JG, Tan EM. Serologic changes during induction of lupus-like disease by procainamide. *Am J Med* 1986;80:999–1002.
133. Rubin RL, McNally EM, Nusinow SR, Robinson CA, Tan EM. IgG antibodies to the histone complex H2A-H2B characterize procainamide-induced lupus. *Clin Immunol Immunopathol* 1985;36:49–59.
134. Yung RL, Johnson KJ, Richardson BC. New concepts in the pathogenesis of drug-induced lupus. *Lab Invest* 1995;73:746–759.
135. Sutton RNP, Emond RT, Thomas DB, Doniach D. The occurrence of autoantibodies in infectious mononucleosis. *Clin Exp Immunol* 1974;17:427–436.
136. Whittingham S, McNeilage J, Mackay IR. Primary Sjogren's syndrome after infectious mononucleosis. *Ann Intern Med* 1985;102:490–493.
137. Maisch B. Autoreactive mechanisms in infective endocarditis. *Springer Semin Immunopathol* 1989;11:439–456.
138. Itescu S. Rheumatic aspects of acquired immunodeficiency syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 1996;8:346–353.
139. Johnson HM, Torres BA, Soos JM. Superantigens: structure and relevance to human disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;212:99–109.
140. de Inocencio J, Hirsch R. The role of T cells in Kawasaki disease. *Crit Rev Immunol* 1995;15:349–357.
141. East J, Prosser PR, Holborow EJ, Jaquet H. Autoimmune reactions and virus-like articles in germ-free NZB mice. *Lancet* 1967;i:755–757.
142. Hultman P, Eneström S, Pollard KM, Tan EM. Anti-fibrillarin autoantibodies in mercury-treated mice. *Clin Exp Immunol* 1989;78:470–477.
143. Pelletier L, Pasquier R, Rossert J, Vial MC, Mandet C, Druet P. Autoreactive T cells in mercury-induced autoimmunity. *J Immunol* 1988;140:750–754.
144. Black C, Pereira S, McWhirter A, Welsh K, Laurent R. Genetic susceptibility to

scleroderma-like syndrome in symptomatic and asymptomatic workers exposed to vinyl chloride. *J Rheumatol* 1986;13:1059–1062.
145. Yoshida SH, German JB, Fletcher MP, Gershwin ME. The toxic oil syndrome: a perspective on immunotoxicological mechanisms. *Regul Toxicol Pharmacol* 1994;19:60–79.
146. Kaufman LD. The eosinophilia-myalgia syndrome: current concepts and future directions. *Clin Exp Rheumatol* 1992;10:87–91.
147. Hochberg MC, Perlmutter DL, Medsger TA Jr, et al. Lack of association between augmentation mammoplasty and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1996;39: 1125–1131.
148. Wong O. A critical assessment of the relationship between silicone breast implants and connective tissue diseases. *Regul Toxicol Pharmacol* 1996;23:74–85.
149. Leslie RD, Hawa M. Twin studies in auto-immune disease. *Acta Genet Med Gemellol* 1994;43:71–81.
150. Block SR, Winfield JB, Lockshin MD, D'Angelo WA, Christian CL. Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets. *Am J Med* 1975;59:533–552.
151. Vyse TJ, Kotzin BL. Genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol* 1996;8:843–851.
152. Drake CG, Rozzo SJ, Vyse TJ, Palmer E, Kotzin BL. Genetic contributions to lupus-like disease in (NZB×NZW) F1 mice. *Immunol Rev* 1995;144:51–74.
153. Tsao BP, Cantor TM, Kalunian KC, et al. Evidence for linkage of a candidate chromosome 1 region to human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1997;99:725–731.
154. Salmon JE, Millard S, Schacter LA, et al. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J Clin Invest* 1996;97: 1348–1354.
155. Ruddy S. Rheumatic diseases and inherited complement deficiencies. *Bull Rheum Dis* 1996;45:6–8.
156. Hauptmann G, Tappeiner G, Schifferli JA. Inherited deficiency of the fourth component of human complement. *Immunodef Rev* 1988;1:3–22.
157. Arnett FC, Bias WB, Reveille JD. Genetic studies in Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 1989;2:403–413.
158. Reveille JD, Schrohenloher RE, Acton RT, Barger BO. DNA analysis of HLA-DR and DQ genes in American blacks with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1989;32:1243–1251.
159. Fujisaku A, Frank MB, Neas B, Reichlin M, Harley JB. HLA-DQ gene complementation and other histocompatibility relationships in man with anti-Ro/SSA autoantibody response of systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1990;86: 606–611.
160. Rothfield NF, Stollar BD. The relation of immunoglobulin class, pattern of antinuclear antibody, and complement-fixing antibodies to DNA in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1967;46:1785–1794.
161. Radic MZ, Weigert M. Origins of anti-DNA antibodies and their implications for B-cell tolerance. *Ann NY Acad Sci* 1995;764:384–396.
162. Shlomchik MJ, Aucoin AH, Pisetsky DS, Weigert MG. Structure and function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9150–9154.
163. Shlomchik M, Mascelli M, Shan H, et al. Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arise by clonal expansion and somatic mutation. *J Exp Med* 1990; 171:265–292.
164. Bloom DD, Davignon J-L, Cohen PL, Eisenberg RA, Clarke SH. Overlap of the anti-Sm and anti-DNA responses of MRL/Mp-*lpr/lpr* mice. *J Immunol* 1993; 150:1579–1590.
165. Ibrahim SM, Weigert M, Basu C, Erikson J, Radic MZ. Light chain contribution to specificity in anti-DNA antibodies. *J Immunol* 1995;155:3223–3233.
166. Diamond B, Scharff MD. Somatic mutation of the T15 heavy chain gives rise to antibody with autoantibody specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81: 5841–5844.
167. Behar SM, Scharff MD. Somatic diversification of the S107 (T15) Vh11 germline gene that encodes the heavy-chain variable region of antibodies to double-stranded DNA in (NZB × NZW) F1 mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 3970–3974.
168. Bloom DD, Davignon J-L, Retter MW, et al. V region gene analysis of anti-Sm hybridomas from MRL/Mp-*lpr/lpr* mice. *J Immunol* 1993;150:1591–1610.
169. Miller FW, Twitty SA, Biswas T, Plotz PH. Origin and regulation of a disease-specific autoantibody response. Antigenic epitopes, spectrotype stability, and isotype restriction of anti-Jo-1 autoantibodies. *J Clin Invest* 1990;85:468–475.
170. Huff JP, Roos G, Peebles CL, Houghten R, Sullivan KF, Tan EM. Insights into native epitopes of proliferating cell nuclear antigen using recombinant DNA protein products. *J Exp Med* 1990;172:419–429.
171. Patton JR, Habets W, van Venrooij WJ, Pederson T. U1 small nuclear ribonucleoprotein particle-specific proteins interact with the first and second stem-loops of U1 RNA, with the A protein binding directly to the RNA independently of the 70K and Sm proteins. *Mol Cell Biol* 1989;9:3360–3368.
172. Papoian R, Pillarisetty R, Talal N. Immunological regulation of spontaneous antibodies to DNA and RNA. II. Sequential switch from IgM to IgG in NZB/NZW F1 mice. *Immunology* 1977;32:75–79.
173. Eisenberg RA, Craven SY, Cohen PL. Isotype progression and clonality of anti-Sm autoantibodies in MRL/Mp-*lpr/lpr* mice. *J Immunol* 1987;139:728–733.
174. Rubin RL, Tang FL, Chan EK, Pollard KM, Tsay G, Tan EM. IgG subclasses of autoantibodies in systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome, and drug-induced autoimmunity. *J Immunol* 1986;137:2528–2534.
175. Eisenberg RA, Winfield JB, Cohen PL. Subclass restriction of anti-Sm antibodies in MRL mice. *J Immunol* 1982;129:2146–2149.
176. Nakamura RM, Tan EM. Autoantibodies to nonhistone nuclear antigens and their clinical significance. *Hum Pathol* 1983;14:392–400.
177. Habets WJ, Hoet MH, De Jong BA, Van der Kemp A, van Venrooij WJ. Mapping of B cell epitopes on small nuclear ribonucleoproteins that react with human autoantibodies as well as with experimentally-induced mouse monoclonal antibodies. *J Immunol* 1989;143:2560–2566.
178. Kozono Y, Kotzin BL, Holers VM. Resting B cells from New Zealand Black mice demonstrate a defect in apoptosis induction following surface IgM ligation. *J Immunol* 1996;156:4498–4503.
179. Maddison PJ, Reichlin M. Quantitation of precipitating antibodies to certain soluble nuclear antigens in SLE. *Arthritis Rheum* 1977;20:819–824.
180. Budman DR, Merchant EB, Steinberg AD, et al. Increased spontaneous activity of antibody-forming cells in the peripheral blood of patients with active SLE. *Arthritis Rheum* 1977;20:829–833.
181. Hollinger FB, Sharp JT, Lidsky MD, Rawls WE. Antibodies to viral antigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1971;14:1–10.
182. Maul GG, French BT, van Venrooij WJ, Jiminez SA. Topoisomerase I identified by scleroderma 70 antisera: enrichment of topoisomerase I at the centromere in mouse mitotic cells before anaphase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5145–5149.
183. Mathews MB, Bernstein RM. Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity. *Nature* 1983;304:177–179.
184. Mamula MJ, Fox OF, Yamagata H, Harley JB. The Ro/SSA autoantigen as an immunogen. Some anti-Ro/SSA antibody binds IgG. *J Exp Med* 1986;164: 1889–1901.
185. Eisenberg RA, Craven SY, Warren RW, Cohen PL. Stochastic control of anti-Sm autoantibodies in MRL/Mp-*lpr/lpr* mice. *J Clin Invest* 1987;80:691–697.
186. Hochberg MC, Boyd RE, Ahearn JM, et al. Systemic lupus erythematosus: a review of clinico-laboratory features and immunogenetic markers in 150 patients with emphasis on demographic subsets. *Medicine* 1985;64:285–295.
187. Friou GJ. Setting the scene: a historical and personal view of immunologic diseases, autoimmunity, and ANA. *Clin Exp Rheumatol* 1994;12[Suppl 11]:S23–S25.
188. Friou GJ. Antinuclear antibodies: diagnostic significance and methods. *Arthritis Rheum* 1967;10:151–159.
189. Lefkowith JB, Gilkeson GS. Nephritogenic autoantibodies in lupus. *Arthritis Rheum* 1996;39:894–903.
190. Koffler D, Agnello V, Carr RI, Kunkel HG. Anti-DNA antibodies and the renal lesions of patients with systemic lupus erythematosus. *Transplant Proc* 1969; 1:933–938.
191. Lee LA, Gaither KK, Coulter SN, Norris DA, Harley JB. Pattern of cutaneous immunoglobulin G deposition in subacute cutaneous lupus erythematosus is reproduced by infusing purified anti-Ro (SSA) autoantibodies into human skin-grafted mice. *J Clin Invest* 1989;83:1556–1562.
192. Buyon JP, Ben-Chetrit E, Karp S, et al. Acquired congenital heart block: pattern of maternal antibody response to biochemically defined antigens of the SSA/Ro-SSB/La system in neonatal lupus. *J Clin* Invest 1989;84:627–634.
193. Elkon K, Weissbach H, Brot N. Central nervous system function in systemic lupus erythematosus. *Neurochem Res* 1990;15:401–406.
194. Palmer DG. The anatomy of the rheumatoid lesion. *Br Med Bull* 1995;51: 286–295.
195. Salmon M, Gaston JS. The role of T-lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Br Med Bull* 1995;51:332–345.
196. DeKeyser F, Elewaut D, Vermeesch J, DeWever N, Cuvelier C, Veys EM. The role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 1995;14[Suppl 2]:5–9.
197. Winchester RJ, Gregersen PK. The molecular basis of susceptibility to rheumatoid arthritis: the conformational equivalence hypothesis. *Springer Semin Immunopathol* 1988;10:119–139.
198. Smiley JD, Hoffman WL, Moore SE, Paradies LH. The humoral immune response of the rheumatoid synovium. *Semin Arthritis Rheum* 1985;14:151–162.
199. Winchester RJ, Agnello V, Kunkel HG. Gamma globulin complexes in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. Partial characterization and relationship to lowered complement levels. *Clin Exp Immunol* 1970;6:689–706.
200. Paliard X, West SG, Lafferty JA, et al. Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* 1991;253:325–329.
201. Vaughan JH, Fox RI, Abresch RJ, Tsoukas CD, Curd JG, Carson DA. Thoracic duct drainage in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1984;58:645–653.
202. Sany J. Immunological treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1990;8[Suppl 5]:81–88.
203. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996;14:397–440.
204. Fox DA. Biological therapies: a novel approach to the treatment of autoimmune disease. *Am J Med* 1995;99:82–88.
205. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 4997;344:1105–1110.
206. Nabozny GH, David CS. The immunogenetic basis of collagen induced arthritis in mice: an experimental model for the rational design of immunomodulatory

treatments of rheumatoid arthritils. *Adv Exp Med Biol* 1994;347:55–63.
207. Ronnelid J, Klareskog L. Local versus sytemic immunoreactivity to collagen and the collagen-like region of C1q in rheumatoid arthritis and SLE. *Scand J Rheumatol* 1995;101[Suppl]:57–61.
208. Zvaifler NJ, Firestein GS. Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:783–789.
209. Hughes RA, Keat AC. Reiter's syndrome and reactive arthritis: a current view. *Semin Arthritis Rheum* 1994;24:190–210.
210. Lopez-Larrea C, Gonzalez-Roces S, Alvarez V. HLA-B27 structure, function, and disease association. *Curr Opin Rheumatol* 1996;8:296–308.
211. Careless DJ, Inman RD. Etiopathogenesis of reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7:290–294.
212. Geczy AF, Sullivan JS. Possible role of HLA-B27 associated cytotoxic T lymphocyte activity in the pathogenesis of the seronegative arthropathies. *Ann Rheum Dis* 1995;54:329–330.
213. Kaye BR. Rheumatologic manifestations of infection with human immunodeficiency virus (HIV). *Ann Intern Med* 1989;111:158–167.
214. Taurog JD, Hammer RE. Experimental spondyloarthropathy in HLA-B27 transgenic rats. *Clin Rheumatol* 1996;15[Suppl 1]:22–27.
215. Khare SD, Luthra HS, David CS. Spontaneous inflammatory arthritis in HLA-B27 transgenic mice lacking beta 2-microglobulin: a model of human spondyloarthropathies. *J Exp Med* 1995;182:1153–1158.
216. Bacon PA. Systemic vasculitis syndromes. *Curr Opin Rheumatol* 1993;5:5–10.
217. Mader R, Keystone EC. Infections that cause vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 1992;4:35–38.
218. Sunday JS, Haynes BF. Pathogenic mechanisms of vessel damage in vasculitis syndromes. *Rheum Dis Clin North Am* 1995;21:861–881.
219. Invernizzi F, Pietrogrande M, Sagramoso B. Classification of the cryoglobulinemic syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13[Suppl]13:S123–S128.
220. Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY. Wegener's granulomatosis: an analysis of 158 patients. *Ann Intern Med* 1992;116:488–498.
221. Gross WL, Schmitt WH, Csernok E. ANCA and associated diseases: immunodiagnostic and pathogenetic aspects. *Clin Exp Immunol* 1993;91:1–12.
222. Price EJ, Venables PJ. The etiopathogenesis of Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 1995;25:117–133.
223. Bruze M, Krook G, Ljunggren B. Fatal connective tissue disease with antinuclear antibodies following PUVA therapy. *Acta Derm Venereol* 1984;64:157–160.
224. Van Rappard-Van der Veen FM, Kiesel U, Poels L, et al. Further evidence against random polyclonal antibody formation in mice with lupus-like graft-vs-host disease. *J Immunol* 1984;132:1814–1820.
225. Morris SC, Cheek RL, Cohen PL, Eisenberg RA. Autoantibodies in chronic graft versus host result from cognate T-B interactions. *J Exp Med* 1990;171:503–517.
226. Stastny P, Stembridge VA, Ziff M. Homologous disease in the adult rat, a model for autommune disease. I. General features and cutaneous lesions. *J Exp Med* 1963;118:635–648.
227. Kennedy MJ, Hess AD. Autologous graft-versus-host disease. *Med Oncol* 1995; 12:149–156.
228. Smiley JD. The many faces of scleroderma. *Am J Med Sci* 1992;304:319–333.
229. White B. Immunologic aspects of scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7: 541–545.
230. Weiner ES, Earnshaw WC, Senecal J-L, Bordwell B, Johnson P, Rothfield NF. Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I: a study of 355 patients. *Arthritis Rheum* 1988;31:378–385.
231. Gershwin ME, Abplanalp H, Castles JJ, et al. Characterization of a spontaneous disease of white leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis. *J Exp Med* 1981;153:1640–1659.
232. Cohen PL, Eisenberg RA. *Lpr* and *gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease.* Annu Rev Immunol 1991;9:243–269.
233. Izui S, Kelley VE, Masuda K, Yoshida H, Roths JB, Murphy ED. Induction of various autoantibodies by mutant gene *lpr* in several strains of mice. *J Immunol* 1984;133:227–233.
234. Perkins DL, Glaser RM, Mohan CA, Michaelson J, Marshak-Rothstein A. Evidence for an intrinsic B cell defect in *lpr/lpr* mice apparent in neonatal chimerias. *J Immunol* 1990;145:549–555.
235. Jevnikar AM, Grusby JJ, Glimcher LH. Prevention of nephritis in major histocompatibility complex class II-deficient MRL-*lpr* mice. *J Exp Med* 1994;179: 1137–1143.
236. Koh D-R, Ho A, Rahemtulla A, Fung-Leung WP, Griesser H, Mak T-W. Murine lupus in MRL/*lpr* mice lacking CD4 or CD8 T cells. *Eur J Immunol* 1995;25: 2558–2562.
237. Maldonado MA, Eisenberg RA, Roper E, Cohen PL, Kotzin BL. Greatly reduced lymphoproliferation in *lpr* mice lacking major histocompatibility complex class I. *J Exp Med* 1995;181:641–648.
238. Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* 1985;37:269–390.
239. Datta SK. A search for the underlying mechanisms of systemic autoimmune disease in the NZB × SWR model. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;51:141–156.
240. Reininger L, Winkler TH, Kalbere CP, Jourdan M, Melchers F, Rolink AG. Intrinsic B cell defects in NZB and NZW mice contribute to systemic lupus erythematosis in (NZB × NZW) F1 mice. *J Exp Med* 1996;184:853–861.
241. Izui S, Iwamoto M, Fossati L, Merino R, Takahashi S, Ibnou-Zekri N. The Yaa gene model of systemic lupus erythematosus. *Immunol Rev* 1995;144:137–156.
242. Merino R, Fossati L, Lacour M, Lemoine R, Higaki M, Izui S. H-2-linked control of the Yaa gene-induced acceleration of lupus-like autoimmune disease in BXSB mice. *Eur J Immunol* 1992;22:295–299.
243. Satoh M, Kumar A, Kanwar YS, Reeves WH. Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10934–10938.
244. Satoh M, Hamilton KJ, Ajmani AK, et al. Autoantibodies to ribosomal P antigens with immune complex glomerulonephritis in SJL mice treated with pristane. *J Immunol* 1996;157:3200–3206.
245. Shoenfeld Y, Mozes E. Pathogenic idiotypes of autoantibodies in autoimmunity: lessons from new experimental models of SLE. *FASEB J* 1990;4:2646–2651.
246. Fricke H, Mendlovic S, Blank M, Shoenfeld Y, Ben-Bassat M, Mozes E. Idiotype specific T-cell lines inducing experimental systemic lupus erythematosus in mice. *Immunology* 1991;73:421–427.
247. Kozlowski M, Mlinaric-Rascan I, Feng GS, Shen R, Pawson T, Siminovitch KA. Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTP1C is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice. *J Exp Med* 1993;178: 2157–2163.
248. Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, et al. Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *J Clin Invest* 1996;98:2109–2119.
249. Marengere LE, Waterhouse P, Duncan GS, Mittrucker HW, Feng GS, Mak TW. Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science* 1996;272:1170–1173.
250. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993;75:203–205.
251. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263–274.
252. Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutants. *Cell* 1993;75:203–205.
253. Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, et al. Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8661–8665.
254. Reap EA, Felix NJ, Wolthusen PA, Kotzin BL, Eisenberg RA. bcl-2 transgenic *lpr* mice show profound enhancement of lymphadenopathy. *J Immunol* 1995; 155:5455–5462.
255. Green MD, Sweet HO, Bunker LE. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol* 1976;892:493–512.
256. Hatakeyama A, Kasturi KN, Wolf I, Phelps RG, Bona CA. Correlation between the concentration onf serum anti-topoisomerase I autoantibodies and histological and biochemical alterations in the skin of tight skin mice. *Cell Immunol* 1996;167:135–140.
257. Wallace VA, Kondo S, Kono T, et al. A role for CD4+ T cells in the pathogenesis of skin fibrosis in tight skin mice. *Eur J Immunol* 1994;24:1463–1466.
258. Houri JM, O'Sullivan FX. Animal models in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7:201–205.
259. Cromartie WJ, Craddock JG, Schwab JH, Anderle SK, Yang CH. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med* 1977;146: 1585–1602.
260. Stimpson SA, Esser RE, Carter PB, Sartor RB, Cromartie WJ, Schwab JH. Lipopolysaccharide induces recurrence of arthritis in rat joints previously injured by peptidoglycan-polysaccharide. *J Exp Med* 1987;165:1688–1702.
261. Castro JE, Listman JA, Jacobson BA, et al. Fas modulation of apoptosis during negative selection of thymocytes. *Immunity* 1996;5:617–627.
262. Naboczny GH, David CS. Collagen arthritis in T cell receptor congenic mice. A unique approach to study the role of T cell receptor genotypes in autoimmune arthritis. *Adv Exp Med Biol* 1995;383:99–104.
263. Iwakura Y, Tosu M, Yoshida E, et al. Induction of inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in mice transgenic for HTLV-1. *Science* 1991; 253:1026–1028.
264. Green JE, Hinrich SH, Vogel J, Jay G. Endocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature* 1989;341:72–74.
265. Nishioka K, Maruyama I, Sato K, Kitajima I, Nakajima T, Osame M. Chronic inflammatory arthopathy associated with HTLV-1. *Lancet* 1989;i:441–441.
266. Brennan FM. Transgenic models for arthritis: useful clues to be gained? *Ann Med* 1996;28:271–274.
267. Wang Y, Hu Q, Madri JA, Rollins SA, Chodra A, Matis LA. Amelioration of lupus-like autoimmune disease in NZB/W F1 mice after treatment with a blocking monoclonal antibody specific for complement component C5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8563–8568.
268. Koffler D, Schur PH, Kunkel HG. Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1967;126:607–624.
269. Mukherjee R, Zhang Z, Zhong R, Yin Z-Q, Roopenian DC, Jevnikar AM. Lupus nephritis in the absence of renal major histocompatibility complex class I and class II molecules. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2445–2452.
270. Roubey RAS. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum* 1996;39:1444–1454.
271. Kagnoff MF. Oral tolerance: mechanisms and possible role in inflammatory joint diseases. *Baillieres Clin Rheumatol* 1996;10:41–54.

第 34 章 器官特异性自身免疫

Ethan M. Shevach[①]

1089

习惯上根据自身免疫性反应针对的抗原是局限于特定的器官还是广泛分布在体内,将自身免疫病分为器官特异性(胰腺、脑、甲状腺、胃肠道)或非器官特异性(系统性红斑狼疮、风湿性关节炎)。器官特异性自身免疫的特征是选择性地定位于单个器官或个别细胞类型,整个免疫系统受累异常少见。但应当指出的是这种区分是人为的,因为系统和器官特异性自身免疫仍有可能具有相同的机制。事实上,在人和动物体内一种器官特异性疾病常常与另一种相关(如糖尿病、胃炎和甲状腺炎),这使得共同的免疫、遗传或环境因素在这两种类型的自身免疫中可能均起关键作用。

器官特异性自身免疫病通常被认为是耐受诱导机制缺陷,使机体不能清除或灭活自身抗原反应性淋巴细胞所致。自身抗原破坏自身耐受的作用在大多数自发性自身免疫病中并不太清楚,例如,是否需要自身靶抗原的存在来启动和维持致病性的免疫反应(发生在自身免疫过程中)?抗原的呈递和自身反应性淋巴细胞的初始活化是否一定发生在靶器官部位,还是发生在远离靶器官的部位?本章分为三节,第一节描述人和实验动物的主要器官特异性自身免疫病的临床和病理特征以及相关的动物模型;第二节分析与这些疾病的病因和发病机制有关的常见免疫学特征;第三节主要讨论免疫治疗的问题。

人和实验动物的主要器官特异性自身免疫病

胰岛素依赖型糖尿病

胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)是一种自身反应性淋巴细胞介导的胰腺 β 细胞完全破坏的自身免疫病。IDDM 是一种多因素的自身免疫病,其易感性由环境和遗传因素共同决定。遗传是多基因的,MHC 基因型是最强的遗传决定因素。同卵双生子间患病一致率只有 50%,90%新近诊断的 IDDM 患者对其一级亲属无影响,这提示环境因素起重要作用。大量(大约 19 个)其他遗传区域在决定易感性中也起着重要作用。对 IDDM 的易感性或抗性与不同的 HLA-DR 和 DQ 基因型相关联。在美国尽管只有 45%的白人具有 HLA-DR3

① E.M.Shevach: Laboratory of Immunology, National Instional Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892.

或 DR4,但 95%的糖尿病患者至少具有这些 HLA-DR 抗原的一种。特定 MHCⅡ基因位点和疾病易感性之间的这种强的关联意味着糖尿病反应是由抗原驱动的。在人类和主要的 IDDM 动物模型——NOD 小鼠中进行广泛的 MHC 等位基因序列分析,发现人类 MHCⅡ类分子 DQ 和 DR 以及小鼠的Ⅰ-A 和Ⅰ-E 这两种主要的等位基因之间存在复杂的相互作用[1]。NOD 小鼠表达一种不常见的 MHCⅡ类分子Ⅰ-A^{g7},其Ⅰ-A 等位基因(HLA-DQ 的鼠同源基因)在 56 位为组氨酸残基,在 57 位为一小的氨基酸残基(丝氨酸),而其他小鼠种系在这些位置的残基为脯氨酸和天冬氨酸。IDDM 易感性最强的决定因素是编码 57 位丝氨酸、丙氨酸或撷氨酸的 DQ^{β}-和 I-A^{β}-链的等位基因,而 57 位表达天冬氨酸可介导对 IDDM 的抗性。NOD 小鼠表达 I-E(β链 57 位为天冬氨酸)以及 57 位表达天冬氨酸的 DRB1 也可介导对Ⅰ型 IDDM 不同程度的抗性。尽管糖尿病 患者的 DQB1 0602(一种 IDDM 抗性等位基因)阳性同胞很少发生糖尿病,但他们能产生针对几种胰岛细胞抗原的高滴度的自身抗体。这表明抗性等位基因产生抗性并不是因为比易感的 DQB1 等位基因诱导更多的对胰岛细胞抗原的自身耐受。

在糖尿病的临床前期通常有几年的慢性自身免疫过程[2,3]。长期患 IDDM 的胰腺最显著的组织学特征是分泌胰岛素的β细胞几乎全部缺失,但保留了分泌胰高血糖素或胰腺多肽的细胞。在 IDDM 发生时或发生后不久大多数胰岛缺失β细胞,剩余的胰岛发生胰岛炎,表现为慢性炎症浸润,主要由 $CD8^+$ T 细胞和数量不等的 $CD4^+$ T 细胞、B 淋巴细胞、巨噬细胞和 NK 细胞组成。β细胞上 HLAⅠ类分子的表达增加,而Ⅱ类分子在巨噬细胞和内皮上过量表达。胰岛血管内皮上的 ICAM1 也增加。有胰岛炎的胰岛在新诊断的 IDDM 患者的胰腺内分布明显不均,因为大部分代谢活化的β细胞可优先被破坏。组织学研究表明,β细胞体积减小 80%才能诱导有症状的 IDDM。

胰岛细胞胞质自身抗体(ICA)可与胰岛内所有内分泌细胞胞质内的抗原发生反应,用间接荧光显微镜可检测到这种抗体。靶抗原包括胰岛素、羧基肽酶 H、外周蛋白、硫酸脑苷脂、ICA512 和 ICA89[4]。ICA512/IA-2 是蛋白酪氨酸磷酸酶多基因家族的一个成员,主要表达在神经内分泌细胞中,尤其在分泌颗粒中。用糖尿病患者的血清可检测到的另外两种分子量为 37kDa 和 40kDa 的抗原,现在已证明,40kDa 的抗原是 ICA512/IA-2 基因产物重要的蛋白水解片段,37kDa 的抗原是另一种相关的编码 Phogrin 分子基因产物的蛋白水解片段。0.5%的正常人、3%~4%的 IDDM 患者的非糖尿病亲属以及 70%~80%新近诊断的 IDDM 患者体内发现了针对以上抗原的抗体。较小的年龄和较高的自身抗体滴度与发病危险性的增加有关。在未用任何胰岛素治疗之前,大约过半的 IDDM 患者体内存在针对胰岛素的自身抗体,抗胰岛素自身抗体和胰岛素细胞胞质抗体在体内同时存在比只存在其中之一有更高的患病危险性[4]。在较年轻的个体内存在抗胰岛素抗体可能反映更快速的胰岛细胞破坏和 IDDM 进展。谷氨酸脱羧酶(GAD)被认为是一种重要的β细胞自身抗原。GAD 有两种同工酶——GAD65 和 GAD67,可催化γ-氨基丁酸的生物合成。GAD65 和 GAD67 的分子大小、氨基酸序列(大约存在 30%序列差异)、细胞内的分布以及与 GAD 辅助因子(吡哆醛磷酸)的相互作用均不相同。已证明,在尚无糖尿病症状的个体内抗 GAD 抗体的存在是发展为明显糖尿病的可靠预测指标。抗 GAD 自身抗体水平在患病后几年内开始下降,6 年后与对照组无明显差别[5]。含有 GAD 的β细胞的破坏和抗原驱动的免疫反应被抑制可能导致这些抗体的消失。大部分有神经病变的糖尿病患者继续表现高水平的抗 GAD,这可能反映了免疫系统受到 GAD(存在于外周神经系统)的继续刺激。新近诊断的 IDDM 患者可能具有针对 BSA 和被称为 ABBOS 的 17 个氨基酸的 BSA 肽的抗体。据推测,在生命早期食入牛奶可启动对β细胞的破坏,其机制为与牛血清白蛋白和 69kDa 的β细胞抗原同源的 ABBOS 序列之间存在分子模拟,但是对这种观点尚存在争议。

尚无证据表明自身抗体在 IDDM 发病机制中起作用,但已有大量证据表明,胰岛β细胞破坏和损伤是由胰岛细胞抗原特异性 Th1 细胞介导的。已鉴定有 8~10 种胰岛β细胞表达的蛋白可作为自身免疫过程潜在的靶抗原,过去 5~8 年已鉴定了这些蛋白的生化特性。但是关于每种抗原是否为真正的病原及其在疾病过程中的作用了解得并不多。有一半新近患 IDDM 的患者可产生针对 GAD 的 T 细胞增殖反应。在限定 GAD 功能表位方面已有一些进展,这些表位由 DR4 呈递[6]。淋巴细胞对 GAD 的反应性比高滴度的针对 GAD 的

自身抗体或许能更好地预示 IDDM 的发展，但是目前尚不能将外周 T 细胞反应性作为患 IDDM 危险性的可靠指标。将 IDDM 患者的淋巴细胞暴露于胰岛细胞、138kDa 的胰岛细胞抗原和胰岛素也可发生增殖。T 细胞介导的胰岛破坏可能继发于由 Th1 细胞自身产生的细胞因子，或在发炎胰岛内的另一些炎症细胞中诱导的细胞因子；此外，这些细胞因子可能刺激 β 细胞产生导致这些细胞死亡的 NO。总之，仍不清楚哪一种抗原在启动自身免疫反应中起主要作用，也不可能从这些自身抗原中区分出诱发自身免疫反应的主要自身抗原。

1091

应用合适的动物模型极大促进了对 IDDM 的研究。Biobreeding(BB)大鼠[7]和 NOD 小鼠可发生一种与人类疾病非常相似的 IDDM[8,9]。NOD 小鼠具有较高发病率(雌性为 80% ~ 90%，雄性 50% ~ 60%)。基因分析表明 NOD 所患的糖尿病是多基因疾病。正如前面讨论的那样，糖尿病相关基因(Idd)MHC 起了关键作用。小鼠和人的两种 MHCⅡ 的易感等位基因在结构上非常相似，这进一步支持 NOD 模型对人类疾病的重要性和相关性。其他 IDDM 易感的隐性等位基因包括小鼠染色体 3、7、11 和 14 上的基因，这些基因对增加 IDDM 发病率似乎有累积作用。3 号染色体上的 Idd-3 和 Idd-10 是胰岛炎和糖尿病的易感基因，而 Idd-5 似乎主要是胰岛炎的易感基因。胰岛炎和糖尿病并非 100% 相关，因为一些种系的 NOD 小鼠可发生胰岛炎但很少患糖尿病。胰岛炎对糖尿病诱导可能必要但并不充分。奇怪的是，在所有 NOD 克隆系中均发现无致病菌的 NOD 小鼠的发病率最高(几乎 100%)。

在 NOD 小鼠大约 3 ~ 4 周龄时可自发出现胰岛炎，在 10 ~ 30 周龄之间 80% 的雌性小鼠可发展成明显的糖尿病。已明确 T 细胞在 NOD 小鼠发病机制中的作用，免疫组织学分析表明胰岛损伤中的主要细胞是 T 细胞。先天性无胸腺或在新生期被摘除胸腺的 NOD 小鼠不患病，应用大量抗 T 细胞试剂可改善或防止疾病。将来自患病动物的 T 细胞(包括 T 细胞克隆系)输入经射线处理过的年轻 NOD 小鼠或未经处理的新生 NOD 小鼠可在其成熟期之前诱导糖尿病的发生。短期内分析 NOD 小鼠体内的 β 细胞反应发现在早期只有少数自身反应性抗原参与反应。随着胰岛炎症的发展，更多的 β 细胞受到破坏，可明显导致其他 β 细胞特异性 T 细胞的致敏和募集。如果用四氧嘧啶毒素处理以破坏 6 个月龄的 NOD 小鼠 β 细胞，其脾细胞不转移糖尿病，却可诱导受者发生涎腺炎(在 NOD 小鼠中表现的另一种疾病)[10]，可见，保持致糖尿 T 细胞的功能活性需要 β 细胞的存在。此外，将糖尿病小鼠的脾细胞输入 β 细胞缺陷小鼠体内也表现出转移糖尿病的能力下降(表 34.1)。

表 34.1　致糖尿病 T 细胞的诱导和持续存在需要胰岛细胞

供　体	发病率/%
A.非糖尿病患者	89
B.四氧嘧啶处理	0
C.糖尿病患者→雄性	60
D.糖尿病患者→雄性/四氧嘧啶处理	0

将 6 个月龄的非糖尿病 NOD 雌性小鼠(A)的脾细胞或年龄相当在 3 周龄时用四氧嘧啶处理过的雌性小鼠(B)的脾细胞输入经放射线处理过的 8 周龄的 NOD 雄性小鼠体内，输入细胞后 12 周检测糖尿病的发病率。将糖尿病雌性小鼠的脾细胞输入经放射线处理的雄性小鼠(C)或放射线和四氧嘧啶处理过的雄性小鼠(D)体内，经过 28 天后检测这些受者体内的细胞诱导放射线处理的雄性小鼠发生糖尿病的能力。资料来自参考文献[10]。

用 TCR 转基因小鼠可研究 NOD 小鼠疾病的发展过程，这种转基因小鼠的 T 细胞克隆可识别胰岛细胞抗原[11]。BDC2.5 细胞克隆是 $CD4^+$ 致糖尿病细胞，用任何鼠系的胰岛细胞和 NOD 小鼠的抗原呈递细胞(APC)刺激时这种细胞均可增殖。表达转基因 TCR 的细胞在转基因小鼠胸腺内被阳性选择后迁移到外周，而且未表现出异常的活化状态，在 3 周时突然发生胰岛炎，并很快蔓延，波及整个胰岛，即使存在非常严重的胰岛炎，糖尿病也只有很晚时才出现，经 10 ~ 25 周已广泛蔓延。从 BDC2.5 转基因小鼠的这些结果可推测，在 TCR 转基因小鼠和普通 NOD 小鼠体内疾病的演变过程都有两个关键的时相点[12]。在 3 周龄之前未发生胰岛炎，尽管此时免疫系统中循环着大量的自身反应 T 细胞(在转基因体内)，检测时相点 1 标志胰岛炎的发生。尽管胰岛炎已扩散，但是完好的 β 细胞可长期持续存在，而且无糖尿病发生，最后失去平衡，胰岛炎变得具有攻击性。检测时相点 2 标志从胰岛炎向明显的糖尿病转变，但是 BDC2.5 转基因小鼠具有预先形成的细胞池，在检测时相点 1 之前，NOD 小鼠需要 3 周的时间来募集、激活自身反应细胞。检测时相点 1 可能与断奶和此时免疫变化有关，包括摄食和肠道菌群的转变，发生在断奶时的广泛刺激可能改变了 T 细胞的归巢

能力，并赋予它们向胰腺部位迁移的能力，或者导致胰腺血管内皮改变从而有利于胰岛炎的发生。患胰岛炎但无糖尿病的TCR转基因或NOD小鼠的脾细胞不能将糖尿病转移给新生受者，但患有明显糖尿病的脾细胞则可转移疾病。大量的因素可能与检测时相点2的调控有关，包括浸润的T细胞(Th1/Th2)分泌细胞因子的能力；通过细胞表面分子(如CTLA4)介导阴性调控的信号传导途径被阻断；或者通过非特异性相互作用(如抑制性细胞因子的分泌)(参见"共刺激在自身反应T细胞活化和失活中的作用")来调控胰岛炎的调节性细胞群发生缺乏或失活。将转基因小鼠与TCRα链缺陷小鼠交配清除非转基因编码特异性的T细胞并未阻止糖尿病的发生，反而加速了疾病发生，这提示突破检测时相点2不需要其他细胞(如$CD8^+$)参与。

当观察到微弱的胰岛炎症组织学征象而在其他β细胞抗原(如热激蛋白HSP60、外周蛋白和羧基肽酶)的反应尚不能被检测到的年龄时，NOD小鼠可发生针对GAD和胰岛素的抗体反应[13]。抗GAD反应可能调节了与胰岛炎有关的起始事件。在胰岛炎症发生前或出现广泛的胰岛炎的年龄时，用GAD处理NOD小鼠可防止糖尿病的发生[14]。被诱导的GAD特异性调节T细胞可能介导这种保护作用，这种T细胞分泌的淋巴因子可非特异性抑制致糖尿病反应(参见"Th1/Th2平衡")。胰岛素是另一种β细胞自身抗原，在致糖尿病反应中似乎起关键作用。胰岛素特异性$CD4^+$ T细胞克隆可加速年轻NOD小鼠的疾病进程，或将疾病转移给NOD-SCID(重症联合免疫缺陷)小鼠[15]。口服胰岛素治疗年轻NOD小鼠也能防止糖尿病(参见"免疫治疗方法"一节的"口服耐受")，与用GAD处理年轻NOD小鼠相反，用胰岛素处理的NOD小鼠继续表现胰岛炎，提示抗胰岛反应对疾病发展中的更远端事件可能是必需的。在NOD小鼠体内也可检测到自身抗体和HSP60特异性T细胞反应。目前尚不清楚HSP60是否为人类糖尿病中的靶抗原，有报道用HSP60处理NOD小鼠也可防止疾病发生。

1092

IDDM的NOD小鼠模型被广泛用于探讨胰腺β细胞破坏的病理过程。最重要的是在NOD小鼠的胰岛内发现$CD8^+$和$CD4^+$ T淋巴细胞浸润，过继转移新近患糖尿病NOD小鼠的细胞后发生的β细胞破坏需要$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞二者的共同参与。人们对这些结果的最初解释为：$CD4^+$细胞启动对胰岛的攻击，然后召募$CD8^+$细胞，后者是负责最终β细胞破坏的效应细胞。但是现在看来，$CD8^+$细胞似乎更有可能在诱导疾病中起重要作用，因为与MHC Ⅰ缺陷、$β_2$微球蛋白($β_2$m)基因敲除小鼠杂交的NOD小鼠既不发生胰岛炎也不发生糖尿病[16]。自身抗原特异性$CD8^+$ T细胞的作用是启动β细胞损伤。由于胰腺β细胞不表达MHC Ⅱ类分子，$CD4^+$细胞将识别被处理过的可溶性抗原，这种抗原来自MHC Ⅱ($I\text{-}A^{g7}$)环境中的β细胞(NOD的APC上表达)。6~8周龄的供者对疾病的转移绝对依赖于$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞，但是将糖尿病供者脾细胞内的$CD8^+$ T细胞清除后再输入受者体内，只观察到糖尿病发病率降低和发病时间延迟，这一现象与上述研究结果一致。

从7周龄的NOD小鼠体内分离出胰岛反应性$CD8^+$细胞毒性T细胞(CTL)克隆，进一步支持了$CD8^+$ T细胞在NOD小鼠体内的致病作用，此时的小鼠患有胰岛炎，但在几周内不会转变成糖尿病[17]。已证明这些细胞在体外可破坏胰腺β细胞，并迅速(<5天)在经放射线处理但无$CD4^+$共同输入的NOD小鼠体内导致糖尿病发生。另外$CD8^+$克隆能将糖尿病转移给只有MHC Ⅰ抗原相匹配的SCID小鼠。与这些结果相反，其他研究证明$CD8^+$克隆只有与$CD4^+$克隆共同输入时才能诱导疾病。在2~5周龄的任何时间向年轻NOD小鼠注射抗-CD8单抗可抑制胰岛炎的发展[18]。尚不清楚在生命早期的几周内缺乏$CD8^+$ T细胞是如何导致胰岛炎的终生抑制。在生命最早的2~6周内仍有可能表达严格的自身抗原并激活$CD8^+$细胞产生抗胰岛细胞反应，导致炎症产生，然后激活$CD4^+$细胞的抗胰岛反应，最终导致胰岛炎。断奶时的生理变化可诱导这种自身抗原的表达。疾病的发生并不绝对需要$CD8^+$ T细胞，单独输入某些$CD4^+$细胞克隆就能诱导放射线处理的受者发生糖尿病，并能加剧具有内源性$CD8^+$细胞的年轻NOD小鼠的糖尿病。糖尿病NOD供者的$CD4^+$ T细胞也能把疾病转移给缺乏内源性$CD4^+$、$CD8^+$和β细胞的NOD/SCID小鼠。总之，这些研究表明，$CD8^+$淋巴细胞在NOD小鼠的糖尿病发病中起重要作用，但是一旦产生$CD4^+$细胞反应，$CD8^+$细胞就不是绝对需要了。糖尿病脾细胞可将疾病过继转移给NOD-$β_2$m缺陷小鼠，但发病时间延迟了，这表明$CD8^+$细胞在诱导糖尿病中起直接的效应作用。尽管关于启动人IDDM的效应细胞所知甚少，但对发病时死亡患者的尸检和新

患病者的活检中均发现胰腺中有 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 细胞[4]。

发病过程中产生大量与胰岛细胞抗原反应 $CD4^+$ T 细胞系，但相对来说只有极少数的细胞系具有病理活性的特征[19]。分析 T 细胞克隆致病作用时发现只有一个非常狭窄的窗口期，在此期间疾病才能被转移给未经射线处理的 NOD 小鼠，在出生后 8 ~ 14 天的受者中可观察到最高的疾病转移效率。3 周龄后 NOD 小鼠可抵抗 T 细胞转移的疾病。但是将糖尿病 NOD 小鼠的脾细胞过继转移给 NOD/SCID 小鼠，在 3 ~ 4 周内可导致糖尿病发生，转入 NOD/SCID 动物体内后不是所有的 $CD4^+$ 克隆都能诱导糖尿病，在许多情况下只发现胰岛炎和无明显症状的糖尿病。许多致病性 T 细胞克隆可识别由 β 颗粒膜分离的抗原片段。由于胰岛素构成了大约 80% 的 β 细胞蛋白，因此其作为自身抗原的作用也引起了人们极大的兴趣。胰岛素也是 β 细胞的主要分泌物，细胞不需要死亡即可释放大量胰岛素抗原。从 NOD 小鼠的胰岛中已分离出胰岛素特异性细胞克隆，并对包含有胰岛素 B 链 9 ~ 23 残基的肽表现出优先反应。当用胰岛素免疫其他种系小鼠时，它们可对胰岛素 A 链或复合的 A-B 链决定簇发生反应。首次检测 4 周龄的 NOD 小鼠可发现，损伤的胰岛内存在胰岛素 9 ~ 23 残基特异性 T 细胞，这些 T 细胞具有致病性，将其注射到年轻 NOD 小鼠体内可迅速导致胰岛炎和糖尿病的发生。对 B 链 9 ~ 23 残基反应性克隆的 TCRα 和 β 链进行序列分析，未发现 TCR-β 链限制性，但是大多数克隆都利用与两个同源的 Jα 区段其中之一偶联的 $V_{\alpha}13$[20]。尽管已有证据提示 GAD 可能是 NOD 小鼠疾病发生的主要抗原，但是未能从胰岛中分离出 GAD 反应性 T 细胞。

IDDM 的流行病学研究也证明了未知环境因素在疾病发展中可能起一定作用。针对与 β 细胞蛋白具有同源氨基酸序列的病毒蛋白的免疫反应可能启动了对 β 细胞的自身免疫(参见"器官特异性自身免疫病因和发病机制"一节的"分子模拟")，或者细菌和(或)病毒性超抗原(SAg)可能导致外周自身反应性 T 细胞的活化。SAg 的功能受 APC 上的 MHCⅡ 和 T 细胞上一种或多种特定 V_{β}TCR 链表达的限制。在 2 例患 IDDM 死亡病例的胰腺中发现 $V_{\beta}7$ 的优势表达[21]。正常 T 细胞可被胰腺炎症损伤部位的表面膜制备物(surface membrane preparations)激活(而用健康对照的胰腺膜制备物则不然)，其 $V_{\beta}7$ 的表达也增加。这一结果提示可能存在表面膜 SAg(surface membrance SAg)。事实上，在 2 例患者体内已鉴定出一种由人内源性反转录病毒编码的超抗原——IDDM1,222，这种病毒与鼠反转录病毒 MMTV 有关。与 MMTV 相反，IDDM 相关 SAg 由反转录病毒 env 基因编码而不是 3′LTR。反转录病毒 RNA 序列在发病的 IDDM 患者血浆中也可检测到，但在年龄相匹配的健康对照组中未发现。这种表达在 APC 内的反转录病毒 SAg 可能诱导 V_{β} T 细胞亚群的系统性活化。一些被活化的 $V_{\beta}7$ T 细胞向胰腺迁移，其中的胰岛细胞反应性 T 细胞可介导胰腺 β 细胞的破坏。生理性刺激(诸如甾体类激素、感染性病原体或普遍存在的病原体)可调节 SAg 的表达。尽管这种 IDDM 相关性 SAg 是令人激动的发现，但是这些患者的 SAg 功能的激活仍有可能是炎症的结果而不是其原因。对其他刺激反应的细胞可侵人胰腺，介导对 β 细胞的破坏，反转录病毒可能是促使 β 细胞损伤的第二刺激信号。

1093

多发性硬化和实验性过敏性脑脊髓炎

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种复发性的神经系统紊乱疾病，青壮年多发。有间接的证据支持 MS 中存在免疫介导机制[23~25]。MS 患者的大脑、脊髓和脑脊髓液(cerebrospinal fluid, CSF)中炎症细胞的特征性表型提示，MS 发病机制的中心环节是直接针对中枢神经系统(central nervous system, CNS)髓(磷脂)鞘一些成分的免疫攻击。牛痘后脑炎(postvaccinial encephalitis, PVE)与 MS 在组织病理方面的相似性也支持后者是由免疫介导。PVE 的病理学特征是血管周炎症和脱髓鞘。MS 损伤的早期征兆是血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)被突破，用磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)可观察到顺磁性物质渗漏进脑实质。MS 损伤的特点是呈斑块状，这与肉眼观察到脱髓鞘损伤的外观相似。整个大脑和脊髓中均可发现斑块状损伤。在不同的疾病期斑块损伤有不同的组织学表现。在活动性损伤中，BBB 被破坏，血清蛋白外渗进入细胞外空间。在血管周套中、整个白质区和活化的单核巨噬细胞控制区均可见炎症细胞。表达活化标志的 $CD4^+$ $TCR\alpha\beta^+$ T 细胞在斑块边缘的毛细血管后微静脉周围聚积，并在白质中呈散在分布。$CD8^+$ T 细胞在长期损伤

中的数量更多。

使活化的T细胞和单核细胞进入CNS的因素尚不十分清楚,已观察到黏附分子、MHC抗原和T细胞活化标志的表达上调。巨噬细胞主要参与髓磷脂破坏的起始步骤。在整个斑块区均可见脱髓鞘,在斑块边缘可见细长的髓鞘轴索,表明髓鞘试图再生。少突胶质细胞在损伤早期未遭破坏,但在疾病的慢性期却消失了。在MS损伤中也可发现表达γδTCR的T细胞,这种细胞可能与少突胶质细胞的选择性破坏有关。早期损伤的特征表明脱髓鞘与免疫反应共存。在慢性斑块中炎症性浸润不太明显,且存在反应性的神经胶质增生以及髓鞘再生的失败。抗髓磷脂抗体在MS损伤机制中的作用尚不清楚,尽管它们可能介导慢性MS的脱髓鞘作用。在慢性斑块中通常可见β细胞和浆细胞。在CSF中一致证明免疫球蛋白数量增加,这一现象通常被用作诊断标准,免疫球蛋白数量上升是由于IgG和一些IgM、IgA的合成增加所致,用电泳和等电聚焦技术分离Ig可发现数量有限的不同条带。在>90%的患者中可观察到这种所谓的寡克隆条带。MS患者CSF中寡克隆Ig可特异性针对几种不同的病毒。

由于MS相关的自身抗原特异性T细胞尚未被分离出来,因此难以断定细胞因子在MS发病机制中的作用。事实上,细胞因子的作用大多数是从各种治疗方案的成功和(或)失败中所推断的。例如,在一项应用IFN-γ治疗MS的实验中,18例被治疗的患者中有7例出现病情恶化,实验被迫终止。相反,用重组的人IFN-β(IFN-β-1b,用丝氨酸替换17位的半胱氨酸残基)治疗发病率减少了1/3,严重患病者也减少了一半,临床症状的好转与MRI的变化相对应,从活动性瘢痕和新损伤出现的数量来看,疾病活动性明显降低,但未证明对残疾有明显的益处。IFN-β在MS中的作用机制仍不清楚,可能与其抗T细胞增殖效应有关,也可能与其抑制IFN-γ上调内皮细胞上黏附分子的表达、MHC在单核和星状细胞上的表达或TNF的产生有关。IFN-β也可能增强活化T细胞产生转化生长因子-β(TGF-β)。IFN-β对复发-缓解型的MS也有一些治疗作用,但在慢性进展型MS中的作用尚待确定。

有26%的单卵双生子和2.3%的二卵双生子共同患有MS,MRI检测发现一些临床表现正常的单卵双生子出现与MS相同的损伤。因此,遗传因素在MS发生中有明显的作用,尽管同IDDM一样,单卵双生子之间的发病一致率远<100%。在不同种族中不同的HLA-DR特异性与MS相关,在北欧MS与MHC Ⅱ类基因DR2和DR6间存在显著的关联,对TCR胚系基因库的研究表明,TCRα和β链复合物内的基因是独立于HLA基因的危险因素。

1094 MS的地理分布并不一致,在两半球气候较冷的地区患病率较高。此外15岁前移居到发生MS地区可获得患病的危险性。MS曾经发生过流行。研究最广泛的是发生在法罗岛的MS,此地在1940年前未发现MS病例,二次世界大战期间英国军队占据此岛后才出现这种病。流行病学资料表明,MS与13~16岁之间遭遇到感染性致病因子有关,但尚未鉴定出与疾病相关的单个病原体。HTLV-1与慢性、炎症性、脱髓鞘疾病的相关性促使人们开展了在MS患者中鉴定HTLV-1样反转录病毒的广泛研究,但是未证实HTLV-1样病原体的存在。病毒在MS发病机制中的作用集中在2种病毒家族,即黏液病毒和疱疹病毒。重要观察结果是,在MS患者的CSF中常常发现针对麻疹病毒融合蛋白的抗体滴度升高。疱疹病毒家族中,以EB病毒、单纯疱疹病毒Ⅰ型和人疱疹病毒6为代表[26]。从MS患者的软脑膜、脉络膜丛和EBV感染的B细胞中多次分离出所谓的MS相关反转录病毒(MS-associated retrovirus, MSRV)[27]。

已证明在外周血中存在髓磷脂碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)反应性T细胞,MBP特异性T细胞系来自MS患者和健康个体的PBL。MS中MBP作为靶抗原的意义尚不清楚。尽管有限稀释试验已证明在MS患者的血液和CSF中,MBP特异性T细胞数量比健康个体的高,但是难以排除这种较高的细胞水平是发病过程中髓磷脂释放后事先存在的MBP特异性T细胞二次扩增造成的。在脑脊髓炎和麻疹后的血液中以及莱姆病和风疹病患病期间的CSF,MBP特异性T细胞在感染期间也可被活化。在健康对照者的血液中存在MBP特异性T细胞,这表明CNS自身抗原特异性的细胞属于正常T细胞库,这些细胞在病毒感染过程中可能被扩增。另外,通过识别病毒和自身抗原共有表位可活化自身反应性T细胞。大多数MBP特异性T细胞系是$CD4^+$,可分泌大量IFN-γ和TNF-α。MBP 87~106氨基酸序列可在4种HLA分子环境中被识别,这4种

HLA 分子与不同人种的 MS 相关。关于 MS 患者血液中 MBP 特异性 T 细胞的 TCR 应用情况的研究几乎都不一致，尚未确证优势 TCR 的应用。

研究 MS 的主要动物模型是实验性过敏性脑脊髓炎(EAE)[28,29]。具有讽刺意味的是，这种人类疾病的动物模型实际上来自于 1885 年对神经后遗症机制的分析(Pasteur 引入减毒狂犬疫苗后不久发现的)。尽管起初推测活的狂犬病毒自身诱发了 PVE，但神经并发症甚至在 1919 年引入死疫苗后仍持续存在。接种疫苗产生的抗体可与脑提取物反应，因此神经并发症由病毒疫苗相关的神经系统抗原致敏所引起。1935 年，Rivers 的实验证明了这种观点，他在试验中反复给猴子注射 CNS 的提取物，并诱导 PVE 发生[30]。使病毒在兔子的脊髓中生长来制备疫苗，用正常脊髓免疫的对照动物也可发展成 PVE。对受影响的动物进行神经病理学检查，发现了与微静脉周围淋巴细胞和单核细胞浸润相关的广泛的髓磷脂破坏区。后来证明，一次注射 CNS 提取物加佐剂即可诱导 EAE，致脑炎的化学特征表明抗原就存在于髓磷脂内。尽管 MBP 是致病性 CNS 提取物的主要成分，但后来证明其他的髓磷脂成分如脂蛋白(PLP)也能诱导 EAE，PLP 高度疏水，很难用它进行试验，但合成肽的运用克服了一些技术上的因难，在少突胶质细胞-髓磷脂膜中还有许多其他蛋白可作为 EAE 中的靶抗原，这些蛋白包括髓磷脂相关糖蛋白(myelin-associated glycoprotein，MAG)和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein，MOG)。EAE 可以是单相的，也可以是复发缓解型的。病理学研究发现，EAE 由微静脉周围炎症细胞组成，细胞种类和脱髓鞘的程度随疾病类型的不同而有所变化。用 MBP 免疫 Lewis 大鼠可诱导单相疾病，其主要病理特征是微静脉周围炎症，并伴有极轻微的脱髓鞘，而在豚鼠中，脱髓鞘程度严重得多。

EAE 由抗原特异性 CD4^{+} T 细胞所介导，已有报道发现了能够将疾病过继转移给 SJL 和 PL/J 小鼠的 T 细胞系和克隆[31]。宿主因素，尤其是研究所选的动物种属也非常重要。尽管可在远交系兔子、豚鼠和大鼠中诱导 EAE，但近交系大鼠、豚鼠和灵长类动物对 EAE 易感，而其他动物相对抵抗[32]。近交 Lewis 大鼠毫无例外全都易感；而 Brown Norway 大鼠相对抵抗，在同样条件下免疫时后者不发生疾病。同样，近交系 13 号豚鼠相对易感，而 2 号动物相对抵抗。用"相对抵抗"(relatively resistant)这个术语是因为通过调整免疫程序可在抗性种系中诱导 EAE。大多数近交系 MHC 同系和突变系小鼠对 MBP 诱导的 EAE 均表现抗性或微弱的易感性。疾病的表现和强度与致脑炎接种物的成分有关，例如，某种系的小鼠对 MBP 诱导的 EAE 表现抵抗，而对脊髓匀浆诱导的 EAE 则不然。CNS 组织或 MBP 制备物的来源在一些种系的疾病诱导中也很重要。对 Lewis 大鼠来说，豚鼠 MBP 比大鼠 MBP 致病性更强。乳剂的成分和制备、注射部位和注射次数均可影响 EAE 的诱导。百日咳杆菌被广泛用作在小鼠中诱导 EAE 的辅助因子，这种作用模式是通过增加血管的通透性来介导的。

MBP 以几种不同的形式存在，在不同的动物种系中数量和结构有所变化。在小鼠中已鉴定了 5 种不同形式的 MBP，分子质量为 14.0～21.5kDa，这些不同形式的分子通过 mRNA 剪接机制产生。每种分子的生物学功能尚不清楚。对不同物种致脑炎的分子区域亦不相同，残基 1～9 对 H-2^{u} 小鼠具有致脑炎性，而至少 2 个表位(91～102 和 95～108)对 SJL(H-2^{s})小鼠具有致脑炎性。在每一种系的动物中均发现独特的致脑炎决定簇，这一现象可能是由于 T 细胞库、抗原处理和 CNS 中暴露表位的不同所致，或者是由于肽与 MHCⅡ分子结合的不同所致。在 SJL 小鼠中 I-A^{s} 与肽 91～103 相互作用形成优势表位，T 细胞反应将首先主要针对分子的这一区域，而肽 1～9 可与 I-A^{u} 相互作用形成优势表位。但这并不排除其他 MBP 肽与 I-A^{s} 或 I-A^{u} 相互作用形成亚优势表位或抑制性表位。用 MBP 或肽免疫的 SJL 小鼠，其 T 细胞与 MBP 或肽 91～102 培养时可发生强烈增殖，也能将疾病过继性转移给幼稚的受者，同样的淋巴结细胞对肽 1～39 可产生较好的增殖反应，但不能过继转移疾病。致脑炎性与非致脑炎性 T 细胞克隆可识别同样的肽表位，诱导 MBP 特异性 T 细胞致脑炎性的因素尚不完全清楚[33]。除了与致脑炎性表位的特异性反应外，T 细胞的固有特性可能也起关键作用。EAE 效应细胞的其他生物和生化性质在 EAE 的发病机制可能起重要作用，包括其产生一系列特定细胞因子、向特定部位归巢或与特殊 APC(星状细胞、内皮细胞、小神经胶质细胞)呈递的靶抗原肽相互作用的能力。在 EAE 中淋巴细胞在 CNS 中的浸润依赖于外周血细胞与大脑毛细血管内皮的黏附作用，结果导致内皮细胞破坏，淋巴细胞向微静脉周围区域迁移。淋巴细胞与内皮细胞相互作用中有意义的黏附蛋白是 VLA-4

(整合素 α4β1)和 VCAM-1,T 细胞克隆的致脑炎性与其表达 VLA-4 的能力有关。此外,抗 VLA-4 可阻止细胞克隆在大鼠或小鼠中转移 EAE。

EAE 被认为是由原型 Th1 介导的器官特异性自身免疫性疾病。可转移 EAE 的 $CD4^+$ T 细胞系对体外抗原刺激均产生 IFN-γ 和(或)TNF-α/LTα[31]。用中和性抗体、可溶性 TNF Ⅰ受体或Ⅰ型磷酸二酯酶抑制剂阻断 Th1 细胞因子——TNF-α 的活性可导致 EAE 逆转,但注射 TNF-α 可促使其复发[35,36]。IL-12 在 EAE 效应 T 细胞的发展中起关键作用[37]。过继性转移在体外由 PLP 和 IL-12 共同培养的 T 细胞与单独同抗原培养的 T 细胞相比可使疾病病程更长,并加剧疾病发展。同样,在输入抗原刺激的淋巴结细胞后用 IL-12 处理小鼠可使疾病加剧,病程延长,如果用针对 IL-12 的抗体处理小鼠可完全阻止瘫痪的发生,只有 40%的小鼠发生轻微的疾病,目前尚没有用抗 IL-12 进行疾病治疗的相关资料,在野生型和 TNF-γ 缺陷(-/-)小鼠体内均证明,IL-12是诱导 EAE 效应细胞的关键因素[38]。

用 MBP 加不完全佐剂免疫可抑制随后用 MBP 加完全佐剂刺激时 EAE 的发生[39]。在这一模型中用合成肽加完全佐剂的保护效应与致脑炎活性一致。因此,只有致脑炎性肽才具有有效的保护作用。事先用 MBP 加不完全佐剂免疫小鼠所观察到的抑制作用可被脾细胞转移。在大鼠中,EAE 是单相的,急性期后是恢复期,再次免疫不致病[40]。这种抵抗性可能是由于诱导调节性 T 细胞(见病因和发病机制一节中 Th1/Th2 平衡)引起的。用针对 MHCⅡ的抗体处理可能通过改变致脑炎性表位向 $CD4^+$ T 细胞的呈递而防止 EAE。同样,针对 $CD4^+$ T 细胞的抗体可逆转大鼠和小鼠中的 EAE。在一些易感种系如 B10 PL 和 PL 中,与 MBP 肽反应的 T 细胞群表现出限制性细胞池。未免疫的 PL 小鼠的外周 T 细胞中有 16%~25%表达 TCRVβ8。用 MBP1~11 免疫后,PL 小鼠的 LN 细胞可被分为 $V\beta8^+$ 和 $V\beta8^-$ 亚群,检测其对 MBP1~11 肽的反应增殖能力,在 $V\beta8^+$ 细胞池中发现了反应性细胞[41]。此外,给予抗 Vβ8 单抗可阻止用 MBP1~11 加 CFA 免疫后 EAE 的诱导。这种以 TCR 为靶抗原的治疗方法在其他种系中不可能有用,这些种系的抗 MBP 反应 T 细胞池更具有异质性。

特定种系小鼠相对均一的抗-MBP 反应 T 细胞池也有助于分析在自身免疫病易感性中起作用的环境因素。在大多数自身免疫病(包括 MS)的临床复发机制中感染可能是主要的刺激因素[42]。细菌性 SAg 葡萄球菌肠毒素 B(SEB)可活化表达 Vβ8 的 T 细胞。在其 T 细胞运用 Vβ8TCR 识别 MBP 的小鼠系中,注射 SEB(表 34.2)可诱导处于临床缓解期的小鼠瘫痪疾病的恶化或复发[43]。因此,一旦自身反应被启动,微生物 SAg 通过与致病性 T 细胞直接作用影响自身免疫性疾病的过程。

表 34.2 细菌性超抗原诱导 EAE 复发

处理	发病率的增加/%
PBS	14~20
SEB	67~86

用 MBP Ac1-11 和百日咳毒素免疫诱导 EAE,3~4 周后,当小鼠从疾病的急性发作中恢复时,用 PBS 或 SEB 处理,2 周后检测疾病的发病率。资料来自参考文献[43]。

在探讨自身免疫性疾病诱导中环境因素的作用时,被证明有用的第二种方法是建立表达编码 MBP 特异性 TCR 的转基因小鼠。这种转基因动物的 MBP 特异性 T 细胞不被克隆清除,也不会失能,但可对 MBP 反应、增殖并分泌细胞因子[44]。在注射抗原加佐剂和百日咳毒素后,TCR 转基因小鼠对 EAE 的诱导高度敏感,单独注射百日咳毒素后一些转基因动物也可发生疾病,并可检测到 MBP 特异性自身抗体,这表明内源性 MBP 以转基因 T 细胞识别的形式被呈递。疾病诱导后未出现复发,表明慢性复发性 EAE 的诱导依赖于其他因素。当小鼠在普通设施或在不存在病原体的环境下饲养,可发现疾病易感性存在明显差异。在干净条件下,未见自发性疾病,单独用佐剂不能诱导疾病发生,但加上百日咳毒素后则可诱导疾病;相反,在普通环境下,一些小鼠可发生自发性 EAE,接受 MBP 加佐剂的一些小鼠也可发生疾病。

尽管这些结果强烈提示,除了特异性自身抗原外尚需要感染相关的辅助因子来促进疾病发生,但用另一种抗 MBP TCR 转基因种系可得到迥然不同的结果。在这些研究中,MBP TCR 转基因小鼠与 $RAG\text{-}1^{-/-}$ 小鼠交配得到只表达转基因 TCR 的 T 细胞转基因小鼠。在 $RAG\text{-}1^{-/-}$ 小鼠体内,只有表达经过重排的抗原受体转基因的淋巴细胞才能成熟,大约只有 14%的普通 TCR 转基因小鼠可发生自发性 EAE,而 100%的 TCR 转基因 $RAG\text{-}1^{-/-}$ 小鼠在 12 个月内可发生 EAE。总之。这些结果表明,EAE 损伤和临床症状的发生并不需要其他细胞群(包括 $CD4^+$ T 细胞、$CD8^+$ T 细胞或 B 细胞)的参与。EAE 由表达 TCR 的单一淋巴细胞群所介导,与其他

肽(由同种自身抗原或同一组织其他抗原衍生)反应的淋巴细胞对疾病的充分发展并不必要(参见“病因和发病机制”一节的“决定簇扩展”)。另一方面,这些研究也表明,在疾病诱导细胞和具有保护作用的细胞之间存在复杂的相互作用。由非转基因淋巴细胞或在普通 TCR 转基因中表达两种 TCR(一种针对自身抗原,一种针对外源抗原)的淋巴细胞所提供的保护机制仍有待阐明。外源肽特异性 TCR 可能通过分泌抗炎症细胞因子干扰诱导疾病的炎症反应,或者是由 B 细胞呈递的 MBP 肽诱导了保护性 T 细胞的产生,总而言之,这些关于抗 MBP TCR 转基因的研究(在一些方面获得了相反的结果)反映了环境因素在自身免疫病发生和发展中所起的微妙作用。

继发于调节性 T 细胞缺乏的自身免疫

在 T 细胞中介导自身-非自身区别的机制或许可分为两大类[46],第一组机制是被动的或隐性的,因为它们依赖自身反应细胞的功能性缺失或以非免疫原形式呈递自身抗原。被动耐受的机制包括对那些在胸腺内表达的自身抗原的克隆清除、T 细胞失能或对只表达在胸腺外的抗原不反应。这些机制要么依赖于自身反应 T 细胞在胸腺内死亡,要么依赖于诱导胸腺外未清除的细胞发生不反应,从这个意义上来讲这些机制是被动的。第二组机制是主动的或是显性的,因为它们可阻止能够诱导自身免疫的其他 T 细胞发生活化。主动耐受机制与其他调节性 T 细胞对自身反应性 T 细胞的主动控制有关。通过干扰正常细胞成熟或使部分 T 细胞缺乏,均可诱导正常情况下不发生自身免疫的啮齿类动物发生多种器官特异性自身免疫病。来自同系健康供者的特定 T 细胞亚群能阻止转移给这些淋巴细胞缺少的动物的自身免疫的发展,这表明完整的免疫系统包含能够阻止自身反应性细胞活化的 T 细胞。

关于调节性 T 细胞在阻止器官特异性自身免疫中作用的最早实验是对大鼠 $CD4^+$ T 细胞功能的研究,根据其表达白细胞共同抗原 CD45RC 异构体的不同,可将这些 $CD4^+$ T 细胞分为两个亚群[47],在正常成年大鼠体内 1/3 的 $CD4^+$ T 细胞是 $CD45RC^{low}$,2/3 是 $CD45RC^{high}$ 细胞,$CD45RC^{low}$ 细胞分泌 Th2 样细胞因子,在二次抗体反应中可向 B 细胞提供辅助作用;而 $CD45RC^{high}$ T 细胞与分泌 Th1 样细胞因子,在移植物抗宿主疾病(GVHD)中介导同种异体反应。奇怪的是,给无胸腺大鼠注射 $CD45RC^{high}$ 亚群细胞可诱导一种致命的系统性消耗性疾病,并伴有单个核细胞在不同器官内的浸润,如肝、胃、胰和甲状腺。注射了 $CD45RC^{low}$ 的大鼠依然健康,而且比未注射的 *nu*/*nu* 大鼠对感染具有更强的抵抗性。共同注射 RC^{low} 和 RC^{high} 亚群可阻止消耗性疾病的发生和多器官单个核单细胞的浸润。由此可见,在正常细胞池中致病性 T 细胞受控于调节性 T 细胞。

应用其他方法清除调节性 T 细胞亚群后可产生典型的器官特异性自身免疫[48]。PVG.$RT1^c$ 系大鼠不发生自发性自身免疫病,但当在 6 周龄时被切除其胸腺(Tx),并每隔 2 周用 250rads 剂量给予亚致死照射时,连续照射 4 次后可发生 IDDM,最后一次照射后 8~10 周,所有的雄性和 70% 的雌性大鼠发生选择性破坏胰腺 β 细胞的自身免疫性糖尿病。静脉注射来自同系正常供者的 $CD45RC^{low}$ T 细胞可完全阻止这种疾病,注射 IL-4 的中和性抗体不能阻断由 $CD45RC^{low}$ 细胞介导的保护作用。Penhale 及其同事最初证明用同样的方案处理 PVG.$RT1^c$ 大鼠可诱导甲状腺炎[49],也有一些可发生糖尿病,这种疾病能转移给其他动物。这些研究均涉及到对 T 细胞亚群的调控,除此之外,应该强调的是发生自发性 IDDM 的 BB 系大鼠患有遗传性淋巴细胞缺乏症,缺少表达 RT6 抗原的 T 细胞亚群,输入非糖尿病同系大鼠的 $RT6^+$ T 细胞可阻止这种大鼠发生自发性糖尿病。

尽管 $CD45RC^{low}$ T 细胞阻止疾病发生的机制仍不清楚,但这种独特的细胞亚群具有一些显著的特征。来自长期 Tx 供者的 $CD45RC^{low}$ T 细胞与来自正常供者的相比,至少具有同样的阻止糖尿病发生的能力。因此,保护性 $CD4^+$ 亚群在外周可长期存活,其调节效应不依赖于胸腺持续补给新的细胞。注射 $CD45RC^{low}CD4^+$ T 细胞阻止糖尿病发生过程中出现了一些典型的变化,经射线处理的 Tx 大鼠的胸导管淋巴结回收的 T 细胞的表型发生了变化,表达活化标志的 $CD4^+$ T 细胞的百分率降低,大约是前糖尿病动物的一半,$CD45RC^{high}$ 亚群细胞明显增加。注射 $CD45RC^{low}$ 亚群似乎导致 $CD4^+$ T 细胞亚群分布的变化,使其更接近正常大鼠的细胞。事实上,这一模型中 $CD4^+$ CD8-胸腺细胞在阻止疾病发生方面比外周 RC^{low} T 细胞更加有效。这提示由外周调节性 T 细胞介导的保护效应不可能是由于其被外周环境抗原激活所致[51]。

由新生期 Tx 诱导的自身免疫可作为另一种实验系统的例证，在这种系统中 T 细胞池的衰减导致自身免疫病。在小鼠出生后 3 天进行 Tx(d3Tx)可导致几种器官特异性自身免疫病的发生，如甲状腺炎、胃炎、卵巢炎或睾丸炎[52,53]。用同系正常动物的成年 $CD4^+$ T 细胞在出生后 14 天内重建 Tx 动物能阻止这些自身免疫病的发生。这些研究提示，正常胸腺在出生后不久即开始产生致病性的自身反应性 T 细胞，在出生后 3 天时进行 Tx 可阻止具有保护活性的成熟 T 细胞外周化，从而使 Tx 之前已经进入外周的自身反应性 T 细胞相对占优势。将正常 T 细胞的 $CD4^+$ $CD5^{low}$ 亚群输入同系 *nu*/*nu* 受者体内后可诱导同样的自身免疫病，当共同输入 $CD4^+$ $CD5^{high}$ 亚群时可阻止疾病发生。尽管起初证明这一模型中调节性 T 细胞表达高水平的 CD5 抗原，但所有的小鼠 $CD4^+$ 细胞均为 $CD5^+$，因此很难用这一标志加以区分。对具有自身免疫保护活性的 $CD4^+$ T 细胞来说 CD25 的表达比 $CD5^{high}$ 或 $CD45RB/RC^{low}$ 更具有特异性，因为清除 $CD25^+$ 细胞只清除一部分 $CD4^+$ $CD5^{high}$ 或 RB^{low} 细胞，此时自身免疫病的发病率比清除 $CD5^{high}$ 或 $CD45RB^{low}$ 时更高，涉及到的器官更广泛[54]。共同输入 $CD4^+$ $CD25^+$ 细胞群可阻止自身免疫的诱导。在正常未经免疫的小鼠体内 $CD25^+$ T 细胞大约占外周 $CD4^+$ T 细胞 10%，占 $CD8^+$ 细胞不足 1%，这些细胞大部分不表达 IL-2Rβ 链(CD122)。除了器官特异性自身免疫病，将 $CD25^-$ 细胞转入 *nu*/*nu* 受者体内可导致免疫复合物肾小球肾炎、关节炎和 GVHD 样消耗性疾病。除了针对累及器官的抗体外，也可发现 IgG 独特型抗 dsDNA 自身抗体、高丙种球蛋白血症以及自发性的抗半抗原抗体，疾病可从具有 $CD25^+$ 细胞的 *nu*/*nu* 受者被转移给另一个体，而且有别于 $CD25^-$ 细胞的输入。

这些试验表明，清除特定的 T 细胞亚群足以激活自身反应性 T 细胞，并在自身抗原以生理浓度正常表达的情况下诱发自身免疫病。尽管已有人提出[55]，或许所有被激活表达 CD25 的 $CD4^+$ T 细胞都能抑制自身反应性 T 细胞，但其他资料提示，另一种完全不同的专门抑制自身免疫的 $CD4^+$ $CD25^+$ 亚群可能具有这种抑制活性[56]。首先，$CD4^+$ $CD25^+$ 细胞是能阻止 Post-d3Tx 后发生自身免疫的惟一细胞群，因为用清除了 $CD25^+$ 细胞的脾细胞群重建 d3Tx 动物未阻止疾病发生(表 34.3)。因此，阻止输入正常 $CD4^+$ $CD25^-$ 细胞诱导 *nu*/*nu* 小鼠发生自身免疫的调节性细胞群与控制Post-d3Tx自身免疫的是同一细胞群。第二，当用SCID TCR转基因小鼠的同源 $CD4^+$ 细胞群重建 d3Tx 动物时，未观察到疾病抑制。最重要的是即使用抗原激活转基因 T 细胞，诱导动物体内 50% 以上的 $CD4^+$ 细胞表达 CD25，仍未观察到疾病阻止。除了抑制 d3Tx 之后疾病的诱导外，$CD4^+$ $CD25^+$ 细胞也能抑制将自身抗原特异细胞克隆输入 *nu*/*nu* 小鼠体内诱导的疾病。因此 $CD4^+$ $CD25^+$ 细胞群不但能抑制器官特异性自身免疫的先兆，也能抑制其效应。关于 $CD4^+$ $CD25^+$ 细胞群仍有许多重要的问题有待解决，包括被 TCR 识别的生理配体的性质、是否必须通过 TCR 活化才能发挥抑制功能以及如何介导抑制效应。

表 34.3　$CD25^+$ 细胞对 Post-d3Tx 胃炎的抑制

用于重建的细胞	发病率(%)
无任何细胞	59
正常脾细胞	0
清除 CD25 的脾细胞	59
TCR 转基因 SCID	60
TCR 转基因 SCID/免疫	55

BALB/c 小鼠出生后 3 天被摘除胸腺，第 10 天时，用表中所示细胞群重建 BALB/c 小鼠，用 TCR 转基因 SCID T 细胞重建的动物立即用能被转基因 TCR 识别的抗原免疫来诱导 CD25 表达，6 周后检测胃炎的发生，资料来自参考文献[56]。

免疫调节 T 细胞在其他自身免疫的器官特异性模型中也起作用。用 MBP 免疫后 Lewis 大鼠可发生单相的 EAE，重复免疫未诱导复发[40]。尚未发现致脑炎 T 细胞被破坏或诱导不反应的任何证据，因为 EAE 已痊愈的动物脾细胞与 MBP 一同培养可被重新激活，而且能将 EAE 转移给未经免疫的受者。从 EAE 中恢复的大鼠体内似乎正发生一种主动的过程，这种动物对输入致脑炎细胞诱导的被动性 EAE 表现渐进性的抵抗，这种抵抗是抗原特异性的。正如上节所讨论的那样，普通背景下的抗 MBP TCR 转基因小鼠与 $RAG^{-/-}$ 背景下的易感性差异强烈提示在前者体内存在免疫调节细胞，已证明这些细胞是表达 αβTCR 的 T 细胞[57]。

为使非糖尿病成年 NOD 小鼠获得对糖尿病转移的敏感性，雌性大约在 5 周龄而雄性大约 3 周龄时需要用放射线照射[58]。诱导淋巴细胞减少症的细胞毒药物——环磷酰胺可加剧 NOD 小鼠的自发性自身免疫糖尿病，并增加雄性的发病率。在年轻雌性和雄性 NOD 小鼠体内注射环磷酰胺可诱导早期糖尿病，并需要事先用射线处理才能获得对糖尿病转移的敏感性，这提示抑制自身免疫现象的作用。此外，NOD 小鼠(在糖尿

病发生前)的淋巴细胞能延迟或抑制糖尿病的转移(将患糖尿病小鼠的脾细胞输入亚致死剂量照射的NOD受者体内)[58],但未发现胰岛炎的抑制,这种抑制是由 $CD4^+$ T细胞介导的。而这种 $CD4^+$ 细胞在3周龄时摘除胸腺的雌性小鼠体内缺失。在脾细胞中检测到的保护活性在非糖尿病NOD小鼠8周龄时达最高水平,尽管在新生者的胸腺细胞存在这种保护活性,但未发现脾细胞也具有这种活性。新生期Tx可使抑制和效应活性均受到阻断。同样,糖尿病NOD供者的脾细胞与非糖尿病小鼠的 $CD4^+$(非 $CD8^+$)T细胞共同将疾病转移给NOD/SCID受者的能力受到抑制[59](表34.4),而且抑制活性仅限于 $CD4^+$ 细胞的 $CD45RB^{low}$ 亚群。

表34.4 调节性 $CD4^+$ T细胞对糖尿病的抑制

效应细胞	调节细胞	发病率/%
糖尿病NOD小鼠的脾细胞	无	90
糖尿病NOD小鼠的脾细胞	$CD4^+$ 非糖尿病细胞	20
糖尿病NOD小鼠的脾细胞	$CD8^+$ 非糖尿病细胞	70

将新近患糖尿病NOD小鼠的脾细胞与年轻(7~12周龄)非糖尿病NOD小鼠的 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T细胞共同输入NOD/SCID受者体内,8周后测定发病率。资料来自参考文献[59]。

从以上这些结果可以得出如下结论:正常健康动物具有可诱导器官特异性自身免疫病的T细胞,但调节性T细胞在保持自身耐受中起主导作用。尚待解决的主要问题是调节性T细胞抗原特异性的性质如何。有人提出T细胞通过识别耐受性抗原或由其衍生的抗原性肽来介导对耐受的调控[51]。这一模型的困难之处在于调节T细胞在胸腺内产生的同时,具有自身抗原高亲和力受体的T细胞发生了克隆清除。这种调节性T细胞池也仅限于针对那些在胸腺内表达的自身抗原,难以理解的是,这种调节性T细胞池是如何控制那些只在胸腺外表达的抗原特异性的自身反应T细胞。这些调节T细胞也可能通过基于TCR的免疫调节介导抑制作用(见"免疫治疗方法"一节的"基于TCR的免疫调节")。有人提出调节T细胞抑制效应所针对的其他对象,但任何模型都必须处理抑制细胞如何区分自身反应T细胞与外来抗原尤其是病原体决定簇特异性T细胞这个棘手的问题。目前,尚未鉴定出任何一种人类自身免疫病的发病机制是继发于调节性T细胞缺乏。另一方面,许多年来人们已知道与淋巴细胞缺少症相关的免疫缺陷患者自身免疫的发病率增高。

炎症性肠病

炎症性肠病(IBD)是一种慢性肠炎症,可能为非感染性的[65],有两种不同的类型。溃疡性结肠炎(UC)仅限于大肠,在病理上是相对表浅的溃疡性炎症;相反,节段性回肠炎(CD)可发生在胃肠道的任何部位,以透壁的肉芽肿炎症为特征。CD和UC的病因不清楚,但可能有自身免疫的基础。免疫系统被暴露于肠道内来自于食物和细菌的大量抗原,但黏膜免疫反应的特点是缺乏对针对这些抗原的细胞介导的免疫反应。适当的调节机制可主动阻止对肠道内抗原免疫反应的发展,经口暴露于抗原可能导致免疫耐受状态(见"免疫治疗方法"一节的"口服耐受")。黏膜免疫系统的免疫自稳依赖于对肠道病原体的反应和对普通的、遍在的肠道组分不反应之间的微妙平衡。大肠内容纳大量的菌群,增加了由于针对肠内菌群成分的细胞免疫反应失调导致结肠炎发生的可能性。细菌性SAg自身可激活T细胞,而细菌产物可激活固有免疫系统产生IL-12,使平衡倾斜于向Th1反应发展。IBD是由于这种平衡被打破引起的,但是仍不清楚IBD是否是一种典型的自身免疫病。已发现存在针对自身成分的抗体,就此而言,UC的确是一种器官特异性自身免疫病。抗体特异性的变化范围从与上皮细胞产物交叉反应的细菌成分到上皮细胞抗原或中性粒细胞胞浆抗原。仍不清楚这些自身抗体在发病机制中的作用,它们有可能通过抗体依赖的细胞毒性来介导破坏作用。

对动物和人IBD模型的所有研究均提示不同形式的疾病引起对正常肠道组分的高反应。IBD的结肠组织中巨噬细胞、B细胞、T细胞数量发生明显变化,而且细胞因子水平增高。正如在任何炎症反应中所预期的那样,对IBD患者的研究表明,炎症细胞因子IL-1、IL-6和TNF-α水平明显升高[66]。在一项研究中,IBD患者的外周和肠道淋巴细胞产生IL-12的水平较高,而另外的研究表明,血清和黏膜损伤中IL-12 mRNA水平和IL-12分泌增加。IL-2分泌降低的证据来自对丝裂原刺激的T细胞的研究,而IL-12产生增加的证据来自对自发性IL-2分泌的研究。

有4种主要的动物模型对研究IBD有用:①T细胞亚群和T细胞选择发生改变的小鼠,包括TCRα和β

链缺陷小鼠、MHC Ⅱ缺陷小鼠、用 CD45RB^{high}T 细胞重构的 SCID 小鼠、HLA-B27 转基因大鼠和用清除了 T 细胞的 F1 骨髓细胞重构的人 CD3ε 转基因小鼠;②基因打靶干扰 IL-2[67]、IL-10 和 TGF-β 基因的小鼠;③信号蛋白和 Gαi2 缺陷小鼠;④在直肠内引入炎症性半抗原(如三硝苯磺酸,TNBS)后发生结肠炎的大鼠和小鼠。这些不同的模型中发生的炎症反应可能代表不同的疾病。

在 IDDM 和 MS 的动物模型中有可能克隆出效应细胞,并在许多情况下可发现效应细胞具有自身抗原特异性,与此相反,研究 IBD 的动物模型获得关于效应细胞的线索极少,但这些研究强调了调节细胞在阻止疾病中的作用[68]。事实上,IBD 可能是继发于调节性 T 细胞缺乏的人类自身免疫病动物模型的最好范例(见前面讨论的"继发于调节 T 细胞缺乏的自身免疫")。一些研究提示 T 细胞对调节结肠炎是必需的,但对其诱导是选择性的。缺少大部分 αβT 细胞或 CD4$^+$ 细胞的小鼠可发生结肠炎,而 αδ 缺陷小鼠不患病[69]。这些结果提示,Ⅱ类限制性的 αβT 细胞群在阻止结肠炎发生中是重要的。αβ 和 γεT 细胞都缺乏的小鼠仍可发生疾病,这表明 T 细胞以外的细胞如 β 细胞或 NK 细胞可能参与了疾病过程。

HLA-B27 转基因大鼠可自发地发生胃十二指肠炎、结肠炎、关节炎和脊椎炎[70],这一模型在表明肠道细菌是诱导 IBD 的病原体方面最具启发性,5~20 周龄时发生的腹泻是最早的临床表现,在无菌条件下饲养的 B27 转基因大鼠不发生结肠炎和关节炎,但仍发生睾丸炎、脱毛和皮炎,发病率和严重性与普通条件饲养的 B27 转基因大鼠相似。当无菌动物重新在不存在致病性肠道菌的普通条件下饲养时,可发生关节炎和胃肠炎。因此,当不存在致病菌、病毒和寄生虫时,正常菌群中的细菌可能与慢性肠炎的发病机制有关。当转基因大鼠暴露于细菌时,可在发炎的结肠内观察到 IFN-γ 和单核因子 IL-1α/β, IL-1RA、TNF-α 和 IL-6 的表达增加。

关于人类 IBD 中效应细胞产生的细胞因子知道甚少,相反,对几种小鼠模型的研究使人们对可能涉及的病理性和保护性细胞因子有更加详细的了解,在这方面最好的疾病研究模型是将 CD45RB^{high}CD4$^+$ T 细胞输入 SCID 小鼠[71,72]。奇怪的是,这些小鼠无一例外地发生了结肠炎,而且深溃疡出现频率高,与 CD 中发生的结肠损伤相类似,但是在这一模型中小肠未受到损伤,而且直肠发病率高,这些更具有 UC 的特征。在许多方面,这种动物模型最接近于仅限于结肠损伤的 15%~25% CD 患者的疾病。对肠道菌群的反应性在这一模型中具有一定作用,将 CD45RB^{high}转入 SCID 受者后发生的消耗性疾病可用抗生素加以防止,透壁性浸润主要由巨噬细胞和 CD4$^+$ T 细胞组成。

这一模型中的结肠炎具有致病性 Th1 反应的特征,因为患有严重结肠炎的小鼠固有层 CD4$^+$ T 细胞群对体外的多克隆刺激可产生极高水平的 IFN-γ 以及较低水平的 IL-4 和 IL-10。IFN-γ 对上皮细胞有直接影响,包括加强多形核白细胞的转移和增加结肠上皮细胞的通透性,IFN-γ 也能活化巨噬细胞,与 TNF-α 协同作用加强黏附分子的表达,与 LPS 协同作用使许多炎症递质(如活性氧和氮中间递质、TNF-α 和 IL-1)产生增加。此外,给予受者抗 IFN-γ 或 IL-10 几乎可完全阻止疾病发生(表 34.5),抗 IFN-γ 的阻断效应可能继发于致病性 Th1 细胞的变化,因为只有在重构后第 1 天和 4 天时给予的 2 剂抗体可导致 10 周后明显的保护作用,此时中和水平的抗体已不存在了。用抗 IFN-γ 治疗后未诱导出 Th2 细胞。每周给予抗 TNF 阻断 TNF-α 和 TNF-β(LTα)可保护动物免于患消耗性疾病,并使结肠炎的发生显著降低。抗 IFN-γ 比抗 TNF 更能有效地防止结肠炎。仅在 T 细胞重构后前两周内给予抗 TNF 不产生任何影响,接受 8 周抗 TNF 治疗的小鼠在最后一次治疗后 4 周可发生疾病。IL-10 可能具有阻止 Th1 细胞因子诱导的功能,因为给予 IL-10 可抑制结肠内的 IFN-γ 和 TNF mRNA 水平。当治疗中断时疾病可发生,因此保护作用依赖于 IL-10 的持续存在,这表明 IL-10 阻断了炎症 T 细胞亚群的活性而

表 34.5 细胞因子在发病机制中的作用及其对 IBD 输入 SCID 受者 CD4$^+$ CD45RB^{high}T 细胞诱导的治疗

治 疗	对疾病的影响
抗 IFN-γ(1 和 4 天)	强大的保护
抗 TNF(1 和 4 天)	无保护
抗 TNF(每周)	只在治疗期有保护
IL-10	只在治疗期有保护
IL-4	无保护
CD4$^+$ CD45RB^{low}T 细胞	完全保护
CD4$^+$ CD45RB^{low} + 抗 IL-4	完全保护
CD4$^+$ CD45RB^{low} + 抗 IL-10	完全保护
CD4$^+$ CD45RB^{low} + 抗 TGFβ	无保护

将 CD4$^+$ CD45RB^{high}T 细胞注射进 SCID 小鼠体内诱导 IBD,如表所示对重构小鼠进行治疗,输入细胞后 12 周检测疾病发生。资料来自参考文献[72]~[74]。

不是调节 Th1 细胞的发展或分化。在这一模型中 IL-4 不能防止结肠炎的发生。

这一模型使人们对调节 T 细胞介导的保护机制有了更深入的了解[73,74]。当 CD45RB^{low}细胞与 CD45RB^{high}细胞共同输入时,针对 IL-10 的中和抗体不能逆转对结肠炎的抑制。相反,当重构时用抗 TGF-β mAb 治疗小鼠,每周注射持续 6 周,CD45RB^{low}细胞对结肠炎的抑制作用被完全消除(表 34.5)。抗 IL-4 可阻断保护作用,自 IL-4 缺陷小鼠和野生型小鼠分离的 CD4RB^{low}细胞能防止动物患结肠炎。因此,在缺乏 IL-4 的情况下依赖于 TGF-β 的调节机制可正常发展并发挥作用。这些研究直接证明 TGF-β 是控制肠道免疫反应的天然免疫调节机制的重要介质[68],这与 TGF-β1 缺陷小鼠的表型一致,这种小鼠可发生严重的多器官炎症性疾病,损伤最严重的是心和肺,动物在 3~5 周龄时即死亡[75]。这些小鼠受累及器官内的细胞浸润与 IFN-γ 和 TNF-α 水平升高相关,这提示 TGF-β 在防止许多器官炎症反应失调中具有重要作用。

1100

调节性 T 细胞防止 IBD 中的主要作用也可在表达人 CD3ε 基因的转基因小鼠中得到体现[76]。这些小鼠的特点是 T 细胞早期发育的早期停滞和高度异常的胸腺微环境,而且小鼠缺乏外周 T 细胞和 NK 细胞。将正常的已清除 T 细胞的 F1 骨髓移植给这些小鼠,可导致严重的结肠炎,但同时移植进正常胎儿胸腺可防止结肠炎的发生。输入少量患病小鼠的淋巴结 T 细胞可在 RAG$^{-/-}$ 受者体内诱导严重的结肠炎。患病小鼠的结肠 T 细胞具有活化的 CD4^{+} 细胞的表型,并表现明显增强的细胞毒活性。在患病动物体内已鉴定出产生 IFN-γ 和 TNF-α 的大量 CD4^{+} 和 CD8^{+} TCRαβ^{+} T 细胞[77]。将 TCRαβ$^{-/-}$ 供者的骨髓细胞移植进转基因动物体内时也可观察到 γδT 细胞的参与。这些小鼠的疾病与产生 IFN-γ 的外周和结肠内的 TCRγδ^{+} T 细胞的发展相关联。TCRαβ^{+} 和 γδ^{+} T 细胞向 IFN-γ 产生的明显倾斜与其他 IBD 模型是一致的,可能继发于结肠肠腔内细菌产物对 T 细胞的多克隆和(或)非特异性活化。这一模型提示,经过异常胸腺发育的 T 细胞缺少调节性细胞亚群,因此能诱导肠道内的致病性反应。调节性 T 细胞在移植的胎儿胸腺微环境中正常发育,而且这些细胞可防止在异常胸腺内分化的致病性 T 细胞诱导结肠炎。调节性 T 细胞在异常胸腺内不能被选择,而致病性 T 细胞可正常发育,其原因尚不清楚。这些小鼠发生的炎症性疾病为何仅限于结肠内,其原因也不清楚。

将半抗原 2,4,6 一三硝基苯磺酸(TNBS)经直肠内给予小鼠时,可明显观察到致病性 CD4^{+} Th1T 细胞的参与以及 IL-12 在这些细胞中产生的关键作用[78]。TNBS 将自身结肠蛋白与 TNP 结合在一起,然后诱导强烈的免疫反应以及与 CD 相似的广泛的透壁性炎症(如腹泻、直肠脱垂、体重下降和肉芽肿炎症)。这种炎症可持续存在,而且能被 CD4^{+} T 细胞转移给幼稚的受者,这提示起初对 TNP 替代蛋白的反应最终被针对黏膜内交叉反应抗原的反应所取代。T 细胞在体外产生 IFN-γ 和 IL-2 的水平显著增高,而 IL-4 水平减低,炎症组织内的细胞产生的 IL-12 和 IFN-γ 水平增高。在诱导同时给予抗 IL-12 和抗 IFN-γ 抗体可防止结肠炎,在结肠炎发生后用抗 IL-12 治疗也可消除疾病[79],用抗 IL-12 治疗过的小鼠固有层的 CD4^{+} T 细胞在体外刺激不能分泌 IFN-γ。这表明 IL-12 的存在对保持 TNBS 诱导的结肠炎和肠固有层 T 细胞的局部 Th1 反应的持续存在是必要的。给予 IFN-γ$^{-/-}$ 小鼠 TNBS 不能诱导疾病发生。

如果 Th1 细胞在 IBD 起重要作用,那么人们可能会推测 Th1 反应失调也会诱导疾病发生。事实上,IL-10 缺陷小鼠在普通室内条件下饲养可普遍发生小肠结肠炎,但在无致病菌条件下肠道炎症减轻而且只发生在结肠附近的黏膜内。起病时表现为小病灶炎症和极轻微的盲肠上皮增生,然后上行并横断回肠。早期损伤包括 T 细胞数量增加以及上皮细胞 MHCⅡ分子异常表达。病理变化发生在断奶时,此时正常菌群在胃肠道内发生有意义的定植。在年轻 IL-10$^{-/-}$ 小鼠体内,损伤发生的部位正是定植的细菌数量和类型最多的部位,疾病在成年小鼠体内更加严重,在回肠多个区段发生多病灶损伤,偶尔也发生在十二指肠,最终疾病以数量增加的溃疡灶和透壁损伤为显著特征。

有人推测,发生在 IL-10$^{-/-}$ 小鼠的肠道疾病是由于缺乏 IL-10 对巨噬细胞和 Th1T 细胞因子的普遍抑制效应。患病 IL-10$^{-/-}$ 小鼠的肠组织在体外自发产生 IL-1α、TNF、IL-6 和 NO 的水平升高,用免疫组化可检测到数量极多的巨噬细胞,巨噬细胞分泌细胞因子可能正处于失控状态。在结肠损伤中也检测到异常高水平的活化 CD4^{+} 和 CD8^{+} T 细胞,并产生大量的 IFN-γ,但不产生 IL-4[81]。IFN-γ 可与肠腔内细菌协同作用增强巨噬细胞细胞因子的产生,从而进一步加强炎症反应,尤其是在缺乏 IL-10 阴性调节的情况下。当 IL-10$^{-/-}$ 小鼠

在断奶时用抗 IFN-γ 处理 6 周，小鼠结肠炎的发病率降低(30%)，断奶时给予对照抗体的发病率为 90%。抗 IFN-γ 治疗对成年动物已发生的结肠炎无效，尽管上皮细胞表达 MHC Ⅱ 的水平降低。因此，IFN-γ 在反应开始时是必需的，但对反应的持续存在则不然。对年轻 IL-$10^{-/-}$ 小鼠进行 2 个月的 IL-10 治疗对调节疾病非常有效，IL-10 不能治愈成年动物中已发生的疾病，但的确可降低与疾病进展相关的腺癌和十二指肠炎的发病率。

1101 G 蛋白是信号传导蛋白，它能与一庞大的受体家族偶联向效应器传递信号，如腺嘌呤环化酶、磷脂酶 C 和离子通道。G 蛋白亚基 α_{i2} 缺陷小鼠表现出生长迟缓，并产生致命的弥散性结肠炎，其临床和组织病理学特征与人类的 UC 相似，包括结肠腺癌的发生[82]。人 UC 的这些典型特征是这种动物模型特有的。这些小鼠的淋巴细胞成熟和功能也发生了深刻的变化。缺陷小鼠的单阳性淋巴细胞数量增加，CD3 呈高密度染色，脾内 T 细胞数量正常。$\alpha_{i2}{}^{-/-}$ 小鼠的胸腺细胞和外周 T 细胞产生的 IL-2、IFN-γ 和 TNF 水平比对照组高 80 倍，而 IL-4 只有轻微升高。尽管未观察到 B 细胞发育或功能的明显异常，但在缺陷小鼠体内可检测到血浆 IgG 和 IgA 水平升高，血液中性粒细胞数量增多。由于 α_{i2} 在趋化因子与受体偶联中起作用，因此中性粒细胞或许不能向血管外迁移。与许多其他 IBD 动物模型相反，$G\alpha_{i2}$ 缺陷小鼠即使在无致病菌的条件下也可发生具有结肠炎的消耗性和组织病理特征的疾病以及腺癌。与基因缺陷、免疫功能异常以及 IBD 相关联的复杂因素仍有待探讨。

器官特异性自身免疫病的转基因模型

过去对器官特异性自身免疫病的研究仅限于发生在近交系动物的几种自发性疾病模型和注射自身抗原加佐剂后发生的疾病。需要用动物模型作为工具来了解自身免疫反应起始阶段的发病机制。转基因技术的应用建立了人类疾病的动物模型，这有利于我们了解疾病的基本机制和建立有效的治疗方法[83]。以组织特异性方式表达某些分子的动物种系尤其有用，例如，由大鼠胰岛素启动子(RIP)控制在朗格汉斯胰岛内表达转基因。外源(病毒或微生物)基因被整合进宿主基因，传给子代，变成自身抗原。用表达这种“外源”抗原的动物进行实验，研究了自身免疫中的外周耐受；用表达细胞因子或共刺激分子的动物直接研究发病机制(见前面“继发于调节 T 细胞缺陷的自身免疫”一节)。应用这些系统已建立了几种模型，使人们能够精确追踪自身免疫反应的发生、发展。因为已有充分的证据证明自身反应性 T 细胞存在于健康个体或动物体内[52,84]，因此，转基因模型在研究这些自身反应性 T 细胞的命运时尤其有用，这些自身反应 T 细胞能与不在胸腺内但只在胸腺外组织呈递的抗原反应。

向非 H-2^b 单体型小鼠注射与 RIP 连结的 MHC Ⅰ 分子 K^b 的基因，建立在 β 细胞(可产生胰岛素)内表达 K^b 基因的转基因小鼠[85]，然后将 RIP-K^b 小鼠与编码抗 K^b 特异 TCR 基因的转基因小鼠交配，使双重转基因子代的大部分 T 细胞都是 K^b 特异性和单克隆型的。最初通过这一模型研究能否诱导针对胸腺外自身抗原的耐受。尽管这些双重转基因小鼠既不发生糖尿病也不患胰岛炎，但对这些研究的解释是复杂的，因为转基因 TCR 表达密度最高的 T 细胞被清除了，可能因为转基因表达出现漏洞，K^b 并不是绝对在胰腺内表达，胸腺内可能存在一定水平的表达。另一方面，年轻的转基因小鼠确实具有低密度克隆型受体的 $CD8^+$ T 细胞，并能对表达 K^b 的皮肤移植产生排斥。抗原特异性 T 细胞似乎与胰岛 β 细胞上的 K^b 不反应，即使在皮肤移植和排斥反应后，仍未见胰岛内浸润。

当转基因 RIP-K^b 小鼠被切除胸腺、经射线照射并移植抗 K^b 转基因小鼠的骨髓和非转基因小鼠的胸腺进行重构时也可观察到上述同样的结果。在这些条件下，胸腺不能表达 K^b，这些小鼠未能清除表达高水平抗 K^b TCR 的 T 细胞。尽管如此，这些动物不发生糖尿病，并对表达在 β 细胞上的抗原仍不反应，但同对照小鼠一样可对皮肤移植产生迅速的排斥。当用表达 K^b 的细胞刺激这些动物，3 周内可观察到胰岛细胞被 $CD8^+$ T 细胞浸润，但浸润不能持续，并在以后的时相点不能被观察到，除非进行多次刺激。总而言之，这些研究清楚地证明，大多数初始 T 细胞通常不通过非淋巴组织循环，未受刺激的自身免疫 T 细胞不对靶组织产生损害。此外，这些结果提示就自身免疫病的发生而言，用交叉反应的感染因子一次刺激自身反应性 T 细胞

或许不足以诱导疾病,正如在慢性感染期间观察到的,或许需要更持久的刺激才能维持致病性反应。

在一种动物模型中淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的糖蛋白(GP)。受 RI P 的控制在胰腺 β 细胞内表达[86]。尽管体外刺激后在这些小鼠的外周很容易检测到自身反应性的 GP 特异性 CTL,但这些小鼠从不发生自发性糖尿病,因为自身抗原不能被识别。感染 LCMV 后,在 RIP/GP 转基因小鼠体内表达 GP 的 β 细胞在 8~14 天内被破坏,而在表达 RIP/GP 和抗 GP 特异性转基因 TCR 的双重转基因小鼠体内 4 天内可被破坏[87]。胰岛内浸润的 T 细胞是病毒产物(GP)特异性的,并能在体外溶解病毒感染的靶细胞。$CD8^+$ 淋巴细胞的存在对免疫病理的产生是必需的,清除这些细胞可防止 IDDM 发生。与 LCMV 感染后的疾病诱导相反,用表达 LCMV/GP 重组疫苗(VAC/GP)感染 RIP/GP 转基因小鼠未诱导自身免疫性糖尿病,但在 TCR × GP 双重转基因动物体内至第 8 天时可诱导疾病发生。因此,自身免疫诱导具有量化的一面,因为用 LCMV 感染小鼠产生的 CTL 活性比用 VAC/GP 感染高 100~1000 倍。在 RIP/GP 小鼠体内 VAC/GP 感染仍能诱导胰岛炎,但不足以诱导明显的糖尿病。在双重转基因动物中 CTL 前体细胞的增多可补偿微弱的抗原刺激,感染 VAC/GP 后小鼠可发生糖尿病。

1102

除了自身抗原特异性前体细胞的数量外,其 TCR 亲和力也决定感染是否导致自身免疫损伤,Oldstone 研究小组的发现使这一问题得到很好的解释[83,88],他们用同上所述非常相似的方法构建 LCMV RIP/GP 转基因小鼠,感染 LCMV 后,这些小鼠出现缓慢进展的 β 细胞损伤,在 LCMV 感染后只有 3~6 个月就可诱导 IDDM 发生,而在由 Ohashi 等[86]构建的小鼠体内,IDDM 在刺激后 7~4 天内即迅速发生。后来发现这两项研究之间的差异是由于 Oldstone 的实验中所用的动物在胸腺和胰腺内均表达转基因,而 Ohashi 所用的动物只在胰腺内表达转基因。在前一种情况下,在胰岛浸润中只检测到低亲和力的抗自身 CTL, $CD8^+$ CTL 的产生需要 $CD4^+$ T。这一模型在许多方面可能更好地模拟了正常小鼠和人类自身免疫的诱导过程。由于胸腺内的阴性选择和清除从来不会 100% 地有效,因此低亲和力的抗自身前体细胞以相对低的比例存在于外周。需要感染性病原体重复刺激才能使这种低亲和力的自身反应细胞活化、扩增,从自身免疫反应开始至发病需要一段较长的时间。

尽管已对 RIP/LCMV 模型进行了深入研究,但仍应该谨慎以防从单一的系统中得出过多的结论。例如,当流感病毒血凝素(HA)受 RIP 控制表达时[89],表达普通 T 细胞池的小鼠不发生糖尿病,即使用流感病毒免疫后也不发生。当这些小鼠与表达抗-HA 受体的 TCR 转基因动物交配时,$CD8^+$ 细胞在双重转基因小鼠的胰岛内聚集,新生小鼠在出生后 10 天内即可发生糖尿病。所有其他的模型均需要额外转基因的局部表达或用外源形式的转基因自身抗原免疫小鼠。在这一模型中自身耐受机制可能被大量表达转基因 TCR 的自身反应 T 细胞所掩盖,特定的 T 细胞克隆可能具有较低的活化阈值,不需共刺激信号即能活化,或者是 HA 可能被事先处理并由胰岛内的专职 APC 呈递。

综上,从这些转基因模型中得出的主要结论是针对器官特异性(非淋巴血源性的)自身抗原的 T 细胞耐受几乎未被建立,这些自身抗原存在于隔绝区或在临界水平以下被表达。这些自身抗原特异性自身反应 T 细胞既没有在生理状况下被清除也不能被功能性的灭活。这些自身抗原大部分不被识别。只要自身反应性 T 细胞的不反应状态不被淋巴内专职 APC 呈递的自身抗原所破坏,这些 T 细胞仍对机体无害。即便是实验型自身免疫的诱导也只有存在强的佐剂和(或)百日咳毒素时才能实现。在急性病毒感染期间,宿主清除病毒时只对组织产生轻微的损害,其自身抗原只是暂时小量释放,不足以活化自身反应性 T 淋巴细胞。自身免疫不可能发生,除非通过分子模拟过程病毒与被感染宿主具有共同的抗原决定簇(见“分子模拟”)。在慢性病毒感染的炎症反应期间,大量的自身抗原可能被释放,并转移给淋巴组织内的 APC,然后耐受被终止,识别组织特异性自身抗原的细胞将被激活。既使在这些条件下,自身免疫性 T 细胞的诱导也在数量、抗原暴露的时间、细胞因子的需要以及 MHC 抗原的上调方面受到精确的调控。由于自身免疫的发病率较低,在大多数宿主体内即使严重的组织破坏和大量自身抗原的释放,正常情况下也不足以诱导自身免疫病的明显症状。应该指出的是上文提到的所有转基因模型都涉及到自身抗原被 $CD8^+$ T 细胞再次识别;几种由 $CD4^+$ 细胞系表达转基因自身反应性 TCR 的小鼠的确可自发地发生自身免疫病[11],或者由于致病性 *T 细胞受到调节 T 细*

胞的控制而仍不发病[57]。

器官特异性自身免疫的病因和发病机制

分子模拟

大量关于人类自身免疫病的临床和流行学研究以及上面描述的动物模型均表明感染在自身免疫诱导中是至关重要的。在靶组织中一直未能检测到病原体,由此人们提出了“分子模拟”机制的假说,通过分子模拟对外源病原体的反应能被扩展至对自身抗原的反应[90]。许多病毒具有与正常宿主细胞成分相同的抗原位点。研究者已鉴定出与宿主和病毒组分都能反应的单抗,这提示病毒具有激发自身免疫反应并诱导疾病的能力。在一项针对 11 种不同病毒的 600 种单抗的研究中发现,这些抗体中超过 3% 与正常组织也能反应[91]。微生物病原体与宿主蛋白具有共同的决定簇。宿主针对感染病原体决定簇产生的免疫反应能与被模拟的宿主序列发生交叉反应,可能导致炎症、组织破坏和自身免疫。在病原体被清除后或多次病毒感染后再次诱发,免疫病理过程可呈慢性持续存在。宿主遗传因素也起一定作用,并能影响感染性病原体的复制。证明诱发事件(如病毒感染)和自身免疫病之间存在关联的主要困难在于发病前通常要经过较长的潜伏期,至今,分子模拟已被提示在几种人类疾病的发病机制中起作用,包括 IDDM、关节强直性脊椎炎、格-巴二氏综合征(急性感染性多发性神经炎)、原发性胆管硬化(PBC)和 MS。但是仍需确证分子模拟是这些自身免疫病的诱发因素。微生物病原体被模拟的表位与自身的不同足以引起针对它的免疫反应(对微生物来说假定具有严重的后果),而与自身的相似性使自身耐受破坏,继而发生针对被模拟的自身决定簇的自身免疫反应。

1103

分子模拟最初的例证之一是由 Fujinami 和 Oldstone 开展的研究[92],MBP(兔 MBP 的致脑炎部位,66~75 位氨基酸)的 8~10 个氨基酸和病毒蛋白之间的交叉反应能产生自身免疫反应(表 34.6)。用 B 型肝炎病毒的多聚酶接种兔子产生的体液和细胞免疫反应与 MBP 和 MBP 肽均能发生交叉反应,一些动物发生 EAE 特征性的损伤。据推测,在表达 HLA-DR2 的 MS 患者体内,相对少数的 MBP(84~102 位氨基酸)反应性 T 细胞的扩增可能继发于同免疫优势 MBP 肽有足够结构相似性的病毒肽的识别。同样,在 IDDM 中,GAD65 和 GAD67 与柯萨奇病毒的 P2-C 蛋白具有相同的氨基酸序列(表 34.7),这表明在 IDDM 中柯萨奇病毒感染将导致分子模拟,而分子模拟可能诱导自身免疫,结果导致 β 细胞破坏, GAD 释放。GAD 可激活已接触过柯萨奇病毒肽的淋巴细胞。感染消退后抗 GAD 反应还要持续很长时间[5]。另一个能较好反映分子模拟特点的例子是疟疾 CS 蛋白Ⅱ区内的一个基序(可介导子孢子与肝细胞的结合)与细胞黏附基序(在血小板反应素和补体系统的一些成员中发现的)之间存在高度同源性。

表 34.6 MBP 与 HBVP 之间的分子模拟

	66	75
MBP	Thr -Thr- His-Tyr-Gly-Ser-Leu-Pro-Gln-Lys	
	589	598
HBVP	Ile-Gly-Cys-Tyr-Gly-Ser-Leu-Pro-Gln-Glu	

资料来自参考文献[92]。

表 34.7 GAD 与柯萨奇病毒 P2-C 之间具有相同的序列

257		267
	K-M-F-P-E-V-K-E-K-G-M	
35		46
	K-I-L-P-E-V-K-E-K-H-E	

资料来自参考文献[5]。

分子模拟最使人感兴趣的例子之一是在 PBC 中观察到的,PBC 是一种自身免疫性慢性胆汁郁积性肝病,主要影响女性,可导致肝内胆管破坏,患者死于肝衰竭[93]。据推测分子模拟与 PBC 中抗线粒体抗体的产生有关,因为哺乳动物线粒体酶的 E2 亚基和大肠肝菌丙酮酸脱氢酶复合体 E2 亚基之间存在同源性。另外,在 PBC 中胆管上皮细胞表面异常表达的 HLA-DRα 链也与 E2 表位有同源性。一系列复杂的级联事件可能参与此病的致病过程。

自身免疫应该只有在微生物肽与宿主决定簇发生交叉反应,但二者之间的差异足以中断免疫耐受时才发生。在缺乏启动免疫反应的感染性病毒时组织损伤也能发生,不需要病毒复制。自身免疫本身导致组织

损伤，反过来导致更多的自身抗原释放，并不断循环。持续存在的病毒可能不断或周期性表达病毒抗原，结果被适当呈递的抗原可激发针对交叉反应的组织抗原的免疫反应，导致慢性进展性疾病。对病毒来说分子模拟可能也具有选择优势，可通过模拟抑制性或诱导耐受的宿主分子上的位点或区域使病毒可能被看作自身成分，而不被免疫反应清除。清除感染病原体后可发生免疫损伤，由于针对病原体的免疫反应可继续攻击宿主，导致自身抗原释放，然后继续刺激免疫反应，并激发进一步损伤，这即是麻疹、流行性腮腺炎、牛痘或带状疱疹感染之后发生病毒性脑病的原因。

潜伏性和(或)持续感染的病毒可对自身反应性细胞群产生慢性抗原刺激。根据 MBP 免疫优势表位与 MHC Ⅱ结合和 TCR 识别的结构特点，建立了搜索数据库的原则，其中考虑到 MHC Ⅱ结合所需的氨基酸侧链的简并性(degeneracy)和 T 细胞活化所需的氨基酸侧链的保守性[94]。这项研究证明，一些 TCR 事实上不仅仅识别单个肽，而是识别来自不同抗原的结构相关的一个限制性肽库。这种识别并不仅仅代表较弱的交叉反应，因为这些肽可有效活化 MBP 特异性克隆。已鉴定的具有刺激作用的模拟肽只具备有限的原始序列相似性，如果只根据 MBP 和病毒抗原之间的简单排列比较(表 34.8)就不可能预测到会发生交叉反应。刺激 MBP 特异性 T 细胞克隆的病毒肽具有多样性特点，表明 MS 自身免疫可能不仅仅由一种病毒肽诱发。似乎是一组共同的病毒病原体，尤其是疱疹病毒家族(EBV、单纯疱疹和巨细胞病毒)、流感病毒和乳头状瘤病毒，参与了自身免疫过程的启动。已达成共识的是 TCR 识别具有精确的特异性，因为既使 T 细胞表位内较小的替换也能减弱或消除 T 细胞活化，但也存在明显的交叉反应。需要非常庞大的 T 细胞库来对付大量的经常变化的由病原体衍生的表位，由此产生的一个并发症是必然有某些 TCR 也具有一定程度的自身反应性，这种自身反应性T细胞可能具有相对低的亲和力，逃脱了胸腺内的阴性选择和外周耐受(由克隆清除或失能所介导)。

表 34.8 病毒肽对 MBP 特异性 T 细胞的活化

肽	序列	T 细胞增殖
MBP(85～99)	ENPVVHFFKNIVTPPR	70 350
EBV 的 DNA 多聚酶	TGGVYHFVKKHVHES	96 613
流感病毒 A 血凝素	YRNLVWFIKKNTRYP	45 094

MBP85～99 和另外两种无关肽对 MBP 特异性、DRI 限制性 T 细胞克隆的活化程度相同。

1104

已建立了可直接检验分子模拟学说的转基因小鼠模型[95]。这种小鼠只在少突胶质细胞内表达病毒蛋白，为了确定病毒诱导的免疫反应是否能导致针对病毒基因产物的自身免疫攻击，用编码同样基因的病毒感染成年转基因小鼠，但不感染 CNS，病毒很快被宿主免疫反应所清除。用 LCMV 感染免疫活性小鼠可导致许多组织感染，但 CNS 细胞并不感染。尽管 LCMV 感染后已被清除，但随后发生了一种慢性 CNS 自身免疫病，用 LCMV 或不相关的病毒第二次感染可加重记忆免疫反应。自身免疫病(如 MS)患者被不同病毒感染后为何经常表现疾病的加剧？原因可能是随后病毒感染诱导的少突胶质细胞蛋白特异性记忆 T 细胞发生了交叉反应。这一模型与 MS 模型有很好的一致性，在后一种模型中，同髓磷脂(如 MBP)具有相同表位的病毒感染可导致自身反应性 T 细胞的活化，这些 T 细胞将通过 BBB 并识别少突胶质细胞呈递的自身肽。

决定簇扩展

了解器官特异性自身免疫病的主要目的之一是确定具有刺激活性的自身抗原。正如在“免疫治疗方法”一节中所讨论的那样，希望这些信息能有助于发展抗原特性免疫治疗方案。在自发性自身免疫病(如 NOD 小鼠模型的 IDDM)演变过程的最早期，试图鉴定自身靶抗原的大部分研究都证明抗原特异性 T 细胞可能识别多种自身抗原。对外源抗原免疫反应的研究导致两类抗原表位的确定[96]。当动物受到蛋白或感染性因子刺激时最初与之反应的那些表位被确定为优势表位，激发后来的超免疫反应的其他抗原表位被称为次级或隐性表位。针对感染性病原体上一种或两种优势表位的免疫反应通常是不充分的，因此免疫系统已发展了一种在感染过程中增加表位数量的机制，结果导致针对隐性表位的反应，但如上所述，实际上也增加了与自身抗原交叉反应的可能性。

自身抗原的隐性决定簇可能根本就没有产生，或者在正常抗原处理过程中以极低的水平产生。在胸腺

阴性选择过程中诱导T细胞对自身的耐受需要抗原肽的表达达到一定水平，因此，这些隐性表位特异性T细胞可能逃避清除而存在于正常T细胞池中。有待回答的根本问题包括：在正常情况下隐性表位是如何被免疫系统识别，这些表位特异性的自身攻击细胞是如何被活化的，隐性表位是怎样诱导持续的致病性反应的。尽管激活隐性表位特异T细胞的机制尚不清楚，但人们普遍认为，识别自身表位的T细胞在靶器官内诱导炎症级联反应，导致组织损伤[97]，组织碎片可被巨噬组织、树突细胞或B细胞摄取，并呈递给初始的组织特异性T细胞，T细胞一旦被活化，即可使炎症反应长久存在。在炎症反应过程中发生的MHCⅡ合成增加和黏附-共刺激分子的上调可能有利于呈递。抗原特异性B细胞是高效的APC，在免疫反应的分化中可能起作用[98]。抗体可增加抗原特异性B细胞和产生Fc受体的APC捕获抗原的有效性。抗体也可调节抗原的处理加工，使一些表位的产生增加而另一些降低。在炎症反应中细胞因子的产生可导致与抗原处理有关的某种酶上调，这也可能加强次要表位的产生。

在自身免疫病中，对新的自身决定簇的识别被称为"决定簇扩展"。慢性复发型EAE是慢性自身免疫病的最好例证，其中决定簇扩展在发病中起重要作用。Lehmann等完全用免疫优势I-A^{u}肽MBP Ac1～11免疫(SJL×B10.PL)F_1小鼠，在其慢性EAE发展过程中发现存在针对非优势决定簇(MBP的35～47、81～100、121～140位氨基酸)的免疫反应(表34.9)。在自身免疫病发展过程中决定簇扩展是一种有序的生理过程，其中特定的自身决定簇以可预测的方式依次被识别[100]。与自身免疫性脱髓磷的复发和慢性化有关的炎症性细胞因子和趋化因子活性的一部分，是由于对新的髓磷脂自身决定簇的T细胞识别的扩展。在决定簇扩展过程中，决定簇被识别的顺序并不遵循传统的免疫优势先于非优势的等级，也不对细胞内分子产生偏爱[101]。CNS髓磷脂的破坏对启动表位扩展是必需的。疾病复发-进展的发展和对新的免疫优势致脑炎决定簇识别的扩展之间存在着固定的联系。用PLP 139～151诱导复发型EAE后，在(SWR×SJL)F_1小鼠体内可观察到细胞间和细胞内表位扩展按照一种可预测的顺序发生，在疾病进展过程中，首先出现针对PLP 249～273的反应，然后依次为针对MBP 87～99和PLP 173～198的反应(表34.10)。当小鼠处于LPL 139～151诱导的EAE缓解期时，其CNS中可发现PLP 173～198特异性T细胞的存在。EAE发生后，针对扩展的致脑炎决定簇肽的特异性耐受可防止EAE的进展，而对非扩展决定簇的耐受则无保护作用。因此，诱导对完整PLP或复发相关的PLP 173～198表位的耐受，可防止处于PLP 139～151诱导的急性疾病缓解期的小鼠重新患病。但是对致病性PLP 139～151表位的耐受不能产生保护作用。同样地，对MBP87～99的耐受可阻止PLP139～151诱导的(SWR×SJL)F1小鼠EAE的进展。

1105

表34.9　用MBP Ac1～11免疫后分子内的表位扩展

Ac1～11	35～47	81～100	121～140
5/5	1/5	3/5	5/5

用MBP Ac1～11和百日咳毒素免疫诱导EAE，21天后，检测脾细胞对表中所示的肽的增殖反应。结果用检测动物中对肽发生阳性反应的动物数来表示。资料来自参考文献[99]。

表34.10　用LPL139～151免疫后细胞内和细胞间的决定簇扩展

抗原	免疫后天数			
	7	28	56	84
PLP 139～151	+	+	+	+
PLP 249～273	−	+	+	+
MBP 87～89	−	−	+	+
PLP 173～193	−	−	−	+

(+)，反应；(−)不反应。

动物用PLP139～151免疫，如表中所示的时间检测对不同肽的增殖反应。资料来自参考文献[100]。

表位扩展在NOD小鼠的IDDM中也可观察到。通过胸腺内或静脉注射肽可诱导对GAD65的新生期耐受，从而阻止对其他β细胞表位的反应活性以及随后糖尿病和胰岛炎的发生[14]，这些结果支持如下观点，即NOD小鼠T细胞对65kDa的GAD异构体的反应启动了胰岛细胞的破坏，这一现象在小鼠4周龄内即可发生，T细胞反应性后来扩展到其他胰腺β细胞抗原，如羧基肽酶H、胰岛素和HSP65。表位扩展可能在慢性和复发-缓解型器官特异性与系统性人类自身免疫病中发挥作用，诸如SLE、风湿性关节炎和MS。如同EAE一样，在MS中决定簇扩展可能与疾病进展相关[102]。

Th1-Th2 平衡

在 Th 细胞极化的 Th1/Th2 模型中,初始的 Th 细胞被同种配体活化后分化成不同功能的细胞亚群,这些细胞亚群以其细胞因子分泌模式而各具特色(第 26 章)。Th1 细胞分泌 IFN-γ,活化巨噬细胞,诱发迟发型高敏反应(DTH)。Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13,对 IgE 产生具重要作用,并抑制细胞介导的免疫。由一种细胞亚群产生的细胞因子可交叉调节另一细胞亚群的发育和功能。影响 Th 亚群发展最典型的因素是淋巴因子。表型极化可能与持续感染和自身免疫之类的慢性病最具相关性。

基础免疫反应不但控制对外来抗原应答,也可能在自身免疫病中操纵对自身抗原的识别,Th1 和 Th2 在其中起不同的作用[103]。可以推测 Th1 细胞可促进器官特异性自身免疫病的发展,而 Th2 应该促进抗体介导系统性自身免疫病(如 SLE)。对氯化汞诱导的狼疮和慢性 GVHD 的研究首次证明了细胞因子表型在自身免疫病发病机制中的作用,这两种疾病均以 IgE 水平升高为特点。在免疫反应的早期,给予抗 IL-4 不仅可抑制 IgE 产生也可抑制相关的病理作用,包括脾大和肾病综合征[104]。有人已对 Th1 细胞作为效应细胞群在所有器官特异性自身免疫病中(包括 IDDM 、EAE 和 IBD)的主要作用进行综述。总之,只有 Th1 而非 Th2 细胞群能通过被动转移诱导这些疾病。分析细胞因子在自身免疫发病机制中的作用,所得的信息或许有助于设计自身免疫病的免疫治疗方案。由于 Th1 和 Th2 可彼此交叉调节,因此或许可以将致炎症性 Th1 细胞介导的自身免疫病转变成由 Th2 介导的保护作用,或者将 Th2 介导的疾病转变成 Th1 起保护作用的情形。

对 EAE 中细胞因子产生的调节已进行了深入研究。在 EAE 损伤中观察到的炎症与 DTH 反应的炎症相似。在大多数研究中,EAE 的发展和针对髓鞘质的 DTH 之间有很强的关联。Kennedy 等[105]已证明在 EAE 恶化期间由 IFN-γ 控制脑内细胞因子的产生,但接着在恢复期出现 IL-10 mRNA 表达水平的显著升高,同时伴随 Th1 细胞因子表达的减少。在整个恢复期 IL-10 mRNA 水平仍保持升高。用免疫组化方法在其他研究中也观察到,与自然恢复密切平行的脑内 IL-4 和 IL-10 选择性上调[106]。在疾病高峰期 CNS 组织中存在 IL-2、TNF-α 和 INF-γ,但不存在 IL-4。在恢复期,IFN-γ 水平较低,IL-4、IL-10 和 TGF-β 占优势。这些研究提示给予 IL-4 或 IL-10 可能对治疗 EAE 有效。

在体内可以抗原特异性方式激活 $CD4^+$ T 细胞产生 IL-4,这一现象使人怀疑由 Th1 细胞控制的免疫反应是否能被偏移向由 Th2 细胞所控制。当初始 SJL 小鼠被接种高度致病性的 MBP 特异性 Th1 细胞系,并用外源性 IL-4 处理时,EAE 的临床状受到抑制[107]。细胞转入后必须立即给予 IL-4,在此期间 T 细胞开始侵入 CNS 并被自身抗原激活。从受者的脾内可分离出 Th2 样 $CD4^+$ T 细胞,但奇怪的是这些 $CD4^+$ T 细胞与 Th1 细胞因子产生下调无关联。一旦 Th2 细胞被诱导,在没有进一步治疗情况下,动物至少在 1 个月内仍受到保护而不出现 EAE 的临床症状。

在 EAE 的大鼠模型中,疾病开始时系统地(免疫后 0、3、6 天)给予 IL-10 可有效地抑制随后 EAE 的诱导[108]。临床疾病的抑制伴随着 MBP 特异性抗体的产生显著增加,同时,针对 MBP 的 T 细胞增殖反应持续存在,CNS 内的炎症浸润减弱。在这些动物体内未发现自身抗原特异性 Th2 细胞的存在,而且,IL-10 的保护效应似乎继发于 Th2 样反应的增强和 Th1 细胞因子产生的同时降低。IL-10 的所有治疗效应仍有可能是由小神经胶质细胞和侵入脑内的巨噬细胞失活所介导的。在大鼠体内也证明,IL-13 是巨噬细胞功能的有效抑制剂。用 MBP 免疫大鼠的同时注射分泌 IL-13 的细胞,可观察到 EAE 受到明显抑制[109]。这种抑制效应未伴有 MBP 特异性 T 细胞增殖减弱和 MBP 特异性自身抗体产生的改变。可见,IL-13 可抑制巨噬-小神经胶质细胞产生前炎症性免疫介质,从而对机体产生保护作用。巨噬-小神经胶质细胞在 EAE 最后的效应期起关键作用,与组织破坏和临床症状的表现有关。在保护机体对抗疾病的临床症状出现之前不久即可观察到这种细胞群被清除,这一现象是巨噬细胞在 EAE 中起中心作用最有说服力的证据。

1106

由于 IL-4 在诱导 Th2 细胞分化中起关键作用,因此研究者对如下问题也很感兴趣,即针对外源抗原的免疫能否通过调节自身反应性 T 细胞克隆所处的细胞因子环境,使其细胞因子从炎症性 Th1 向保护性 Th2 型

表 34.11 细胞因子环境可调节自身反应性 T 细胞的活化

第一次免疫	疾病		
	第二次免疫	发病率	分数
PBS	髓磷脂/CFA	80	1.5
KLH/IFA	髓磷脂/CFA	80	1.8
KLH/IFA	髓磷脂/KLH/CFA	20	0.1

用 KLH 加 IFA 或用 PBS 注射刺激动物。4 周后，两组用髓磷质加 CFA 刺激，第三组注射髓磷质和 KLH。所有动物均接受百日咳毒素。第二次免疫后 14～16 天检测疾病发生。资料来自参考文献[110]。

转变，从而防止 EAE 的发生[110]。用 KLH 加不完全佐剂免疫 SJL 小鼠可诱导 KLH 特异性 Th2 细胞群。用 MBP 可诱导这些动物发生 EAE，同时用 KLH 加强免疫时，EAE 的临床症状明显减轻（表 34.11）。而且，MBP 特异性 T 细胞分泌的细胞因子类型由炎症性 Th1 向保护性 Th2 型转变。总之，由 KLH 特异性记忆 Th2 细胞分泌的 IL-4 能够使其细胞因子类型向保护性 Th2 表型偏移，这种记忆 Th2 细胞存在于淋巴微环境中，自身反应性 T 细胞在此被 MBP 激活。用 KLH 免疫产生的保护性效应可被 IL-12 消除，IL-12 可抑制 IL-4 的产生，并使自身免疫反应向 Th1 占优势的类型偏移。

此外，对大鼠的研究也支持 Th2 细胞在 EAE 中可诱导保护效应，在这些研究中用致脑炎性 MBP 肽与抗 IgD 单抗共价偶联来处理大鼠，将自身抗原靶向于 B 细胞[111]。用此方案免疫的动物对 MBP 加 CFA 刺激诱导的 EAE 表现抵抗，而且未观察到白细胞在 CNS 内的浸润。由于体外刺激来自 MBP 刺激部位引流淋巴结的淋巴细胞表明，用抗 IgD-肽事先处理过的供者细胞与来自对照大鼠的细胞对 MBP 产生同样的增殖反应，而且抗 MBP 抗体滴度容易被检测到，因此未诱导出不反应状态。出现这些结果最有可能的原因是，呈递抗原的 B 淋巴细胞不能分泌 IL-12，使最终的免疫反应向 Th2 表型极化。用 MBP 加佐剂免疫之前的 7～14d 静脉注射抗体-肽结合物也能抑制 EAE 的诱导。事先处理过的大鼠的 T 细胞在体外活化均产生较少的 IFN-γ，细胞向初始受者转移 EAE 的能力较弱，IL-4 和 IL-13 mRNA 水平大约比对照高 5～10 倍。中和性的抗大鼠 IL-4 可减弱事先用抗 IgD-肽处理产生保护效应，这与预先处理可诱导产生 IL-4 的 Th2 细胞一致。

总之，所有这些研究都支持如下的观点：IL-4 诱导的自身抗原特异性 Th2 细胞，或许与巨噬细胞产生的抑制性细胞因子（如 IL-10/IL-13）一起在 Th1 介导的自身免疫病中具有治疗作用。但是，应该强调的是，从上述研究得出的结论大部是根据阳性治疗结果和 Th2 细胞诱导之间的关联得出的。在少数研究中，过继输入自身抗原特异性 Th2 或产生 TGF-β 的细胞系，可防止小鼠发生输入 Th1 细胞（或克隆）或主动免疫诱导的疾病[112,113]。另一方面，使人有些困惑的是用高度极化的自身抗原特异性 T 细胞系进行的大部分细胞转移研究中，缺乏 Th2 的治疗效果。将高度极化的 PLP 特异性 Th1 细胞输入初始宿主体内时可诱导严重的 EAE，而高度极化的 Th2 细胞并不转移疾病，将两种细胞共同输入也未观察到保护性效应，即使 Th2 对 Th1 高比率的情况下也是如此[114]。Th2 细胞或许可以更有效地抑制初始细胞产生 Th1 细胞，但它们不能中和已经活化的 Th1 细胞。

研究 IDDM 中的 Th1/Th2 平衡得出许多同 EAE 实验中相同的结论。尽管从研究人类中得到的资料极少，但针对 GAD 高滴度抗体的存在（可能表示 Th2 细胞因子的参与）与防止自身免疫糖尿病家族患临床型糖尿病有关，而 T 细胞对 GAD 表现强烈增殖反应（可能表示 Th1 细胞因子的参与）的个体是发生 IDDM 的高危者[115]。尽管致病性 Th1 可能在 IDDM 中发挥作用，但是在 NOD 小鼠体内难以分析细胞因子的原位产生，用原位杂交技术在胰岛中只发现 TNF-α 和颗粒酶的转录。在胰岛移植物破坏之前用逆转录多聚酶链反应（RT-PCR）检测到产生 IFN-γ 的 T 细胞。能加速 NOD 小鼠糖尿病发生的 T 细胞克隆在体外用胰岛和 APC 刺激时可产生 Th1 类型的细胞因子。NOD 小鼠的 GAD 特异性 T 细胞对 GAD 反应可产生大量的 IFN-γ。抗 IFN-γ 抗体可防止环磷酰胺或过继输入致糖尿病细胞诱导 NOD 小鼠发生糖尿病[116]。系统地给予 IL-4 可阻止 NOD 雌性小鼠糖尿病的发生，在这项研究中对 T 细胞亚群未做检测，IL-4 的保护机制仍有待确定[117]。

1107

关于 Th2 细胞因子在 IDDM 中起保护作用最好的研究例证之一是对 TCR 转基因小鼠的研究，在这种小鼠体内大部分 $CD4^+$ T 表达识别流感病毒 HA 衍生肽的 TCR。当这些小鼠与表达 HA（作为新抗原表达在胰岛细胞上）的转基因小鼠交配时，双重转基因小鼠未表现出克隆清除或失活的迹象。根据与它们回交的种系的遗传背景，在双重转基因小鼠中存在两种截然不同的表型。在 BALB/c 背景下，双重转基因小鼠不发生自发性糖尿病，用相关 HA 肽或病毒免疫后也不发生；相反，在 B10.D2 背景下第三次回交后即可发生早期的自

发性糖尿病。这些小鼠的胰岛内出现广泛的细胞浸润，主要由 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞、B 细胞和树突细胞构成。B10.D2 小鼠的 T 细胞分泌高水平的 IFN-γ，但只是短暂分泌低水平的 IL-4，而 BALB/c 的 T 细胞产生高水平的 IFN-γ 与持久的水平升高的 IL-4。

在这种转基因模型中不需要用特异性抗原或佐剂诱导疾病。这一系统证明对普通近交系小鼠遗传因素而非只存在于 NOD 小鼠基因的依赖性。这些结果强调啮齿类动物和人类疾病的一个共同特点是：MHC 和非 MHC 基因对疾病发生均起关键作用。而且，这里提到的遗传影响与对利什曼病原虫感染的免疫反应产生的遗传影响具有明显的相似性，在后一种情况下，BALB/c 小鼠产生占优势的 Th2 反应，而 57BL/6 小鼠产生 Th1 炎症反应，导致感染的痊愈。因此，BALB/c 的 Th2 反应可能产生对抗自身免疫的保护作用，但它不适应于寄生感染的情况。在新生期切除胸腺诱导的自身免疫中也发现了对非 MHC 基因相似的依赖性[52]。在此，大量普通近交系小鼠对一系列不同的器官特异性自身免疫综合征的易感性依赖于非 MHC 基因。非 MHC 基因对疾病易感性的贡献与人类中的情形一致；在具有 MHC 单倍体的某些家族内可观察到高得多的发病率。

NOD 小鼠不表达 I-E，并具有独特的 I-Aβ-链位点：$I\text{-}A^{g7}$。正常 MHCⅡ I-A 位点的转基因 NOD 小鼠不发生糖尿病，尽管它们可持续表达 $I\text{-}A^{g7}$，NOD $I\text{-}A^{g}$ 转基因小鼠的纯化 T 细胞可阻止向非转基因 NOD 受者过继转移糖尿病[119]。将 NOD 转基因小鼠 $I\text{-}A^{g7}$ 等位基因的 56 和 57 位氨基酸（His-Ser，Pro-Asp）突变，可防止这种小鼠患胰岛炎和糖尿病[120]。这些突变小鼠的 T 细胞可抑制糖尿病的过继转移，此外，这些 T 细胞在体外对 β 细胞抗原反应不能产生增殖或分泌 IFN-γ，尽管这些小鼠体内的确存在 β 细胞抗原特异性 T 细胞。普通 NOD 小鼠的 GAD 反应性 T 细胞可产生 IFN-γ，由此可预测这种小鼠体内的抗 GAD 抗体主是 IgG2αⅡ类。相反，表达突变 $I\text{-}A^{g7}$ 等位基因 NOD 小鼠产生 IgG1 和 IgE 亚类的抗 GAD 抗体，这与其体内存在产生 IL-4 的 T 细胞一致。在过继转移系统中，这些转基因小鼠的 T 细胞可阻止糖尿病的发生，部分原因是由于 T 细胞产生的 IL-4/IL-10。因此，在这个模型中似乎是由 MHC 本身调节 Th1/Th2 对自身抗原的平衡。MHC 对正在分化的 T 细胞表型的调节机制仍不清楚。在这些转基因 NOD 小鼠中，MHCⅡ 转基因可能在胸腺内和胸腺外均起作用，可影响调节性细胞的阳性选择，进而影响其扩增。自身抗原特异性免疫调节细胞可能具有低亲和力的 TCR，使它们逃脱了胸腺内的阴性选择。这些细胞在外周能通过免疫偏离机制控制自身反应性 T 细胞。

尽管这些关于 IDDM 中 Th1/Th2 平衡的研究都强烈支持 Th2 细胞具有保护性的观点，但是同在 EAE 中一样，在过继转移试验中直接证明 β 细胞特异性 Th2 细胞的保护作用是极其困难的。BDC2.5 转基因动物可表达一种未知的胰岛细胞抗原特异性 TCR，在促进向 Th1 或 Th2 分化的培养条件下刺激这种转基因动物的细胞，通过向新生 NOD 小鼠过继转移来检测这两种细胞诱导疾病的能力，在几乎所有的受者体内 Th1 细胞可迅速诱导糖尿病发生，但是接受 Th2 细胞的受者极少发生糖尿病。两种细胞类型均能向胰腺迁移，因为输入细胞后在两组受者体内均立即出现淋巴细胞浸润，但是，到第 11 天时，所有 Th1 细胞受者的胰岛均表现明显的胰岛炎，而 Th2 细胞受者体内的浸润没有发展。在胰岛中发生独特型转换的 B 细胞的 IgG1/IgG2 表型与已知的 Th1 和 Th2 细胞因子对 Ig 转换的影响相关联。当将两种细胞共同过继转移时，输入 1:1 混合细胞的受者发生了糖尿，发病率与单独接受 Th1 细胞的受者一致；但是当 Th1 细胞数量降低至 1:10 时，发病率只是稍有降低。这些结果为 Th1 细胞亚群在促使疾病发生中的作用提供了直接证据，但并不支持 Th2 细胞可介导保护作用防止疾病发生的观点。

尽管将细胞输入正常动物的研究未证明 Th2 细胞在诱导器官特异性炎症反应中有任何作用，但应当强调的是 Th2 型免疫反应的诱导可能导致针对胞内微生物的非保护性免疫，并能促进过敏反应，因此抑制 DTH 型反应，有利于体液反应，在某些情况下有可能导致病理性后果。事实上，在用 BDC2.5 小鼠 Th1 和 Th2 极化细胞群进行的另一项研究中，Pakala 等发现，Th1 和 Th2 极化 T 细胞均能将疾病转移给 NOD/SCID 小鼠和其他免疫缺陷受者（表 34.12），这与新生 NOD 小鼠作为受者时的观察结果相反。在 NOD/SCID 受者体内 Th2 介导的糖尿病，表现较长的前糖尿病期和较低的总发病率。Th2 细胞产生的损伤与过敏性炎症相似，包括大面积嗜酸性粒细胞浸润、胰岛坏死脓肿以及严重的胰腺炎，并伴有外分泌和内分泌组织的破坏。相反，Th1细

表 34.12　Th2 细胞诱导 NOD/SCID 小鼠发生糖尿病

转入细胞	受者	Rx	发病率(%)
Th1	新生者	—	100
Th2	新生者	—	0
Th1	NOD/SCID	—	100
Th2	NOD/SCID	—	60
Th2	NOD/SCID	抗 IL-4	100
Th2	NOD/SCID	抗 IL-10	20

在 Th1 或 Th2 极化条件下用胰岛细胞刺激 BDC2.5 TCR 转基因小鼠的初始 T 细胞，然后将细胞输入新生 NOD 或成年 NOD/SCID 小鼠体内。一些受者用抗 IL-4 或抗 IL-10 处理，输入后 28d 检测疾病发病率。资料来自参考文献[122]。

胞产生局部限制性的胰岛浸润和 β 细胞凋亡，而且不伤害外分泌组织。抗细胞因子抗体阻断研究证明，局部的 IL-10 而非 IL-4 导致 Th2 介导的胰岛细胞破坏，这一结果与用 NOD 转基因动物进行的研究一致，后者可在胰岛内表达 IL-4 或 IL-10，其中 IL-4 的表达是保护性的，IL-10 则促进疾病发生(见下节的细胞因子环境)。IL-10 诱导免疫病理的确切机制尚不清楚，但据推测，IL-10 可能改变有炎症细胞浸润的内皮，或者诱导血管损伤，导致缺氧和脓肿形成。

将表达抗MBP Ac1-10 TCR的转基因细胞在体外诱导极化成 Th1 和 Th2 群，然后过继转移到受者体内，可观察到与上述非常相似的结果[57]。输入 MBP 特异性 Th1 而非 Th2 细胞，可诱导正常小鼠发生 EAE。Th2 细胞不能对抗 Th1 细胞介导的 EAE，但被输入免疫受损(immunocompromised)的 $RAG^{-/-}$ 受者体内时可诱导 EAE 的发生。在 Th2 受者中，EAE 临床症状首次出现的时间与 Th1 受者相比大约延迟了 10 天。尽管在这些研究中未确定与 Th2 $RAG^{-/-}$ 受者炎症性脑炎有关的细胞因子，但是在 CNS 中多形核细胞和肥大细胞水平异常增高，而在接受 Th1 细胞的 $RAG^{-/-}$ 小鼠中未发现这些细胞。

另外应该强调的是，在某些情况下器官特异性自身免疫可能是 Th1/Th2 病理性免疫反应的混合表现。用 MOG 免疫后普通绢猴发生的 EAE 就是这种致病性 T 细胞和 B 细胞混合反应的例证。事实上，在某些情况下疾病的 Th2(或 B 细胞)成分可能占主导地位。给予抗原加佐剂后第 7 天时经腹膜下给予可溶性的 MOG，一直持续 18 天，可诱导绢猴耐受，从而导致疾病抑制[123]。奇怪的是，停止处理后发生迅速进展的致死型超急性 EAE 比在对照组中观察到的更为严重。在耐受动物 CNS 中观察到的变化与可能由体液免疫反应介导的脱髓鞘一致，耐受组的抗体滴度较高，而且耐受动物对 MOG 反应时合成 IL-10 和 IL-6 mRNA 的水平增高。在耐受动物免疫后的第 14d，针对 MOG 反应产生的细胞因子类型由 Th1 型向 Th2 型的转变。从这些研究中可得出如下结论：经腹膜内给予可溶性抗原时 Th2 反应可被优先表现出来，并通过增强致病性自身抗体的分泌从而加剧自身免疫。

总之，关于 Th1/Th2 平衡在器官特异性免疫中作用的所有研究均提示，能使平衡向 Th2 端倾斜的遗传因素能够导致发病率和疾病严重性的降低。一旦 Th1 介导的自身免疫病已经发生，那么建议采取以下措施或许具有治疗作用，即给予外源 IL-4 诱导免疫偏离[124]，给予改变的肽抗原(APL)(见"免疫治疗方法"一节的抗原特异性治疗)或者诱导口服耐受(见"免疫治疗方法"一节的口服耐受)。另一方面，在大量的共同转移研究中均未证明免疫活性的 Th2 细胞具有任何治疗作用，这使人们对这种治疗方法的兴趣有所减弱。而且上述研究清楚地证明在某些情况下 Th2 细胞可诱导急性疾病。这些研究的一个显著特点是，在健康动物体内致病性 Th2 细胞受到表达 αβTCR 免疫调节 T 细胞的密切监控，因为在具有免疫活性的宿主体内 Th2 不能诱导疾病。这种免疫调节的性质仍有待确定，其他 T 细胞的存在如何影响 Th2 细胞的体内功能也有待研究。采用免疫偏离作为器官特异性自身免疫的治疗方案时应三思而后行。在 MS 患者体内也存在髓磷质特异性自身抗体，可能发生抗体和补体介导的损伤。在 MS 中诱导针对髓磷脂蛋白的 Th2 反应可能会促进体液性自身免疫。

细胞因子环境

细胞因子能影响介导和调节器官特异性自身免疫病 Th1/Th2 细胞的发展，对此很少有人怀疑，因此人们试图用转基因和敲除技术从动物整体水平或靶器官水平来分析特定细胞因子表达的作用。在 C57BL/6 小鼠的胰腺中，IL-2 的过量表达可导致针对 β 细胞的严重炎症反应以及胰岛的破坏，并导致糖尿病发生；过继转移和胰岛移植证明，在这些 IL-2 转基因小鼠 β 细胞破坏不是由抗原特异性免疫引起的，因为在 *nu*/*nu* 和

SCID 小鼠体内也证明 IL-2 表达可诱导炎症反应和糖尿病[125]。因此,胰岛局部产生的 IL-2 以非抗原特异性机制募集和活化能破坏胰岛的细胞。而且, IL-2 的局部表达可能加强由其他方式激活的效应 T 细胞的活性。例如,在胰腺 β 细胞内表达 K^b、抗 K^b TCR 以及 IL-2 的三重转基因小鼠在出生 1 周后全部发生了糖尿病[126]。胰腺 β 细胞产生的 IL-2 可诱导大量淋巴细胞浸润,而且大部分浸润细胞是表达 IL-2R 的 $CD8^+$ 细胞克隆。在这些动物体内逃避了胸腺清除的抗 K^b 特异性 T 细胞是低活性的,而且在皮肤移植后不能导致胰岛细胞损伤,另外在三重转基因动物中,胰岛破坏和糖尿病的迅速发生表明如果能得到足够的由 IL-2 提供的辅助作用,这些低活性的细胞能被激活而且有攻击性。自身免疫的发生和发展可能依赖于自身反应性 T 细胞的活性,并有可能受外源 IL-2 的影响,而这种外源 IL-2 在慢性感染过程中甚至可以旁分泌形式提供。高活性的细胞自身可产生 IL-2,其反应也不依赖于 $CD4^+$ T 细胞的辅助。

NOD 小鼠和抗性小鼠都曾被用作研究大量不同细胞因子的局部表达对糖尿病的影响。由于 IFN-γ 胰岛转基因小鼠[127]发生严重的炎症细胞浸润和胰岛素分泌细胞的完全破坏,因此胰腺内前炎症细胞因子的过表达将有利于自身免疫病发展。当建立病毒性 GP(来源于 LCMV)和 IFN-γ 的双重转基因小鼠时,其胰岛内 IFN-γ 的表达可消除耐受状态,并可自发性地诱导抗 LCMV CTL,这种 CTL 可导致胰岛炎和糖尿病[128]。由此可见,在靶组织内分泌的细胞因子可能在消除自身耐受中起关键作用。事实上,胰岛内 IFN-γ 的局部表达以一种特异的方式消除对胰岛细胞抗原的耐受,因为 IFN-γ 转基因小鼠可排斥组织相容性胰岛移植,但并不排斥垂体移植。

总之,随着病毒感染和局部细胞因子的分泌,具有遗传倾向个体特殊靶组织内的免疫反应可能发生失调。在特定组织内局部因素可能也具有重要作用,当 IFN-γ 在胰岛内表达时可激活 T 细胞,但不能激活抗体反应。但是当 IFN-γ 在运动终板表达时,可诱导针对运动终板的抗体和类似于重症肌无力的疾病[129]。因此,组织特异性因素可能决定局部免疫反应的致病性。局部因素可能与产生更容易被激活的免疫系统识别的靶细胞有关。当小鼠在出生 3d 被切除胸腺时可发生自身免疫性胃炎,靶抗原是表达在胃壁细胞内的 H/K 腺苷三磷酸酶(ATPase),当这种抗原在胰岛内表达并且在出生 3d 时切除胸腺,小鼠可发生胃炎和胰岛周炎,但不发生糖尿病。存在胰岛周炎而不发生糖尿病,这一现象强烈提示胃壁细胞和胰岛细胞对靶抗原的呈递不同[130]。

最初通过系统地给予细胞因子研究 TNF-α 在 IDDM 模型中的作用,这些研究提示在 NOD 小鼠临床疾病进展过程中发生的早期和晚期事件是可以分开的,并由不同的调节机制所控制。给予成年 NOD 小鼠 TNF-α 可观察到 IDDM 发展受到完全抑制。尽管给予新生小鼠 TNF-α 可使 IDDM 恶化,但是难以确定 TNF-α 是在胰岛内局部还是系统性地对疾病过程产生影响[131]。TNF-α 产生的早期疾病恶化效应可能是由于这种细胞因子对胸腺的影响,最终影响到淋巴系统的发育。用 TNF-α 处理过的成年小鼠胰腺内未观察到任何白细胞浸润,因此,产生保护效应的原因可能是因为循环白细胞黏附能力的变化导致归巢性质的改变。用抗 TNF-α 处理 NOD 小鼠时也观察到相似的现象,在出生后前 4 周给予抗体时,NOD 小鼠的糖尿病发病率降低,但持续给予 8 周可增加发病率。

当前炎症细胞因子和抗炎细胞因子各自在转基因小鼠组织内表达时,它们作用是不可预知的。TNF-α 是一种有效的炎症介质,在体外可激活内皮细胞表达大量白细胞黏附分子,包括 E 选择素、VCAM-1 和 ICAM-1;TNF-α 也可以上调胰岛细胞上的 MHC Ⅰ类分子。在抗性 C57BL/6 小鼠体内 TNF-α 或 TNF-β(LTα)的表达可导致严重的胰岛炎,但这些小鼠不发生糖尿病,即使观察时间超过 1 年也未见发生[132]。这些小鼠的损伤仅限于胰岛,包括淋巴细胞性胰岛炎、内皮细胞改变、纤维化反应和内分泌细胞结构破坏。胰岛炎由 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞组成,未见多形核细胞浸润。所有这些变化与在 NOD 小鼠中观察到的相似。由此可见,炎症性浸润不足以导致自身免疫病的产生,TNF-α 转基因小鼠缺少加剧 β 细胞损伤所需的继发事件。这些事件中的一部分可能由 NOD 小鼠的独特基因所控制, 尤其是 MHC 基因。在 NOD 小鼠中 TNF-α 过表达可导致严重的胰岛炎,但奇怪是 TNF-α 的表达也可防止 NOD 小鼠患糖尿病[133],细胞浸润的组成与正常 NOD 小鼠相同。此外,TNF-α 转基因动物的脾细胞不能将疾病转移给 NOD/SCID 受者,但是将致糖尿病细胞克隆或糖尿病

NOD 小鼠的细胞输入这种转基因小鼠时，可诱导其发生糖尿病，这表示效应细胞的功能未受到抑制。

TNF-α 转基因 NOD 小鼠在新生期不表达 TNF-α，在 7 周龄时才开始表达，此时可首次观察到胰岛内浸润。在这些转基因小鼠体内缺乏能诱导糖尿病的致敏自身反应性淋巴细胞。T 细胞对 GAD 和胰岛细胞提取物中自身抗原的反应明显减弱，但对外源抗原的反应正常。由此可见，TNF-α 的表达似乎下调对自身抗原的反应，并阻止胰岛特异性自身攻击 T 细胞的发展。尽管 TNF-α 在这种 NOD 转基因模型中介导保护效应的机制仍不清楚，但被 TNF-α 招募到胰岛的淋巴细胞可能起保护作用，因为它们可遭遇到表达水平升高的胰岛自身抗原(继发于 TNF-α 对 MHC 抗原表达的影响)。在这些情况下刺激自身反应性细胞可能已经诱导了失能或凋亡。TNF-α 介导的保护性效应也可能针对于诱发疾病的 $CD8^+$ 细胞，如果 $CD8^+$ 细胞失能，就不能使导致 $CD4^+$ 效应细胞募集的级联事件持续存在，这些效应细胞在介导大部分 β 细胞破坏中起重要作用。目前尚不能排除 TNF-α 的其他效应(如对抗原呈递或处理的局部抑制)。胰岛内 IL-6 的过表达可导致胰岛炎，但也可防止 NOD 小鼠发生糖尿病[134]。在 IL-6 胰岛转基因动物中可观察到胰岛细胞、导管细胞和成纤维细胞的增殖增强，这可能是由于 IL-6 在组织修复中起作用的结果。TNF-α 的保护效应比 IL-6 明显得多，后者只有2~3倍。

1110

抗炎症性 Th2 细胞因子——IL-4 在 NOD 小鼠胰岛细胞内的表达可完全保护小鼠不发生胰岛炎或明显的糖尿病[135]。IL-4 转基因 NOD 小鼠仍可发生下颌下腺内的涎腺炎，这表明 IL-4 在胰腺内可诱导局部免疫抑制效应，但并不诱导整体水平的免疫抑制。研究者们也观察到了功能性耐受诱导的迹象，因为将年轻 NOD 小鼠的胰岛移植到 10~11 月龄 NOD/IL-4 小鼠的肾囊(kidney capsule)下时，移植物仍完全不被炎症细胞浸润。将急性糖尿病小鼠的脾细胞注射进经亚致死剂量射线照射的 8~10 周龄 NOD/IL-4 小鼠及其非转基因幼仔体内时，NOD/IL-4 小鼠只发生胰岛周炎，但未发生糖尿病，而对照小鼠则出现大面积炎症浸润和严重糖尿病。由此可见，致糖尿病脾细胞能向 NOD/IL-4 小鼠的胰岛归巢，但它们不能启动破坏性自身免疫攻击。当 NOD/IL-4 小鼠的胰岛被移植进糖尿病小鼠体内后，被移植的胰岛可遭到破坏。NOD/IL-4 小鼠终生都处于胰岛周炎症期。与 TNF-α 转基因相反，IL-4 转基因小鼠的脾细胞可对胰岛抗原发生反应。IL-4 可能在疾病启始和发展期间均具有调节能力，而 TNF-α 可阻止疾病的发生。尽管这些结果提示，Th2 型细胞因子(如 IL-4)可阻止自身反应性免疫应答发生和胰岛破坏，但是尚无证据表明 $CD4^+$ T 细胞可转变为抑制性 Th2 细胞，而且在 NOD/IL-4 小鼠体内也未检测到 GAD 特异性 Th2 细胞。将 NOD/IL-4 小鼠的 T 细胞和糖尿病 NOD 小鼠的脾细胞共同输入 NOD/SCID 受者时，前一种细胞对这种共同输入不具有任何调节活性。此外，当 NOD/IL-4 小鼠与转基因 BDC2.5 小鼠(其表达的转基因 TCR 可识别一种未知的胰岛细胞抗原)交配时，T 细胞分化的限制消除了 IL-4 的保护作用[136]。综上所述，这些研究提示，胰腺 IL-4 的调节效应只局限于存在于胰腺内的 T 细胞，而不表现系统性的效应。或许，胰腺 IL-4 可对巨噬细胞之类的 APC 起作用，这种 APC 是疾病发生所必需的。IL-4 暴露可能减弱了自身反应的扩增和胰岛抗原特异性记忆效应细胞的产生，这一保护机制可能被 BDC2.5 转基因小鼠致病性 T 细胞的单克隆化所逆转，但能抑制致糖尿病 NOD 小鼠脾内的多种 T 细胞群。

当另一种主要的抗炎症 Th2 细胞因子——IL-10 在胰岛内表达时可观察到完全不同的结果[137]。在非糖尿病易感种系转基因小鼠的胰岛内表达 IL-10 可诱导胰岛周炎，而且这种胰岛周炎不会发展成胰岛炎和糖尿病，而 IL-10 转基因 NOD 小鼠可迅速发生糖尿病。IL-10 的表达可促进 Th2 样细胞因子的产生，这一作用可由浸润细胞的 IL-10 产生水平来确定。尽管这项研究与 Th2 分泌的 IL-10 能介导 IDDM 的观察结果一致[122]，但其他遗传因素也可能具有重要作用。例如，在 BALB/c 小鼠的 β 细胞中转基因表达 IL-10 可导致胰岛周炎症，而且不会发展成胰岛炎或糖尿病。

尽管有关 IL-10 转基因表达的研究表明这种细胞因子可介导胰岛内的前炎症效应而非抗炎效应，但是研究者们已对 PLP 特异性 T 细胞克隆进行了遗传修饰，使其可表达抗原诱导型的 IL-10[138]。将这种 T 细胞克隆输入正常受者时可阻止 EAE 的发生，并在神经症状出现后对 EAE 有一定的治疗效果。同样地，用反转录病毒转染的 MBP 特异性 T 细胞克隆可在 CNS 内分泌 IL-4，用这种细胞克隆处理动物可使 EAE 发生延迟，而且可减轻疾病的严重性[139]。通过重组的人 5 型腺病毒载体将外源 IL-4 经腹膜下导入患有 TNBS 结肠炎

的大鼠体内，可明显加重组织损伤，并降低结肠内的 IFN-γ 水平[140]。或许，将来的研究会证实通过细胞或病毒向自身免疫炎症部位导入抑制性细胞因子的治疗效应。

研究者对一种前炎症或抗炎症细胞因子遗传缺陷小鼠进行了研究，这些研究在分析 IDDM 和 EAE 的免疫致病机制方面非常具有启发性。$IFN\text{-}\gamma^{-/-}$ NOD 小鼠的确发生了糖尿病，尽管发病时间有所延迟，发病率也有所下降[141]。$IFN\text{-}\gamma^{-/-}$ 和 $IFN\text{-}\gamma^{+/+}$ 小鼠的胰岛浸润无明显差异。在 $IFN\text{-}\gamma^{-/-}$ 小鼠体内 TNF-α 的表达稍有下降。IL-4 和 IL-10 在 $IFN\text{-}\gamma^{+/+}$ 小鼠体内均可被检测到，但在 $IFN\text{-}\gamma^{-/-}$ 小鼠体内明显减少。IL-2 在 $IFN\text{-}\gamma^{-/-}$ 小鼠体内未被检测到，但却存在于 $IFN\text{-}\gamma^{+/+}$ 体内。这两种小鼠的脾细胞可以同样的效率将疾病转移给年轻的 $IFN\text{-}\gamma^{+/+}$ 小鼠。与 NOD 小鼠相反，用 LCMV 感染后 $IFN\text{-}\gamma^{-/-}$ RIP-LCMV 转基因小鼠不发生 IDDM[142]。抗病毒 CTL 向胰腺迁移，在胰岛周围可检测到这种 CTL，但既未发现胰岛内浸润也未见 MHC Ⅰ类或Ⅱ类分子的上调，对体内急性 LCMV 感染的清除 IFN-γ 并非必需。这些小鼠不发生 IDDM 可能是由于 β 细胞上的Ⅰ类分子和 APC 上Ⅱ分子未发生上调，结果缺少抗原呈递，致使功能性的 CTL 不能在胰岛内持续存在。

如果能够建立在 CNS 局部表达细胞因子的小鼠模型，将促使人们开展同 IDDM 实验模型中类似的研究，尽管这种小鼠模型尚未建立，但已经证明，细胞因子系统性表达的变化（被认为在 EAE 发病机制中有重要的作用）所导致的疾病，临床结局却大相径庭（表 34.13）。例如，注射针对 IFN-γ 的中和性抗体可导致疾病恶化，多次研究均发现给予 IFN-γ 具有保护效应[143,144]。在 $IFN\text{-}\gamma^{-/-}$ 和 $IFN\text{-}\gamma\text{-receptor}^{-/-}$ 小鼠中 EAE 很容易被诱导，而且与野生型小鼠相比缺陷小鼠的病情通常更为严重[145,146]。这些结果提示，或许在致脑炎效应细胞的演变过程中 IFN-γ 实际上能够抑制 EAE 的发生。奇怪的是 $IL\text{-}12^{-/-}$ 小鼠对 EAE 具有抵抗性，用抗 IL-12 抗体处理 $IFN\text{-}\gamma^{-/-}$ 和 $IFN\text{-}\gamma^{+/+}$ 小鼠均可阻止 EAE 发生。可见，IL-12 似乎是出现 EAE 临床表现不可缺少的细胞因子[38]。

表 34.13　细胞因子缺陷小鼠发生 EAE 的情况

缺陷基因	抗原	疾病易感性
IFN-γ	MBP	增高
IL-10	MBP	增高
IL-4	MBP	无变化
IL-12	MBP	降低
TNF-α	MOG	增高
TNF-α/ LTα	脊髓	无变化
LTα	MOG	降低
LTβ	MOG	无变化

资料来自参考文献[38]、[143]～[150]。

单纯地将 Th1/Th2 模式应用于 EAE 也带来下面的问题，在其他两种 Th1 细胞因子——TNF-α 和 LTα 双重缺陷的小鼠体内可成功诱导疾病发生[147]；与野生型对照相比，在 $IL\text{-}4^{-/-}$ 小鼠体内未诱导更严重的 EAE 发生[148]。已证明 $IL\text{-}10^{-/-}$ 小鼠的易感性有所增强。由此可见，在疾病发病机制中一种或多种前炎症细胞因子的缺乏可代偿另一种的缺乏。在某种情况下，这种代偿可能不起作用，因为用 MOG 衍生肽免疫后，$LT\alpha^{-/-}$ 小鼠对 EAE 具有抗性，而 $LT\beta^{-/-}$ 小鼠则表现为易感[149]。奇怪的是，TNF-α 缺陷小鼠对 MOG 诱导的 EAE 敏感性增强，用 TNF-α 处理 $TNF\text{-}\alpha^{-/-}$ 和 $TNF\text{-}\alpha^{+/+}$ 小鼠可降低疾病的严重性[150]。在缺乏 IFN-γ 或 TNF-α 时均可促进 EAE 的发生，这种矛盾的现象强烈提示，这些前炎症细胞因子的一些多向性效应实际上是抗炎症效应。

尽管大量研究都集中于细胞因子在器官特异性自身免疫病发病机制中的作用，但是任何效应机制必须能解释疾病过程的极其特异性，即仅仅导致靶细胞（如胰岛 β 细胞）的损伤和（或）清除，而对胰岛内的其他细胞类型不造成伤害。效应机制的研究集中于穿孔素介导的细胞溶解和 Fas/Fas 配体（FasL）依赖的杀伤作用。在 RIP/LCMV 模型中，LCMV 感染的疾病过程依赖于穿孔素的释放，因为穿孔素基因被阻断的 RIP/LCMV 转基因小鼠在 LCMV 感染后并不发生 IDDM[151]。应该指出的是，穿孔素活性未丧失的情况下，IFN-γ 缺陷的 RIP/LCMV 转基因小鼠尽管可产生高亲和力的自身反应性 CTL，但也不发生 IDDM[142]。CTL 介导的杀伤效应需要 MHC 的上调，而 IFN-γ 可能参与了 MHC 的上调。其他机制（如细胞因子或 Fas 依赖的细胞毒）不足以弥补依赖于穿孔素的细胞毒作用的缺乏。由于接受穿孔素缺陷脾细胞的受者可发生胰岛炎，因此穿孔素依赖机制在病程晚期的效应期最为重要，在早期的诱导期则不然。将糖尿病患者的脾细胞过继转移给年轻的非糖尿 NOD 小鼠后，$CD8^+$ T 细胞内穿孔素的表达明显升高，随后立即出现高血糖症，这提示穿孔素在 β 细胞死亡中的作用。

CD95(Fas)及其配体(CD95L)是TNF神经生长因子受体和TNF蛋白家族的成员。这些分子调节 *lpr* 和 *gld* 小鼠系统性自身免疫病的作用在第33章中已进行过探讨。对穿孔素缺陷小鼠的研究结果强烈提示，$CD8^+$ T细胞可通过直接识别β细胞上的靶抗原介导对胰腺β细胞的破坏，这需要T细胞-β细胞之间的接触，也有可能只是通过活化的T细胞向β细胞接近导致它们死亡。β细胞被 $CD8^+$ 细胞破坏后，$CD4^+$ T细胞可识别从β细胞上脱落下来的抗原。然后，活化的 $CD4^+$ T细胞可能通过多种机制杀死旁观的β细胞，这些杀伤机制包括Fas/FasL介导的细胞死亡、产生可溶性细胞毒性递质或活化杀伤性的巨噬细胞。尽管由β细胞表达的FasL可能导致活化的表达Fas的自身反应性T细胞破坏，从而保护胰岛，但FasL转基因动物表现较高的糖尿病发病率，并且比它们的非转基因幼仔对致糖尿病T细胞更敏感[152]。相反，在25周的观察期间，$NOD^{lpr/lpr}$ 小鼠对糖尿病发生具有抗性，而Fas表达充足的动物则出现 $>70\%$ 的发病率。在NOD小鼠12周龄时β细胞的Fas表达上调，此时可检测到小鼠发生糖尿病。如果这种表达Fas的胰岛也表达FasL，β细胞将通过自杀或被邻近细胞杀死而遭破坏。由 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T细胞产生的IFN-γ可能参与β细胞上Fas的上调。在EAE中可观察到同样的结果[153,154]。最初有人推测，在NOD小鼠CNS中表达的CD95L可能阻止自身反应性细胞介导的损伤作用，因此 *lpr* 和 *gld* 突变可能导致疾病恶化。但是观察到的结果正好相反，因为不管哪一种突变都明显改善了EAE的临床症状，同时并不影响Th1反应的发生或炎症细胞在CNS内的浸润。另外，CNS中细胞凋亡也减少了。从这些研究中可以推断由活化 $CD4^+$ T细胞表达的CD95L可以通过旁路途径介导表达CD95的少突胶质细胞的溶解。尽管CD95 mRNA在正常组织内不表达，但它可能由炎症性细胞因子(如TNF-α和IFN-γ)诱导表达。此外，同IDDM模型一样，CNS细胞的死亡可能由Fas诱导表达后FasL阳性CNS细胞的自杀引起的。总而言之，这些研究强烈支持如下观点：Fas/FasL相互作用是自身免疫性器官特异性损伤诱导或发展至关重要的因素。这些研究也表明，在器官特异性自身免疫的起始、发展和最后的效应期间有多种相互交叠的途径在起作用。

在自身反应性T细胞活化和失活中共刺激的作用

研究发现，正常 $CD4^+$ T细胞的活化需要两种信号，即通过TCR传递的信号1和由共刺激传递的信号2(第20章)。体外研究证明，只给予信号1而缺少信号2导致T细胞不反应或失能。由于共刺激是决定T细胞的抗原识别是导致活化还是失能的关键因素，因此，共刺激可能在自身免疫反应的发生中起一定作用。尽管对转基因小鼠模型的研究已为T细胞免疫忽视的观点提供了强有力的支持，但另外一种观点认为，识别静息APC上的自身抗原而缺乏共刺激时可诱导和维持T细胞对自身抗原的耐受。相反，APC上共刺激分子的异常表达可活化自身反应性T细胞，导致自身免疫[155]。

1112

有研究者认为，外周耐受是由于抗原呈递时缺乏共刺激引起的。为研究共刺激缺乏在诱导外周耐受中的重要性，研究者们构建了一种在胰岛朗格汉斯细胞上特异性表达B7-1(CD80)的转基因小鼠(非糖尿病易感种系)[156]。随着B7-1的表达，胰腺β细胞体内和体外均成为T细胞的免疫原，但在胰岛内表达B7-1的转基因小鼠几乎不发生糖尿病。自身免疫的诱导仍有可能需要其他的主要因素，也有可能需要局部炎症加强淋巴细胞向非淋巴组织的募集。尽管TNF-α转基因小鼠发生了大面积的胰岛浸润，但它们不发生糖尿病[157]。在胰岛内表达B7-1和TNF-α的双重转基因小鼠则[158]迅速发生组织破坏和糖尿病。可见，仅有共刺激或仅有T细胞向组织内的募集都不足以诱导自身免疫，但是募集T细胞的组织如果能够刺激自身反应性T细胞的扩增和活化就足以诱导自身免疫。似乎可以合理地推测，TNF-α的局部表达可替代诱发局部炎症的自然事件(如病毒感染)。这些结果与外周耐受是由于免疫忽视(immunologic ignorance)而不是特异性不反应所引起的观点最为一致。由于初始自身反应T细胞与非淋巴组织的接近受到限制，因此这些T细胞的无反应性很有可能不是由于在缺乏共刺激信号的情况下识别组织特异性抗原被诱导的。

对IDDM转基因模型的研究已清楚证明，活化的自身反应性CTL需要达到一定数量才能诱导疾病发生。在抗原识别部位提供T细胞增殖的共刺激信号，可使少量自身反应性前体T细胞扩增。在胰岛内仅有病毒转基因或仅有B7-1的表达都不足以诱导IDDM。在β细胞内表达共刺激分子B7-1和LCMV-GP的双重转基

因小鼠，其自身反应性 CTL 在无病毒感染时也可被活化，而且可发生自发性的 IDDM[159]。此外，表达 RIP/GP 和 RIP/B7-1 的双重转基因小鼠在 VAC/GP 感染后可发生胰岛炎和糖尿病，RIP/GP 转基因小鼠则不发生。在这一模型中，局部炎症反应被诱导后，加强自身反应性 T 细胞向靶器官的聚集有可能逆转 T 细胞不反应状态。RIP/TNF-α 和 RIP/TNF-α × RIP/GP 小鼠可发生严重的胰岛炎，但不发生糖尿病；而被 VAC/GP 感染时，TNF-α × RIP/GP 小鼠可发生糖尿病。TNF-α 的局部分泌可能加强淋巴细胞的转移并增加局部 MHC 抗原的表达水平。因此，当自身反应性 T 细胞数量少时，IDDM 不发生，除非在靶器官局部环境中提供其他因素。

在缺乏共刺激时对自身抗原的识别可诱导自身反应性 T 细胞失能，这一观点尽管得到的支持很少，但却是关于共刺激分子在控制自身反应中作用的一种截然不同的观点，这一观点产生自对 CD28 和 CTLA4 分子各自促进和抑制 T 细胞活化不同功能的研究[160]。CTLA4 在 T 细胞活化和自身反应的阴性调节中具有重要的生理作用，直接证据来自缺乏 CTLA4 小鼠的表型[161]，这种小鼠可迅速发生自发性淋巴细胞增殖性疾病，在许多器官中出现大面积淋巴细胞浸润和组织破坏，心肌炎尤其严重，具有脾大、淋巴结病和血清 Ig 升高的临床表现，小鼠在 3～4 周龄时死亡。这些小鼠的外周 T 细胞在体外可自发性地活化、增殖，并产生大量细胞因子。这些结果首次证明，共刺激失调可诱导介导致命组织损伤的 T 细胞活化，并提示共刺激在维持对自身抗原的耐受中起着重要的作用，CTLA4 介导的阴性信号具有主动下调自身反应性 T 细胞的作用。事实上，在对特定 APC 上抗原识别的过程中 CTLA4 可能参与了诱导对某种自身抗原的耐受，不能传递这种下调信号可能导致自身免疫[162,163]。

尽管共刺激分子在诱导和(或)维持 T 细胞耐受状态中的作用有待进一步确定，但是很少有人怀疑抗原特异性 T 细胞的活化和扩增高度依赖于共刺激信号的传递。对动物模型的大量研究均集中于抑制共刺激信号的传递作为器官特异性自身免疫的一种治疗方法。一种与 Ig 蛋白融合的可溶性 CTLA4 与 B7-1 和 B7-2 (CD86)均能发生反应，并能阻止这些共刺激分子与 CD28 和 CTLA4 相互作用。在应用百日咳毒素的动物模型中重复注射 CTLA4 免疫球蛋白(CTLAIg)可阻止 EAE 的诱导[164]。但是，用 CTLA4Ig 处理过的动物细胞(已接触过 PLP)在培养中用 PLP 肽激活后，可将典型的 EAE 转移给幼小的动物。可见，给予 CTLA4Ig 似乎不能抑制激活，而且这些动物的致病性记忆 T 细胞在体外培养时仍能被扩增。EAE 的过继转移模型使人们能够区分以下两种机制，即 T 细胞对 MBP 耐受消失的机制以及在效应期导致炎症性脱髓鞘的机制。在免疫期间和体外活化期间 CTLA4Ig 的存在可最有效地阻止临床症状的出现[165]。这种临床症状的减少与致脑炎性 T 细胞在体外受抗原刺激后增殖反应的减弱一致，但与 IFN-γ 产生减少并不一致。相反，输入 MBP 活化的 T 细胞后，再用 CTLA4Ig 处理受者动物对病程和疾病的严重性均无影响。由于记忆细胞对共刺激信号的依赖性较小，因此相对来说效应期或许不依赖于共刺激。在 EAE 的过继转移中，联合运用抗 B7-1 和抗 B7-2 可抑制疾病转移，而单独用一种抗体则不能抑制[166]。另一方面，在活化模型中多次注射 CTLA4Ig 可增加发病率。经常运用 CTLA4Ig 可导致其他共刺激途径的开放，换而言之，CTLA4Ig 的持续存在可能阻止 B7-1 和 B7-2 通过 CTLA4 传递阴性信号。

在 Lewis 大鼠模型中用 CTlA4Ig 治疗 EAE 也观察到不同的结果[167]，系统性给予 CTLA4Ig 可抑制临床疾病，推迟到免疫后 10 天给予抑制效果更强，此时患者已出现病理改变。系统性给予高剂量 IL-2 不能逆转这种保护作用。免疫组织学研究证明，炎症浸润受到抑制的同时 Th1 细胞因子也被抑制，而 Th2 细胞因子不受影响。这项研究表明，CTLA4Ig 的阻断作用使致脑炎性 Th1 细胞不能扩增，但仍可发现调节性 Th2 细胞进入 CNS，保护动物不患 EAE。当大鼠被过度免疫后 17 天，可发生致死的 EAE，死亡率为 100%[168]，如果从 2～18 天时给予 CTLA4Ig，可明显降低发病率和 EAE 的严重性，但推迟到第 7 天给予不影响 EAE 的发展。从 0～10 天每天给予重组 IL-2 可完全逆转 CTLA4Ig 的保护效应。尽管在几种模型中，EAE 早期时阻断 CD28/CTLA4 B7-1/B7-2 的相互作用可抑制疾病诱导的起始阶段，但由这条途径传递的共刺激信号在后来的效应期显得相对不太重要。推迟注射 CTLA4Ig 也许不能抑制已穿越 BBB 的致脑炎性 T 细胞。

在自身免疫病炎症局部特异性传递的共刺激信号在慢性复发型疾病中可能起作用。正常小鼠脾的巨噬细胞、B 细胞和树突细胞上主要表达 B7-2，但未检测到 B7-1 的表达。在 EAE 急性期和复发期 B7-1 在脾巨噬

细胞和 B 细胞上的表达增加，在 CNS 中 B7-1 的表达明显上调，尤其是在浸润的单核细胞上[169]。在急性病程的恢复期用抗 B7-1 的 Fab 段处理动物可减少临床复发。在缓解期同时给予抗-B7-2 抗体对疾病的复发病率和严重性无明显影响。CNS 的组织学检测表明抗-B7-1 Fab 段处理后小鼠的炎症反应和脱髓鞘均减弱。在另一种实验模型中 B7-1 可能作为优势共刺激分子发挥作用，参与向 CNS 中 EAE 效应细胞的抗原呈递以及募集髓鞘脂肽（在第一次发病期间已被暴露）特异性的初始 T 细胞，由这一模型所得结果与上述的研究结果是一致的。

Kuchroo 等[113]首次提出，B7-1 和 B7-2 分子可能激活不同的辅助 T 细胞途径，并以这种方式调节自身免疫病。用抗 B7-1 处理患 EAE 的动物可降低发病率，而抗 B7-2 可增加疾病的严重性。两种抗体均不影响 T 细胞的激活，但可调节被诱导的细胞因子类型。阻止 IL-4 的分泌可消除抗 B7-1 的保护效应。这些研究证明 B7-1 优先作为一种 Th1 细胞产生的选择性共刺激分子，而 B7-2 可共刺激并诱导 Th2 细胞。因此，阻断 B7-1 抑制 Th1 细胞的产生，而加强 Th2 细胞的产生；阻断 B7-2 可产生相反的效应。从其他自身免疫病模型或从外源抗原特异性 Th1/Th2 细胞活化的研究中很少得到支持这一假说的资料。抗 B7 抗体有可能交联 T 细胞、巨噬细胞和树突细胞上的靶抗原，诱导特异性细胞因子（如 IL-12）的分泌，细胞因子微环境的这些变化导致 Th 细胞反应的极化。另外，抗 B7-1 和抗 B7-2 可能分别抑制其靶配体与 CD28 或 CTLA4 的相互作用，并由此影响自身反应的总体强度。

对 NOD 小鼠的研究也证明了 CD28/CTLA4 的作用[170]。在胰岛炎出现时（2～4 周龄），用 CTLA4Ig 或抗 B7-2 处理雌性 NOD 小鼠可防止糖尿病的发生，但胰岛炎的发生和严重性几乎未受影响，推迟至 10 周以后给予这些处理不会改变病程。相反，用抗 B7-1 处理雌性小鼠可使病情明显加剧，并可在正常具有抗性的雄性小鼠体内诱导糖尿病发生，用抗 B7-1 处理也可导致更加快速而严重的浸润，从这些小鼠（用抗 B7-1 处理过）的胰腺内分离的 T 细胞比从其他处理组分离的有更明显的活化表型。联合应用抗 B7-1 和抗 B7-2 处理动物也可加速疾病发生，因此抗 B7-1 产生的效应占主导地位。将 NOD 小鼠与表达 CTLA4Ig（由一种皮肤特异性启动子所控制）的小鼠交配来研究 CD28-B7-1/B7-2 相互作用在糖尿病发生中的作用，这两种小鼠的交配导致血清中表达 10～30μg/ml 的可溶性 CTLA4 Ig[171]。这种小鼠与对照相比发生糖尿病的速度更快，而且疾病的外显率和严重性均较高。

应用抗 CTLA4 单抗对 CTLA4 在阻止自身反应 T 细胞活化中的作用直接进行研究[172]。在 EAE 疾病模型中，免疫后 2 天一次注射抗 CTLA4 导致疾病加重。当 CTLA4 阻断被延迟到临床症状发生之后，疾病出现明显恶化。CTLA4 阻断也可增加前炎症细胞因子的产生，某些接受处理的小鼠可发生死亡。在免疫后 2 天一次注射抗 B7-1，可能通过阻止 CTLA4 介导的免疫反应下调，导致疾病恶化。Karandikar 等也观察到非常相似的结果[173]。抗 CTLA4 单抗或其 Fab 段在体外可增强 PLP 活化的 T 细胞的增殖和前炎症细胞因子的产生，向活化的培养细胞中加入抗 CTLA4 单抗或其 Fab 段，可使 T 细胞能够将疾病过继转移给初始的受者，给予接受了 PLP 特异性 T 细胞的受者抗 CTLA4 单抗，可导致疾病加剧和恶化。

综上所述，抑制 B7-1/B7-2 与其受体 CD28 和 CTLA4 的相互作用对自身免疫病的最终表现产生复杂的影响。在某种条件下尤其是在疾病开始时，抑制自身反应性效应细胞的克隆扩增可导致疾病临床症状的抑制。在体内和体外 CTLA4 均作为自身免疫 T 细胞功能的主要阴性调节信号而出现。阻断 CTLA4 与其配体的相互作用导致所研究的每一种 T 细胞的效应功能均被增强，其最终效应是保持自身免疫病持续存在的能力被加强，疾病复发率和严重性均增强。CTLA4 介导的抑制功能在自身反应性 T 细胞开始活化（此时表达低水平 CTLA4）和随后的克隆扩增（此时活化的 T 细胞表达较高水平低水平 CTLA4）期间都起重要作用。存在可加强 NOD 模型的糖尿病，这可能反映了在 CTLA4 参与的病程早期 BT-1 的作用。用 CD28 拮抗剂治疗器官特异性自身免疫疾病应该非常谨慎。抑制这种共刺激途径可能导致截然不同的后果，这依赖于疾病的病期以及在特定的反应期间 CD28/CTLA4 及其配体的相对表达，也有可能依赖于动物种系向 Th1 和 Th2 反应发展的遗传倾向性。

尽管有关 CD28/CTLA4 及其配体在人类自身免疫病中作用的直接证据极少，但是已用 RT-PCR 和免疫细

胞化学方法对 MS 损伤中共刺激分子 CD80 和 CD86 的表达进行了研究[174]。在急性 MS 斑块损伤中可观察到 CD80 和 CD86 的表达增加,但在炎性梗死中则不然。CD80 染色发现。其主要表达在微静脉周炎症套内的淋巴细胞上,而不是在实质内。CD86 主要表达在不同年龄的 MS 损伤和炎性梗死中的巨噬细胞上。很明显 CD86 表达对 MS 斑块是非特异的,在非自身免疫和病毒介导的炎症中均可见 CD86 的表达。即使 CD80 表达的上调也有可能是 CNS 病毒感染的继发事件,不一定是自身免疫的发病机制。

器官特异性自身免疫的免疫治疗方法

抗原特异性治疗

自身免疫病治疗的主要目的是,建立一种可选择性地针对致病性 T 细胞而保持免疫系统的其余部分完好无损的治疗方案。理想的方法应该在疾病发生后治疗有效。20 世纪 50~60 年代已证明,系统地给予可溶性蛋白抗原可抑制后来对此种蛋白的免疫反应,并可有效地诱导抗原特异性 T 细胞耐受[175]。在糖尿病发生前给予胰岛素能延迟或阻止 NOD 小鼠发生糖尿病[176],这似乎是继发于激素的免疫效应而不是代谢效应[177]。系统地注射抗原可诱导 T 细胞不反应,克隆失能机制与此有关。T 细胞的不反应可能也是 TCR 和 CD8/CD4 水平降低的结果。撤去抗原后 T 细胞的反应低下可被逆转,这提示抗原的持续存在是维持失能状态所必需的。当自身抗原已知时,克隆失能的诱导可能是有效的,并且只有在病程早期给予时才可阻止决簇扩展。在大多数人类疾病中可能需要抗原的联合应用。

此外,系统地给予抗原可通过诱导凋亡调节自身免疫病,这种凋亡可能是由 Fas/FasL 和 TNF 依赖途径介导。在 EAE 的过继转移模型中,重复静脉注射大剂量的 MBP 或 MBP 肽 Ac1~11 可防止疾病发生[178]。由于需要长期维持耐受效应的存在,因此很难将这一模型应用于人类。系统地给予自身抗原也有可能加强自身反应性 T 细胞的反应(见"口服耐受"一节),或者活化 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞产生前炎症细胞因子。

暴露于高浓度的抗原也可能导致免疫偏离。诱导 Th1 细胞失能或清除的因素倾向于促进 Th2 细胞的活化[179]。在胰岛炎发生之前用 β 细胞抗原 GAD65、GAD67、胰岛素和 HSP60 处理年轻的 NOD 小鼠可有效地防止疾病发生。例如,NOD 雌性小鼠在 12 周龄时表现胰岛细胞浸润以及最大程度的 T 细胞和 B 细胞的抗 β 细胞反应,此时用可溶性 GAD65 处理小鼠可阻止糖尿病发生,并可抑制对胰岛浸润的进展,这种效应可能由 Th2 细胞所介导。应当再次强调的是,自身抗原特异性 Th2 反应的诱导可能具有不良反应,尤其是当病程中的一些效应机制可能涉及自身抗体时(见下一节"口服耐受")。用特异性肽而不是完整的抗原有可能阻止 B 细胞反应,但肽的半寿期较短,这就需要建立一种持久的呈递系统。

过去 5~10 年的研究试图依据 TCR 和 MHC 肽间的特异性相互作用系统地给予抗原,从而设计一个合理的治疗方案。用 MHC 分子的高亲和力肽来阻断其抗原呈递功能,被认为是一种有效的免疫治疗方法,可干预 MHC 相关性疾病。首次报道运用一种抑制性肽可抑制 PL/J 小鼠的 EAE,这种肽除了在 MBP Ac1~11 肽的第 4 位用 Ala 代替 Lys 外,与致脑炎性肽的序列相同,这使得肽与 MHC Ⅰ-A^U 的亲和力加强了,使它能有效地与致脑炎性肽竞争结合,并可能阻止疾病诱导[180]。当测定到 MBP 肽 Ac1~11 与 Ⅰ-A^u 和 TCR 相互作用所需的最小结构时,用丙氨酸替换除 5 个氨基酸之外所有 MBP 肽上的氨基酸,并不改变其结合 MHCⅡ、刺激特异性 T 细胞或诱导 EAE 的能力[181]。其他大部分氨基酸侧链与 T 细胞刺激及疾病诱导无关。与 Ⅰ-A^u 结合的肽大部分由丙氨酸组成,只含有 Ac1~11 的 3 个原始氨基酸残基。当用作共免疫原时,这种肽可能通过抑制野生型肽与 I-A^U 的结合从而防止 EAE 的发生。这些结果提示,只需很少的氨基酸和 MHCⅡ分子与 TCR 相互作用,即可启动体内导致自身免疫病的特异性反应。与免疫肽无关的肽只要含有与 MHC 和 TCR 结合的关键残基就能满足这种要求。这些研究结果也支持分子模拟的观点,即病原体表达的肽只要有几个氨基酸残基与自身同源就有可能诱导自身免疫病。

在这些研究中,用肽来抑制 MHC 结合需要知道关于自身抗原的详细资料,并运用与致脑炎性肽结构密切相关的抑制肽,这种高度相关性肽的运用使人们有可能通过抗原特异性而不是 MHC 特异性调节机制来抑

制疾病发生。用与自身抗原无关的肽与抗原竞争结合 MHC,已被用于治疗 Lewis 大鼠的 EAE[182]。用完整的 MBP 和卵白蛋白共同免疫可抑制 Lewis 大鼠 EAE 的诱导。由于这些肽可能是免疫原,因此它们仍有可能通过其他机制抑制疾病,如诱导耐受或克隆免疫优势(clonal immunodominance)。理想的肽应该是非免疫原而且与 MHC 位点有高亲和力。肽 OVA 323 ~ 339 可与 I-A^U 结合,但不能诱导体内的 T 细胞反应,更重要的是,当这种肽作为共免疫原与 Ac1 ~ 9 共同免疫时,可抑制(PL/JXSJL)F_1 小鼠的 EAE。因此,MHC Ⅱ 单独结合就能调节 EAE 的诱导。体外抑制 T 细胞活化也被用来从大量无关肽中鉴定出拮抗性肽[183]。这种肽单独或与 PLP137 ~ 115 共同免疫时可有效地降低 EAE 的诱导,在这一模型中疾病诱导是暂时性的,动物对随后注射 PLP139 ~ 151 诱导的疾病易感。

1115

通过抑制 NOD 小鼠 T 细胞瘤的抗原呈递也鉴定出一种能阻断 MHC Ⅱ 类分子——I-A^{g7} 抗原呈递的肽[184]。这种肽可用作对糖尿病前期的年轻 NOD 小鼠的慢性治疗,在胰岛炎发生之前 3 ~ 4 周龄时开始治疗,每周 5 次持续 3 周,然后每周 2 次直到 22 ~ 23 周(表 34.14),糖尿病的发生被延迟,在整个治疗期糖尿病的发生率 < 16%(对照组到 22 周龄时有 60% 发生糖尿病)。这表明 MHC 阻断不能永久性抑制疾病,因为在中断治疗后疾病会复发。如果应用于人类,连续的治疗中方案可能是必需的,或者在疾病(如 MS)的临床复发期必须重复给予治疗。在这项研究中一个重要发现是尽管以可溶性形式短期给予时这种肽不是免疫原,但在长期治疗时在部分动物体内的确可诱导具有严重副作用(立即出现高敏感性症状)的抗体产生。抗体的产生可能是治疗性肽长期应用于人体的主要障碍。尽管与疾病相关的MHC分子的高亲和力非免疫原性肽有可能是治疗人类自身免疫病的有效方法,但是作为药物来应用可能需要开发小的非肽类的 MHC 阻断分子。

表 34.14　用 MHC 阻断性肽防止 NOD 小鼠发生糖尿病

处　理	发病率(%)	
	22 周	28 周
对照肽	60	60
I-A^{g7}阻断性肽	16	40

在 NOD 小鼠 3 周龄时开始用对照肽或 I-A^{g7}阻断性肽进行处理,一直持续到 22 周。资料来自参考文献[184]。

应用 MHC 阻断性肽的另一个问题是,难以直接证明抑制效应的机制的确是 MHC 阻断。在输入致糖尿病 T 细胞的同时,经腹膜下给予 I-A^{g7}结合肽和不完全佐剂可明显抑制疾病发生[185]。给予肽和不完全佐剂之前经静脉注射首次诱导对同种肽的耐受,可消除对输入致糖尿病细胞的治疗效应。最初在 NOD 小鼠实验中观察到的阻断效应可能不是由于 MHC 呈递作用的阻断引起的,有可能是与阻断性肽的免疫原性有关的其他未知效应引起的。

由于设计纯粹的非免疫原性 MHC 阻断性肽存在实践和理论方面的困难,最近采用的方法集中于对参与 TCR 相互作用的抗原性肽内的残基进行修饰[186]。用这种方法构建的肽能特异性地强烈抑制 T 细胞功能。已有人提议将这些所谓的 TCR 拮抗性肽用作抑制器官特异自身免疫病的特异性治疗。对 TCR 拮抗剂治疗 PLP 在 SJL 小鼠中诱导 EAE 的可行性进行了深入研究[187]。已证明残基 W144 对 TCR 结合是关键的,因为替换这一残基可导致针对几种 T 细胞克隆的抗原性完全丢失。对保持完好 I-A^S 结合能力的非抗原性肽的 TCR 拮抗性进行测定,发现大部分肽至少对一种 T 细胞克隆有拮抗性,但没有一种肽可同时抑制所有不同的 T 细胞克隆。最有效的抑制性肽库被用作体内研究,发现这种 TCR 拮抗性肽库抑制疾病的能力比抗原无关的 MHC 阻断性肽高 1 ~ 3 个数量级,大约与致脑炎性 PLP139 ~ 151 肽等摩尔量的肽库即可产生有效的抑制作用。这一发现强调了抗原类似物可作为非常有效的抗原特异性免疫调节剂。TCR 拮抗剂不能抑制正在进行的反应,在给予致脑炎性肽之前用这种拮抗剂对小鼠进行预免疫只有中等效力。总之,如果抗原和拮抗剂必须在同样的 APC 表面被呈递才能产生 TCR 拮抗作用,那么它们必须被同时给予。同样的方法也适用于 MBP 87 ~ 99 肽诱导 Lewis 大鼠发生 EAE 的模型中[188]。已鉴定出大量抑制性肽类似物可拮抗致脑炎细胞系的增殖反应。而且,其中有一种肽(91K > A)能阻止并逆转 EAE。用肽 87 ~ 99 和 91K > A 共同免疫大鼠可使 IFN-γ 和 TNF-α 的产生下调。最强的抑制剂是与 MHC 亲和力最低的肽,因此抑制 MHC 结合不可能在疾病抑制中起主要作用。

仔细研究与 MHC 或 TCR 相互作用的 MBP 肽 Ac1 ~ 9 的各个残基[189]发现，残基 3 和 6 决定 TCR 的作用位点，而残基 4 和 5 决定与 I-A^{U} 的结合（图 34.1）。经腹膜下给予可溶性 Ac1 ~ 9 可有效诱导成年小鼠的不反应。给予可溶性的与 MHC 有较高亲和力的肽诱导动物耐受时，对 EAE 的抑制效应更强。耐受方案也可抑制 T 细胞增殖以及 IL-2、IL-4 和 IFN-γ 产生。在首次出现临床症状时给予不同的肽类似物也可有效治疗 EAE，但是在疾病进展时肽治疗的有效性降低。自身抗原与 MHC 的亲和力在决定外周自身反应性细胞的结局中起重要作用。高亲和力的肽更有可能诱导耐受，而低亲和力的肽可使自身反应性细胞持续存在于健康个体中。高亲和力肽的作用机制尚不清楚，不可能是 MHC 阻断在起作用，由于一次给予亲和力最高的 MHC 结合肽甚至能在接触过抗原的小鼠体内诱导不反应，而 MHC 阻断性肽主要在免疫时给予或持续给予时才发挥作用。由于未发现免疫偏离或诱导抑制的任何证据，因此在这一模型中失能和删除是最有可能的机制。

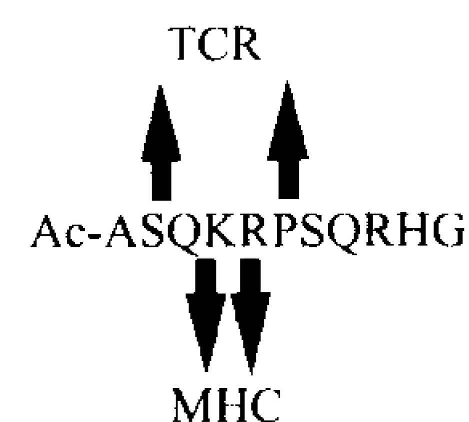


图 34.1　MHC 和 TCR 与肽 MBP Ac1 ~ 11 相互作用的氨基酸残基。

1116

将同一组高亲和力的 MHC 结合肽 Ac1 ~ 11 给予 TCR 转基因小鼠，这种转基因小鼠表达 I-A^{u} 限制性的 Ac1 ~ 11 特异性 TCR[190]。将这些肽注射进正常小鼠体内未观察到 T 细胞活化效应，相反，在转基因小鼠体内可见 T 细胞活化和外周凋亡，而且反应的强度与肽和 MHC 的亲和力呈正相关。存活细胞的 Th 表型发生了转变，低亲和力的肽主要诱导 Th1 反应，而高亲和力肽主要诱导 Th2 反应。这些观察结果表明，除了肽与 MHC 相互作用的变化外，随着 TCR 与肽 MHC 亲和力的第二次变化，MHC 结合肽的结构也可能被改变。这种相互作用的改变可能导致 T 细胞反应发生质的变化，从而增强了 T 细胞的激活能力和诱导 Th2 反应的能力。

上述大部分研究所运用的肽 MHC 结合特性各不相同。另一种方法可用于确定有可能使自身反应性 T 细胞分化过程发生改变的肽，即不改变其 MHC 结合性，而只改变其 TCR 结合残基，PLP139 ~ 151 的 Q144 肽突变体可满足这种条件。用这种突变肽免疫的小鼠不发生 EAE，用突变肽和天然肽共同免疫可降低发病率和疾病的严重性[191]。用 Q144 肽预先免疫防止疾病发生。用天然肽（W144）免疫动物后，其 T 细胞在体外被天然肽刺激时可增殖，并产生大量的 IL-2 和 IFN-γ，但用 Q144 肽免疫则不然。来自 Q144 肽免疫的动物淋巴结细胞对 Q144 肽或 W144 刺激可发生增殖反应，并产生 IL-1、IFN-γ 和 IL-10，但不产生 IL-4。来自 Q144 肽免疫的动物短期 T 细胞系被输入幼年小鼠体内后，再用 W144 肽免疫可诱导 EAE。用 Q144 肽免疫小鼠产生的 T 细胞系在体外用 Q144 肽激活，可使其具有一定的保护作用；用 Q144 肽免疫的小鼠 T 细胞系在体外用 W144 激活后，将其输入其他动物体内可观察到最强的保护作用。这表明 Q144 肽诱导的细胞具有交叉反应性，并且需要用 W144 肽激活才能介导保护作用。用突变肽免疫可诱导混和表型的 T 细胞。与其他研究相反，在这一模型中，Q144 肽可能与 TCR 相互作用并诱导反应细胞的变化，同时并未激发出所有的效应功能，而其他研究证明，肽作为药物拮抗剂在不诱导反应发生时通过与 TCR 结合而抑制疾病。由 Q144 肽诱导的混和表型的 T 细胞与天然肽诱导的 Th1 细胞相比具有较弱的自身攻击性。当 Q144 肽特异性 T 细胞与 CNS 中的天然肽交叉反应时，可分泌 Th2 细胞因子。尽管在这一模型中 Th2 细胞因子有可能与疾病的好转有关，但应该强调的是，尚未开展有关这方面的研究。

为研究突变肽抑制作用的机制，用 PLP139 ~ 151 和 TCR 结合残基替换的突变肽（L144/R147）共同免疫小鼠[192,193]可保护小鼠不患病，但 CNS 内仍出现炎症灶，这提示 L144/R147 并非单纯抑制 LPL139 ~ 151 特异性 T 细胞反应的发生。奇怪的是，L144/R147 肽不仅可抑制另一种致脑炎性 PLP 肽诱导的 EAE，也可抑制由无关的 MBP 和 MOG 肽诱导的 EAE。因此保护作用的机制并不是 TCR 拮抗。来自用 L144/R147 肽免疫动物的 T 细胞在体外与 L144/R147 肽反应，然后将其输入动物体内，再用 PLP178 - 191 免疫受者动物可诱导疾病。用 L144/R147 肽免疫可诱导与天然 PLP139 ~ 151 交叉反应的调节性 T 细胞，输入这种调节性 T 细胞系可通过旁路抑制机制保护动物不发生由其他无关 CNS 抗原诱导的 EAE。L144/R147 肽特异性 T 细胞系和克隆通常与 PLP139 ~ 151 交叉反应，最普遍产生的细胞因子具有 Th1/Th2 混合表型。初始 T 细胞的 TCR 与低活性肽相互作用可能传递一种性质不同的信号，足以改变其极化作用，从而产生混合的 Th1 和 Th2 细胞因子。Brocke 等[194]用一种突变肽（96P > A）成功地治疗了具有麻痹症状和脑内炎症浸润的小鼠，过继转入 MBP 肽 87 ~ 99

特异性致脑炎 T 细胞克隆可诱导这种疾病。由此可见,突变肽也能用于治疗已发生的 EAE。在另一项研究中,转入 BMP Ac1~11 特异性 T 细胞系诱导 EAE,6 天后将 MBP 78~99 特异性 T 细胞克隆注射给同样的小鼠,然后注射突变肽 96P > A,疾病可被缓解(表 34.15)。这种交互作用依赖于损伤内存在识别 96P > A 肽的 T 细胞克隆。突变肽对 EAE 的逆转也依赖于 IL-4 的产生,因为针对 IL-4 的中和抗体可阻断 PLP 的治疗效应。由于大多数自身免疫反应是针对多种抗原的反应,这一现象在炎症反应过程中通过决定簇扩展得到进一步体现,因此即使是针对优势 T 细胞群的治疗方法也不可能是有效的。肽拮抗剂可诱导调节性 T 细胞,这种 T 细胞可有效缓解由结构上无关的髓磷脂抗原诱导的疾病,这一结果强调了此方法在多种不同的自身免疫病治疗中的重要性。

表 34.15 用突变肽逆转 EAE

第 0 天	转入 T 细胞	肽 Rx	疾病分数	
	第 6 天	第 11 天	第 10 天	第 14 天
MBP Ac1~11	——	PBS	1.5	2.0
MBP Ac1~11	——	MBP 87~89(96P→A)	1.5	2.0
MBP Ac1~11	MBP 87~89	PBS	2.0	2.5
MBP Ac1~11	MBP 87~89	MBP 87~89(96P→A)	2.0	1.5

所有小鼠在第 0 天时注射抗 MBP Ac1~11 特异性 T 细胞。第 6 天给一些组的小鼠注射抗 MBP 87~89 特异性 T 细胞克隆。第 11 天,在第一次输入细胞后用 PBS 或突变肽 MBP 87~89(96P→A)处理小鼠。资料来自参考文献[194]。

有研究试图用突变肽体外调节人自身抗原反应性 T 细胞克隆细胞因子的分泌[195]。用 TCR 结合残基替换的突变肽刺激识别 MBP85~99 的人 T 细胞克隆未诱导出任何反应,而用次要残基替换的突变肽刺激则可诱导细胞因子类型从混合的 Th1/Th2 型向 TGF-β 分泌表型转变。用突变肽刺激 T 细胞克隆后参与细胞因子分泌转变的分子机制尚不清楚,推测与 TCR 识别过程中由突变肽传递信号的质的差异可能导致最终细胞因子分泌的改变。TGF-β 可有效下调免疫反应并可改善 EAE[196,197]。

1117

基于 T 细胞受体的免疫调节

Ben-Nun 等[198]首次证明了在啮齿类动物中,诱导 EAE 的 T 细胞可被用作防止 EAE 的疫苗。这一观察结果表明,与细胞疫苗保护效应有关的相关抗原可能就是 TCR 本身。在 B10.PI 或 PL/J 小鼠体内用 MBP 或 MBP 肽诱导 EAE 经常导致一种限制性 V_βT 细胞反应,通常限于 TCR V_β8.2。1989 年,两个研究小组证明[199,200],在 EAE 的 Lweis 大鼠模型中用 V_β8.2 TCR 肽免疫可完全保护大鼠不发生随后诱导的 EAE。后来证明,用 V_β8.2 肽疫苗治疗临床型 EAE 不仅可阻止 EAE 诱导,也可快速逆转疾病症状[201]。这些研究结果使人们推测,由 TCR V_β8.2 T 细胞介导的最初的致脑炎 T 细胞反应的扩增,产生了针对 V_β8.2T 细胞的抑制性调节免疫反应,这种抑制作用可被 V_β8.2TCR 肽疫苗增强,导致免疫反应的进一步下调并使阻止疾病发生。事实上,来自 MBP 免疫大鼠(表现临床型 EAE)的 T 细胞对保护性 TCR V_β8.2 肽刺激可发生强烈的增殖,即使这些 T 细胞从未接触过这种肽。尽管 SJL 小鼠对 MBP 的反应以多种不同的 TCR V_β(包括 V_β2、V_β4 和 V_β17a)为特征,但是用 V_β17a 和 V_β4 的衍生肽处理小鼠与对照组相比疾病的严重性和复发率均降低。

Kamar 和 SarcarZ[202]进一步确定了 EAE 中 TCR 衍生肽诱导免疫调节的性质。值得一提的是,在 B10.PL 小鼠中由 MBP Ac1~10 肽诱导的疾病其临床特征强烈提示存在一种主动的免疫调节过程,病程急而短暂,大部分小鼠可永久康复。从 Ac1~9 诱导的 EAE 中恢复的 B10.PL 小鼠,在缺少外源 TCR 肽免疫的情况下可产生识别 V_β8.2 限制性肽(B5 框架区Ⅲ的氨基酸 76~101)的 T 细胞群[203]。将抗 TCR V_β8.2 反应性 T 细胞克隆输入幼年小鼠体内,随后用 MBP 加佐剂刺激小鼠,这些小鼠在体外对 Ac1~9 的反应减弱,也防止患 EAE。另外,用 V_β8.2 76~101 肽免疫 B10.PL 小鼠可抑制体外对 Ac1~9 的反应,并可防止小鼠患 EAE。抗 V_β8.2T 细胞克隆主要表达 V_β14 并能被新鲜脾细胞激活,提示它们可识别经过内源性处理的 TCR 肽。

B5 特异性 V_β14T 细胞克隆是 $CD4^+$ $CD8^-$ 和 MHCⅡ限制性的。据推测,TCR 肽反应性 $CD4^+$ T 细胞可识

别在 MHCⅡ背景下由炎症部位的 APC 呈递的 TCR 肽。调节性 T 细胞抑制疾病的机制仍不清楚。它们可能分泌抑制性细胞因子(TGF-β 和 IL-10),这些因子能在炎症部位对靶组织产生局部作用。另外,这些调节性 T 细胞能募集 $CD8^+$ T 细胞,这种 $CD8^+$ T 细胞可特异性识别存在于 MHCⅠ类环境中的 MBP 反应性效应细胞表面的天然 TCRα 或 β 链的衍生肽。$CD8^+$ T 细胞的参与或许可解释 CD8 缺陷小鼠从 EAE 中恢复延迟的原因[204]。为直接证明 TCR 特异性调节 T 细胞在保持自身耐受和阻止疾病中的作用,用针对调节性 $CD4^+$ T 细胞上表达的 V_β 链的单抗处理(SJLXB10.PL)F1 小鼠,可导致小鼠从急性 EAE 中恢复的延迟,并使其发生慢性 EAE。在胶原诱导的关节炎中也证明调节性抗 TCR 肽 T 细胞的类似作用[205]。识别胶原的致病性 T 细胞也表达$V_\beta8.2$,调节性 T 细胞也可识别框架区 3 的肽 B5(由 $V_\beta8.2$ 的 76～101 位氨基酸组成)。用胶原免疫之前或之后,用 TCR 肽 B5 疫苗接种可保护动物不患关节炎。接种 B5 不会导致大部分 $V_\beta8.2$T 细胞被清除,B5 特异性 T 细胞介导保护作用的机制仍不清楚。

尽管这些研究共同提示针对自身抗原的免疫反应主要受针对优势 TCR 拮抗反应的调节,但不是所有的研究小组都能重复这一结果,比较所有这些研究发现,它们在技术上存在明显差别。另外,TCR 肽免疫可诱导一种异质性的免疫反应,这种免疫反应有时可使疾病恶化[206]。这些实验中的一个主要的前提假设是,在器官特异性免疫中对自身抗原的免疫反应主要由克隆或寡克隆 T 细胞群组成。B10.PL 小鼠对 MBP Ac1～10 肽的反应就是这种限制性反应的一个明显例子,但是在实验动物和人类的大部分其他自身免疫病中,很难鉴定一种优势 T 细胞克隆,况且在许多研究中还未能检测到克隆偏性[207]。

1118

口服耐受

50 多年前人们已经出现经口暴露于蛋白抗原,可发生抗原特异性的低反应状态。肠相关淋巴组织(GALT)已进化到不仅可以保护宿主免遭摄入病原体的侵害,也可防止宿主与摄入蛋白质发生反应。集合淋巴结散布于肠绒毛之间,是 GALT 中产生特异性免疫反应的主要部位之一。尽管大部分食物抗原在到达小肠时已被降解,但一些完整的或部分降解的抗原可被吸收进入循环系统。被吸收或处理的抗原可能参与耐受诱导,已发现口服耐受与多种机制有关,并不是单一的免疫事件[208,209]。介导口服耐受的主要机制包括清除、失能和主动的细胞抑制,一些研究表明,选择特定的耐受途径取决于摄入抗原的剂量大小。小剂量的抗原倾向于选择主动抑制,大剂量的抗原倾向于清除或失能。在 Lewis 大鼠体内,口服大剂量的 MBP 可导致克隆失能,而较小剂量诱导细胞抑制(能够被转移)[210]。通过诱导 GALT 中的调节性细胞可介导主动抑制,随后这种调节性 T 细胞可迁移向全身的免疫系统。主动性细胞抑制的主要机制是,在抗原特异性刺激后分泌抑制性细胞因子如 TGF-β、IL-4 和 IL-10[211]。在 GALT 中抗原刺激倾向于诱导 Th2 细胞,尤其是分泌 TGF-β 的 T 细胞。TGF-β 也可作为肠黏膜中 IgA 产生的转换因子,也可能参与细胞向高内皮微静脉的归巢机制。由 GALT 中 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞产生的 TGF-β 均是口服耐受主动抑制的重要介导者。在口服耐受的诱导或耐受过程中都能产生 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞,但在 CD8 缺陷小鼠体内也可诱导口服耐受。在口服低剂量抗原的动物的 CNS 中,诸如 TNF 和 IFN-γ 之类的炎症细胞因子被下调,而 TGF-β 被上调[106]。

在抗原存在的微环境中,当口服抗原诱导的调节性 T 细胞被同种抗原激活分泌细胞因子时可产生旁路抑制。对人类器官特异性炎症疾病来说,不必要知道自身免疫反应针对的特异性靶抗原,只要经口给予能诱导调节性 T 细胞的抗原即可,这种 T 细胞随后向 CNS 归巢,并被 CNS 中固有的 MBP 再次激活,分泌抑制性细胞因子可抑制由任何 CNS 自身抗原特异性 T 细胞介导的炎症反应。来自喂饲了 BMP 动物的细胞可抑制 OVA 特异性细胞系的增殖,但这种细胞只有在被 BMP 激活时才具有抑制作用[212],这一研究在体外(表 34.16)证明了旁路抑制作用的存在。体内研究[213]已证明,给动物喂饲 MBP 可保护其不发生 PLP 诱导的 EAE(表 34.17)。旁路抑制在其他几种自身免疫病模型中也被证明。在理论上,旁路抑制可使抗炎症细胞因子集中在靶器官(炎症可能在其发病机制中起作用)中发挥作用,即使疾病在本质上不是以自身免疫为主。在大鼠脑卒中模型中,口服 MBP 可能通过减弱与缺血损伤有关的炎症减小中风的面积[214]。

表 34.16 体外的旁路抑制

上部	下部	抑制百分率/%
	Ova line + OVA	0
MBP-Fed	Ova line + OVA	0
MBP-Fed + MBP	Ova line + OVA	51
PBS-Fed + MBP	Ova line + OVA	0
	MBP line + MBP	0
OVA-Fed	MBP line + MBP	6
OVA-Fed + OVA	MBP line + MBP	47
PBS-Fed + OVA	MBP line + MBP	5

MBP 特异或 Ova 特异性 T 细胞系在 Transwell 系统的下部容器中培养，同时加以抗原 MBP 或 Ova。来自用 PBS、Ova、和 MBP 喂饲的供者动物细胞(分别用 PBS-Fed、Ova-Fed 和 MBP-Fed 表示)置于上部容器中，并如表所示给予刺激。72 小时后检测 T 细胞增殖。资料来自参考文献[212]。

表 34.17 体内的旁路抑制

喂饲抗原	临床评分
组蛋白	4.0
MBP	1.8
PLP	2.2

在 2 周内用组蛋白(对照)、MBP 或 PLP 喂饲动物 7 次，然后所有组均用 PLP 免疫诱导 EAE。用 PLP 或 MBP 喂饲动物抑制 PLP 诱导的 EAE。资料来自参考文献[213]。

在过去几年内 TGF-β 被认为是下调正常免疫反应的主要细胞因子。支持 TGF-β 起关键作用的最有力的证据是观察到 TGF-β 基因突变的纯合子动物在 3 周龄时死于一种消耗性综合征，伴以多病灶的混合炎症细胞反应和组织坏死[75]。用 TGF-β 治疗自身免疫病的研究支持其作为口服耐受主要介质的有效作用。用脊髓加完全副氏佐剂(CFA)免疫小鼠后 5～9 天给予外源性 TGF-β 可阻止急性 EAE 的发生，这种小鼠即使在 48 天时也不发病[196,197]。来自对照和 TGF-β 处理小鼠的引流淋巴结的 T 细胞用髓磷脂致敏，两者的增殖反应相同。这种保护作用不依赖于外源 TGF-β 对髓磷脂致敏 T 细胞发展的抑制作用，尽管在这些研究中未检测到细胞因子的分泌。在受保护小鼠的 CNS 中只观察到少数细胞浸润，这提示致敏细胞不能进入 CNS 或在其中增殖。在活化致敏的 1～5 天给予 TGF-β 是无效的，在 5～9 天时给予最有效，在症状发生时用 TGF-β 治疗不产生保护作用。由此可见，TGF-β 可抑制免疫反应晚期的效应期，而不是早期的 T 细胞诱导期。在急性 EAE 中，免疫后 5～9 天给予抗 TGF-β 可加重疾病症状，较晚给予中和抗体对疾病无影响。在复发型 EAE 中，用抗 TGF-β 处理可加速疾病出现并增加复发的严重性。与抗 TGF-β 相反，抗 TNF 在主动和被动 EAE 中的效应是保护性的，可能是因为内源性 TNF-α 通过上调黏附分子或 MHC Ⅱ 抗原，或者通过促进巨噬细胞活化以及活性氧和氮介质的产生增加疾病的严重性。TGF-β 可能通过拮抗 TNF-α 对内皮细胞的作用或者是抑制 TNF-α 对巨噬细胞的作用，从而阻止淋巴细胞进入 CNS。

关于喂饲抗原后诱导调节性 T 细胞的最初研究是运用大量 T 细胞进行过继转移抑制。从喂饲 MBP 的 SJL 小鼠的肠系膜淋巴细胞分离出 T 细胞克隆[112]。这些克隆是 $CD4^+$，并且与 Th1 致脑炎 $CD4^+$ 克隆的 TCR 特异性、MHC 限制性和表位识别在结构上相同。这些克隆的大多数除了产生数量不同的其他 Th2 细胞因子(IL-4 和 IL-10)外，还产生 TGF-β。用 MBP 免疫 SJL 小鼠诱导 EAE，同时注射这些来自于黏膜的细胞克隆，每一种细胞克隆都能抑制 EAE。这些 MBP 特异性调节细胞克隆可产生旁路抑制，由于它们可抑制 PLP 诱导的疾病。用针对 TGF-β 的抗体处理可逆转其中一种克隆诱导的旁路抑制。分泌 TGF-β 的细胞作为一种具有黏膜 T 细胞辅助功能和下调 Th1 细胞功能的独特亚群，有人建议称之为 Th3 细胞。

尽管通过黏膜暴露于抗原曾重复诱导 T 细胞调节亚群的产生，但是体外存在 IL-10 可诱导并慢性活化人和鼠分泌相似细胞因子类型的同种抗原或抗原特异性的 $CD4^+$ T 细胞[215]。这些抗原特异性 T 细胞克隆通过分泌 IL-10 和(或)TGF-β，抑制 $CD4^+$ T 细胞在抗原反应中增殖，并且曾被称为调节性 T 细胞 1(T-regulatory cell，Tr1)。卵白蛋白特异性 Tr1 细胞可抑制将 $CD4/CD45RB^{high}$ T 细胞转移给 SCID 小鼠诱导的炎症性肠疾病，但只有用卵蛋白喂饲小鼠激活 Tr1 细胞时才具有抑制作用。Tr1 细胞(通过抗原驱动的旁路抑制机制抑制反应)与 Th2 或 Th3 样细胞(在喂饲抗原后出现)的关系仍有待确定。

研究口服耐受的调节机制中存在的一个问题是，宿主对自身抗原的外源效应细胞反应以及对口服耐受原的复杂反应。人们希望能将正在启动的抗自身免疫反应同口服耐受诱导的免疫抑制旁观效应区分开。旁路抑制的作用在转基因模型中已被证明，这在本章第一节“器官特异性自身免疫病转基因模型”中已讨论过，

其中 LCMV 病毒核蛋白在胰腺的β细胞和胸腺内表达[216]，>95%的转基因动物在 LCMV 刺激后出现慢性发作的 IDDM,但在对照中则不发生。在 LCMV 开始感染前 1 周或感染后 10 天用 1mg 胰岛素每周 2 次口服治疗 2 个月,可阻止 50%以上的转基因小鼠发生 IDDM。在这种慢性发作(1~6 个月)的 IDDM 模型中,高亲和力抗自身 CTL 被清除。在外周发现的 CTL 是低亲和力的。被处理过的小鼠体内,抗自身 CTL 反应的产生不受抑制。在受到保护的动物体胰岛内出现 T 细胞浸润,但浸润的程度降低,受破坏的β细胞数量较少,但其胰岛内产生 IL-4、IL-10 和 TGF-β的淋巴细胞数量增加;而在未受保护的小鼠体内,产生 IFN-γ的 T 细胞数量较多。在口服胰岛素且不发生 IDDM 的转基因小鼠体内 MHC Ⅰ和Ⅱ类分子的水平可明显降低。口服胰岛素治疗不能有效地阻止快速发作的糖尿病,这种糖尿病只发生在胰腺内表达转基因的小鼠。由此可推测,口服耐受诱导的保护性反应不能阻止只依赖于高亲和力 CTL 的快速自身免疫过程。虽然如此,这一研究令人信服地证明了,口服自身抗原可有效抵抗针对不同特异性自身抗原诱导的自身免疫病,即使自身免疫过程被启动,胰岛损伤已开始。

用大剂量或小剂量抗原喂饲表达抗 MBP TCR 转基因动物时也观察到类似的结果[217,218]。小剂量抗原诱导细胞产生大量 IL-4、IL-6 和 TGF-β。给予较高浓度的抗原不能诱导这些细胞因子产生,也不导致 IFN-γ产生的减少。喂饲小剂量 MBP 的动物的 T 细胞被过继转移给同系非转基因小鼠,然后用 MPB 刺激小鼠可明显抑制 EAE 的发生。另外,用 MBP 加 CFA 喂饲转基因动物,可观察到临床分数明显降低,由此可见,具有同样的 TCR 并识别 MBP 上确切表位的细胞在暴露于抗原加佐剂时可分化成效应细胞,或者通过暴露于经黏膜途径给予的抗原分化成调节性 T 细胞。

过继转移和 T 细胞清除实验[219]已证明,口服胰岛素可通过 T 细胞依赖机制抑制 NOD 小鼠的胰岛炎和糖尿病的发生。喂饲了胰岛素的小鼠的胰腺组织与对照组相比胰岛炎程度较轻,残余的细胞浸润大部分由 $CD4^+$ T 细胞组成,这些 $CD4^+$ T 细胞可表达 IL-4、IL-10 和 TGF-β,但不表达 IFN-γ和 TNF-α[220]。而对照胰岛的单核细胞浸润由表达 Th1 细胞因子(如 IFN-γ和 TNF-α)的细胞组成。除了口服胰岛素外,经鼻内给予胰岛素和 GAD65[221]也可有效抑制疾病。在 4 周龄时每隔 4 周经鼻内给予胰岛素 B 链肽 9~23 可导致糖尿病发病时间明显延迟[222]。经鼻内诱导保护作用所需肽的数量比口服耐受低得多。尽管经鼻内给予胰岛素的小鼠的 T 细胞的增殖反应较低,但其分泌的细胞因子类型仍未确定,而且经鼻内给予胰岛素肽介导保护的机制尚不清楚。

大量其他的器官特异性自身免疫病动物模型通过经口给予抗原已成功地得到治疗和(或)预防。在 TNBS 诱导的 IBD 模型中,通过给动物喂饲由 TNBS 半抗原衍生的混合结肠蛋白诱导口服耐受,可防止疾病发生[78],喂食 TNBS 蛋白的小鼠 T 细胞分泌 TGF-β的能力明显增强,并且可观察到 IL-12 异源二聚体的分泌明显降低。经口给予Ⅱ型胶原可抑制几种模型的关节炎,包括胶原、佐剂、异十八烷和抗原诱导的关节炎[223]。经鼻给予Ⅱ型胶原肽也可抑制小鼠中胶原诱导的关节炎。经口给予分枝杆菌 65kDa 的 HSP,可减轻佐剂关节炎的严重性以及分枝杆菌和 HPS 特异性反应[224]。口服 HPS 后,佐剂关节炎的抑制作用可被耐受动物的脾细胞过继转移。在这一模型中,致敏作用是调节性 T 细胞扩增所必需的,因为只有喂饲 HSP 后又用 CFA 免疫过的动物细胞才能转移抑制作用。视网膜 S 抗原(SAg)能诱导实验型自身免疫性葡萄膜炎。以眼部炎症作为检测指标,经口给予 SAg 可明显减少 SAg 诱导的疾病的临床表现。对腺病毒抗原的口服耐受使人们可运用腺病毒载体进行基因长期表达[226]。

1120

应用口服耐受方案治疗人类自身免疫病是一种颇具吸引力的治疗方法。但是口服耐受在临床实验中被广泛运用尚存在许多理论问题。尽管自身反应性 T 细胞失能和清除的诱导也被确切证明,尤其是经口给予大剂量的抗原,但这种治疗方法仍不可能适用于人体,因为在特定自身免疫病中靶抗原必须被明确限定。表位扩展预示,在疾病诱导之后用起初的肽诱导口服耐受可能是无效的治疗。T 细胞可识别在决定簇扩展过程中产生的新的内源性自身表位,从而可能介导疾病进展(见前面所述“病因和发病机制”一节的“决定簇扩展”)。诱导能够介导旁路抑制的调节性 T 细胞使我们不需确切知道自身靶抗原,但是诱导这种调节性 T 细胞所需的抗原剂量的变化范围非常小,而且也难以从动物模型中推算出所需剂量。尽管口服抗原相对比较

容易防止自身免疫病的诱导，但是仍不清楚口服特定肽是否能调节已建立的自身免疫病（如 EAE）。此外，即使在一些动物模型研究中也难以证明口服小量或中等剂量的抗原后诱导了调节性 T 细胞。例如，PLP139 ~ 151 的一次口服剂量可完全防止用 PLP139 ~ 151 免疫诱导的急性和复发型 EAE。这种口服耐受方案可降低 T 细胞增殖以及 IL-2 和 TNF-γ 的产生，并导致 IL-4 产生明显增加，但 IL-10 或 TGF-β 水平不升高。IL-10 产生的增加不直接参与疾病抑制，因为在体内用抗体治疗中和 IL-4 对口服耐受的诱导或其防止疾病的能力无影响[227]。口服 PLP139 ~ 151 似乎可诱导失能，因为在 IL-2 存在时体外培养来自口服肽动物的 T 细胞可逆转其不反应。在 IL-2 中培养使反应恢复是失能的标志之一，并明确证明了，不是所有的 PLP139 ~ 151 特异性 T 细胞都被清除。没有证据表明产生了抑制细胞或旁路抑制，而且也不能证明较小剂量的抗原不能诱导口服耐受或防止临床症状。

在大多数研究中，包括那些对人体的研究，口服抗原未导致有害后果或疾病进展。另一方面，给动物喂食卵白蛋白可诱导细胞毒性 T 细胞，这表明经口给予抗原有可能诱导能导致自身免疫病的自身反应性 CTL[228]。在其胰腺 β 细胞内表达卵白蛋白的转基因动物用致死性剂量射线照射，并用在 $CD8^+$ CTL 上表达识别卵白蛋白的转基因 TCR 小鼠的骨髓重建这种转基因动物，这种嵌合体动物几乎不发生糖尿病，但有 50% 患轻度胰岛炎，当用卵白蛋白喂饲这些小鼠，大约 40% 发生糖尿病。很难从双重转基因模型的这一单项研究中得出结论，但这些结果的确明显提示经口暴露于自身抗原能激活 $CD8^+$ CLT，并强调在口服耐受研究中应谨慎行事。

迄今为止关于人类口服耐受诱导的研究数量有限。有报道将钥孔血蓝蛋白经口给予人体可降低随后细胞介导的免疫反应，尽管抗原反应不受影响[229]。在 MS 风湿性关节性和葡萄膜炎中已开始进行口服耐受的人体实验[229,230]。口服重组人胰岛素实验在新发生的糖尿病患者和危险人群中也已经开始进行。使风湿性关节炎患者口服鸡胶原Ⅱ的一项小规模前期实验表明，这些患者的疾病进展明显减弱，14% 患者的疾病消退，但一致的临床有效性尚待确定。在口服牛的髓磷脂进行治疗的 MS 患者的外周血中可见到 MBP 和 PLP 特异性 Th3 型细胞，但在未经治疗的患者体内未见到此类细胞[231]，在治疗过的患者体内 MBP 和 PLP 特异性 IFN-γ 分泌细胞未见增加。

结论

在过去 10 年的研究中，尤其是运用转基因小鼠对胸腺内阳性和（或）阴性选择过程中，T 淋巴细胞发育和分化的研究使我们对介导器官特异性自身免疫病 T 细胞的起源有了新的理解。自身反应可能是由于胸腺内阴性选择的失败或失调，或者不能诱导外周失能或不反应所致，尽管这一理论似乎很有道理，但是证明任何途径的实验材料都寥寥无几。事实上，大量研究已确证，自身反应性 T 细胞在外周 T 细胞库中占有相当的比例。那么为什么自身免疫病发病率如此之低？正如本章已详细阐述的那样，存在于外周的 $CD8^+$ 自身反应性 T 细胞处于不反应和（或）对表达在非骨髓来源细胞上的自身抗原不反应。关于 $CD4^+$ 自身反应性细胞的情况不太清楚，因为可利用的转基因模型较少。过去 5 年的研究已证明抑制性或调节性 T 细胞群的存在，

1121

这些 T 细胞可控制自身反应性 $CD4^+$ 细胞可能的致病性。调节性 T 细胞已被证明在人类疾病的所有动物模型中起重要作用，包括 IDDM、EAE 和 IBD。这些调节细胞发挥抑制效应的机制仍待探讨。

将来的研究将集中于那些使平衡倾斜并导致自身反应性 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞活化的因素。感染性因素具有重要作用，可能刺激诱导 Th1 细胞活化的因子产生，如 IL-12。或许，IL-12 抑制因子可能在防止感染后常见的某种自身免疫病（如 MS）恶化中具有临床价值。多年来分子模拟的概念一直影响我们的思维，但是关于病原体表达的模拟肽（与天然自身抗原只有微细的同源性）诱导自身反应性 T 细胞活化的新的研究，再次强调了感染性因素在诱导和维持自身免疫中的重要性。

由于发现细胞因子在器官特异性自身免疫病中作用，使人们构建了几种新的免疫治疗模型。在器官特异性自身免疫病中，Th1/Th2 平衡的观点被再一次证实。人和动物的大多数器官特异性疾病由 Th1 淋巴细胞

的极化细胞群介导。自身抗原特异性 Th2 细胞是否确定具有保护作用仍存在争议。尽管如此,人们还是进行了大量研究试图通过给予 Th2 极化细胞因子、注射倾向于活化 Th2 样细胞因子产生的各种肽,或者通过口服抗原刺激来自于黏膜的 Th2 和 Th3 细胞,诱导自身抗原特异性 Th2 细胞的产生。尽管这些治疗在人类临床实验中已被检验,但最近对细胞因子基因缺陷小鼠的研究使人们开始关注 Th1/Th2 在自身免疫中的简单性。在 EAE 动物模型中已证明有几种 Th1 细胞因子具有保护效应(表 34.13)。此外,在特定条件下已证明自身抗原特异性 Th2 细胞群可诱导器官特异性自身免疫[57,122,123]。进一步研究将有助于解决这一复杂的问题。其他治疗方法(如加强抗原特异性或非特异性调节 T 细胞)也应该使人感兴趣。器官特异性自身免疫病的理想治疗方法是不诱导整体水平的免疫抑制,而仅特异性地针对自身抗原特异性细胞群,但是我们离这一目标还很遥远。

(李亚斐 译)

参 考 文 献

1. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996;85:291.
2. Bach J-F. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 1994;15:516.
3. Thomas JW, Powers AC. Immunology of diabetes. In: Rich R, ed. *Clinical immunology: principles and practice.* St. Louis: Mosby-Year Book, 1996: 1503-1522.
4. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994;331:1428.
5. Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992;89:283.
6. Endl J, Otto H, Jung G, et al. Identification of naturally processed T cell epitopes from glutamic acid decarboxylase presented in the context of HLA-DR alleles by T lymphocytes of recent onset IDDM patients. *J Clin Invest* 1997;99:2405.
7. Crisa L, Mordes JP, Rossini AA. Autoimmune diabetes mellitus in the BB rat. *Diabetes Metab Rev* 1992;8:4.
8. Wicker LS, Todd JA, Peterson LB. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol* 1995;13:179.
9. Delovitch TL, Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation get the NOD. *Immunity* 1997;7:727.
10. Larger E, Becourt C, Bach JF, Boitard C. Pancreatic islet β cells drive T cell-immune responses in the non-obese diabetic mouse model. *J Exp Med* 1995;181: 1635.
11. Katz JD, Wang B, Haskins K, Benoist C, Mathis D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 1993;74:1089.
12. Andre I, Gonzalez A, Wang B, Katz J, Benoist C, Mathis D. Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2260.
13. Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 1993;366:72.
14. Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tlan J, et al. Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 1993;366:69.
15. Daniel D, Gill RG, Schloot N, Wegmann D. Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur J Immunol* 1995;25:1056.
16. Katz J, Benoist C, Mathis D. Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulitis in non-obese diabetic mice. *Eur J Immunol* 1993;23:3358.
17. Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA Jr. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med* 1996;183:67.
18. Wang B, Gonzalez A, Benoist C, Mathis D, The role of $CD8^+$ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1996;26:1762.
19. Haskins K, Wegmann D. Diabetogenic t-cell clones. *Diabetes* 1996;45:1299.
20. Simone E, Daniel D, Schloot N, et al. T cell receptor restriction of diabetogenic autoimmune NOD T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2518.
21. Conrad B, Weissmahr RN, Boni J, Arcari R, Schupbach J, Mach B. A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* 1997;90:303.
22. Conrad B, Weldmann E, Trucco G, et al. Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetology. *Nature* 1994;371:351.
23. Noronha A, Arnason B. Demyelinating diseases. In: Rich R, ed. *Clinical immunology: principles and practice.* St. Louis: Mosby-Year Book, 1996: 1364-1376.
24. Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problem, perspectives. *Brain* 1997;120:865.
25. Ruddick RA, Cohen JA, Weinstock-Guttman B, Kinkel RP, Ransohoff RM. Management of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1997;337:1604.
26. Soldan SS, Berti R, Salem N, et al. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 1997;3:1394.
27. Perron H, Garson JA, Bedin F, et al. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7583.
28. Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 1990;8:579.
29. Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 1992;10:153.
30. Rivers TM, Schwentker FF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med* 1935;61:689.
31. Powell MB, Mitchell D, Lederman J, et al. Lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha production by myelin basic protein-specific T cell clones correlates with encephalitogenicity. *Int Immunol* 1990;2:539.
32. Fritz RB, McFarlin DE. Encephalitogenic epitopes of myelin basic protein. In: Sercarz E, ed. *Antigenic determinants and immune regulation.* Basel: Karger. 1989;101-125.
33. Kuchroo VK, Martin CA, Greer JM, Ju ST, Sobel RA, Dorf ME. Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipd protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1993;151:4371.
34. Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA. Surface expression of α4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med* 1993;177:57.
35. Ruddle NH, Bergman CM, McGrath KM, et al. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 1990;172:1193.
36. Selmaj K, Paplerz W, Glabinski A, Kohno T. Prevention of chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis by soluble tumor necrosis factor receptor. *J Neuroimmunol* 1995;56:135.
37. Leonard JP, Waldburger KE, Goldman SJ. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J Exp Med* 1995; 181:381.
38. Segal BM, Dwyer BK, Shevach EM. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls suceptibility to autoimmune disease. *J Exp Med* 1998; 187:537.
39. Chou FCH, Chou CHJ, Fritz R, Kibler R. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats with peptide 68-88 of guinea pig myelin basic protein. *Ann Neurol* 1980:7:336.
40. Swierkosz J, Swanborg R. Suppressor cell control of unresponsiveness to experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1975;115:631.
41. Acha-Orbea H, Mitchell DJ, Timmerman L, et al. Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocyte mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell* 1988;54:263.
42. Rocken M, Urban JF, Shevach EM. Infection breaks T-cell tolerance. *Nature* 1992;359:79.
43. Brocke S, Gaur A, Piercy C, et al. Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature* 1993; 365:642.
44. Goverman J, Woods A, Larson L, Weiner LP, Hood L, Zaller DM. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop sponta-

neous autoimmunity. *Cell* 1993;72:551.
45. Lafaille JJ, Nagashima K, Katsuki M, Tonegawa S. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell* 1994:78:399.
46. Saoudi A, Seddon B, Heath V, Fowell D, Mason D. The physiological role of regulatory T cells in the prevention of autoimmunity: the function of the thymus in the generation of the regulatory T cell subset. *Immunol Rev* 1996149:195.
47. Fowell D, McKnight AJ, Powrie F, Dyke R, Mason D. Subsets of CD4⁻ T cells and their roles in the induction and prevention of autoimmunity. *Immunol Rev* 1991;123:37.
48. Fowell D, Mason D. Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4⁻ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J Exp Med* 1993;177:627.
49. Penhale WJ, Farmer A, Irvine WJ. Thyroiditis in T cell-dpeleted rats. Influence of strain, radiation dose, adjuvants and antilymphocyte serum. *Clin Exp Immunol* 1975:21:362.
50. Greiner DL, Handler ES, Nakano K, Mordes JP, Rossini AA. Absence of the RT-6 T cell subset in diabetes-prone BB/W rats. *J Immunol* 1986;136:148.
51. Saoudi A, Seddon B, Fowell D, Mason D. The thymus contains a high frequency of cells that prevent autoimmune diabetes on transfer into prediabetic recipients. *J Exp Med* 1996;184:2393.
52. Sakaguchi S, Sakaguchi N. Thymus, T cells, and autoimmunity: various causes but a common mechanism of autoimmune disease. In: Coutinho A, Kazatchkine MD, eds. *Autoimmunity: physiology and disease*. New York: Wiley-Liss, 1994:203–227.
53. Gleeson PA, Toh B-H, van Driel IR. Organ-specific autoimmunity induced by lymphopenia. *Immunol Rev* 1996;149:97.
54. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151.
55. Sakaguchi S, Toda M, Asano M, Itoh M, Morse SS, Sakaguchi N. T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *J Autoimmun* 1996;9:211.
56. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998;160:1212–1218.
57. Lafaille JJ, Van de Keere F, Hsu AL, et al. Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. *J Exp Med* 1997;186:307.
58. Boitard C, Yasunami R, Dardeene M, Bach JF. T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in nod mice. *J Exp Med* 1989;169:1669.
59. Shimada A, Charlton B, Rohane P, Taylor-Edwards C, Fathman CG. Immune regulation in type 1 diabetes. *J Autoimmun* 1996;9:263.
60. Pankewycz O, Strom TB, Rubin-Kelley VE. Islet-infiltrating T cell clones from non-obese diabetic mice that promote or prevent accelerated onset diabetes. *Eur J Immunol* 1991;21:873.
61. Diaz-Gallo C, Moscovitch-Lopatin M, Strom TB, Kelley VR. An anergic, islet-infiltrating T-cell clone that blocks interleukin 2/interleukin 4-dependent proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:8656.
62. Akhtar I, Gold JP, Pan L-Y, et al. CD4⁻ β islet cell-reactive T cell clones that suppress autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1995;182:87.
63. Shevach EM, Thornton A, Suri-Payer E. T lymphocyte mediated control of autoimmunity. *Ciba Found Symp* 1998;(*in press*).
64. Eisenstein EM, Sneller MC. Common variable immunodeficiency; diagnosis and managment. *Ann Allergy* 1994;73:285.
65. Strober W, Neurath MF. Immunologic diseases of the gastrointestinal tract. In: Rich R, ed. *Clinical immunology: principles and practice*. St. Louis: Mosby-Year Book, 1996:1401–1428.
66. Sartour RB, Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 1994:106:533.
67. Sadlack B, Merz H, Schorie H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993;75:253.
68. Strober W, Kelsall B, Fuss I, et al. Reciprocal IFN-γ and TGF-β responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* 1997;18:61.
69. Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 1993;75:275.
70. Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, et al. Normal luminal bacteria, especially bacteroides species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human β2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 1996;98:945.
71. Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, Liggitt D, Watson JD. CD4⁺ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1993;178:237.
72. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in *scid* mice reconstituted with CD45RB^{hi} CD4⁺ T cells. *Immunity* 1994;1:553.
73. Powrie F. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity* 1995;3:171.
74. Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. A critical role for transforming growth factor-β but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB^{low} CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1996;183:2669.
75. Kulkarni AB, Huh C-G, Becker D, et al. Transforming growth factor β_1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:770.
76. Hollander GA, Simpson SJ, Mizoguchi E, et al. Severe colitis in mice with aberrant thymic selection. *Immunity* 1995;3:27.
77. Simpson SJ, Hollander GA, Mizoguchi E, et al. Expression of pro-inflammatory cytokines by TCRαβ⁻ and TCRγδ⁺ T cells in an experimental model of colitis. *Eur J Immunol* 1997;27:17.
78. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Presky DH, Waegell W, Strober W. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-β-mediated oral tolerance. *J Exp Med* 1996;183:2605.
79. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogaate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995;182: 1281.
80. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263.
81. Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4⁺ TH1-like responses. *J Clin Invest* 1996;98:1010.
82. Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, et al. Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in $G\alpha_{i2}$-deficient mice. *Nature* Genetics 1995;10:143.
83. von Herrath MG, Evans CF, Horwitz MS, Oldstone MBA. Using transgenic mouse models to dissect the pathogenesis of virus-induced autoimmune disorders of the islets of Langerhans and the central nervous system. *Immunol Rev* 1996;152:111.
84. Wekerle H, Bradl M, Linington C, Kaab G, Kojima K. The shaping of the brain-specific T lymphocyte repertoire in the thymus. *Immunol Rev* 1996:149:231.
85. Miller JFAP, Heath WR. Self-ignorance in the peripheral T-cell pool. *Immunol Rev* 1993:133:131.
86. Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, et al. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 1991;65:305.
87. Aichele P, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM. Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. *Immunol Rev* 1996;152:21.
88. Von Herrath MG, Dockter J, Oldstone MBA. How virus induces a rapid or slow onset insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model. *Immunity* 1994; 1:231.
89. Morgan DJ, Liblau R, Scott B, et al. CD8⁺ T cell-mediated spontaneous diabetes in neonatal mice. *J Immunol* 1996;157:978.
90. Oldstone MBA. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 1987;50:819.
91. Hall R. Molecular mimicry. *Adv Parasitol* 1994:34:81.
92. Fujinami RS, Oldstone MBA. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 1985;230:1043.
93. Burroughs AK, Butler P, Stemberg MJE, Baum H. Molecular mimicry in liver disease. *Nature* 1992;358:377.
94. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80:695.
95. Evans CF, Horwitz MS, Hobbs MV, Oldstone MBA. Viral infection of transgenic mice expressing a viral protein in oligodendrocytes leads to chronic central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med* 1996;184:2371.
96. Sercarz EE, Lehmann PV, Ametani A, Benichou G, Miller A, Moudagil K. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:729.
97. Lehmann PV, Sercarz EE, Forsthuber T, Dayan CM, Gammon G. Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire. *Immunol Today* 1993;14:203.
98. Roth R, Gee RJ, Mamula M. B lymphocytes as autoantigen-presenting cells in the amplification of autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 1997;815:88.
99. Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 1992;358:155.
100. Yu M, Johnson JM, Tuohy VK. A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J Exp Med* 1996;183:1777.
101. McRae BL, Vanderlugt CL, Dal Canto MC, Miller SD. Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 1995;182:75.
102. Tuohy VK, Yu M, Weinstock-Guttman B, Kinkel RP. Diversity and plasticity of self recognition during the development of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 1997; 99:1682.
103. Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 1995;16:35.
104. Goldman M, Druet P, Gleichmann E. TH2 cells in systemic autoimmunity: insights from allogeneic diseases and chemically-induced autoimmunity. *Immunol Today* 1991;12:223.
105. Kennedy MK, Torrance DS, Picha KS, Mohler KM. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that *IL-10 mRNA expression correlates with recovery*.

J Immunol 1992;149:2496.
106. Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor β, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med* 1992;176:1355.
107. Racke MK, Bonomo A, Scott DE, et al. Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. *J Exp Med* 1994;180:1961.
108. Rott O, Fleischer B, Cash E. Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur J Immunol* 1994;24:1434.
109. Cash E, Minty A, Ferrara P, Caput D, Fradelizi D, Rott O. Macrophage-inactivating IL-13 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *J Immunol* 1994;153:4258.
110. Falcone M, Bloom BR. A T helper cell 2 (Th2) immune response against non-self antigens modifies the cytokine profile of autoimmune T cells and protects against experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 1997;185:901.
111. Saoudi A, Simmonds S, Huitinga I, Mason D. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats by targeting autoantigen to B cells: evidence that the protective mechanism depends on changes in the cytokine response and migratory properties of the autoantigen-specific T cells. *J Exp Med* 1995;182: 335.
112. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J-I, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;265:1237.
113. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 development pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995;80:707.
114. Khoruts A, Miller SD, Jenkins MK. Neuroantigen-specific Th2 cells are inefficient suppressors of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by effector Th1 cells. *J Immunol* 1995;155:5011.
115. Harrison LC, Honetman MC, DeAipuzurua HJ, et al. Inverse relation between humoral and cellular immunity to glutamine acid decarboxylase in subjects at risk of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1993;341:1365.
116. Debray-Sachs M, Carnaud C, Boitard C, et al. Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody of IFNγ. *J Autoimmun* 1991;4:237.
117. Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, et al. Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1993;178:87.
118. Scott B, Liblau R, Degermann S, et al. A role for non-MHC genetic polymorphism in susceptibility to spontaneous autoimmunity. *Immunity* 1994;1:73.
119. Singer SM, Tisch R, Yang XD, McDevitt HO. An Ab^d transgene prevents diabetes in nonobese diabetic mice by inducing regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9566.
120. Singer SM, Umetsu DT, McDevitt HO. High copy number I-Ab transgenes induce production of IgE throughan interleukin 4-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2947.
121. Katz JD, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 1995;268:1185.
122. Pakala SV, Kurrer MO, Katz JD. T helper 2 (Th2) T cells induce acute pancreatitis and diabetes in immune-compromised nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 1997;186:299.
123. Genain CP, Abel K, Belmar N, et al. Late complications of immune deviation therapy in a nonhuman primate. *Science* 1996;274:2054.
124. Rocken M, Shevach EM. Immune deviation—the third dimension of nondeletional T cell tolerance. *Immunol Rev* 1996;149:175.
125. Allison J, Malcom L, Chosich N, Miller JFAP. Inflammation but not autoimmunity occurs in transgenic mice expressing constitutive levels of interleukin-2 in islet beta-cells. *Eur J Immunol* 1992;22:1115.
126. Heath WR, Allison J, Hoffmann MW, et al. Autoimmune diabetes as a consequence of locally produced interleukin-2. *Nature* 1992;359:547.
127. Sarvetnick N, Liggitt D, Pitts SL, Hansen SE, Stewart TA. Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon gamma. *Cell* 1988;52:773.
128. Lee MS, von Herrath MG, Reiser H, Oldstone MBA, Sarvetnick N. Sensitization to self (virus) antigen by in situ expression of murine interferon-γ. *J Clin Invest* 1995;95:486.
129. Gu D, Wogensen L, Calcutt NA, et al. Myasthenia gravis-like syndrome induced by expression of interferon γ in the neuromuscular junction. *J Exp Med* 1995; 181:547.
130. Barrett SP, van Driel IR, Tan SS, Alderuccio F, Toh BH, Gleeson PA. Expression of a gastric autoantigen in pancreatic islets results in non-destructive insulitis after neonatal thymectomy. *Eur J Immunol* 1995;25:2686.
131. Yang XD, Tisch R, Singer S, et al. Effect of tumor necrosis factor α on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the dibetogenic process. *J Exp Med* 1994;180:995.
132. Higuchi Y, Herrera P, Muniese P, et al. Expression of a tumor necrosis factor α transgene in murine pancreatic β cells results in severe and permanent insulitis without evolution towards diabetes. *J Exp Med* 1992;176:1719.
133. Grewal IS, Grewal KD, Wong FS, Picarella DE, Janeway CA Jr, Flavell RA. Local expression of transgene encoded TNFα in islets prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice by preventing the development of auto-reactive islet-specific T cells. *J Exp Med* 1996;184:1963.
134. Grewal IS, Flavell RA. New insights into insulin dependent diabetes mellitus from studies with transgenic mouse models. *Lab Invest* 1997;76:3.
135. Mueller R, Krahl T, Sarvetnick N. Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 1996;184:1093.
136. Mueller R, Bradley LM, Krahl T, Sarvetnick N. Mechanism underlying counter-regulation of autoimmune diabetes by IL-4. *Immunity* 1997;7:411.
137. Wogensen L, Lee M-S, Sarvetnick N. Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of β cells in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1994;179:1379.
138. Mathisen PM, Yu M, Johnson JM, Drazba JA, Tuohy VK. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with genetically modified memory T cells. *J Exp Med* 1997;186:159.
139. Shaw MK, Lorens JB, Dhawan A, et al. Local delivery of interleukin 4 by retrovirus-transduced T lymphocytes ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 1997;185:1711.
140. Hogaboam CM, Vallance BA, Kumar A, et al. Therapeutic effects of interleukin-4 gene transfer in experimental inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1997; 100:2766.
141. Hultgren B, Huang X, Dybdal N, Stewart TA. Genetic absence of γ-interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes* 1996;45:812.
142. von Herrath MG, Oldstone MBA. Interferon-γ is essential for destruction of β cells and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1997; 185:531.
143. Billiau A, Heremans H, Vandekerckhove F, et al. Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFNγ. *J Immunol* 1988; 140:1506.
144. Krakowski M, Owens T. Interferon-γ confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1996;26:1641.
145. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, et al. Mice with a disrupted IFNγ gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 1996;156:5.
146. Willenborg DO, Fordham S, Bernard CCA, Cowden WB, Ramshaw IA. IFN-γ plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1996;157:3223.
147. Frei K, Eugster H-P, Bopst M, Constantinescu CS, Lavi E, Fontana A. Tumor necrosis factor α and lymphotoxin α are not required for induction of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 1997;185:2177.
148. Steinman L. Some misconceptions about understanding autoimmunity through experiments with knockouts. *J Exp Med* 1997;185:2039.
149. Suen WE, Bergman CM, Hjelmstrom P, Ruddle NH. A critical role for lymphotoxin in experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 1997;186:1233.
150. Liu J, Marino MW, Wong G, et al. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Med* 1998;4:78.
151. Kagi D, Odermatt B, Ohashi PS, Zinkernagel RM, Hengartner H. Development of insulitis without diabetes in transgenic mice lacking perforin-dependent cytotoxicity. *J Exp Med* 1996;183:2143.
152. Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, et al. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* 1997;89:17.
153. Sabelko KA, Kelly KA Nahm MH, Cross AH, Russell JH. Fas and Fas ligand enhance the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis, but are not essential for immune privilege in the central nervous system. *J Immunol* 1997; 159:3096.
154. Waldner H, Sobel RA, Howard E, Kuchroo VK. Fas- and FasL-deficient mice are resistant to induction of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1997;159: 3100.
155. Harlan DM, Abe R, Lee KP, June CH. Short analytical review. Potential roles of the B7 and CD28 receptor families in autoimmunity and immune evasion. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;75:99.
156. Guerder S, Meyerhoff J, Flavell R. The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen. *Immunity* 1994;1:155.
157. Picarella DE, Kratz A, Li C-B, Ruddle NH, Flavell RA. Transgenic tumor necrosis factor (TNF)-α production in pancreatic islets leads to insulitis, not diabetes. *J Immunol* 1993;150:4136.
158. Guerder S, Picarella DE, Linsley PS, Flavell RA. Costimulator B7-1 confers antigen-presenting-cell function to parenchymal tissue and in conjunction with tumor necrosis factor α leads to autoimmunity in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5138.
159. von Herrath MG, Guerder S, Lewicki H, Flavell RA, Oldstone MBA. Coexpression of B7-1 and viral ("self") transgenes in pancreatic β cells can break peripheral ignorance and lead to spontaneous autoimmune diabetes. *Immunity* 1995: 3:727.
160. Chambers CA, Krummel MF, Boitel B, et al. The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses. *Immunol Rev* 1996;153:27.
161. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995;3:541.

162. Perez VL, Parijs LV, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 1997;6:411.
163. Van Parijs L, Perez VL, Biuckians A, Maki RG, London CA, Abbas AK. Role of interleukin 12 and costimulators in T cell anergy in vivo. *J Exp Med* 1997;186: 1119.
164. Cross AH, Girard TJ, Giacoletto KS, et al. Long-term inhibition of murine experimental autoimmune encephalomyelitis using CTLA-4-Fc supports a key role for CD28 costimulation. *J Clin Invest* 1995;95:2783.
165. Perrin PJ, Scott D, Quigley L, et al. Role of B7: CD28/CTLA-4 in the induction of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1995; 154:1481.
166. Racke MK, Scott DE, Quigley L, et al. Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis. *J Clin Invest* 1995;96:2195.
167. Khoury SJ, Akalin E, Chandraker A, et al. CD28-B7 costimulatory blockade by CTLA41g prevents actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits Th1 but spares the Th2 cytokines in the central nervous system. *J Immunol* 1995;155:4521.
168. Arima T, Rehman A, Hickey WF, Flye MW. Inhibition by CTLA4lg of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1996;156:4916.
169. Miller SD, Vanderlugt CL, Lenschow DJ, et al. Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity* 1995;3:739.
170. Lenschow DJ, Ho SC, Sattar H, et al. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med* 21995;181:1145.
171. Lenschow DJ, Herold KC, Rhee L, et al. CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity* 1996;5:285.
172. Perrin PJ, Maldonado JH, Davis TA, June CH, Racke MK. CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1996;157:1333.
173. Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Walunas TL, Miller SD, Bluestone JA. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med* 1996;184:783.
174. Windhagen A, Newcombe J, Dangond F, et al. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 1995;182:1985.
175. Liblau R, Tisch R, Bercovici N, McDevitt HO. Systemic antigen in the treatment of T-cell-mediated autoimmune diseases. *Immunol Today* 1997;18:599.
176. Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, et al. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulitis characterized by diminished intraislet interferon-γ transcription. *J Clin Invest* 1995:95:628.
177. Karounos DG, Bryson JS, Cohen DA. Metabolically inactive insulin analog prevents type I diabetes in prediabetic NOD mice. *J Clin Invest* 1997;100:1344.
178. Critchfield JM, Racke MK, Zuniga-Pflucker JC, et al. T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;263:1139.
179. Burstein HJ, Abbas AK. *In vivo* role of interleukin 4 in T cell tolerance induced by aqueous protein antigen. *J Exp Med* 1993;177:457.
180. Wraith DC, Smilek DE, Mitchell DJ, Steinman L, McDevitt HO. Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide-mediated immunotherapy. *Cell* 1989;59:247.
181. Gautam AM, Pearson CI, Smilek DE, Steinman L, McDevitt HO. A polyalanine peptide with only five native myelin basic protein residues induces autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 1992;176:605.
182. Gautam AM, Pearson CI, Sinha AA, Smilek DE, Steinman L, McDevitt HO. Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by a nonimmunogenic non-self peptide that binds to I-A. *J Immunol* 1992;148:3049.
183. Lamont AG, Sette A, Fujinami R, Colon SM, Miles C, Grey HM. Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis induction of SJL/J mice by using a peptide with high affinity for IA molecules. *J Immunol* 1990;145:1687.
184. Hurtenbach U, Lier E, Adorini L, Nagy ZA. Prevention of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice by treatment with a class II major histocompatibility complex-blocking peptide. *J Exp Med* 1993;177:1499.
185. Vaysburd M, Lock C, McDevitt H. Prevention of insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by immunogenic but not by tolerated peptides. *J Exp Med* 1995;182:897.
186. Kersh GJ, Allen PM. Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. *Nature* 1996;380:495.
187. Franco A, Southwood S, Arrhenius T, et al. T cell receptor antagonist peptides are highly effective inhibitors of experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1994;24:940.
188. Karin N, Mitchell DJ, Brocke S, Ling N, Steinman L. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis by a soluble peptide variant of a myelin basic protein epitope: T cell receptor antagonism and reduction of interferon γ and tumor necrosis factor α production. *J Exp Med* 1994;180:2227.
189. Liu GY, Wraith DC. Affinity for class II MHC determines the extent to which soluble peptides tolerize autoreactive T cells in naive and primed adult mice—implications for autoimmunity. *Int Immunol* 1995;7:1255.
190. Pearson CI, van Eqijk W, McDevitt HO. Induction of apoptosis and T helper 2 (Th2) responses correlates with peptide affinity for the major histocompatibility complex in self-reactive T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1997:185: 583.
191. Nicholson LB, Greer JM, Sobel RA, Lees MB, Kuchroo VK. An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 1995;3:397.
192. Kuchroo VK, Greer JM, Kaul D, et al. A single TCR antagonist peptide inhibits experimental allergic encephalomyelitis mediated by a diverse T cell repertoire. *J Immunol* 1994;153:3326.
193. Nicholson LB, Murtaza A, Hafler BP, Sette A, Kuchroo VK. A T cell receptor antagonist peptide induces T cells that mediate bystander suppression and prevent autoimmune encephalomyelitis induced with multiple myelin antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9279.
194. Brocke S, Gijbels K, Allegretta M, et al. Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature* 1996; 379:343.
195. Windhagen A, Scholz C, Hollsberg P, Fukaura H, Sette A, Hafler DA. Modulation of cytokine patterns of human autoreactive T cell clones by a single amino acid substitution of their peptide ligand. *Immunity* 1995;2:373.
196. Racke MK, Dhib-Jalbut S, Cannella B, Albert PS, Raine CS, McFarlin DE. Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-β_1. *J Immunol* 1991;146: 3012.
197. Santambrogio L, Hochwald GM, Saxena B, et al. Studies on the mechanisms by which transforming growth factor-β (TGF-β) protects against allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1993;151:1116.
198. Ben-Nun, A, Wekerle H, Cohen IR. Vaccination against autoimmune encephalomyelitis using attenuated cells of a T lymphocyte line reactive against myelin basic protein. *Nature* 1981;292:60.
199. Howell MD, Winters ST, Olee T, Powell HC, Carlo DJ, Brostoff SW. Vaccination against experimental allergic encephalomyelitis with T cell receptor peptides. *Science* 1989;246:668.
200. Vandenbark AA, Hashim G, Offner H. Immunization with a synthetic T-cell receptor V-region peptide protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature* 1989;341:541.
201. Offner H, Hashim G, Vandenbark A. T cell receptor peptide therapy triggers autoregulation of experimental encephalomyelitis. *Science* 1991;251:430.
202. Kumar V, Sercarz E. The involvement of T cell receptor peptide-specific regulatory CD4+ T cells in recovery from antigen-induced autoimmune disease. *J Exp Med* 1993;178:909.
203. Kumar V, Stellrecht K, Sercarz E. Inactivation of T cell receptor peptide-specific CD4 regulatory T cells induces chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Exp Med* 1996;184:1609.
204. Jiang H, Zhang S, Pernis B. Role of $CD8^+$ T cells in experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 1992;256:1213.
205. Kumar V, Aziz F, Sercarz E, Miller A. Regulatory T cells specific for the same framework 3 region of the Vβ8.2 chain are involved in the control of collagen II-induced arthritis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 1997;185:1725.
206. Desquenne-Clark L, Esch TR, Otvos L. Heber-Katz E. T-cell receptor peptide immunization leads to enhanced and chronic experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7219.
207. Olive J. T cell receptor usage in autoimmune disease. *Immunol Cell Biol* 1995; 73:297.
208. Weiner HL, Friedman A, Miller A, et al. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol* 1994;12:809.
209. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today* 1997;18:335.
210. Friedman A, Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:6688.
211. Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both *in vitro* and *in vivo* immune responses by the release of transforming growth factor β after antigen-specific triggering. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:421.
212. Miller A, Lider O, Weiner HL. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med* 1991;174:791.
213. Al-Sabbagh A, Miller A, Santos LMB, Weiner HL. Antigen-driven tissue-specific suppression following oral tolerance: orally administered myelin basic protein suppresses proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in the SJL mice. *Eur J Immunol* 1994;24:2104.
214. Becker KJ, McCarron RM, Ruetzler C, et al. Immunologic tolerance to myelin basic protein decreases stroke size after transient focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10873.
215. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A $CD4^+$ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737.
216. Von Herrath MG, Dyrberg T, Oldstone MBA. Oral insulin treatment suppresses virus-induced antigen-specific destruction of β cells and prevents autoimmune diabetes in transgenic mice. *J Clin Invest* 1996;98:1324.
217. Chen Y, Inobe J-I, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 1995;376:177.
218. Chen Y, Inobe J-I, Kuchroo VK, Baron JL, Janeway CA, Weiner HL. Oral toler-

ance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice: suppression of autoimmune encephalomyelitis and dose-dependent induction of regulatory cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:388.
219. Zhang ZJ, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10252.
220. Hancock WW, Polanski M, Zhang J, Blogg N, Weiner HL. Suppression of insulitis in non-obese diabetic (NOD) mice by oral insulin administration is associated with selective expression of interleukin-4 and-10, transforming growth factor-β, and prostaglandin-E. *Am J Pathol* 1995;147:1193.
221. Tian J, Atkinson MA, Clare-Salzler M, et al. Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med* 1996;183:1561.
222. Daniel D, Wegmann DR. Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:956.
223. Khare SD, Krco CJ, Griffiths MM, Luthra HS, David CS. Oral administration of an immunodominant human collagen peptide moldulates collagen-induced arthritis. *J Immunol* 1995;155:3653.
224. Haque MA, Yoshino S, Inada S, Nomaguchi H, Tokunaga O, Kohashi O. Suppression of adjuvant arthritis in rats by induction of oral tolerance to mycobacterial 65-kDa heat shock protein. *Eur J Immunol* 1996;26:2650.
225. Whitcup SM, Nussenblatt RB. Immunologic mechanisms of uveitis. New targets for immunomodulation. *Arch Ophthalmol* 1997;115:520.
226. Iian Y, Prakash R, Davidson A, et al. Oral tolerization to adenoviral antigens permits long-term gene expression using recombinant adenoviral vectors. *J Clin Invest* 1997;99:1098.
227. Karpus WJ, Kennedy KJ, Smith WS, Miller SD. Inhibition of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice by feeding the immunodominant PLP139-151 peptide. *J Neurosci Res* 1996;45:410.
228. Blanas E, Carbone FR, Allison J, Miller JFAP, Heath WR. Induction of autoimmune diabetes by oral administration of autoantigen. *Science* 1996;274:1707.
229. Husby S, Mestecky J, Moldoveanu Z, Holland S, Elson CO. Oral tolerance in humans. T but not B cell tolerance after antigen feeding. *J Immunol* 1994;152:4663.
230. Weiner HL, Mackin GA, Matsui M, et al. Double-blind pilot trial of oral tolerization with myelin antigens in multiple sclerosis. *Science* 1993;259:1321.
231. Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-β1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1996;98:70.

第35章 超敏反应

Stephen J. Galli and Chris S. Lantz[1]

本章的目的是对过敏反应进行全面的阐述,特别要讨论 IgE 相关的过敏反应性疾病发生的免疫学机制。 *1127* 许多有关过敏反应的问题,如 T 细胞、B 细胞和抗原呈递细胞(APC)的生物学以及特定过敏反应性疾病的临床特征等,已在本书其余章节或更偏重临床的教科书中有详细叙述;这些在本章只是有选择地加以介绍,以提供有关 IgE 相关过敏反应疾病的发展及表现的一般知识。其他对我们了解过敏反应十分重要但在本书其余章节未予详述的问题,如肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞的生物学、高亲和力 IgE 受体的结构和

[1] S. J. Galli: Department of Pathology, Harvard Medical School; Division of Expenrimental Pathology, Beth Israel Deaconess Medical Cedical Center, Boston, Massachusetts 02215. C. S. Lantz: Department of Pathology, Harvard Medical School and Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, Massachusetts 02215.

功能以及过敏反应介质的生物化学功能，将更详细地叙述。

由于变态反应一词现在的意义与其最初的定义有很大不同，我们从变态反应一词的起源及随后应用中的改变开始介绍。

引言及历史回顾

变态反应最一般的定义是对抗原刺激改变了的反应[1]。事实上，von Pirquet 被认为是变态反应一词的最早使用者，他意图用此词指对抗原刺激反应性的各种改变，不论是导致对宿主的保护性反应（即免疫）还是导致相反的临床反应（即超敏反应）[1]。因此，变态反应最早的含义包括免疫系统功能有益的和有害的表现，而免疫应答指保护性反应[1]。 *1128*

然而，现在免疫应答常用于指免疫系统对外来抗原或自身抗原的功能表现，不论反应的结果对宿主是有益还是有害。相反，变态反应现在专指一类有害的免疫反应。而且，与临床一样，现在通常将过敏反应限制为对环境中的抗原（变应原）[1]，如某些食物、药物、花粉等。这些过敏反应有如下特点：①反映了获得性免疫反应的表征，与预先存在特异性抗体和（或）T 细胞有关；②导致一些综合症状如多泪、鼻腔分泌增加及打喷嚏（枯草热）、喘鸣和咳嗽（哮喘）、皮肤发红、瘙痒（荨麻疹）以及对接触性变应原（如常春藤）的反应。因此，虽然外行用过敏这个词更广泛（如孩子们对家庭作业过敏），但对临床人员而言，定义过敏性疾病的必要条件是这些疾病的免疫学基础。

对过敏性疾病和其他超敏反应进行分类的最有生命力的体系是 Coombs 和 Gell[2] 提出的。在这个系统最初的框架中，划分出 4 类超敏反应（或者说对宿主有害的变态反应）：Ⅰ型，现在叫速发型超敏反应，变应原（或抗原）可与用特异性抗体致敏后的细胞（如肥大细胞）作用而导致炎症的释放；Ⅱ型，现在称为细胞毒反应，抗体与细胞表面成分抗原或联合在细胞表面的半抗原相互作用，补体激活与组织损伤有关；Ⅲ型，Arthus 反应和其他的免疫复合物反应，抗体与过量抗原形成免疫复合物而产生毒性（最初认为这类反应中的组织损伤也与补体激活有关）；Ⅳ型，不需抗体的任何作用，致敏 T 细胞与抗体作用。

Coombs 和 Gell 强调，他们的分类主要根据过敏反应的启动机制，而并不是试图对疾病晚期或急性疾病的病理进行分类。他们感觉到某些单一免疫学疾病可能涉及到上述过敏反应的多种类型[2]。然而，后来对这一体系的修饰不仅对 4 类超敏反应进行了有用的亚类分别，而且试图确定一些免疫性疾病作为 4 个主要反应方式的亚类的典型[3]。在表 35.1 所示的体系中，我们保留了 Janeway 和 Travers 对 Coombs 和 Gell 分类的修改，以及 Kay 所做的微小改动[3]，还包含了一些其他有关分类的内容及其与特异性变态性疾病的相关性。 *1129*

表 35.1 对免疫介导的副反应（如“超敏反应”）启动机制 4 种主要类型修改后的 Coombs/Gell 分类

免疫学特异性	Ⅰ型：IgE 抗体（+IgG1 小鼠中）	Ⅱ型：IgG 抗体		Ⅲ型：IgG 抗体	Ⅳ型：T 细胞		
		a	b		a1 Th1 细胞	a2 Th2 细胞	b 细胞裂解 T 细胞
抗原	可溶性抗原“过敏原”	细胞或基质相关抗原	细胞表面受体	可溶性抗原	可溶性抗原	可溶性抗原	细胞相关抗原
效应机制							
	FcεRⅠ或 FcγRⅢ依赖的肥大细胞/嗜碱性粒细胞活化，伴随着介质/细胞因子的释放	补体 FcγR⁺ 专职吞噬细胞，NK 细胞	抗体改变信号转导	FcγR⁺ 细胞[a]，补体	Th1 相关因子（如巨噬细胞）	Th2 相关因子（如嗜酸性粒细胞，嗜碱性粒细胞）	直接细胞溶解
起始结果	快速发生的（几秒到几分钟）介质对靶细胞的效应（通常不涉及直接的细胞毒性）	细胞死亡和（或）组织损伤	由于受体依赖细胞功能增加或降低所致或降低所致的病理学	与中性粒细胞和其他细胞的募集和活化相关的炎症	慢性炎症反应发展慢（几小时至几天），可持续较长时间	慢性炎症	靶细胞死亡

续表

免疫学特异性	Ⅰ型:IgE 抗体（+IgG1 小鼠中）	Ⅱ型:IgG 抗体		Ⅲ型:IgG 抗体	Ⅳ型:T 细胞		
		a	b		a1 Th1 细胞	a2 Th2 细胞	b 细胞裂解 T 细胞
举例和注释	IgE(在小鼠为 IgG1)依赖过敏症(具潜在致死性的全身反应)或被动皮肤过敏症(一局部反应)	某些药物反应及对不容性输血的反应	Graves 病(甲状腺刺激性激动抗体);重症肌无力(乙酰胆碱受体拮抗性抗体)	(包括小鼠中肥大细胞) Arthus 反应和其他免疫过敏炎症)的反应	慢性过敏病理感染反应过敏炎症)和其他免疫复合物介导的反应	慢性过敏性炎症(Ⅰ型反应也参与慢性过敏性炎症	对某些病毒感染的细胞,某种形式的移植排斥反应

[a] 此处对原分类(参考文献[2])的修改融合了一些其他所做修改的特征[3,4]。

[b] 这些是主要的起始结果;强烈的炎症反应(如Ⅲ或Ⅳa1 型)有时能引起反应部位组织损伤和细胞死亡,而广泛的细胞坏死(如Ⅱa 或Ⅳb 型反应中)能诱导炎症反应发展。

在此强调,某些临床疾病也许相对"纯"地呈现出 Coombs 和 Gell 分类中某类的表现,而其他一些疾病的病理会更复杂一些。过敏症是发生在致敏个体的危及生命的全身反应,在暴露于过敏原后几分钟即可发生;这种反应主要是(即使不是全部)特异的效应细胞因 IgE 依赖的激活而释放介质的效果(看 IgE 相关过敏性疾病的性质一节)。过敏症被认为是相对纯粹的Ⅰ型"速发型超敏反应"。而对常春藤毒物的变态反应以及其他一些皮肤接触性超敏反应,被认为是相对纯粹的Ⅳ型 T 细胞依赖的"迟发型超敏反应"。但其他临床结果反对在 Coombs-Gell 体系内对号入座。

考虑到大多数过敏性疾病(以及过敏性疾病的动物模型)的复杂性,我们支持在任何时候都应尽量避免使用这些命名或分类体系,这些体系似乎暗示这些疾病的机制已经确定,而实际上还未能确定。例如,IgE 与 T 细胞或其他效应机制对人类不同的过敏性哮喘的病理特征不同贡献。这种疾病的某些方面也许更依赖于 T 细胞依赖机制,而不是 IgE 依赖机制。另一方面,许多免疫学家和过敏学家坚信,IgE 在许多人类过敏性疾病病理中的重要作用,这很可能是正确的。因此,本章用"IgE 相关的"(而不是用Ⅰ型速发型超敏反应或 IgE 依赖)一词来指实验造成的自发产生的对过敏原的 IgE 抗体占优势的免疫反应。用这个词,我们是想指明,强烈的抗原特异性 IgE 反应是这些免疫反应的一个重要表型特征,但我们无意暗示 IgE 依赖的反应在这些效应中一定是惟一最重要的或是同等重要的病理机制。

表 35.2 关键术语的定义

超敏反应	最初的定义(皮尔盖反应):对抗原刺激的改变了的反应性,可导致保护效应(即免疫)或临床副反应(即超敏反应)。 目前用法:对环境抗原(过敏原,参看下文)的临床副反应,反映了与过敏原特异性抗体和(或)T 细胞相关的获得性免疫反应的表现。常用于特指与过敏的特异性 IgE 产生相关的免疫副反应
过敏原	可以典型地引起特异的 IgE 效应(至少在某些个体中)的抗原。过敏原通常很少或没有内在毒性(膜翅目昆虫的过敏原成分和其他毒素等除外),但由于其引起 IgE 相关免疫反应的能力因而引起病理改变,并且在以后再次刺激时能诱导 IgE 和(或)T 细胞依赖的超敏反应。注意:能引起接触性超敏反应(表 35.1 中的一种 typeⅣa1 反应)通常称作接触性过敏原,尽管它们也许不引起 IgE 效应。
IgE 相关免疫反应	与对某些抗原(过敏原)特异性的 IgE 产生有关且 IgE 介导的反应。(Coombs/Gell 分类中的Ⅰ型或速发型超敏反应,参看表 35.1)在其中发挥作用的一类免疫反应(可以是保护性的,如抗某些寄生虫感染,也可以是临床副反应,如过敏性疾病)。
速发型超敏反应	也可称为急性 IgE 相关过敏反应。是一类在致敏个体接触过敏原后几分钟之内出现的免疫学特异性反应(不管是全身的,还是局部的),它反映了过敏原被结合在效应细胞(主要是肥大细胞和嗜碱性粒细胞)上其特异性受体的 IgE 识别(小鼠中为 IgG1);这导致受体交联,引起效应细胞活化并释放介质,这些介质产生此反应的急性体征和症状。
过敏性疾病	典型的直接针对别的无毒的环境过敏原的 IgE 相关免疫反应,被认为有病理作用的一类临床疾病(如枯草热、过敏性哮喘和特应性皮炎)。这些疾病相关病理的某些方面,如作为过敏性哮喘或特应性皮炎特征的慢性过敏性炎症,可能反映了除 FcεRⅠ[+] 效应细胞外 T 细胞(特别是 Th2 细胞)显著的效应细胞功能。
特异反应性	对常见过敏原产生速发型超敏反应的倾向性,注意:非特应性个体(对常见环境过敏原缺乏皮试反应)对蜇人昆虫的毒素也可出现致命的 IgE 相关反应。

尽管 Coombs 和 Gell 分类的所有 4 类变态反应都是人类疾病的因素(一些例子见表 35.1);然而临床上的大多数过敏患者都苦于 IgE 相关的免疫效应。由于这个原因,再加之对变态反应其他 Coombs-Gell 类别表达

机制的讨论在本书其余章节已有叙述,本章主要集中在 IgE 相关的免疫反应。本章用到的一些关键术语的定义列于表 35.2。

IgE 相关免疫反应(包括 IgE 相关的临床过敏反应)的特征

概述

由寄生虫感染或许多非寄生虫的无毒环境过敏原引起的免疫反应常常与 IgE 高水平产生有关;现在知道这些免疫反应是由抗原特异性 T 辅助 2 (Th2)细胞促发的[7~10]。这些事实支持一个广为接受的观点:不希望有的 IgE 相关免疫反应(即过敏性疾病)是免疫系统接触并对无害的过敏原起反应(好像这些过敏原是从寄生虫来的一样)的不幸结果(图 35.1)。

在寄生虫感染或过敏性疾病病程中,对致敏宿主用过敏原刺激会引起一系列组织反应,这取决于过敏原刺激的途径和剂量,是单次短暂刺激还是持续刺激,是按季节发生(如枯草热)还是其他某种重复方式;组织反应也受到宿主遗传背景和大量非遗传因素(如某些同时感染)的重要影响,它们可以改变宿主对过敏原的反应。

将 IgE 相关免疫反应的效应相分为 3 个时相是有用的:①急性反应相,在接触过敏原后数秒或数分钟内发生;②晚期反应,在接触过敏原后数小时内产生,通常至少是在某些急性反应相效应部分消失之后;③慢性过敏性炎症,可持续数天至数年(图 35.1)。选择合适的实验模型系统,可能复制出急性反应相、晚期反应及慢性过敏性炎症的动物模型,以进行更详细的分析。然而,“自然”致敏(不论致敏是由寄生虫感染或过敏性疾病中获得)的个体对过敏原刺激产生的反应也许是一个非常复杂的组织反应,这反映了急性、晚期和慢性 IgE 相关反应的重叠或顺序出现。IgE 相关免疫的重要共同性列于表 35.3。

表 35.3 人和小鼠 IgE 相关免疫反应的主要特征

1. 反应可由源于寄生虫或各种环境物质(如某些食物和药物、植物花粉、昆虫或哺乳类宠物)的某些组类的抗原组分(即过敏原)引起。
2. 依赖于不同情况,致敏个体对过敏原的反应可导致急性反应(几秒到几分钟内发生),晚期相反应(过敏原刺激后数小时后发生)和(或)慢性过敏性炎症(可持续数天到数年)。
3. Th2 细胞和 Th2 细胞相关的细胞因子在效应的多方面调节中是重要的。Th2 细胞在某些反应,特别是某些晚期相反应和慢性过敏性炎症中,也起着效应细胞的功能。
4. 表达 FcR 的效应细胞活化的免疫学特异性是由 IgE(小鼠中为 IgG1)抗体提供的。
5. 组织肥大细胞,某些情况下还有血液嗜碱性粒细胞,在急性反应中有重要的效应细胞功能,并且可以参与晚期相反应和慢性过敏性炎症。
6. 结合表达在人和小鼠肥大细胞和嗜碱性粒细胞的 FcεRⅠ(IgE 高亲和力受体)是 IgE 在这些反应中表达效应功能的主要机制。注意:人体中(而不是小鼠)FcεRⅠ可在反应中其他有潜在效应功能或免疫调节作用的细胞表达,包括单核细胞/巨噬细胞,循环树突细胞,朗格汉斯细胞和嗜酸性粒细胞。
7. 急性反应反映了源于通常位于组织内的由 IgE/IgG 致敏过的细胞(特别是肥大细胞)的介质作用,而募集到组织内的白细胞在晚期相反应和慢性过敏性炎症中起重要作用。
8. 急性反应不会在受影响组成造成永久的结构改变,而这些变化典型地发生在持续的慢性过敏性炎症部位。
9. 这些反应主要是有害的,特别是由别的本质上无毒的过敏原引起的时候,而在由某些寄生虫引起的反应可以对宿主有益。

人和实验动物 IgE 相关反应的相似之处及差别

许多哺乳动物在 IgE 相关免疫反应研究中的作用已有综述[11~17]。有关人类和其他研究过的动物间 IgE 相关免疫反应特征的详细比较不在本章范围,在此只介绍一些主要之处。每种动物在研究 IgE 相关免疫反应的特定方面都有其优点和不足(研究者也特别喜欢他们所用的实验动物),然而大多数研究者同意:在动物

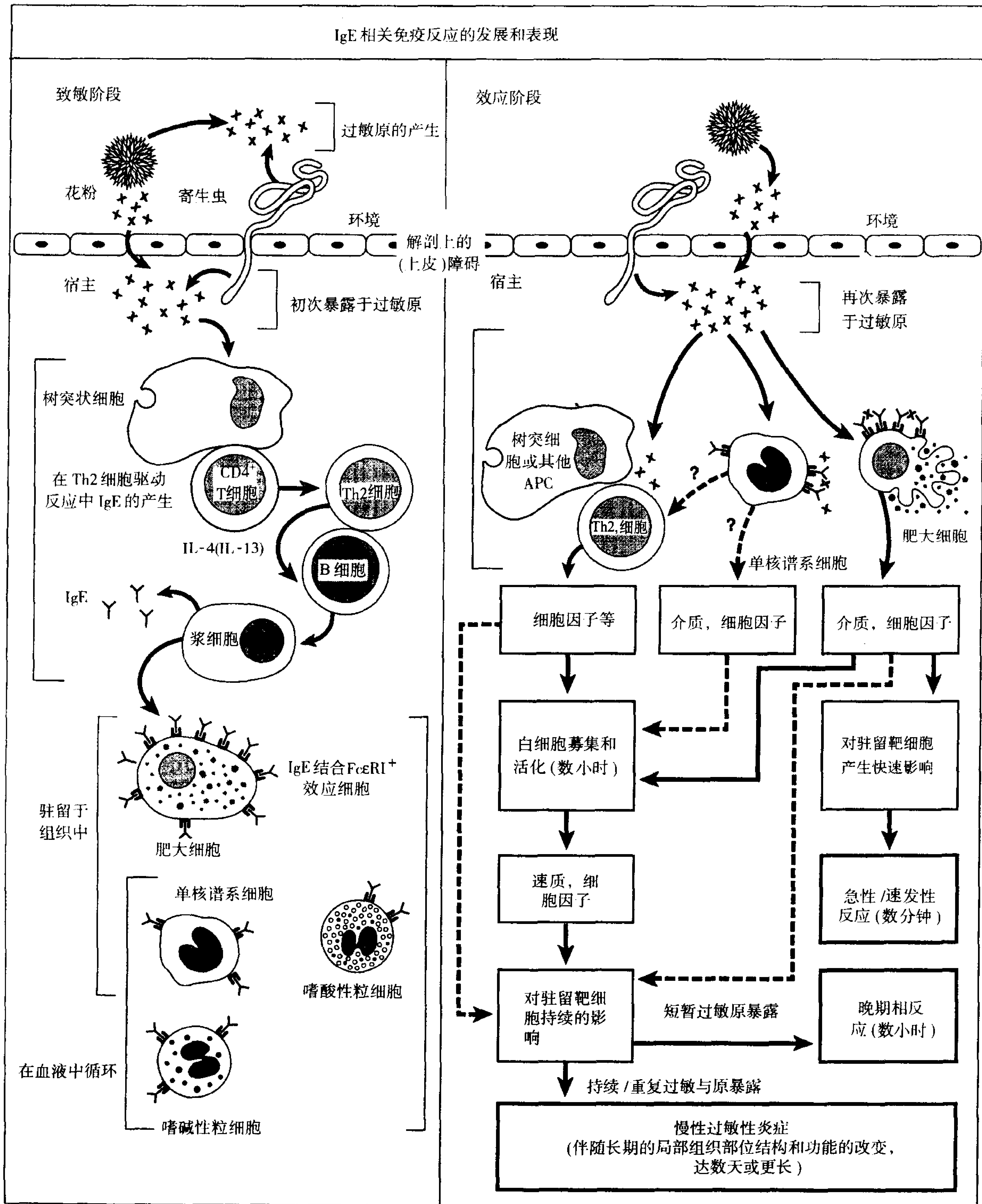


图 35.1 IgE 相关免疫反应如系寄生虫过敏原引起的,以及由其他无毒过敏原(如花粉)引起的发展(致敏相)和表现(效应相)的步骤。虚线表示其生物学重要性尚未明了的潜在相互作用。注意树突细胞,如呼吸道黏膜内的树突状细胞及皮肤内朗格汉斯细胞,可在上皮内出现,图中将它们置于与上皮表面或附近的过敏原相互作用的位置。在 IgE 相关效应的效应相中,肥大细胞与 Th2 细胞对不同背景下的晚期相反应和慢性过敏性炎症的各种特征的贡献度可以不同。目前还不清楚单核细胞谱系的细胞(如巨噬细胞、朗格汉斯细胞或其他树突细胞)除了作为 APC 的功能外,是否也是重要的 IgE 依赖的细胞因子和其他介质的来源。然而,过敏原与结合在这些细胞表面的 IgE 相结合可增强这些细胞的 APC 功能。

上获得的结果是否与人一致最终需在人身上证实。另一方面，也必须承认用动物研究免疫反应的灵活性和重要性。小鼠是一个特别有用的模型，因为可以对其进行广泛的遗传学操作，饲养相对廉价，性成熟时间相对较短，对其免疫系统了解较多。因此，本章主要集中小鼠和人的研究结果。

人和小鼠 IgE 相关免疫反应的共同特征见表 35.3。然而，它们也存在一些显著的差异(见表 35.4)。其中两点需特别强调。

表 35.4　人和小鼠 IgE 相关免疫反应的重要差别

1. 小鼠中，IgE 或 IgG1 能使肥大细胞以发挥过敏原特异的效应功能，而在人类尚未有足够证据表明除 IgE 同种型外有临床重要性的可引起过敏反应的抗体。
2. 在正常小鼠中，FcεRⅠ只表达在肥大细胞和嗜碱性粒细胞，而人体中，$\alpha\gamma_2$ 型 FcεRⅠ表达在许多其他细胞类型，包括单核/巨噬细胞，循环中的树突细胞，朗格汉斯细胞和嗜酸性粒细胞。注意：在小鼠，IgE 相关的免疫应答中，有可能是一些在人体表达 $\alpha\gamma_2$ 型 FcεRⅠ的效应细胞通过过敏原特异的 IgG 抗体和 FcεR 参与引起的。
3. 小鼠的一些 IgE 相关免疫反应与受影响组织内某些肥大细胞类群显著增生有关(如在某些线虫感染时小肠黏膜肥大细胞升高 > 100 倍)；而人体在相应情况下组织肥大细胞数量的改变要少得多。
4. 效应细胞嗜碱性粒细胞在这些反应中在人体比在小鼠中更重要的(这种细胞类群通常在许多品系小鼠血液中非常罕见)。

第一，小鼠中 Th2 细胞驱动的、能致敏肥大细胞和其他 FcεRⅠ$^+$效应细胞以使其在特异过敏原刺激时分泌介质的抗体同种型较人类有更多的冗余性。小鼠 IgG，不仅与 IgE 协同调节，也行使许多与 IgE 相同的功能(参看后面有关 IgE 合成调控一节)。而在人类尚无确凿证据表明有在速发型超敏反应的表达期能代替 IgE 作用 IgG 亚类抗体。在许多研究中必须考虑这一点，例如，IgE 遗传性缺陷表型的小鼠(还可表现出过敏原特异性过敏症反应的诸多特点，包括死亡)[18]，可能并不准确模拟 IgE 缺陷人的表型。

第二，证据显示，人类 FcεRⅠ(高亲和力 IgE Fc 受体)在某些条件下，可在除肥大细胞和嗜碱性粒细胞之外的其他效应细胞表达，包括朗格汉斯细胞血液单核细胞和巨噬细胞、循环中的树突细胞、嗜酸性粒细胞等(参看"IgE 受体"一节)。这些细胞许多只表达 $\alpha\gamma_2$ 型受体。这也许会有不同于肥大细胞和嗜碱性粒细胞上 $\alpha\beta\gamma_2$ 型 FcεRⅠ的功能(参看"IgE 受体"一节)。然而，FcεRⅠ在这些细胞中的表达说明它们也参与人类 IgE 相关免疫反应表达。相反，正常小鼠只在肥大细胞和嗜碱性粒细胞表达 FcεRⅠ($\alpha\beta\gamma_2$ 型)。但小鼠单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和自然杀伤细胞(NK 细胞)表达 FcγRⅢ、FcγRⅢ可结合 IgG1，F_ε 与 FcεRⅠ有着相同的 β 链和 γ 链[19]。这样，在小鼠 Th2 效应(Th2 response)中产生的 IgG1 可允许除肥大细胞和嗜碱性粒细胞外的其他效应细胞参与 IgE 相关免疫反应的表达，而在人类，IgE 本身即能致敏除肥大细胞和嗜碱性粒细胞之外的多种效应细胞，表现其在 IgE 相关免疫反应中的过敏原特异性的功能。

1132

过敏原

过敏原是至少能在部分个体中引起足够强的、可引起 IgE 相关超敏反应临床表现的 IgE 反应的抗原[20,21]。人和动物个体对特异过敏原产生特异 IgE 反应的能力以及反应的强度是遗传决定的(参看"IgE 合成调节"一节)。结果，特定的过敏原并不是在所有个体都是"过敏性的"。然而，有发生强 IgE 反应遗传倾向的人(即特应性人群)对许多不同的过敏原都表现出典型的 IgE 反应。

为什么某些外来抗原是潜在过敏原而其他的不是？遗憾的是，尽管在多种过敏原的克隆、测序及理化鉴定等方面取得了很大进展，但尚无法确定一套简单的"过敏性共同规律"。也许这并不奇怪，因为经黏膜表面小量刺激即可有过敏性的过敏原的(如许多空气中的过敏原或气源性变应原)性质，可能与胃肠外刺激免疫系统的过敏原有很大不同(如注射的抗生素)。前者需能在呈递给免疫系统之前穿越呼吸道黏膜屏障。对后者而言，过敏原的全身分布由健康关爱提供者保证。

1133

另一方面，对过敏原的性质也有些总结，尽管几乎全都有例外。过敏原一般是蛋白质(常是糖蛋白)或能结合到蛋白质上的化合物(半抗原)[21]。这些物质按 1994 年出版的世界卫生组织/国际免疫学联合会过敏原

命名分会的指南命名[22]。其名字是产生过敏原物种所在的属名的前 3 个字母和种名的第 1 个字母(为避免混淆,有的用前 2 个字母),加上 1 个阿拉伯数(表示不同物种来源的结构同源的过敏原)。例如,源于两种黄胡蜂属(*V. vulgaris* 和 *V. vidua*)的过敏原(抗原 5,)分别被命名为 Ves V5 和 Ves Vi5。另外可加最多 4 个数字用于区分特异的同源过敏原或其变异体。例如,来源于短豚草属的 4 种同源过敏原(其中 2 个是第一个过敏原的变异体)被命名为 Amb a 1.01, Amb a 1.0101 和 Amb a 1.0102, Amb a 1.02。

为了临床需要及弄清为什么有的物质具有过敏原性,在鉴定、克隆及过敏原确定方面做了大量努力。高纯度的天然过敏原制品(现在更多的是其基因工程重组蛋白)可用于临床诊断,如确定反应性(或交叉反应性)IgE 的存在[23],进行临床试验(如皮试或气道刺激研究,也可激发特异的 IgE 相关过敏反应以进行实验分析。在某些情况下,这些过敏原制品也用作治疗,以产生脱敏或试图诱导 T 细胞耐受(参看"IgE 相关过敏性疾病的治疗策略"一节)。

对过敏原的研究目前还不能揭示这些物质为什么能诱导 Th2 细胞驱动的 IgE 相关反应。过敏原的抗原片段通过 APC 上的 MHCⅡ类分子被呈递给 T 细胞受体(TCR),这和其他抗原一样[24],DR 限制和 DP 限制的对过敏原的反应都已确定[25]。许多过敏原是酶。现在认为,对酶表现出强烈的 Th2 型反应的能力是迫于选择压力而进化获得的,这有利于产生针对寄生虫的足够强的免疫反应(许多寄生虫成功侵入或借助过宿主组织依赖酶的作用)。但这种反应也可被"无毒"的酶引起,如植物、昆虫和宠物产生的过敏性酶[26~29]。不管是源于寄生虫等病原体酶还是无毒过敏原,它们本身也可能有启动 Th2 型反应发生的能力(不依赖于它们作为抗原的能力),如直接诱导肥大细胞、嗜碱性粒细胞、T 细胞产生 IL-4 或 IL-3,或诱导这些因子的其他产生途径。

两种假说都很有吸引力,但第一种(即过敏原是免疫系统对之当作寄生虫成分而反应的物质)也许难以用实验证实,而第二种(即过敏原本身可直接启动 Th2 型反应)尽管可用严格实验验证,但这一工作还有待进一步验证。过敏性酶要能在不依赖于细胞因子诱导下也可促进过敏性。例如,Derpl 是具蛋白水解活性的室内尘螨过敏原,可促进人 B 细胞释放 CD23[30],如果可溶性 CD23 可显著增强 IgE 反应[31],或者说 CD23 从 B 细胞表面丢失可降低 IgE 产生的负调控信号[32](参看"IgE 受体"),那么 DerP1 至少可部分通过改变 IgE 产生的调控而促进 IgE 相关免疫反应的发展[30]。

但是,许多过敏原没有酶活性[21]。而且,许多过敏原是糖蛋白,有可能这些分子的糖链有利于它们与 APC 细胞上的植物凝集素受体结合而促进 APC 细胞的过敏原摄入[21]。因此,最合理的假说可能是,不同的过敏原也许会通过不同的机制引发 Th2 型 IgE 相关反应。

临床上对过敏原的分类是建立在其特异来源或者是分布规律和(或)空气中的传播等基础之上。如,气源性变应原指空气中的过敏原,典型的是附着空气中的颗粒上的过敏原(如花粉粒,尘螨粪便,动物毛发皮屑等)。这又可进一步分为室内和室外气源性致敏原(前者有尘螨过敏原、蟑螂和家养宠物来源的过敏原,后者有花粉来源的过敏原等)[21]。花粉一般是较小的高度水溶性蛋白(允许其在黏液或其他体液中扩散),并且附着或是直接来源于一些颗粒,这些颗粒有助于过敏原的存活和扩散[20,21]。例如尘螨相关过敏原(其中一些是消化酶,如 Der p1,一个 222 个氨基酸的半胱氨酸蛋白酶[33]),混在螨虫(尘螨属 *pteronyssinus* 和 *D. farinae*)的粪便颗粒中。这些生物以人皮肤表面角蛋白为食,许多因素都可增强它们的生存和繁殖,这些因素常与所谓的社会经济生活的"进步"有关,包括空调房间内温暖及相对湿润的环境和铺满地板的地毯(很难彻底清除螨虫粪便或角蛋白)[20]。而且,Der p1 和其他尘螨过敏原在尘螨粪便颗粒中可长时间地保持活性。这些颗粒也提供了一个运输系统(转运过敏原穿过皮肤或消化道黏膜)。也可能有利于 APC 对过敏原的呈递和加工[20]。

显然,与特定气源性致敏原相关的临床问题的类型是变化着的,虽然这在多大程度上反映了过敏原的性质而不是其刺激途径的差别还不清楚。花粉相关的过敏原一般与过敏性鼻炎(枯草热)的相关性大于哮喘,而针对蟑螂、尘螨和猫来源的过敏原的 IgE 产生却有很大的发生哮喘及枯草热的危险[20,34]。

许多食物都含过敏原成分,但源于花生和其他豆类、坚果、鱼、贝类、甲壳类和软体类动物、牛奶、鸡蛋及

谷类的过敏原是临床上主要的食物过敏原[21,35,36]。这些过敏原大多是10～70kDa的蛋白质,对热变性、酸水解、蛋白水解和消化有相对较好的抗性。然而也有一些重要的例外(如新鲜水果和蔬菜中的许多过敏原是热不稳定的),对食物的过敏反应可以是灾难性的,包括致死的过敏症[35～37]。 *1134*

昆虫毒素含有过敏原(其中许多是酶),能在特应性和非特应性个体诱发IgE相关反应[38,39],膜翅目昆虫(如胡蜂、蜜蜂、大黄蜂等)的毒刺是过敏症的常见病因。这也许反映一个事实:一蜇就可将相对大量的毒素注入皮内和皮下(大约50g)[38]。而且,有些膜翅目相关过敏原是交叉反应性的。幸运的是,用膜翅目毒素过敏原对许多致敏个体进行脱敏的成功率都很高[38,39]。

大多数常规药剂是分子量相对较低的化合物,它们只有在半抗原化与内源性蛋白结合后,才能成为过敏原。青霉素有较大的过敏反应率(在接受青霉素的人中,约3%会产生因IgE所致的负反应[40]),这也许是因为青霉素及其代谢产物都具有很高的化学反应性。而且,青霉素经常经胃肠外给药,这大大升高了IgE相关负反应致死的可能性[41]。确实,自从1949年第一个青霉素诱导的过敏症记录以来,到1972年,75%因过敏症而死亡的记录都是青霉素引起的[42]。蛋白质结合的青霉素本身是主要的过敏原,而它的一些代谢产物(penicilloate和penilloate)虽然只是比较次要的过敏原,却可以在接受青霉素的人中观察到许多危及生命的反应[40]。不过,许多其他药物也与过敏症有关,包括头孢菌素(或称先锋霉素,结构上类似于青霉素,可能与青霉素诱导的IgE有交叉反应。)、磺胺类抗生素以及用作神经肌肉阻断剂的4价的氨化合物[41]。

在此要强调,对药物产生免疫副反应不仅仅限于IgE相关的速发型超敏反应,也包括Coombs-Gell分类中所有的免疫病理反应[2,41](参看表35.1)。

IgE合成的调节

1921年Prausnitz和Küstner[43]表明,将对鱼过敏个体(此例为Küstner本人)的血清因子被动转移给不过敏的个体(Prausnitz)后,本来不过敏的个体也表现出对特异过敏原的过敏性。几十年后,这个血清因子(也称反应素)被确定为一类新的免疫球蛋白[44],通过对人骨髓瘤蛋白IgND的分析也得到认识[45]。这个新的抗体类别被命名为IgE。IgE在所有抗体类别中半衰期最短(2.5天或更少)[46,47],而且在血清中浓度最低,在非特应性个体中通常<100ng/ml[48]。虽然在正常成人和特应性成人个体IgE水平有很大的重叠,在特应性或寄生虫感染的个体中IgE可结合多价过敏原,激活各种效应细胞如肥大细胞和嗜碱性粒细胞,因此直接参与介导许多过敏反应(参看"IgE受体"和"Ig相关免疫反应的效应细胞和介质"部分)。

IgE合成诱导需$CD4^+$ Th细胞分泌的细胞因子(图35.2)。根据它们的功能和产生的细胞因子,这些细胞可分为Th1和Th2两个亚类。Th1细胞是在细胞介导免疫反应中很重要的细胞因子IL-2、INF-γ、TNF-β的主要来源。Th2细胞分泌IL-4、IL-5、IL-6,IL-10和IL-13,这些因子在体液免疫反应中有重要作用,包括IgE相关过敏反应。虽然不是所有的免疫性疾病都可很容易地被分为Th1或Th2细胞介导的,过敏性疾病(以及对许多寄生虫的IgE相关免疫反应)却主要依赖于Th2细胞[9,10]。

虽然受多种因素影响,过敏原诱导的原始Th1和Th2细胞的分化要求在免疫反应早期产生IL-4[50](图35.2)。目前还不知早期产生IL-4的细胞(图2中的细胞X、Y、Z)。虽然很多注意力集中在依赖于体内适宜条件激活能产生大量IL-4的$NK1.1^+$ $CD4^+$ T细胞上,但这些细胞对导致IgE产生的Th2效应并不是必需的[51～55]。早期IL-4的来源也可能是原始$CD4^+$ T细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞[56～58],也可能在不同的IgE相关免疫反应中,调节早期IL-4产生的细胞因子来源不同。

不论早期IL-4是怎么产生的,IgE合成的诱导都要求过敏原特异的B细胞通过膜结合免疫球蛋白受体(BCR)与过敏原结合(图35.2)。然后B细胞内化并加工过敏原,加工过的过敏原与MHCⅡ类分子结合,被呈递给Th2细胞(图35.2)。多肽MHC Ⅱ类复合物被Th2细胞的TCR识别。一旦激活(例如通过与APC或B细胞上的过敏原多肽MHCⅡ复合物相互作用激活),这些T细胞能提供B细胞产生IgE的两个关键信号。第一,激活的Th2细胞开始分泌IgE重链类转换细胞因子IL-4和(或)IL-3(见下文)。此外,B细胞和T细胞的接触

1135

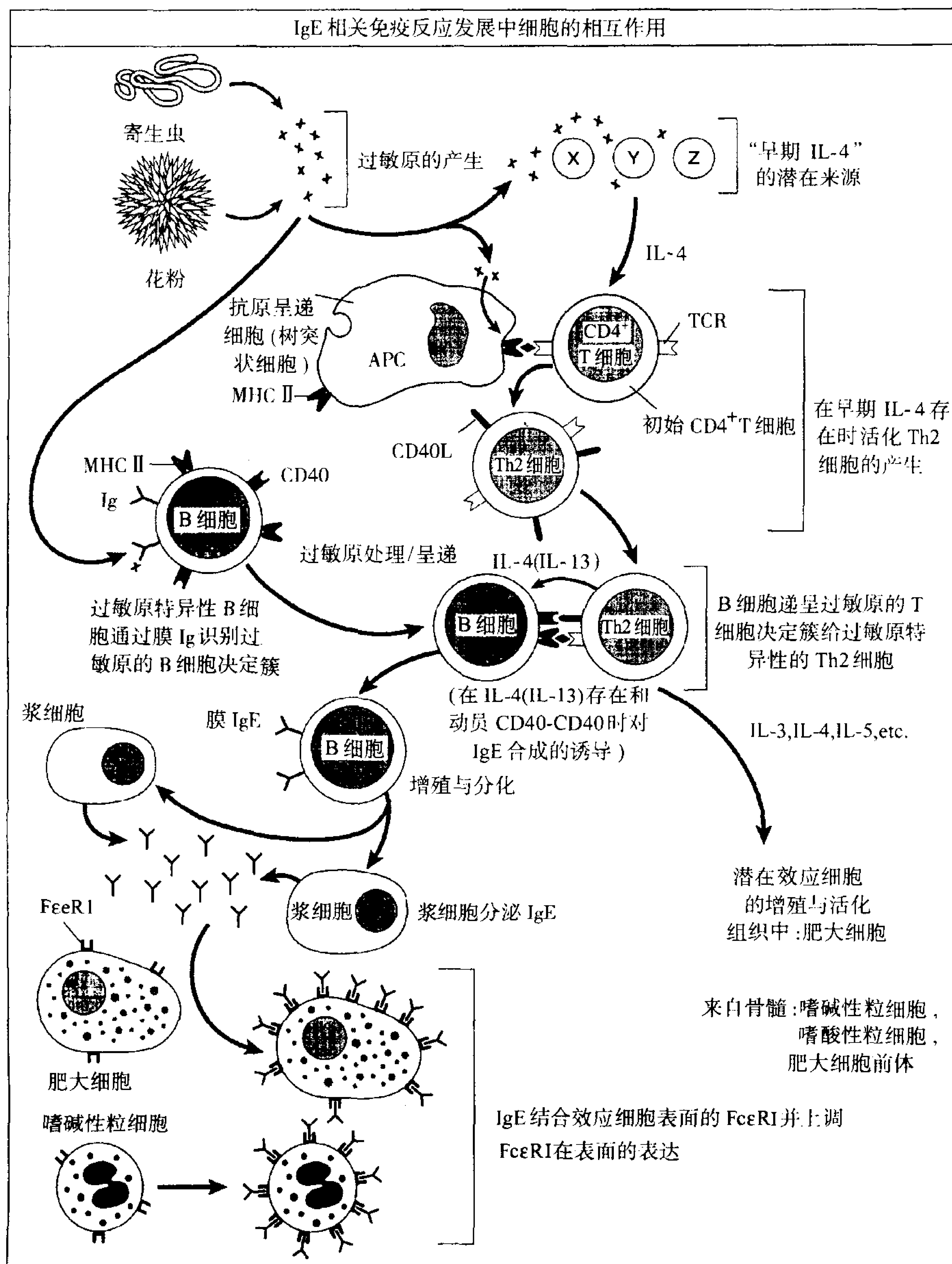


图 35.2 IgE 相关反应致敏相发生中的主要的细胞相互作用。注意,此图系统中早期 IL-4 的细胞来源及诱导这些细胞释放早期 IL-4 的因子还有待确定。树突细胞也很可能在对过敏原的原发性反应中起着最关键的 APC 功能;这些细胞可在上皮表面或附近获得过敏原,然后迁移到局部淋巴组织,在那儿成为成熟的树突细胞,能将多肽 MHC 复合物呈递给初始细胞,并为 T 细胞活化传递共刺激信号。

1136 对 IgE 产生也是必需的,这可以通过 Th2 细胞表面的 CD40 配体(CD40L)与 B 细胞表面 CD40 结合来实现。

B 细胞从 IgM 转至 IgE 是经过一系列缺失形成的。在小鼠 B 细胞,最初是转换至 IgE1,而在人类 B 细胞是转换成 IgG4(第 24 章)。这些特定 IgG 亚类和 IgE 的产生都受相似的调节信号调节,因此它们经常同时高表达。上面提到的 IgE 产生的简化双信号模型受可溶性分子和膜相关分子的精细的正调控和负调控(第 24 章)。例如,最近的研究表明,APC 上的 B7-2 与 T 细胞上的 CD28 的作用可提供 Th2 反应过程中 T 细胞产生 IL-4 的共刺激信号[59]。下面会谈到,IgE 也可在不依赖于 T 细胞和(或)IL-4 时产生,这进一步说明 IgE 产生的复杂性。

据报道，由于 RNA 的选择性剪接可产生几种不同的 IgE 重链。这说明了一种很有意思的可能（然而还未能证实）：不同的 IgE 亚类在体内有不同的功能特征[60]。

IL-4，IL-13 和其他细胞因子对 IgE 合成的调节

最早认识 IL-4 是建立在它能促进 B 细胞生长和 IgG_1 类别转换基础上的[61,62]。IL-4 在 IgE 诱导中的中心作用最早是用 LPS 刺激的小鼠 B 细胞和与激活 T 细胞克隆或其上清共培养的人类 B 细胞获得的[63,67]。最近，用过量表达 IL-4 和在 IL-4 信号传导的不同步骤有缺陷的小鼠，已在体内证实了 IL-4 在 IgE 诱导中的作用。IL-4 转基因小鼠有很高的血清 IgE 水平，发生类似过敏的皮肤疾病[68]，而用抗 IL-4 或 IL-4 受体抗体处理小鼠，其多克隆和抗原特异性的 IgE 反应都被严重破坏[69,70]。类似的，IL-4 基因敲除小鼠在用线虫（巴西日本圆线虫）感染时不能检测到 IgE 合成[71,72]。虽然绝大多数 IgE 合成都需要 IL-4，但在某些情况下，小鼠也可发生 IL-4 非依赖的 IgE 类别转换。例如，当用硕大利什曼原虫，夏氏鼠疟原虫或能引起小鼠免疫缺陷的逆转录病毒感染时，IL-4 缺陷小鼠可产生少量 IgE[73~75]。

小鼠和人 IL-4 是部分通过诱导覆盖 ε 转换区的转录，导致 ε 胚系转录物（ε 胚系转录子）的合成行使功能的。在小鼠，在 ε 胚系 RNA 主要的转录启始位点 5′端有大量高度保守的 DNA 序列，这些序列可结合转录因子 STAT6，NF-κB/Rel 蛋白与 C/EMP 家族的许多成员[76]。任何一个结合位点发生突变，都会严重影响 IL-4 诱导 ε 启动子的转录[76]。在人类，STAT6 和 B 细胞系特异的激活蛋白（BSAP 或 Pax-5）似乎可以激活 ε 胚系启动子[77]。STAT6 在 IL-4 诱导的 IgE 合成中是关键的，因为 STAT6 基因敲除小鼠在用线虫感染或免疫前后都检测不到血清 IgE[78~80]。显然，在体内，IgE 分泌需要 IgE 在膜上表达，因为缺失 IgE 膜结构域和胞质区域的小鼠血清 IgE 水平大大下降（$>95\%$），并且对过敏原免疫只有很小的特异性反应[81]。

IL-13 在人类 B 细胞也表现出 IgE 重链转换活性[82]。IL-13 和 IL-4 有许多相互重叠的生物学特性，包括诱导 B 细胞活化、增殖及 IgE 和 IgG4（人）类别转换，二者都由活化 T 细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞产生[82~95]。然而，小鼠和人 T 细胞及小鼠 B 细胞缺乏 IL-13 受体，对 IL-13 无反应[83]。IL-4 和 IL-13 受体也有相似之处，IL-4R 的 γ 链是二受体的共有成分[96]。IL-13 和 IL-4 都可激活 STAT6，STAT6 基因敲除小鼠的 T 细胞不会因IL-13，也不会因 IL-4 作用而分化成 Th2 细胞[80]。尽管 IL-13 和 IL-4 有许多共同功能，对 IL-4 和 IL-13 在人体内 IgE 产生中的相对贡献还需更多的研究。

许多其他细胞因子或因素也可调节 IgE 合成。能抑制 IgE 合成（至少在某些情况下）的细胞因子有 INF-γ、INF-α、TGF-β、IL-8、IL-10 和 IL-12[97]，而增强 IgE 合成的有 IL-5、IL-6、IL-9、TNF-α[97] 和 MIP-1α[98]。这些因子直接影响 B 细胞 IgE 转换或增殖，或直接作用于 T 细胞。进一步地，某些细胞因子调节 IL-4 诱导的 IgE 合成能力在人或小鼠 B 细胞以及在不同培养条件（如用于 IgE 效应诱导的共刺激类型）下都是不同的[66,99,100]。然而，这些因子调节 IgE 合成的特殊机制还未被完全理解。

CD40 和 CD40L 对 IgE 合成的调节

虽然 IL-4 和 IL-3 都能诱导 ε 胚系转录子合成，但成熟的 εmRNA 和 IgE 蛋白产生需要 B 细胞与 T 细胞或其他细胞的物理作用。这可由 B 细胞表面的 CD40 与活化 T 细胞（静息 T 细胞无表达）及其他细胞（肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞）表达的 CD40L 相互作用所介导[101,102]。CD40 是 50kDa 的膜整合糖蛋白，属于一跨膜受体家族，此家族包括 CD30、CD27、Fas 抗原、TNF-α 和神经生长因子的受体。CD40L 是 39kDa 的 Ⅱ 型膜糖蛋白，其家族成员包括淋巴毒素、TNF-α 及 CD27 和 CD30 的配体。

CD40 在 IgE 合成中的作用最早是在使用抗 CD40 抗体发现的，后来用 CD40L 也得到同样结果[103,104]。后来用 CD40 和 CD40L 基因敲除小鼠[105,108]和有因 CD40 或 CD40L 突变引起高 IgM 综合征[101,102]患者中得到确认。除了 T 细胞外，肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞也表达 CD40L，至少在体外某些情况下，它们也能诱导 B 细胞合成 IgE 及增殖[94,109,110]。来自过敏性鼻炎患者的过敏原活化的肥大细胞或来自于正常个体的血液嗜碱性粒细胞在体外缺乏外源细胞因子的情况下，能促进 B 细胞合成 IgE，这进一步说明了肥大细胞

和(或)嗜碱性粒细胞对 IgE 产生的潜在影响[94,110]。

1137 既然有证据表明它们能表达 CD40L 和能产生 IL-13 和(或)IL-4,那么肥大细胞、嗜碱性粒细胞和(或)嗜酸性粒细胞在体内 IgE 相关免疫反应的发生中多大程度上可代替 T 细胞呢？现在的研究回答这一问题还太早。目前证据表明,肥大细胞产生的 IL-4 相对于嗜碱性粒细胞是相对较少的[111,113],然而有报告表明,肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞在体内确能促进 IgE 反应。然而,不太可能它们中任何一个在 IgE 产生中都是重要的。例如,遗传性肥大细胞缺乏的小鼠能产生似乎正常的 IgE 反应[114,115]。也许,肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞影响含有较多这些细胞的组织内 IgE 反应的产生,或者调节主要由 Th2 细胞驱动的 IgE 反应的发生。

CD23 对 IgE 合成的调节

CD23 是 IgE 的低亲和力受体(参看"IgE 受体"),长期以来猜测它在 T 细胞依赖的 IgE 产生中有作用[32,116,117]。CD23 表达可被 IL-4 和 IL-13 上调(IL-4 和 IL-13 也上调 IgE 产生),CD23 在淋巴细胞和巨噬细胞的表达在过敏性疾病患者中也经常升高[118,119]。CD23 也在许多其他细胞表达,包括滤泡树突细胞、朗格汉斯细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、血小板和一些胸腺上皮细胞[32]。尽管有许多研究认为 CD23 在 IgE 产生的调节中起作用,但其确切作用还不清楚。部分原因是 CD23 在人体内能促进 B 细胞合成 IgE 而在小鼠体内却抑制 B 细胞产生 IgE[120]。这些差异也许反映了 CD23 及配体的种间差异[120]。例如,用 CD23 基因敲除小鼠和 CD23 转基因小鼠研究表明,CD23 能负调控 IgE 产生[121~123]。然而,IgE 产生在用 N. brasiliensis(*N. b*)感染的 CD23 基因敲除小鼠中不受影响[123~125]。相反,一个研究[123]表明,在用 DNP-OVA(一种胸腺依赖抗原)免疫后,CD23 缺陷小鼠中抗原特异性的 IgE 升高;但另一个研究[124]却未得到同样结果。表达膜 CD23 的转基因小鼠在 *N. b* 感染或有抗 IgD、BPO-KLH 或 DNP-KLH 免疫时,表现出降低的 IgE 反应[121,122],支持 CD23 在 IgE 产生中的抑制作用。然而,这个效应在过量表达可溶性 CD23 的转基因小鼠中没有观察到[122],这支持以前关于可溶性 CD23 对小鼠 IgE 合成无影响的研究结果[126]。

与上面在小鼠中的研究结果不同,CD23 能促进人及大鼠的 IgE 合成。IgE 复合物,可溶性 CD23,一些 CD23 抗体都能抑制体外培养的人淋巴细胞合成 IgE[66,127,129],用 CD23 多克隆抗体处理大鼠要强烈抑制体内抗原特异性 IgE 合成[129]。除了 IgE,CD23 也可结合 CD21(EB 病毒受体,或称补体受体 2),这种作用在 IL-4 存在时可升高人 B 细胞的 IgE 合成[130]。因此,至少在过敏患者中,T 细胞上 CD23 与 B 细胞上 CD21 结合也许促进 T 细胞和 B 细胞相互作用,进一步导致 B 细胞 IgE 产生增加[118]。

IgE 产生的遗传学研究

血清总 IgE 包括抗原特异性 IgE 和多克隆 IgE 两部分。高水平血清 IgE 与过敏性疾病,特别是特应性过敏性哮喘表现强烈相关[131]。对双生子进行的研究表明,IgE 浓度受遗传因素的强大影响[132,133]。对集中在很可能与过敏性疾病有关的基因(如 IL-4)附近有限的染色体区内的候选基因进行连锁分析[134],以及其他类型的遗传分析表明多克隆 IgE 反应受到位于染色体 5q31-33 IL-4 细胞因子基因簇内基因的强烈影响[134~136]。5q31-33 附近的基因编码许多已知在 IgE 反应调节和过敏性疾病中有重要作用的细胞因子,包括 IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-13 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),以及其他一些潜在的候选者,如转录因子 IRF1(其基因产物上调 INF-γ)。再考虑到 IL-4 在 Th2 细胞分化和 IgE 类别转换中的作用,这些结果意味着 IL-4 基因或其调控区内的一个或多个功能多态性也许可以(至少部分地)解释血清总 IgE 水平的遗传决定[137]。

相反,人 6p21.3 人类的白细胞抗原 C(HLA-D)区域内的基因与抗原特异性 IgE 反应有关[138]。针对许多临床上重要过敏原(包括黑麦和尘螨过敏原)都与 HLA 连锁的免疫反应(Ir)基因有关[139]。与我们目前对 Th 细胞效应的 MHC 限制性的理解一起考虑,就并不奇怪对许多吸入过敏原特异性的 IgE 反应有强烈的 Ir 效应。然而,HLA Ⅱ 类单倍体与发生临床疾病的可能性未发现有明显关联。

其他对 IgE 产生的遗传因素的研究在其他染色体发现了另外一些相关基因,包括 11q13(在其中已发现了

FcεRIβ 多态性)[134,140~144](并参看以下章节),或 12q15-24.1(其中含有几个候选基因,包括 INF-γ 和干细胞因子 SCF)[145]。哮喘过敏性位点的全基因组检查已经证实了这些染色体区域在 IgE 产生中的重要作用[146,147]。

IgE 受体

高亲和力 IgE 受体(FcεRⅠ)

根据其结构及对 IgE 的相对亲和力,IgE 受体主要分为两类。第一类,高亲和力受体(FcεRⅠ),以大约 10^{10} mol/L^{-1} K_a 的亲和力与单体 IgE 结合,而第二类 IgE 受体(FcεRⅡ,CD23,参见下文)以低得多的亲和力(K_a = 10^8 mol/L^{-1})结合 IgE[148]。

在发现 IgE 后不久,1970 年,通过对 IgE 易于结合嗜碱性粒细胞,后来结合肥大细胞的研究,发现了 FcεRⅠ[149]。虽然相对较高的组成型表达仅限制在肥大细胞和嗜碱性粒细胞,在人朗格汉斯细胞、外周血树突细胞和单核细胞中可检测到较低水平的 FcεRⅠ表达。这些低水平表达的 FcεRⅠ可在 IgE 介导的过敏原呈递中起作用[150~155]。此外,FcεRⅠ也在人嗜酸性粒细胞上表达,包括来自于特应性和非特应性患者的细胞[156,157]。然而,由于易获得有确定的抗原特异 IgE 杂交瘤以及其他有用的细胞系,如大鼠嗜碱性粒细胞白血病细胞系 RBL-2H3,对 FcεRⅠ功能的大部分研究都是在啮齿类动物中得到的。

1138

许多证据表明,肥大细胞和嗜碱性粒细胞通过 FcεRⅠ活化,导致生物活性递质释放,是 IgE 依赖的过敏反应,例如可通过抗原特异性 IgE 抗体被动转移的过敏反应的原发机制(在许多情况下是惟一的原发机制)。FcεRⅠ聚集而引起的肥大细胞和嗜碱性粒细胞活化启动了一系列协调的生化及形态学事件,导致①含组胺和其他合成好的介质的分泌颗粒的胞吐作用;②需新形成的脂类介质(如前列腺素和白三烯)的合成和分泌;③细胞因子的合成和分泌。这些因子一起作用,是大部分与急性 IgE 相关过敏反应有关的临床综合征的主要机制,而且也在晚期相反应和慢性变应性炎症有重要作用。用结合 IgE 的 FcεRⅠα 链的基因敲除小鼠[158]或 FcεRⅠ和 FcγRⅡ/Ⅲ共有的胞内 γ 链的基因敲除小鼠[159]证实了 FcεRⅠ在 IgE 相关反应中的关键作用。当 FcεRⅠγ 链缺陷的或 FcRγ 链缺陷的小鼠在注射特异抗原后静脉注射特异 IgE 时,这些小鼠并不表现出全身性过敏症状,如体液外渗、体温下降、肺功能改变、心动过速或者死亡[158,160]。在被动皮肤过敏(PCA)模型中,当试图让 FcεRⅠα 链缺失或 FcRγ 链缺失的小鼠产生 IgE 依赖的急性过敏反应时,也得到了同样的结果[158,161]。

FcεRⅠ结构

在肥大细胞和嗜碱性粒细胞,FcεRⅠ是由 1 条结合配体的 α 链,1 条 β 链和 2 条相同的由二硫键相连的 γ 链组成的四聚体(图 35.3)。从小鼠 γ 链的 cDNA 克隆预测了其氨基酸序列,含 227 个氨基酸残基,有 6 个潜在的 *N*-糖基化位点[162]。N 端 181 个氨基酸位于胞外,含 2 个免疫球蛋白样结构域。IgE 与 γ 链的作用位点与 IgE 重链 Cε2 和 Cε3 结构域有关。γ 链有一个 21 个氨基酸的疏水跨膜区和 25 个 C 端残基,形成一个短的胞质内尾巴。FcεRⅠβ 链是含 235 个氨基酸的多肽,目前认为它跨膜 4 次,N 端和 C 端都暴露在胞质内。γ 链胞外区仅有 5 个氨基酸残基,有一个跨膜区段和 36 个残基的胞质区域。γ 链的序列分析表明它与 TCRζ 链有很高的同源性,事实上 γ 和 ζ 亚单位在某些功能方面是可以互换的[163]。与转染实验的推断一致,啮齿类 FcεRⅠ在细胞表面的有效表达需 3 个亚单位同时存在,而当人只有 α 和 β 链时也可有效表达 FcεRⅠ,实际上,这种 $\alpha\gamma_2$ 形式的 FcεRⅠ也许是人类 APC 细胞独有的受体类型(图 35.3)[165]。

FcεRⅠ属于一多链免疫识别受体家族,此家族还包括 Fcγ 受体及 B 细胞和 T 细胞抗原受体[166]。它们都含有与多个蛋白亚单位非共价结合的胞外配体结合蛋白[167],含称为 ITAM 的信号基序。ITAM 含 6 个长 26 个残基的保守序列($D/EX_7D/EX_2YX_2LX_7YX_2L$)。从结构上看,FcεRⅠ与低亲和力 IgG 受体 FcγRⅢ显示最高的同源性,后者也在小鼠肥大细胞上表达。二者显示同样的 $\alpha\beta\gamma_2$ 比例,分享同样的 β 和 γ 链,在结合配体的 γ 链仅有很小差别(95%序列同源)。这种高度同源性与功能的相似性有关,体内外实验均表明,FcγRⅢ的聚集

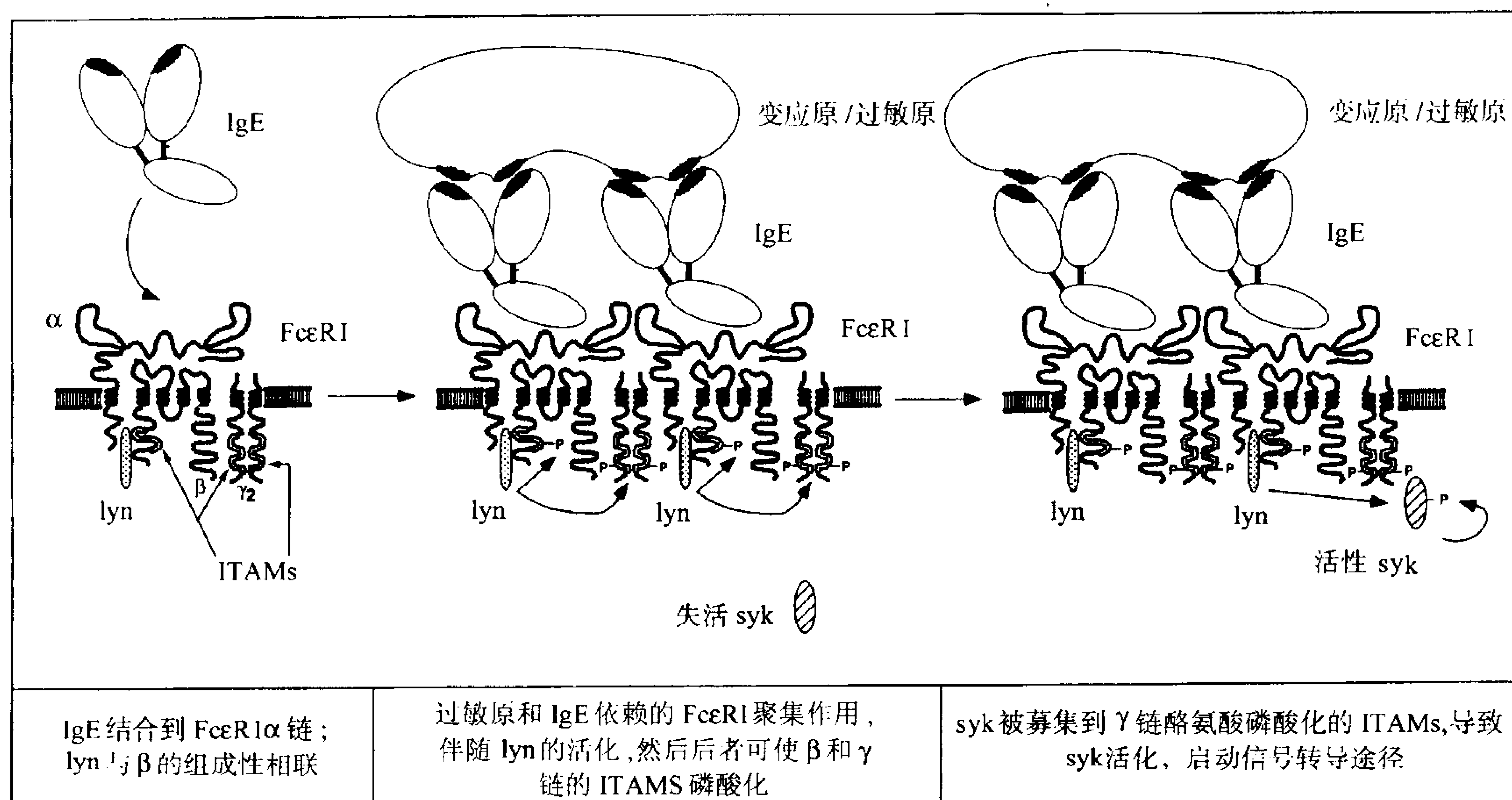


图 35.3 当今关于通过 FcεRⅠ的 IgE 和抗原依赖的信号转导最初步骤的模型。图中显示表达在肥大细胞和嗜碱性粒细胞的 $\alpha\beta\gamma_2$ 型受体。在人体中，$\alpha\gamma_2$ 型受体在单核细胞谱系的细胞表达，包括巨噬细胞、朗格汉斯细胞和树突细胞(参考正文)。注意图例已被大大简化，如，不明白 lyn 是否与β链 ITAM 相联；syk 可自身磷酸化，也可被 lyn 和其他机制磷酸化(对 Scharenberg AM, Kinet J.P 的图 2 作了修改。Early events in mast cell signal transduction. In：Marone G, ed chem Immunol vol 61。Human basophils and mast cells: biological aspects. Basel: Karger, 1995; 72 ~ 87，得到允许。)

与 FcεRⅠ一样可导致肥大细胞活化和介质释放[160,161,168]。而且，由于小鼠 FcεRⅠ和 FcγRⅢ竞争有限的β和γ链，因此缺乏 FcεRⅠα链的小鼠在体内和体外均表现出 FcγRⅢ表达增加、FcγRⅢ依赖的肥大细胞活化升高[160,161]。最后，FcγRⅢ可以低亲和力结合 IgE 聚合体[169]。

FcεRⅠ信号转导

IgE 识别特异多价抗原时 FcεRⅠ与 IgE 的聚集或交联，足以启动下游信号[170](图 35.3)。在实验条件下，FcεRⅠ活化也可用抗 FcεRⅠα链抗体或有丝分裂原如刀豆素 A(被认为与 IgE 分子上糖链结合可诱导递质释放)诱导。仅仅数百对 IgE 分子交联就足以启动人嗜碱性粒细胞释放组胺[171]。因为只需总表面 FcεRⅠ的很少一部分交联就可启动脱粒反应(肥大细胞和嗜碱性粒细胞可表达 $>1.0\times10^5$ FcεRⅠ/细胞[172,173]，肥大细胞或嗜碱性粒细胞可以被多种具不同特异性的 IgE 抗体同时致敏，因此可对许多不同的抗原作出反应。

因为 FcεRⅠ并无酶活性，它必须与其他膜蛋白或胞质蛋白作用以放大生化信号。FcεRⅠγ链主要负责传递细胞激活信号[168,174]，而β链起信号放大器作用[175]。有关 FcεRⅠ介导的信号转导早期事件见图 35.3。FcεRⅠ聚集后，一直通过其独特结构域与β链 C 端结构域相结合[176]的酪氨酸激酶 lyn，立即使β和γ链的 ITAMs 磷酸化。γ链 ITAM 酪氨酸磷化诱导它与 syk 酪氨酸激酶结合，后者被磷酸化后可与下游底物作用并激活之。

大量的信号途径可直接或间接地被 syk 激活(图 35.4)。可被 syk 直接磷酸化的一个底物是 PLCγ，PLCγ1 裂解磷酯酰肌醇二磷酸，产生二酰基甘油(DAG)和 1,4,5-三磷酸肌醇(IP3)。然后，这些第二信使可分别激活蛋白激酶 C(PKC)和内质网释放 Ca^{2+}。FcεRⅠ依赖的对肥大细胞的刺激也激活鞘氨醇激酶，释放 1-磷酸鞘氨醇，后者也可在 Ca^{2+} 动员中起作用[177]。钙离子动员对以颗粒形式贮存的递质 FcεRⅠ依赖的胞吐作用及脂类和细胞因子递质的释放都是必需的；因此，钙离子载体 ionomycin 或 A23187，在实验中常用于诱导不依赖 FcεRⅠ的肥大细胞和嗜碱性粒细胞递质释放。Ras-分裂原激活的蛋白(MAP)激酶途径也在 FcεRⅠ交联后

被激活[178~180]，并且是 syk 依赖[179]的。除了激活核转录因子外，MAP 激酶也调节 PLA_2 的酶活性从而在前列腺素和白三烯产生中起作用。

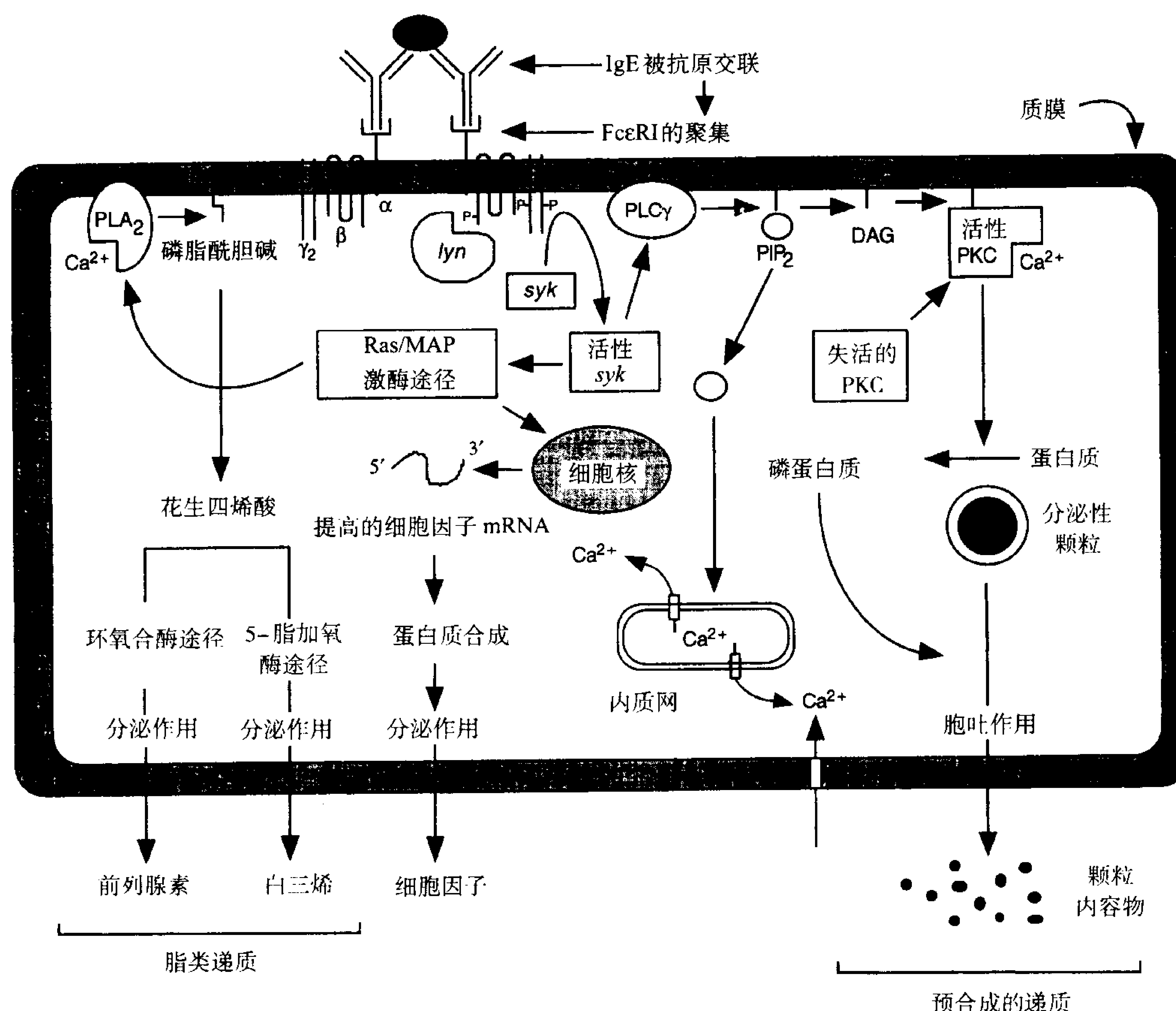


图 35.4 IgE 和 FcεRⅠ依赖的肥大细胞活化而释放介质的主要生化事件(更详细的资料见正文)。注意至少一些肥大细胞能从"预合成"库和其他"新合成库"中释放 TNF-α 和某些其他细胞因子。

此外，许多其他蛋白质也在 FcεRⅠ交联后被酪氨酸磷酸化和(或)丝-苏氨酸磷酸化[174,180~182]。其中一些活化蛋白可诱导①酪氨酸激酶 Btk、Src、Yes、Fer 和 Fak[183~186]；②Vav 和 Cb1 原癌基因[187,188]；③细胞骨架蛋白、paxillin[189]；④酪氨酸磷酸酶、CD45[190~191]；⑤Shc、Grb2、SOS 及其他与 Ras/MAP 激酶途径相连的蛋白质[192,193]。尽管在确定这些分子及其他分子与 FcεRⅠ介导分泌物的潜在关系中取得了很大进展，但它们在这条途径中激活的机制和(或)重要性还未能充分阐明。

含基于酪氨酸的抑制性基序的免疫受体及其他细胞表面受体对 FcεRⅠ功能的负调控

几个细胞表面受体可作为 ITAM 依赖的信号转导的负调控因子，包括免疫球蛋白家族的一些Ⅰ型跨膜蛋白，如 B 细胞的 FcγRⅡB、T 细胞的 CTLA-4、NK 细胞的杀伤细胞抑制性受体(KIR)[194]。它们都含有一个保守基序，此基序最早被认为是 FcγRⅡB 依赖的抑制 B 细胞活化所必须的 13 个残基的序列[195,196]。这个基序(称为 ITIM)通常有共同序列 I/VxYxxL/V[197]。含 ITIM 的受体与激活受体共同作用以行使功能(如 FcγRⅡB 通过同源抗原和 IgG 与 B 细胞抗原受体(BCR)共交联)。除了 FcεRⅠ和 FcγRⅢ，小鼠肥大细胞和人嗜碱性粒细胞也表达 FcγRⅡB。FcγRⅡB 和 FcεRⅠ共交联在体外可降低小鼠肥大细胞和 RBL 细胞以及人嗜碱性粒细胞 IgE 依赖的活化[198,199]。相似的，FcγRⅡB 基因敲除小鼠 FcγRⅢ依赖的肥大细胞脱粒反应和 IgG_1 诱导的 PCA 反应升高[200]。啮齿类肥大细胞也表达 2 个另外的含 ITIM 的分子；gp49b1[201]，免疫球蛋白超家族的一员；肥

1141

大细胞功能相关抗原(MAFA),一个Ⅱ类跨膜蛋白C型凝集素[202]。虽然还未确定 gp49 和 MAFA 的内源性胞外配体,但体外用特异性抗体使之聚集可降低 IgE 依赖的体外细胞激活作用[201,202]。

尽管对这类抑制信号的研究还很有限,但已总结出一些普遍规律。含 ITIM 的抑制性受体与抗原受体的共聚集,导致 ITIM 酪氨酸磷酸化及含 SH2 磷酸酶的募集[194]。在 B 细胞,磷酸化的 FcγRⅡB 结合蛋白质酪氨酸磷酸酶 SHP-1 和肌醇-5-磷酸酶,而 NK 细胞的 KIR 只结合 SHP-1。来源于虫蛀小鼠的肥大细胞(缺乏 SHP-1)不受 FcγRⅡB 抑制[203]。据此可推断,在肥大细胞,FcγRⅡB 也许选择性地结合 SHP-1,而后 SHP-1 抑制需要磷酸肌醇和(或)胞内 Ca^{2+} 升高的下游尚需进一步确定。

细胞表面分子 CD81 在体外也可抑制 RBL 细胞 FcεRⅠ依赖的脱粒反应,CD81 抗体在体内可降低 IgE 和肥大细胞依赖的 PCA 反应的强度[204]。CD81 属于跨膜 4 次的超家族(包括 CD9、CD53、CD63 和 CD82)成员,它们在造血细胞广泛表达,包括 T 细胞、B 细胞、粒细胞和单核细胞;CD81 无 ITIM 基序[205]。值得注意的是,CD81 调节 FcεRⅠ活化但不影响聚集依赖的酪氨酸磷酸化、Ca^{2+} 动员及白三烯合成[204]。

IgE 依赖的 FcεRⅠ表面表达上调

FcεRⅠ在小鼠肥大细胞表面表达,在体内是在分化和(或)成熟早期开始出现,在体外大约是在颗粒形成时开始的[206,207]。另一方面,体外来源的小鼠肥大细胞的一小部分(胞质含有颗粒)检测不到 FcεRⅠ表达[208]。初生小鼠血液中的前肥大细胞也含胞质颗粒以及小鼠肥大细胞相关蛋白酶 mRNA,而 FcεRⅠα mRNA 出现在此之后[209]。然而当前肥大细胞体外与 IL-3 和 SCF 共培养时,FcεRⅠα mRNA 很快就诱导表达[209]。而且,正如肥大细胞在正常鼠体内的成熟一样,FcεRⅠ最终会以每细胞 10^5 受体的水平表达[172]。

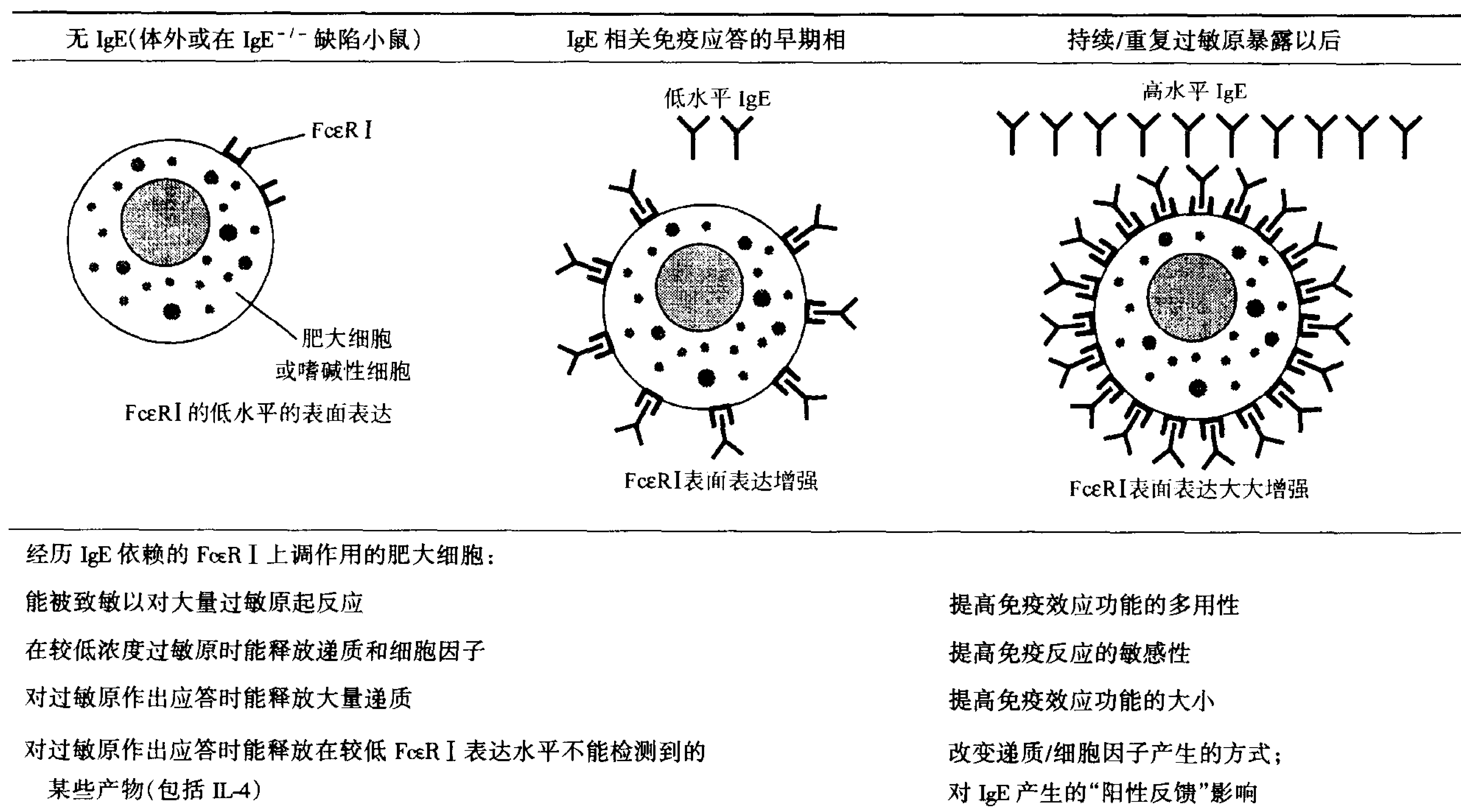
大约 20 年前就已观察到血清 IgE 浓度与人血液中嗜碱性粒细胞表面 IgE 受体表达有相关性[173,210,211]。然而却不清楚这种相关的基础。在小鼠和人的研究表明,FcεRⅠ在肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的表达可受 IgE 水平调节[212,215]。而且,IgE 遗传性缺陷的小鼠肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面 FcεRⅠ表达大大降低($>80\%$),这可用单体 IgE 体内处理加以纠正[212,213]。这种 IgE 依赖的 FcεRⅠ表达上调,允许小鼠和人肥大细胞在特异抗原浓度更低的情况下表现出 IgE 依赖的递质释放,和(或)在给定抗原浓度或抗 IgE 刺激时分泌更多的介质,以及某些细胞因子产生更高水平的表达[95,213,216]。

这项工作确定了增强效应细胞在 IgE 依赖过敏反应或对寄生虫的免疫反应中的功能的一种重要机制(图 35.5)。因为这个过程也可促使肥大细胞产生 IL-4[213]、IL-13[95] 和 MIP-1α[216],它们都可促进 IgE 产生(参看"IgE 合成调节")的能力,IgE 依赖的 FcεRⅠ上调也许是诱导 IgE 进一步增加的正反馈机制的一部分(图 35.5)。尽管单体 IgE 调节 FcεRⅠ的机制还不清楚,这一领域的研究也许会发现一些新的过敏症疾病的治疗方法。

来源于 $IgE^{-/-}$ 小鼠的肥大细胞和嗜碱性粒细胞可表达能检测到、但水平大大降低的 FcεRⅠ,这说明除 IgE 外一定有其他因子在 FcεRⅠ表达调控中起作用。细胞因子是最有可能的。IL-4 在体外可上调人脐带血来源的[217]、鼻腔的(94)或胎肝来源[218]的肥大细胞 FcεRⅠ的表达[94,217],对人胎肝来源[218]或脐带来源的[95]。肥大细胞研究表明,IL-4 和 IgE 在体外可协同作用增加 FcεRⅠ表达。而且,来源于 $IL\text{-}4^{-/-}$ 小鼠的腹膜肥大细胞和嗜碱性粒细胞 FcεRⅠ表达水平较 $IL\text{-}4^{+/+}$ 小鼠来源的低[219]。然而,$IL\text{-}4^{-/-}$ 小鼠来源的肥大细胞和嗜碱性粒细胞 FcεRⅠ表达水平的降低也许是(至少部分是)因这些动物 IgE 水平偏低所致,因为静脉注射 IgE 可升高 FcεRⅠ表达至野生型小鼠的水平(我们未发表的资料)。

FcεRⅡ/CD23

FcεRⅡ(B 细胞分化抗原,CD23)是一个Ⅱ型膜整合蛋白,属于 Ca^{2+} 依赖的动物凝集素家族[32,220]。因此,FcεRⅡ/CD23 和 FcεRⅠ是结构上不相关的两个受体,惟一的相似性是有共同的配体。与 FcεRⅠ相比,CD23 以相对较低的亲和力($K_a = 10^8$ mol/L)结合 IgE。除了 IgE 之外,CD23 也结合 CD21(补体成分 C3b 和 EB 病毒的受体)以及 β2 整合素的 α 链,即 CD11b 和 CD11c[130,221,222]。



1142

图 35.5　IgE 依赖的 FcεRⅠ在细胞表面表达的上调对肥大细胞、嗜碱性粒细胞和免疫调节功能的潜在影响。

CD23 由一个胞外区(构成 C 端凝集素结构域)和一个单次跨膜片段及一个短的 N 端胞质尾部组成。在凝集素结构域与跨膜片段之间是由 7 段脱水氨基酸组成的区域(这是有 α 螺旋的螺旋结构蛋白质的特征)。虽然 CD23 在膜上以三聚体形式表达，但它可被蛋白酶切为保持 IgE 结合能力及其他功能的可溶性片段。小鼠和人 CD23 结构上是相似的，但人 CD23/FcεRⅡ以两种形式存在(主要在 B 细胞表达的 CD23a/FcεRⅡa 和在 B 细胞及其他细胞表达的 CD23b/FcεRⅡb,)，二者仅在胞内 N 端有 6 个氨基酸[118,223]差异。在小鼠，CD23 主要在 B 细胞和滤泡树突细胞表达，而人 CD23 可在另外一些细胞表达，包括单核细胞、嗜酸性粒细胞、血小板、T 细胞、朗格汉斯细胞和一些胸腺上皮细胞[32]。

作为未加工的细胞表面分子或是可溶性片段，CD23 有许多功能。在人[224,225]或小鼠[226]B 细胞，CD23 可介导 IgE 依赖的抗原聚集，这可以在体外增强抗原呈递给 T 细胞，而且被动转移的 IgE 增强 IgG 抗体反应的能力在 CD23⁻/⁻ 小鼠受到极大破坏[124]，CD23 的其他作用包括 IgE 合成调节(参看"IgE 合成调节")、IgE 依赖的吞噬作用的调节、B 细胞活化调节、B 细胞归巢在生发中心的调节、细胞黏附的调节、可溶性 CD23 还有多种细胞因子样活性[32,118,220]。然而，由于小鼠和人 CD23 生物学上的明显差异以及不同研究小组在 CD23 缺陷小鼠研究中看似矛盾的结果，目前对 CD23 的这些推测功能的生物学重要性及临床相关性尚未达成共识。

IgE 相关免疫反应的效应细胞和递质

概述

肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞长期以来一直被认为是 IgE 相关过敏反应以及针对寄生虫有益宿主的 IgE 相关保护反应的重要效应细胞。认为肥大细胞(在全身反应中还有嗜碱性粒细胞)胞质颗粒相关的脂类递质，是急性 IgE 相关过敏反应症状或综合征的原因。肥大细胞，嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞也可能在晚期相反应及慢性过敏症的发展中起重要作用。然而，T 细胞(特别是 Th2 细胞)、单核细胞和巨噬细胞、中性粒细胞，也在晚期相反应及慢性炎症反应部位的炎症浸润细胞中出现，这些细胞也可能在这些反应的病理发生中起作用。

1143

肥大细胞及嗜碱性粒细胞的发育及自然史

尽管肥大细胞和嗜碱性粒细胞有一些引人注目的共同性质，但它们是不同的细胞类群（表 35.5）。肥大细胞和嗜酸性粒细胞：①含丰富的胞质颗粒，在用某些碱性染料反应时表现出异染性；② 来源于骨髓祖细胞；③是组胺及其他炎症化学递质的主要来源；④在所有已分析过的哺乳动物中都表达 FcεRⅠ。

表 35.5　肥大细胞和嗜碱性粒细胞的自然史

特征	肥大细胞	嗜碱性粒细胞
前体细胞起源	CD34⁺ 造血祖细胞	CD34⁺ 造血祖细胞
成熟位置	结缔组织（少数在骨髓）	骨髓
循环的成熟细胞	无	有（通常 < 血细胞的 1.0%）
成熟细胞从循环中募集到组织内	不	是
肥大细胞通常位于结缔组织内	是（在某些 IgE 相关免疫反应或其他慢性炎症部位数量大大上升	不
成熟细胞有增殖能力	是（在某种环境中）	没有
生命周期	数周至数月（依据对小鼠和大鼠的研究）	数天
主要的发育因子	SCF	IL-3
表达 FcεRⅠ	是	是

曾经认为嗜碱性粒细胞也许是循环的前体肥大细胞或肥大细胞是“组织内嗜碱性粒细胞”，但目前证据表明，成熟的嗜碱性粒细胞是终末分化的循环的粒细胞，在许多炎症反应或免疫过程中能浸润组织或出现在渗出物中。相反，形态学上已成熟的肥大细胞不能循环，而是在其所在的血管化组织内发育成熟。

常规的组织固定及处理方法不适宜于显示小鼠或人的肥大细胞和嗜碱性粒细胞；用适当制备的 1μm 塑料切片或超微结构方式可以得到最佳显示[227]。在超微结构上，嗜碱性粒细胞细胞核裂开，有高度凝缩的染色质，胞内含圆形或卵圆形颗粒（图 35.6）。而肥大细胞呈圆形或延长，核不裂开，偶尔见成两叶或多叶的细胞核，核内含中等凝缩染色质（图 35.6）。

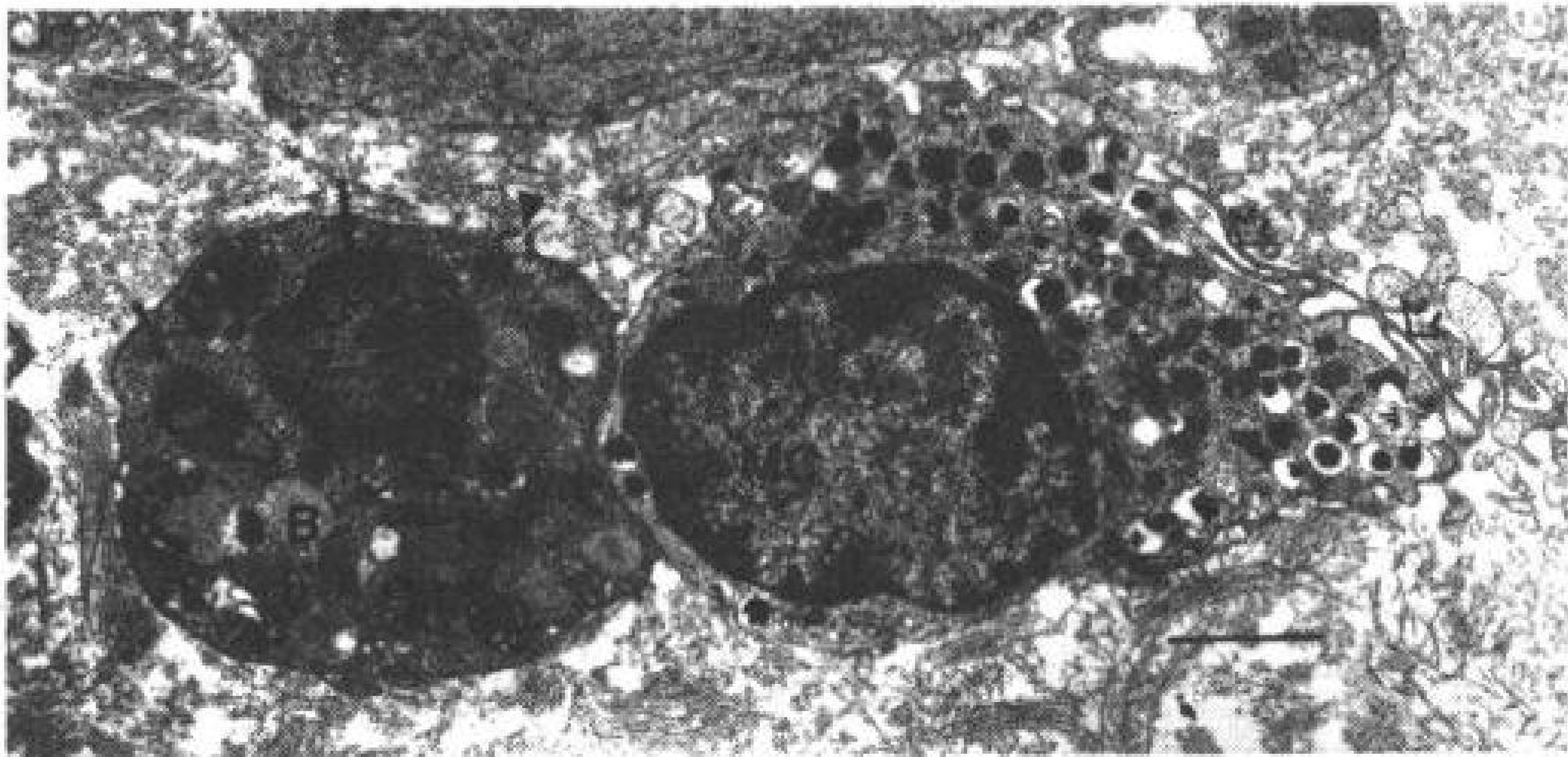


图 35.6　节段性回肠炎（克隆病）患者回肠黏膜下邻近的肥大细胞（MC）的嗜碱性粒细胞（B）。嗜碱性粒细胞有双叶核（实心箭头），其染色质在核膜下高度凝缩。细胞表面相对平滑，只有少数钝的突起（箭头）。肥大细胞核更大，染色质凝缩程度较嗜碱性粒细胞低。肥大细胞颗粒更小，数量更多，在性状和内容物上变化更大，肥大细胞表面有许多细长的折叠（开放箭头）（Bar = 2μm）（得到 Dvorak AM，Monahan RA，Osage JE，Dickersin GR 的允许，Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. Ⅱ. Immunologic inflammatory response. Alterations of mast cells, basophils, eosinophils, and the microvasculature. Hum Pathol 1980; 11: 606 ~ 619 做了修改。）

与其他粒细胞一样，嗜碱性粒细胞也来源于 CD34⁺ 多能造血干细胞，通常在骨髓分化和成熟，然后在血液中循环[228,229]。IL-3 是调节嗜碱性粒细胞发育的重要因子，其他一些因子也可能影响嗜碱性粒细胞发育[228~230]。嗜碱性粒细胞是人体最少的血液粒细胞，大约只占白细胞总数的 0.5% 或有核骨髓细胞的 0.3%[227]。嗜碱性粒细胞在小鼠循环系统及骨髓内有较低数量存在，且各小鼠品系间相差显著[90,212,231,232]。尽管人嗜碱性粒细胞产生和外周循环的动力学与嗜酸性粒细胞类似，但与嗜酸性粒细胞不同，它通常并不在外周组织大量出现[227,229]。嗜碱性粒细胞能浸润许多免疫或炎症反应部位，包括 IgE 相关的晚期相反应和慢性过敏性炎症反应部位，并常常伴随着嗜酸性粒细胞浸润，并参与对某些肿瘤的炎症反应[233]。

肥大细胞也起源于 CD34⁺ 造血干细胞[228,229,234]。然而，除了小部分肥大细胞定居骨髓外，肥大细胞成熟都在外周组织完成。许多证据表明，酪氨酸激酶受体 C-kit（在肥大细胞及其前体细胞表达）与其配体 SCF 间

的相互作用对肥大细胞正常发育及存活是必需的[235]。例如,带有导致 C-kit 功能显著损害或膜结合 SCF 显著降低的突变的小鼠缺乏组织内肥大细胞[235,236],在小鼠[230,237~239]、大鼠[239]、实验的灵长类动物[240]和人[241]皮下注射重组 SCF(rSCF),能诱导体内肥大细胞增生。SCF 在多种细胞的质膜表面表达,包括成纤维细胞、骨髓基质细胞和血管上皮细胞,蛋白酶解可使 SCF 胞外区域从这些细胞脱落;膜结合 SCF 和可溶性 SCF 都有生物学活性[235]。局部的 SCF 水平可能不仅是调节正常组织内肥大细胞数量的重要因素,也对许多免疫反应、修复反应及疾病进程中的肥大细胞数目显著改变起着重要作用[235,236,241~245]。

1144

然而在 SCF 之外,小鼠和人肥大细胞的发育及表型性质也可能受多个细胞因子和生长因子复杂的相互作用影响[235,236,241~243]。例如,在小鼠和大鼠,对线虫的 IgE 相关免疫反应经常与胃肠道内的黏膜肥大细胞显著增生有关[246,247]。很早就知道这个过程是 T 细胞依赖的,它可能主要反映了 IL-3[230,248]、IL-4[249~251]及 Th2 细胞(也可能是其他细胞)产生的其他细胞因子(包括 IL-9)[252]在寄生虫感染中的作用。对小鼠进行的遗传学研究已确定,在对委内瑞拉类圆线虫(*Strongyloides venezuelensis*, S.v)感染的反应中,黏膜肥大细胞增生需要足够的 SCF/c-kit 功能和 IL-3[230]。因此,肥大细胞遗传性缺乏 Kit^{W}/Kit^{W-v}、IL-$3^{+/+}$ 小鼠在 S.v 感染时黏膜肥大细胞增生显著缺陷(不到野生型的 3%),但在 Kit^{W}/Kit^{W-v}, IL-$3^{-/-}$ 小鼠进一步降低(实际上缺乏)[230]。

肥大细胞的分布和异质性

肥大细胞的分布遍及所有结缔组织,常位于血管和淋巴管附近,靠近神经或在神经内,或位于暴露在环境的表皮下,如呼吸道、胃肠道及皮肤,在小鼠和大鼠也可分布在浆膜腔内[235,236,242~245]。肥大细胞也是(如果数量不多的话)骨髓和淋巴样组织的正常组分。然而与成熟的嗜碱性粒细胞不同,成熟的肥大细胞正常情况下不在血液中循环。

在小鼠、人及许多其他哺乳类动物,正常组织内不同解剖部位的肥大细胞数量有很大差异,肥大细胞的这些"基线"水平可因 IgE 相关免疫反应及其他免疫或炎症反应而改变[235,236,242~245]。例如,由各种不同原因(包括某些寄生虫感染的反应)引起的慢性炎症部位的肥大细胞可比相应组织高许多倍[235,236,242~245]。"肥大细胞异质性"这一概念是建立在对人、实验动物特别是小鼠的研究基础上的,用以表明肥大细胞在许多方面的差异,包括形态学、组织化学、递质成分及对药物和活化刺激的反应[235,236,242~245]。虽然肥大细胞异质性的调节及功能还不完全清楚,但很明显,肥大细胞的许多表型可被不同的细胞因子调节(特别是在体外)[235,236,242~245]。而且在健康和疾病状态中表型不同的肥大细胞有不同的功能[235,236,242~245]。如小鼠[253],大鼠[254,255]和人[256]肥大细胞有许多亚类,它们在贮存于胞质颗粒的胰蛋白酶样或胰凝乳蛋白酶样蛋白酶(即类胰蛋白酶和胃促胰酶)的种类和数量、在 FcεRⅠ依赖的活化时产生的脂类递质的种类和数量[257,258]都不一样,所以分泌的细胞因子也有差别[259]。

在小鼠,许多肥大细胞可被归入 T 细胞依赖的(或黏膜的)和 T 细胞非依赖的(或结缔组织或浆膜的)两个亚类[235,236,242,243]。人肥大细胞的分类主要建立在颗粒相关蛋白酶——胃促胰酶的有无上[256]。类胰酶阳性、胃促胰酶阴性的人肥大细胞在某些方面类似于小鼠黏膜肥大细胞,而胃促胰酶阳性,类胰酶阴性的人肥大细胞与小鼠结缔组织肥大细胞有一些共同性质[256]。然而,正如在其他地方[235,242]详细讨论的一样,这些分类并不是严格的,因为许多证据表明,很多肥大细胞表型特征的表达模型甚至在传统的小鼠黏膜或结缔组织类群中也有很大差异;此外克隆化的肥大细胞类群也有可逆的,双向的变化。而且,有些因素(包括某些细胞因子)能改变某些肥大细胞表型特征的表达,而对其他特征表达影响很少或没有[257,260]。作为一个整体来看,肥大细胞的重要表型特征受到十分精确的调节;从所有表型特征的定性和定量看,甚至可以说每个肥大细胞都是独一无二的。

1145

肥大细胞和嗜碱性粒细胞产生的递质

肥大细胞和嗜碱性粒细胞含有,或者说"为适当刺激而精心定做"了多种有效生物活性递质(表 35.6)[227~229,243,261~265]。这些产物一些被贮存在预先形成的胞质颗粒中(如蛋白聚糖、蛋白酶、组胺);其余

的在细胞受到 IgE 和抗原或其他刺激活化后合成(如花生四烯酸经环化酶或脂氧合酶途径的氧化产物,某些细胞产生的血小板活化因子 PAF)。细胞因子是最近才确定的一类肥大细胞和嗜碱性粒细胞递质,至少其中之一——TNF-α 既要由肥大细胞预先合成也可由活化后新合成而释放[262,266~268]。

表 35.6 人肥大细胞和嗜碱性粒细胞的产物

递 质	肥大细胞	嗜碱性粒细胞
贮存在胞质颗粒中预先合成的主要递质	组胺,肝素和或硫酸软骨素,中性蛋白酶(典型有或无胃促胰酶),酸水解酶,组织蛋白酶 G,羧肽酶	具有产生激肽活性的组胺,硫酸软骨素,中性蛋白酶,β葡糖醛酸酶,类组织蛋白酶 G 酶,主要基质蛋白,溶血磷脂酶
适当活化后产生的主要脂质递质	前列腺素 D2,白三烯 4,血小板活化因子	白三烯 4
细胞因子[a]	IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, TNF-α, MIP-1α, bFGF, VPF/VEGF	IL-4,IL-13

[a] 在某些情况下,所列的是建立在免疫组化证据表明至少一些肥大细胞表现出对细胞因子的免疫反应性基础上,而不是建立在具有生物学活性的细胞因子可从这些细胞释放的证据上。

预先合成的递质

贮存在预先形成的人或小鼠肥大细胞胞质颗粒内的递质包括组胺(小鼠和大鼠肥大细胞含 5 羟色胺,但人没有)、蛋白聚糖、丝氨酸蛋白酶、羧肽酶 A 以及少量硫酸酯酶和外糖苷酶[227~229],肥大细胞和嗜碱性粒细胞通过组氨酸脱羧形成组胺。对肥大细胞遗传缺陷和同类系正常小鼠的研究表明,肥大细胞产生了正常组织内几乎所有的组胺,只在中枢神经系统(CNS)和胃腺例外[269]。嗜碱性粒细胞是正常人血液中组胺的主要来源。

小鼠和人肥大细胞含有数量比例不等的肝素(约 60kDa)和硫酸软骨素蛋白聚糖[228,243,261,263]。虽然正常小鼠和人血液嗜碱性粒细胞中还未发现硫酸化的糖胺聚糖,但髓性白血病患者中硫酸软骨素占蛋白聚糖的大部分。肥大细胞和嗜碱性粒细胞蛋白聚糖在胞内胞外都有一些生物学功能。通过离子相互作用,它们可结合组胺、中性蛋白酶和羧肽酶,它们也参与这些分子在分泌颗粒内的包装和贮藏。在脱粒过程中当颗粒基质暴露在生理性 pH 值及离子强度时,与蛋白聚糖相连的递质以不同的速率解离——组胺非常快,而类胰酶和胃促胰酶则慢得多[228],除了调节递质从颗粒基质中释放的动力学外,蛋白聚糖也调节某些结合递质的活性(见下)。

中性蛋白酶是肥大细胞分泌颗粒的主要成分。嗜碱性粒细胞和肥大细胞都含有具 TAME-酯酶活性的酶,这可以用作人肥大细胞和嗜碱性粒细胞体内活化的标志。从质量上说,类胰酶是人肥大细胞胞质颗粒中的主要酶,这个中性蛋白酶在大部分(如果不是全部)人肥大细胞中存在[228]。人肥大细胞类胰酶是组氨酸肽链内切酶,在颗粒中以 31~35kDa 亚单位组成的 134kDa 的四聚体活性形式存在,每亚基有一个活性位点,用免疫分析在正常人肥大细胞发现微量类胰酶。由于此酶主要在人肥大细胞中表达(即使不是肥大细胞独有),体液(如血浆、血清和炎症性渗出物)中肥大细胞类胰酶的测定已被用于评估这些体系中肥大细胞活化水平。类胰酶在肥大细胞颗粒中与肝素和(可能)其他的蛋白聚糖结合而以四聚体活性形式稳定存在。肥大细胞类胰酶在体内的功能尚不清楚。肥大细胞胃促胰酶也是丝氨酸蛋白酶,以 30kDa 单体活性形式存在于颗粒中,但仅存在于部分肥大细胞中。与嗜酸性粒细胞一样,人嗜碱性粒细胞也能形成 Charcot-Leyden 晶体并且含有嗜酸性粒细胞内数量相当的 Charcot-Leyden 晶体蛋白(溶血磷酯酶)[228]。

1146

新合成的脂类递质

肥大细胞和嗜碱性粒细胞在适当刺激下活化,不仅引起已合成颗粒相关递质的释放,也能启动某些脂源性物质的从头合成(图 35.7)。其中特别重要的是花生四烯酸环氧化酶和脂氧化酶途径代谢物,这些产物有强烈的炎症活性,并且也参与调节释放过程本身[263,265]。肥大细胞主要的脂氧化酶产物是前列腺 D_2

图 35.7　肥大细胞的主要脂类递质的生物合成途径。方框表示最大量的和生物学上最重要的肥大细胞来源花生四烯酸的代谢产物。在含有脂质体的肥大细胞（和其他细胞类型）中，脂质体是这些途径中磷脂的又一来源（参看正文）。

（PGD_2），肥大细胞和嗜碱性粒细胞主要的脂氧化酶产物是硫化多肽白三烯（LTs）：LTC_4 及其肽分解衍生物 LTD_4 和 LTE_4。人肥大细胞但不是人嗜碱性粒细胞也可产生 LTB_4，尽管量比 PGD_2 或 LTC_4 少得多[263,265]。

1147

人肥大细胞和嗜碱性粒细胞在花生四烯酸代谢产物的释放至少有三种方式：①肠和肺肥大细胞产生相似量的 LTC_4 和 PGD_2；② 皮肤肥大细胞主要是 PGD_2；③ 嗜碱性粒细胞产生 LTC_4 和极少量的 PGD_2。对体外来源的小鼠肥大细胞研究表明，SCF 和其他细胞因子能调节与花生四烯酸代谢有关的磷酯酶 A_2 和其他酶的表达，这又可能影响这些细胞释放脂类递质的能力，包括 PGD_2[257,270] 和花生四烯酸本身[258]。

细胞因子

许多细胞因子依赖的过程都和 IgE 相关过敏性炎症有关，包括 IgE 反应本身的上调（如 IL-4、IL-13，可能还有 MIP-1α），嗜碱性粒细胞募集（如 TNF-α、IL-4）或递质产生（如 IL-3、IL-4、MIP-1α）的诱导或增强，促进嗜酸

性粒细胞的发育和(或)存活(如 IL-5、IL-3、GM-CSF)和募集(如 IL-3、IL-4、IL-16、GM-CSF、某些细胞-细胞趋化因子),以及单核细胞和 T 细胞募集(如 IL-16、某些细胞-细胞趋化因子)[264]。某些细胞因子(IL-1 和 TNF-α)对过敏性炎症的发生和持续的作用很大程度上是通过诱导血管内皮细胞上黏附分子,如 P(E)选择素。血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)和细胞间黏附分子 1(ICAM-1)的表达,增强白细胞募集实现的[264,271,272]。然而,细胞因子也可关键性地影响过敏性炎症发生的许多其他时期以及调节这些反应在某些局部的结果。

细胞因子的产生也许是致敏个体受到过敏原刺激后立刻发生的 IgE 依赖肥大细胞活化、随后晚期相反应中发生的炎症以及作为慢性过敏性疾病特征的持久炎症和相关组织损伤三个阶段间的关键联系物[262,273]。例如,对重建肥大细胞缺陷小鼠的肥大细胞研究已经表明,肥大细胞对 IgE 和特异抗原刺激后皮肤或胃壁内的所有细胞浸润是必需的[274,275]。类似的方法也表明,用气溶胶过敏原以一定方法刺激致敏小鼠后,肥大细胞在嗜酸性粒细胞浸润至肺中也起着重要作用[276]。皮肤内 50%的 IgE 和肥大细胞依赖的白细胞浸润可用抗重组 TNF-α 抗体抑制[274]。

除肥大细胞外,慢性过敏性炎症部位的其他细胞也能产生 TNF-α,如巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞,但这些细胞只有很少或没有预先形成的 TNF-α 活性。而多个证据表明,某些成熟的静息的(未被激活的)小鼠[266,268]或人[277,278]肥大细胞含有预先贮存的 TNF-α,所以细胞受到适宜刺激后马上释放[262,264]。因此,在 IgE 依赖的反应中,肥大细胞很可能是初期 TNF-α 的重要来源。

除了 TNF-α 外,肥大细胞也是许多其他能影响 IgE 相关过敏性炎症的细胞因子的潜在来源,这些因子的合成和释放可经 IgE 依赖的机制诱导。因此,某些 FcεRⅠ活化的小鼠肥大细胞内许多因子[IL-1α、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6,GM-CSF 和趋化因子 MIP-1α、MIP-1β、MCAF(MCP-1)、MARC 和 I-309]的 mRNA 升高,相应的具生物活性的分泌物质[IL-1、IL-3、IL-4、IL-6、IL-9、IL-13、GM-CSF 和血管通透因子-血管内皮生长因子(VPF/VEGF)]也升高][84,87,88,113,262,264,273,279]。部分是由于获得高纯度的人肥大细胞很难,对人类肥大细胞产生细胞因子研究进展缓慢。然而,人肥大细胞也是许多因子的潜在来源,包括 TNF-α、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13 和 VPF/VEGF[89,93~95,111~113,279,280]。

糖皮质激素与 CsA 一样,能抑制许多细胞产生细胞因子,这些效应是这些因子在哮喘病中起作用的一个重要机制[281]。在小鼠中,糖皮质激素和 CsA 都能在体外减少肥大细胞细胞因子产生,也能在体内抑制肥大细胞和 TNF-α 依赖的过敏性炎症[282]。

虽然对嗜碱性粒细胞产生细胞因子能力的研究远少于对肥大细胞产生细胞因子的研究,但还是有几个报道表明,从外周血分离的人嗜碱性粒细胞在 FcεRⅠ依赖的活化时可释放 IL-4 和 IL-13,而且在暴露给 IL-3 的嗜碱性粒细胞中其释放增强,而其他一些细胞因子则无加强效应[227~229]。过敏性部位肥大细胞或嗜碱性粒细胞产生的 IL-4、IL-13 和(或)MIP-1α,可能参与增强 IgE 产生或驱动 Th2 细胞分化。而且,最近的研究结果表明,人嗜碱性粒细胞和肥大细胞也表达 CD40L,因此能通过促进免疫球蛋白类别转换而调节 IgE 产生[94,110,227,264]。

肥大细胞或嗜碱性粒细胞活化的机制

在为嗜碱性粒细胞或肥大细胞的功能表现奠定基础的细胞事件中,了解最清楚的是脱粒过程(或者说过敏型脱粒)。这是刺激活化的生化和形态学事件的模式化组合,它导致胞质颗粒膜与质膜融合,释放颗粒相关递质(图 35.8)。尽管许多因子能启动嗜碱性粒细胞和肥大细胞过敏型脱粒,研究得最清楚的刺激途径是由嗜碱性粒细胞和肥大细胞表面的 FcεRⅠ转导的(参看"IgE 受体")。这个过程还未发现对这些细胞有毒性。因为肥大细胞是长命细胞,因此它们有参与多次 FcεRⅠ依赖活化的潜力。正如前面提到的,肥大细胞和嗜碱性粒细胞能同时被多种不同抗原特异性的 IgE 致敏,这使得它们可对多种不同的过敏原的刺激做出反应,释放递质。

除了 IgE 和特异抗原外,大量生物物质(包括补体活化产物和某些细胞因子)、化学试剂和物理刺激都能引起肥大细胞或嗜碱性粒细胞递质释放[227,228,244,245,261,283]。然而人嗜碱性粒细胞和不同类群的肥大细胞对同

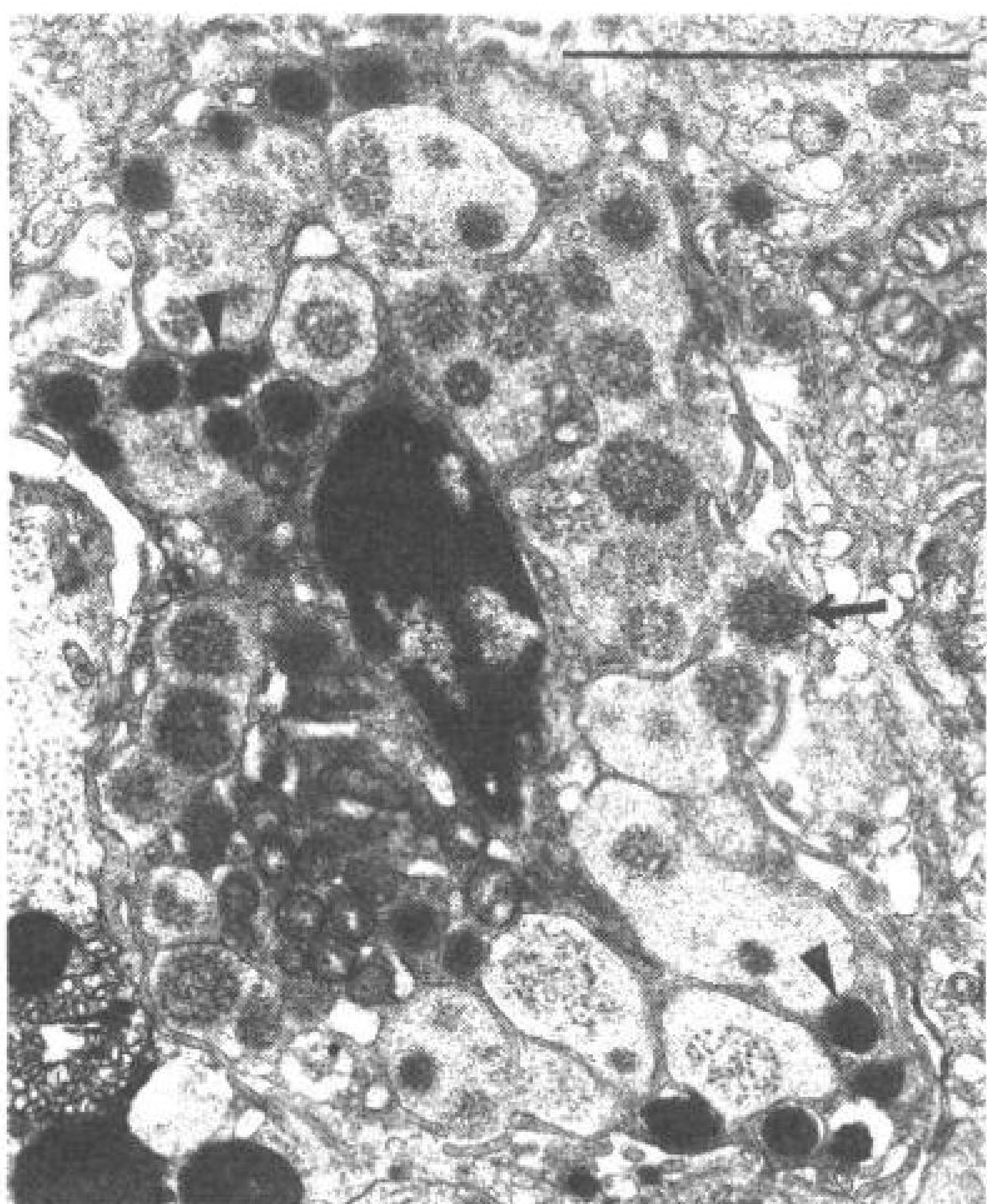


图 35.8　节段性回肠炎患者造口术活检标本中人肥大细胞的“过敏症型”脱粒。注意由含有改变了的、膨大的基质物质颗粒膜融合形成的胞质内脱颗粒通道。一个改变了的、无膜的颗粒(箭)已经穿过脂膜上的开口突出导到胞外。一些未改变的、致密的颗粒留在胞内(箭头)。(Bar = 5μm)(对 Dvorak AM 的《人胃肠道系统的超微结构在人类疾病的肥大细胞、嗜碱性粒细胞,神经和肌肉之间的相互作用》一文作了修改。In: Snape WJ Jr, Collins SM, eds. Effects of immune cells and inflammation on smooth muscle and enteric nerves。Boca Raton, FL: CRC Press, 1991: 139 ~ 168,得到允许)。

一刺激反应是不同的。例如:皮肤肥大细胞对神经肽或吗啡刺激比肺肥大细胞敏感[244,245,261,263]。而且,某些刺激可以诱导不同于 FcεRⅠ依赖活化的递质释放模式(递质的种类和数量不同)。相似的,某些细胞因子可以直接活化肥大细胞或嗜碱性粒细胞和(或)调节细胞在 IgE 和抗原或其他刺激时释放递质的能力,但单个细胞因子对不同的肥大细胞或嗜碱性粒细胞的效应很不同[113,227~229]。例如,SCF 可诱导某些肥大细胞类群的脱粒和预先合成的脂类递质的释放[284~287],而对嗜碱性粒细胞相对来说却无甚反应[286]。而且,某些肥大细胞在 SCF 作用时很少或并不释放预合成的递质,但它们能分泌细胞因子,如 IL-6[288]。细菌 LPS 在某些大鼠[289]或小鼠[288]肥大细胞中诱导 IL-6 释放的程度大大高于预合成递质的释放。

综上所述,这些发现表明肥大细胞和嗜碱性粒细胞在炎症和免疫反应中的作用可被补体激活和许多其他 IgE 非依赖机制以及 FcεRⅠ途径活化所募集,也表明这些效应细胞在这些情况下的功能可被细胞因子调节。因为这些经 FcεRⅠ非依赖机制活化的肥大细胞和嗜碱性粒细胞能释放许多(即使不是全部)与经 IgE 和特异抗原活化的细胞相同的介质,因此在实验动物或在试验肥大细胞和嗜碱性粒细胞 IgE 非依赖活化的人的症状,与在 IgE 相关反应中观察到的没什么不同。最后,形态学证据表明,肥大细胞和嗜碱性粒细胞可经不同于典型的过敏型脱粒的机制释放介质[233]。这种机制(称为逐渐的脱粒)经常在研究炎症部位组织标本内肥大细胞和嗜碱性粒细胞超微结构时见到[233,290]。这些研究和相关的体外实验一起,表明一片一片的脱粒可允许肥大细胞和嗜碱性粒细胞缓慢地和(或)相对有限地释放介质,如果被证实的话,这也可能是对这些细胞未知功能的有意思的暗示[233]。

嗜酸性粒细胞的发育及自然史

嗜酸性粒细胞与中性粒细胞和嗜碱性粒细胞一样,都是一类骨髓来源的粒细胞(表 35.7)。嗜酸性粒细胞胞质颗粒与酸性苯氨染料如酸性粒有极强亲和力,据此可与其他造血细胞相区别。尽管嗜酸性粒细胞胞质颗粒内含几种嗜酸性粒细胞特有的蛋白质,但尚未在其表面发现特有的蛋白质。因此,血液及组织内嗜酸性粒细胞的鉴定还是建立在其染色性质和其他形态学特征上。然而,某些条件下对嗜酸性粒细胞颗粒蛋白的免疫染色或用异硫氰酸盐荧光染色给嗜酸性粒细胞标上荧光或 Giemsa 染色,可用于对这些细胞进行鉴定和定量。以血液中产生的嗜酸性粒细胞增加和嗜酸性粒细胞在组织和血液中的积累为特征的嗜酸性粒细胞增多,特征性的与一系列免疫反应或病理过程有关[291~293],包括 IgE 相关的过敏性疾病和蠕虫感染及大量其

他原因不很明确的疾病。

表 35.7 嗜酸性粒细胞的自然史

特 征	
前体细胞的起源	CD34⁺造血祖细胞
成熟位置	骨髓
循环中有成熟细胞	有
成熟细胞从循环中募集到组织	是
成熟细胞正常驻留在某种连接组织	是(特别是在靠近胃肠道和呼吸道表面)
成熟细胞的增殖能力	无
生命周期	数天至数周
主要发育因子	IL-5
表达 FcεRⅠ	变化,低水平(与肥大细胞和嗜碱性粒细胞相比)

嗜酸性粒细胞与中性粒细胞大小相似,但有呈双叶的核和特殊的胞质颗粒[294]。这种带有包装化的带正电荷的蛋白质,给予细胞嗜酸性粒特性的丰富的特殊颗粒是嗜酸性粒细胞最特殊的形态学特征[294]。从超微结构看,这些特殊颗粒含有特征上可区分的(通常是电子密度不同)晶状核心(图 35.9)。嗜酸性粒细胞也含另外两种颗粒:原始颗粒,缺乏晶状核心,只在嗜酸性粒细胞成熟早期出现;一种更小的颗粒,含芳基硫酸酯酶及其他酶类。隆凸的管状囊泡结构有时被认为是第四种"颗粒"(微颗粒)[294]。嗜酸性粒细胞也含大量脂质小体[295]。脂质小体是非膜包围的,富含脂质的包含体,也在巨噬细胞和肥大细胞[296,297]和许多其他类型细胞发现,它可在花生酸样递质的形成中起作用[295]。

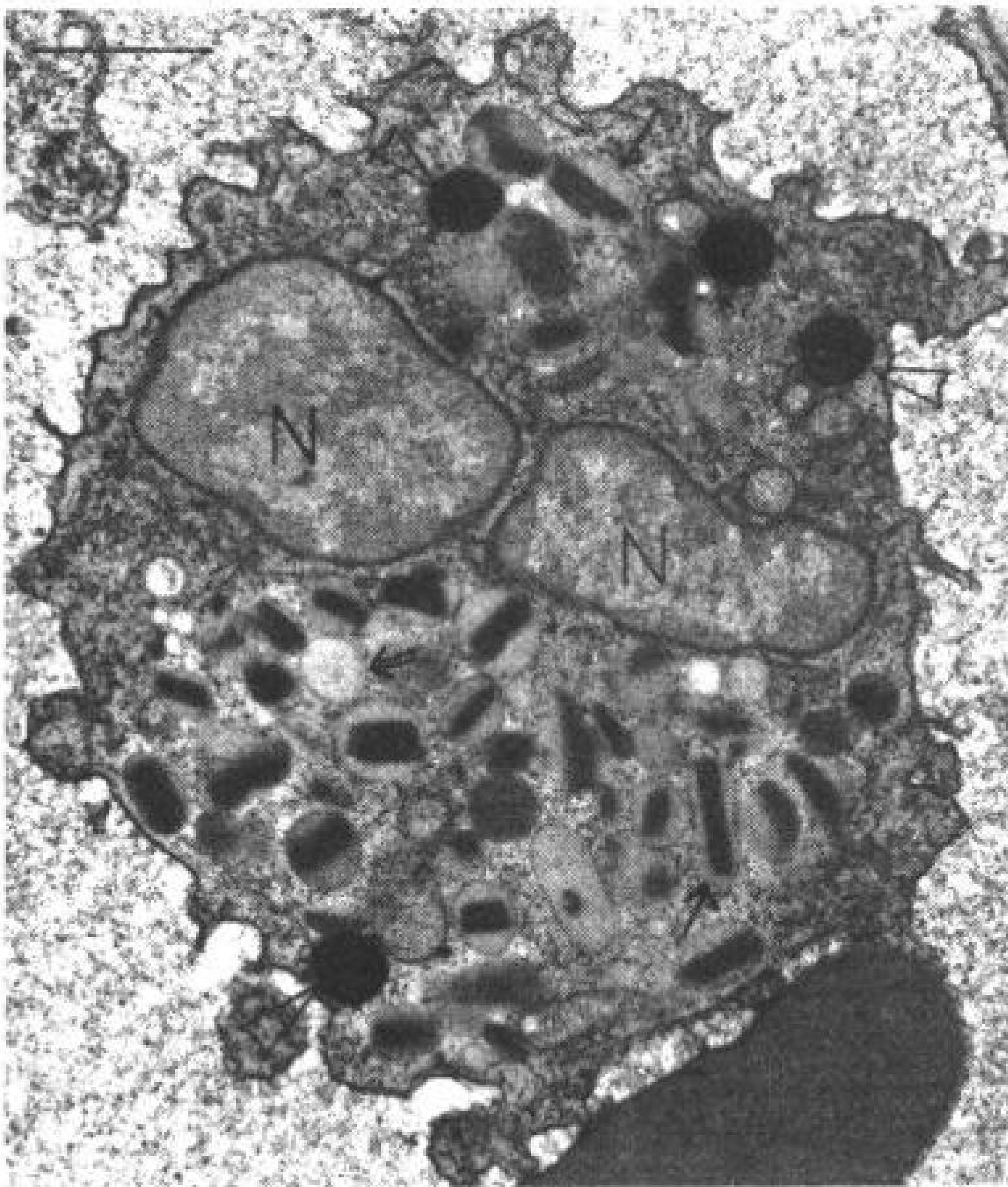


图 35.9 自发性高嗜酸性粒细胞综合征患者的外周血成熟嗜酸性粒细胞,显示双叶核(N);不规则的,钝的表面突起;颗粒和线粒体。黑色的胞质颗粒是单颗粒糖原。有 4 个大的圆形嗜锇酸脂质体(开放箭头)。特殊的颗粒是延长的膜结合结构,有致密的中心晶体和密度低的基质(箭头)。原始颗粒没有中心晶体(开放箭头)。样品用还原锇酸、锇酸钾亚铁化氰化合物技术处理。(Bar = 1.4 μm)(经允许改自 Dvorak AM, Ackerman SJ, Weller PF. Subcellular morphology and biochemistry of eosinophils. In: Harris JR, ed. Blood cell biochemistry. vol 2. Megakaryocytes platelets, macrophages and eosinophils. 伦敦:Plenum Pulishing Corp.,1991:237~344)。

嗜酸性粒细胞也是在骨髓内发育的终末分化的粒细胞,但与嗜碱性粒细胞不同,正常情况下它主要存在于外周组织(表 35.7)。嗜酸性粒细胞在带有处于环境界面的黏膜上皮的组织内皮最为丰富,包括呼吸道、胃肠道和泌尿生殖道下段。虽然不知道嗜酸性粒细胞确切的生命周期,但它比中性粒细胞寿命长,也许可在组织存活数周。

至少有三种细胞因子可促进嗜酸性粒细胞的发育和分化。GM-CSF,IL-3 和 IL-5 在体内都能促进嗜酸性粒细胞产生,但 IL-5 对嗜酸性粒细胞的分化和产生有最高的特异性[298]。IL-5 也可诱导发育完成的嗜酸性粒细胞从骨髓释放至血液[299]。IL-5 由 Th2 细胞产生,IL-3 和 GM-CSF 可由 Th1 和 Th2 细胞产生,嗜酸性粒细胞

(以及肥大细胞)也能精细地调控所有这些细胞因子(见下)。

嗜酸性粒细胞产生的递质

与肥大细胞和嗜碱性粒细胞一样,嗜酸性粒细胞也通过胞质颗粒相关递质、脂类递质及细胞因子的产生和释放完成其功能。

细胞内成分

嗜酸性粒细胞的特殊颗粒含溶酶体水解酶以及嗜酸性粒细胞特有的带正电荷的,对寄生虫和宿主组织表现为毒性蛋白质(表 35.8)[291]。颗粒的晶状核心由 MBP 组成,非核心基质蛋白含有嗜酸性粒细胞带正电荷蛋白(ECP),嗜酸性粒细胞来源的神经毒素(EDN)和嗜酸性粒细胞过氧化物酶。未发现人嗜酸性粒细胞 MBP 有酶活性,但它对蠕虫类寄生虫、肿瘤细胞和宿主细胞是有毒性的[292]。ECP 是带显著正电荷的多肽,对细菌、蠕虫和宿主细胞有毒性[292]。EDN 与 ECP 有一定的序列同源性[292]。它的命名(与 ECP 一样)是根据注入大鼠脑内时诱导大小脑功能失调的能力定的[292]。EDN 和 ECP 与胰核糖核酸酶有一部分相同序列,并有核糖酸酶催化活性;然而,EDN 的效率比 ECP 高约 100 倍[292]。在哮喘患者唾液、实验性吸入抗原后的鼻腔和支气管肺泡灌洗液,以及相关组织内可检测到嗜酸性粒细胞来源的带正电蛋白质浓度升高[291~293]。在过敏性疾病中,嗜酸性粒细胞颗粒蛋白可引起呼吸道上皮细胞的损伤和脱落,改变呼吸道的高反应性和纤毛功能,并引起局部水肿[291~293]。

1150

表 35.8 人嗜酸性粒细胞的产物

递 质	
主要递质贮存在预合成的胞质颗粒中	MBP, ECP, EDN, 嗜酸性粒细胞过氧化物酶、溶酶体水解酶、溶血磷脂酶(Charcot-Leyden crystals)
主要脂类递质适当活化后的产物	白三烯 C_4、lipoxins
细胞因子[a]	IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、Il-10、IL-16、GM-CSF、TNF-α、RANTES、MIP-1α、嗜酸性粒细胞活化趋化因子、TGF-α、TGF-β_1、VPF/VEGF

[a] 在某些情况下,所列的是建立在免疫组化证据表明至少一些肥大细胞表现出对细胞因子的免疫反应性基础上,而不是建立在具有生物学活性的细胞因子可从这些细胞释放的证据上。

嗜酸性粒细胞过氧化物酶与中性粒细胞和单核细胞的髓过氧化物酶不一样,由两条约 15kDa 的多肽链组成。它催化过氧化氢和卤化物离子(主要为溴化物)形成低氯酸(如次氯酸或次溴酸)。因此,在有过氧化氢和卤化物离子存在时,嗜酸性粒细胞过氧化物酶对蠕虫类和原生动物类寄生虫、细菌、肿瘤细胞和宿主细胞是有毒性的[292]。

人嗜酸性粒细胞是形成 Charcot-Leyden 晶体的蛋白质(人嗜碱性粒细胞也能产生)的主要来源。这些双金字塔形晶体常在过敏性哮喘患者和其他以嗜酸性粒细胞显著增加为特征的嗜酸性粒细胞相关疾病患者的唾液、粪便和组织中发现。这个有溶血磷酯酶活性的 17kDa 的蛋白质约占嗜酸性粒细胞总蛋白的 5%[293]。它在原始颗粒中出现且也与嗜酸性粒细胞膜相关。

脂类递质

嗜酸性粒细胞可产生 PAF 和花生四烯酸的花生酸样衍生物[300]。虽然嗜酸性粒细胞可经环加氧酶途径合成类前列腺烷,但主要的类花生酸类物质是花生四烯酸氧化酶经 5-或 15-脂加氧酶途径合成的产物。人嗜酸性粒细胞 5-脂加氧酶途径的优势产物是 LTC_4[300]。三个硫化多肽白三烯物质(LTC_4 及两个衍生物 LTD_4、LTE_4)是血管活性,平滑肌收缩和黏液分泌的有效刺激物质。此外,人嗜酸性粒细胞与中性粒细胞不同,含大量 15-脂加氧酶[300]。脂毒素,双脂氧化产物和某些多肽递质(如 P 物质)也可由嗜酸性粒细胞产生。

细胞因子

近年来认识到嗜酸性粒细胞是许多细胞因子的潜在来源,据此可推测这些细胞可通过前面提到的更多的机制影响 IgE 相关免疫反应以及其他炎症和生物效应[301~304]。免疫组化和免疫细胞化学的证据推测,这些嗜酸性粒细胞因子许多都贮存在特殊颗粒中。然而,由于细胞颗粒染色的假象以及目前还不清楚对嗜酸性粒细胞和肥大细胞颗粒细胞因子的免疫检测是否一定反应其存在生物活性,因此对嗜酸性粒细胞进行免疫细胞化学研究很困难[304]。然而,从这些发现可推测,嗜酸性粒细胞也许含有潜在的、可释放的预合成细胞因子库。

嗜酸性粒细胞精细的细胞因子可被分为 4 类:①生长因子,包括 GM-CSF,IL-3 和 IL-5,它们也许对嗜酸性粒细胞和其他细胞的存活和功能起自分泌或旁分泌效应;②趋化因子,包括 RANTES、MIP-1α 和嗜酸性粒细胞活化趋化因子;③与炎症、纤维化和伤口治疗与修复有关的细胞因子,包括 TGF-α、TGF-β、VEGF/VPF、TNF-α、IL-1α、IL-6 和 IL-8;④具有潜在免疫反应调节活性的细胞因子,如 IL-2、IL-4、IL-10 和 IL-16。

活化和募集的机制

IgE 可结合嗜酸性粒细胞上的 3 种结构:S 型凝集素 galectin-3,FcεRⅡ/CD23 和 FcεRⅠ[305]。虽然 CD23 和 FcεRⅠ都能在过敏反应部位包括呼吸道[306]的嗜酸性粒细胞检测到,但嗜酸性粒细胞在 IgE 相关免疫反应中的功能对它们的依赖程度还远未确定。人嗜酸性粒细胞也表达 IgG 受体,典型的是 FcγRⅠ(CD64)、FcγRⅡ(Cdw32)和 IgA 受体(FcαR)[305]。嗜酸性粒细胞 IgA 受体对分泌性 IgA 的亲和力和比其他形式 IgA 高[307]。由于嗜酸性粒细胞存在于呼吸道、胃肠道和泌尿生殖道黏膜表面,其 IgA 受体能结合这些部位的分泌型 IgA。

嗜酸性粒细胞也表达某些补体成分的受体,包括 C1q、C3b/C4b(CR1)、iC3b(CR3)和 C5a,细胞因子受体(包括 IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IFN-α 和 GM-CSF 的受体)以及多种化学引诱物的配体(其中许多很可能在过敏性炎症部位产生,包括 PAF、LTB_4、C5a 和几个趋化因子如嗜酸性粒细胞活化趋化因子)。这些嗜酸性粒细胞化学引诱物也能刺激嗜酸性粒细胞脱粒及过氧化物阴离子和其他氧化衍生物的形成。嗜酸性粒细胞胞内有雌激素和糖皮质激素受体。

除了这些受体外,嗜酸性粒细胞也表达特殊的整合素,这不仅参与它们向过敏性炎症部位的选择性募集,也帮助调节它们在脉管外组织内的活化[308]。嗜酸性粒细胞(和淋巴细胞)不像中性粒细胞,它可以迁移到白细胞黏附缺陷综合征患者的炎症部位,说明嗜酸性粒细胞可以某种不依赖 CD18 的机制迁入组织内。嗜酸性粒细胞表达 E 和 P 选择素的配体[309]。此外,嗜酸性粒细胞表达两种 α4 整合素——α4β1 和 α4β7。α4β1(VLA-4)结合组织纤黏蛋白内的结构域及 VCAM[310,311]。VLA-4/VCAM 相互作用也许有利于肥大细胞(嗜碱性粒细胞)[311]的活化和选择性募集,也有利于单个核白细胞迁移到过敏性炎症部位。α4β7 可结合黏膜血管地址素 MAdCAM-1。α4β7 在嗜酸性粒细胞和一些淋巴细胞类群(如黏膜营养性 $CD4^+$ 记忆 T 细胞[312])的共同表达,也许可解释它们在某些淋巴样组织内的共同出现。用某些抗 α4β1 和 α4β7 中 α4 的抗体,能阻止嗜酸性粒细胞流入表现出 IgE 相关过敏反应的皮肤和肺[313~314]。而且,α4 整合素的阻断甚至在不抑制嗜酸性粒细胞流入情况下,对实验性 IgE 相关过敏性反应也有好处,如抑制肺晚期相反应[315]。

需要强调,正常个体血液中嗜酸性粒细胞的功能特性(或"活化"状态)与 IgE 相关过敏性炎症的组织或渗出物中的嗜酸性粒细胞,或是循环中嗜酸性粒细胞显著升高的某些特异或非特异反应性主体(即嗜酸性主体)血液中的嗜酸性粒细胞有很大不同。例如,很早就知道源于嗜酸性粒细胞供体的嗜酸性粒细胞表现出代谢、形态学及功能的变化,这些是它们在体内被活化过的指征[291~293]。

1151

嗜酸性粒细胞的许多效应反应(如脱粒、类花生酸类物质的形成)可被特异的嗜酸性粒细胞活性因子(包括 GM-CSF、IL-3 和 IL-5)加强。这些细胞因子也许还影响嗜酸性粒细胞表现出某些免疫调节功能的能力。在骨髓内发育的早期嗜酸性粒细胞前体通常表达 MHCⅡ类分子,而大多数正常供体和嗜酸性粒细胞供体的血液嗜酸性粒细胞,即使在表现出体内活化的表型特征时也缺乏 MHCⅡ类蛋白的表达。然而,当血液来源

的嗜酸性粒细胞在体外加入特殊细胞因子(包括 IL-3、GM-CSF 和 IFN-γ)培养时,它们都会诱导合成表达 HLA-DR[316]。哮喘患者痰中的嗜酸性粒细胞也表达 HLA-DR。通过节段性气道或吸入的抗原刺激的过敏性主体和慢性嗜酸性粒细胞性肺炎患者的呼吸道(但血液中无)中的嗜酸性粒细胞也表达 HLA-DR。

尽管嗜酸性粒细胞活性因子类细胞因子很明显会参与嗜酸性粒细胞体内活化的多个方面,但这些细胞因子单独却不能引出嗜酸性粒细胞活化的全部表现[317],如过敏性主体嗜酸性粒细胞上 FcεRⅠ[318] 或 CD40[319] 表达增强。因此,很可能其他细胞因子和(或)组织来源的或胞外基质来源的活化刺激信号也参与促进嗜酸性粒细胞的特殊功能。

T 细胞

除了在 IgE 相关免疫反应的输入相之外,大量证据表明在某些 IgE 相关免疫反应中也表现出效应细胞功能[5]。T 细胞,特别是原位杂交或免疫组化分析表明可产生 Th2 型细胞因子的 T 细胞,在哮喘患者呼吸道的慢性过敏性炎症部位大量存在[320],能参与呼吸道及其他部位的晚期相反应[5,320,321],这些 T 细胞很明显是这些系统中 Th2 型细胞因子持续产生的一个重要来源,T 细胞作为许多参与慢性过敏性炎症的介质来源的重要性,也得到肥大细胞遗传性缺陷的 Kit^{W}/Kit^{W-v} 小鼠的 IgE 相关免疫反应模型的研究的支持。这些工作有力支持这个假说:T 细胞能调控嗜酸性粒细胞以肥大细胞非依赖的方式游走到过敏原刺激的部位(如呼吸道)[276,322~325],而且这个过程与呼吸道肥大细胞非依赖性的对乙酰甲胆碱的高反应性的发生有关[322]。

单核细胞、巨噬细胞和相关细胞

单核细胞和巨噬细胞可以晚期相反应和慢性过敏性炎症的细胞的渗出物中发现,很明显这些细胞是这些情况下细胞因子和其他介质的潜在来源[326,327]。在这些反应中,单核细胞和巨噬细胞可以 IgE 非依赖的方式激活,如由伴随这些免疫反应产生的 IgG(或补体成分)激活。然而,单核细胞系的细胞,包括树突细胞如朗格汉斯细胞,除表达其他 FcR 外,也表达 FcεRⅡ/CD23,在某些情况下还可表达 FcεRⅠ(参看"IgE 受体")。体外证据表明,CD23 和 FcεRⅠ至少允许某些单核细胞系细胞通过膜结合的 IgE 识别而浓缩过敏原,并可将源于这些过敏原的多肽呈递给 T 细胞(参看"IgE 受体")。这个工作说明,这些细胞可能参与放大和(或)持续 Th2 类免疫反应输出成分的 IgE 依赖机制。单核细胞、巨噬细胞或树突细胞经 IgE 和 $\alpha\gamma_2$ 型 FcεRⅠ的信号刺激后释放介质的程度还待确定。

IgE 相关急性反应、晚期相反应和慢性过敏性炎症的机制

概述

过敏原对致敏个体的刺激可引起三类反应:急性过敏反应、晚期相反应和慢性过敏性炎症。急性过敏反应可在过敏原刺激后数秒或数分钟出现,主要反应了肥大细胞和其他效应细胞释放递质的作用,这些细胞通常定居在过敏原刺激部位的组织内。然而,某些急性反应释放的介质,除了直接作用于被影响组织内的细胞(如血管内皮细胞、分泌性腺体、感觉神经和血管、呼吸道或胃肠道平滑肌细胞)外,也可导致循环中白细胞的募集。这些募集的白细胞又能影响正在发展的过敏反应的局部特性,如参与皮肤红斑(反映血流增加和淤积)和隆肿(反应血管通透性增加)的再现或发展,或参与呼吸道内气道狭窄的发生。这些晚期相反应直到抗原刺激数小时后才会发生,许多情况下,此时急性过敏反应的表征已大大减少或消失。

第三类主要的过敏反应方式是慢性过敏反应,典型地发生在长期受过敏原反复刺激的解剖部位。慢性过敏性炎症部位不仅含从血液中募集的效应细胞,主要包括数量大大增加的嗜酸性粒细胞和 T 细胞(其中许多是 Th2 表型的),也与相应组织内强烈的慢性(持续时间长)的变化有关。如人类过敏性哮喘的慢性过敏性炎症持续时,可与受影响的呼吸道各层组织的主要结构变化以及呼吸道平滑肌功能特性的显著变化有关(见

1152

下节)。由于过敏原重复刺激可导致总 IgE 及过敏原特异性 IgE 的升高,这种升高可增强肥大细胞和嗜碱性粒细胞分泌 IL-4、IL-13 和其他介质的能力,这些介质又可促进 IgE 产生,在此,慢性过敏性炎症也许与个体表现 Th2 细胞驱动的、IgE 相关免疫反应的倾向性长时间显著增强有关。

总之,急性过敏反应、晚期相反应和慢性过敏性炎症在它们的时间进程、对分泌决定其关键性介质的组织内定居细胞和募集的白细胞的依赖程度以及改变发生这些反应的组织结构和功能特性,在程度上都是不同的。因此,这些过敏反应被认为在与 IgE 相关的适应性免疫反应中有不同的作用,它们在过敏性疾病的临床表现上贡献可能也不一样。

急性过敏反应

PCA 是最简单的急性过敏反应模型。在这个模型中,已知过敏原特异性的 IgE(小鼠中为 IgG1)抗体被注射到皮肤里,在一定时间后(对 IgE 依赖的 PCA 反应,常为 24～48 小时),静脉注入特异过敏原[328,329]。继而在 IgE 注射部位的皮肤肥大细胞上诱导 FcεRⅠ交联,导致所有肥大细胞来源的介质的分泌(预合成的,脂类和细胞因子)。此因子又可导致多种局部效应,包括局部血管通透性增加(可引起血浆蛋白外泄,包括纤维蛋白原,从而导致交联纤维的局部解离和组织肿胀),血流增加,伴随红细胞血管内截留(由于小动脉扩大和毛细管液体丢失, 产生红斑)及其他效应,如痒(组胺刺激皮肤感觉神经引起)[263,328,329](图 35.10)。

典型地,这些 PCA 反应可在过敏原刺激后几分钟检测到(如在耳朵发生的反应可测耳朵厚度),其特征表现(如组织肿大)在 30～60 分钟后达到顶峰,然而迅速消失。传统上测量 PCA 的特征指标如血管通透性、组织肿大及最近的纤维蛋白降解测定,在反应达到高峰后降低得如此之快,以致于粗看之下会认为反应完全停止了。然而强烈的 PCA 反应的结果,如中等水平的组织肿大或纤维蛋白降解,在过敏原刺激 24 小时或更长时间后仍能检测到[274,330]。由于下面要提到的原因,小鼠与 IgE 依赖 PCA 反应相关的持续组织肿大,可能是此部位晚期相反应的一部分。

在正常小鼠,FcεRⅠ只在肥大细胞和嗜碱性粒细胞表达。而且,肥大细胞遗传性缺陷的 $Kit^{W}/Kit^{W\text{-}v}$ 小鼠(缺乏组织肥大细胞但含有嗜碱性粒细胞[230])不能表现出可检测到的 PCA 反应[274,329,330]。然而在实验前数周,将来源于同系野生型小鼠骨髓细胞体外培养的同细胞谱系的未成熟肥大细胞过继转移给 $Kit^{W}/Kit^{W\text{-}v}$ 以选择性修复其皮肤肥大缺陷,这些小鼠皮肤部位很容易发生 IgE 依赖的 PCA 反应[274,329]。相似的方法表明,在小鼠呼吸道[331]和胃[275]中发生的 IgE 依赖反应几乎所有受评价急性结果都与肥大细胞有关。根据这些证据推测,很可能肥大细胞对小鼠 IgE 依赖的急性过敏反应中至少主要特征的表现是必不可少的。

很明显,人的急性过敏反应(如注射过敏原的皮肤部位[332]或过敏原刺激的支气管部位[333])也与肥大细胞的广泛激活(通过形态学研究及检测过敏原刺激部位肥大细胞相关介质的组胺和肥大细胞类胰酶的释放来判断)有关[228]。然而,人类 FcεRⅠ(至少在某些情况下)可在除肥大细胞及嗜碱性粒细胞外的其他几类细胞表达,包括单核细胞和巨噬细胞、朗格汉斯细胞、循环中的树突细胞和嗜酸性粒细胞(参看"IgE 受体")。结果,人类一些急性过敏反应的表现也许包括这些细胞及肥大细胞和嗜碱性粒细胞的作用。

晚期相反应

对现在所称的晚期相反应(LPR)的最早描述是 Blackley 做出的,他在 1859 年注意到,吸入过敏原与几个小时后的哮喘综合征发生有关[334]。现在知道,大部分过敏性哮喘患者(估计 50%的成人哮喘病和 > 70%的儿童哮喘病)对吸入的过敏原表现出 LPR(或晚期反应)[335]。过敏性哮喘的气管反应性的典型方式是在过敏原吸入后约 10 分钟立即发生(或早期的)哮喘反应(临床上可通过气流阻塞或支气管狭窄的测量检出),并在 30 分钟左右达到高峰,然后在过敏原刺激 1～3 小时后完全(或几乎完全)缓解。LPR 患者表现出第二相支气管狭窄,这通常在 6～12 小时达到高峰,24 小时后缓解。

合适的急性过敏反应动物模型已建立许多年了,而非人 LPR 模型发展缓慢,未得到广泛接受。因此,关于这些反应的特征和可能的病理机制的数据主要来自于对人的研究。关于人 LPR 有几点已很明确:①这种

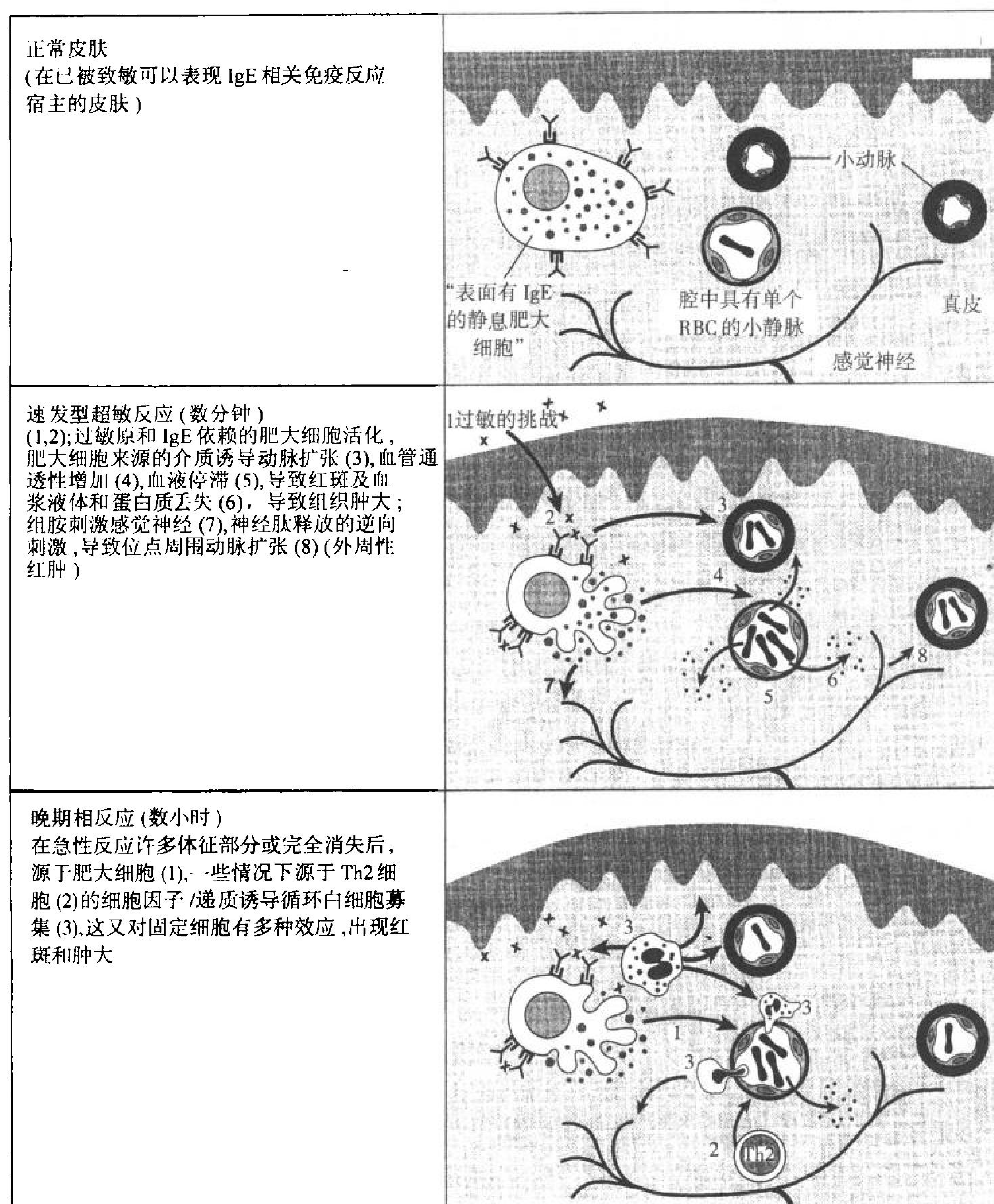


图 35.10 皮肤内 IgE 相关的速发型和晚期相过敏反应表现中主要的细胞相互作用和病理生理事件。

反应可由皮肤(图 35.10)上呼吸道(鼻)和肺内合适的过敏原刺激引起;②在这些反应之前几乎都有急性过敏反应,并且其中至少有一些关键的病理特征通常在 LPR 发生之前缓解;③LPR 的体征(如皮肤红肿、流涕、气道狭窄)和症状(如鼻腔刺激引起的喷嚏、呼吸道下段刺激引起的喘息和咳嗽)特征,与循环白细胞被募集到这些反应部位有关;④许多与减少 LPR 部位白细胞募集有关的治疗措施也能减少作为这些反应特征的体征和症状[335~338]。

也应注意到,在人体内,并不是所有产生急性反应的肥大细胞活化方法都会产生随后的 LPR。如,在正常个体皮肤内注射可待因马上可引起临床上过敏原刺激结果无法区分的皮肤反应,但它并不产生随后的"晚期"细胞反应[339]。

根据这些发现,广泛相信许多(可能是大部分)与 LPR 反应有关的病理生理变化直接或间接地反映了募集到这些效应部位的细胞的功能。在人体中,募集到 LPR 部位的白细胞包括嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和 T 细胞;所有这些细胞都可通过提供前过敏反应递质和细胞因子影响 LPR 反应。

1153

1154

LPR 部位嗜碱性粒细胞的募集和活化，得到对在抗原刺激后几小时后获得的鼻腔灌注或支气管肺泡灌洗(BAL)液分析的支持，这些分析显示，组胺、TAME-酯酶活性和 LTC4 升高，而 PGD2 和类胰酶不升高[227,228]。由于 Th2 在 LPR 相关的渗出物中存在以及它们的功能特性，Th2 细胞也许参与某些 LPR 相关病理的发展[335]。

由于在人体进行临床研究及确定个体因素在复杂炎症反应中的特定的重要性的困难，关于 LPR 的许多基本问题还未解决。其中之一是肥大细胞和 T 细胞控制这些反应的相对重要性。针对过敏原刺激的临床 LPR 在缺乏前面的急性过敏反应的个体中极少发生[335]。而且，对 T 细胞的过敏原刺激显然能诱导其释放细胞因子，这些因子可解释 LPR 的特征——嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞及其他循环白细胞的募集和功能活化[335]。最后，皮质类固醇能显著抑制 LPR 表达；在它们的许多活性中，这些试剂可抑制 T 细胞产生细胞因子，但对肥大细胞释放组胺和其他预合成介质的释放无(或很少)有影响[281,340]。这些结果支持假说：LPR 主要依赖于 Th2 细胞，而对肥大细胞依赖较少[335]。

然而，在单以 IgE 被动转移致敏的小鼠中，皮肤[274]和胃[275]内 IgE 依赖的白细胞募集，以及 IgE 依赖的呼吸道功能改变(这也在人 LPR 中观察到。即呼吸道对胆碱能激动剂乙酰甲胆碱的反应性升高)[331]。大部分(如果不是全部)是肥大细胞依赖性的。这些发现支持 LPR 的某些重要表征在过敏原刺激部位是由 IgE 和肥大细胞依赖机制引起(至少在小鼠中是这样)的观点。而且在小鼠这些反应中，IgE 和肥大细胞依赖的白细胞募集的实际数量反映了源于肥大细胞的 TNF-α(可能还有其他细胞因子)的作用[274]；皮质类固醇和 CsA(可降低肥大细胞[88,341,342]和 T 细胞[281,343]的细胞因子产量)可显著抑制小鼠 IgE 和肥大细胞依赖的皮肤白细胞募集[282]。最后，已经报道在某些受试者中，晚期哮喘反应可由过敏原非依赖的方式引起，包括吸入蒸馏水或锻炼[335]。尽管这些看来是 IgE 和过敏原非依赖性的 LPR 的病理发生及临床意义还未充分阐明，然而这些现象的发生支持"也许有多种病理发生途径导致临床 LPR，其中一些基本上与免疫反应无关"的假说。不过，很可能是过敏原依赖的 LPR 既能由 IgE 和肥大细胞和(或)其他带 FcεRⅠ的细胞相关的机制引起，也可由 T 细胞有关的机制引起；在许多受试者中，这两种机制都参与反应。

慢性过敏性炎症

在自然发生的过敏性疾病中(如过敏性哮喘，过敏性鼻炎和特应性的皮炎)，患者反复(全年或季节性的)暴露于侵犯性过敏原超过几个星期到数年。虽然每种疾病的特殊病理学特征在不同的解剖部位受影响是不同的，但还是发现了一些普遍性质：①这些部位的炎症渗出物含嗜酸性粒细胞和 T 细胞(特别是 Th2 细胞)；②受损伤组织表现出持久的结构变化；③受损组织功能上出现显著改变。

现在普通相信，许多(如果不是全部)慢性过敏性炎症部位发生的慢性组织变化和器官功能改变，都是过敏反应本身直接或间接的结果[344,345]。支持这种观点的证据类似于前面讨论过的 LPR 相关的病理学。特别是在慢性过敏性炎症部位出现的细胞和介质的性质，可以解释为受这些反应影响的组织特征的结构和功能变化；而且直接抗慢性过敏性炎症发展的治疗措施(如皮质类固醇)，不仅能降低炎症反应程度和渗出物中的嗜酸性粒细胞和 T 细胞，而且也能最终导致与这些反应相关的结构和功能变化得到(至少是部分得到)改善[346~348]。

由于在人实验性 LPR 和自然发生的慢性过敏性炎症部位出现的炎症反应细胞渗出物成分上相似(主要是 T 细胞和嗜酸性粒细胞，带有少量单核细胞、巨噬细胞和嗜碱性粒细胞)，慢性过敏性炎症部位的渗出物可能是持久(或重复)暴露给过敏原引起的多个互相重叠的 LPR 的结果。然而，已经知道，在小鼠中，某些慢性过敏性炎症可导致以细胞因子依赖方式产生局部的带淋巴样器官性质的结构[349,350]。而且大量过敏原特异性 T 细胞在慢性过敏性炎症部位的存在，也导致 T 细胞产生的细胞因子局部浓度增加。因此，慢性过敏性炎症相关的病理学从定性和定量上，都不同于实验诱导的 LPR 部位的观察结果。

肥大细胞——白细胞细胞因子级联

正如下面要讨论的(见"IgE 相关过敏反应的特性")，许多讨论都是关于 IgE、肥大细胞以及其他 FcεRⅠ+

效应细胞与T细胞在慢性过敏性疾病(特别是过敏性哮喘)病理发生中的相对重要性。尽管这是一个非常活跃的重要的研究领域,但我们感到关键问题不是IgE、肥大细胞或T细胞在慢性过敏性炎症病理发生中谁起主要作用(因为两种机制很可能都是重要的),而是确定这些疾病特殊的有临床意义的特征在多大程度上反映了这些不同效应机制的特异贡献。

我们小组已提出一个假说:"肥大细胞-白细胞细胞因子级联"在呼吸道和其他部位的IgE相关过敏性炎症部位的启动和持续中起着关键作用[228,262,264,273]。我们认为肥大细胞经FcεRⅠ活化可启动急性和慢性相反应成分。后者部分是通过释放能影响其他效应细胞募集和功能的TNF-α及其他细胞因子完成的。这些募集细胞可产生某些肥大细胞暴露给过敏原产生的细胞因子,也可产生肥大细胞不能产生的新的细胞因子和其他介质,促进炎症反应的进一步发展。某些肥大细胞产生细胞因子和TNF-α、TGF-β,也可通过作用于反应部位的成纤维细胞和其他细胞作用呈慢性过敏性炎症[351,352]。最后,肥大细胞活化可直接或间接促进组织内某些其他细胞释放细胞因子(如在呼吸道,这些细胞包括肺泡巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、支气管上皮细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞、上皮细胞和神经);随后,在这种反应中释放的各种细胞因子参与血管和上皮改变,也参与组织重建、血管形成及纤维化(这在IgE相关慢性过敏性炎症和许多其他与肥大细胞活化和白细胞浸润有关的疾病中非常普遍)。在这些复杂的自然进程的某些环节,源于肥大细胞、嗜酸性粒细胞和其他募集细胞细胞因子和其他介质也许参与这些反应的下调。

除了在过敏性疾病中的作用外,肥大细胞-白细胞细胞因子级联也参与宿主保护,包括在对微生物感染的先天性免疫(其中肥大细胞以不依赖于IgE方式活化)和对寄生虫的免疫反应(见下文)中[356]。

IgE相关免疫反应在宿主保护中的作用

IgE相关免疫反应在自然选择中有什么优点呢?详细的证据强烈表明,这类免疫反应是作为宿主抗寄生虫(特别是蠕虫)免疫的一个重要组成部分发展起来的[246,247,357]。这些寄生虫感染可引起初次IgE应答和二次IgE应答,其中一些IgE对源于寄生虫的抗原有特异性。对这些感染的反应也常表现出Th2类免疫的特征:①在感染的某些时期,血中嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞增加;②寄生虫感染(或虫卵沉积)的部位组织内会出现与人类过敏性疾病慢性过敏性炎症发生部位成分相似的浸润物,主要有嗜酸性粒细胞、T细胞和嗜碱性粒细胞;③形态学和生化分析表明,这些感染与肥大细胞脱粒和递质释放有关,源于肥大细胞和嗜碱性粒细胞的产物,包括生物胺(此时主要是肥大细胞和嗜碱性粒细胞产生)和某些细胞因子(可源于炎症浸润物中的肥大细胞和多种其他类型细胞),可通过直接和间接的作用促进寄生虫驱除和降低其活力或生殖率;④出现在寄生虫感染部位炎症浸润物中的嗜酸性粒细胞能产生几种对蠕虫有直接毒性作用的蛋白质。

尽管有这些发现,还是很难证明IgE相关免疫反应的某一成分(包括IgE本身)在宿主对这些寄生虫的保护性免疫反应中是真正必需的。由于人体研究固有的限制,要证明IgE相关免疫反应在人类抗寄生虫感染中的重要性就更难了。如,受试人群高水平抗血吸虫IgE抗体与埃及血吸虫再次感染率降低有很强相关性[358]。但这种相关性的基础还不清楚。由于重要的免疫反应的表现中有大量冗余性,要证明IgE、肥大细胞或嗜酸性粒细胞在宿主抗寄生虫感染中的关键作用的困难就不奇怪了。维持对蠕虫类寄生虫的有效免疫反应太关键了,故而不能允许其中任何一个效应成分的去除(如IgE、肥大细胞或嗜酸性粒细胞)。例如,用旋毛形线虫和鼠类圆线虫进行的实验性感染的持续时间,肥大细胞遗传性缺陷的 $Kit^{W}/Kit^{W\text{-}v}$ 小鼠比相应的正常小鼠要长[359~362]。然而,还不清楚这种缺陷在多大程度上反映了这些小鼠的肥大细胞缺陷而不是C-*Kit*相关的其他血系细胞异常[360~362],而且在肥大细胞缺陷小鼠中抗寄生虫免疫的破坏不如无胸腺小鼠严重,在每个例子中,肥大细胞缺陷小鼠甚至都能最终消除感染。相似地,$IgE^{-/-}$ 小鼠在对 *S. mansoni* 的免疫应答中只表现出相对较小的异常[363]。

同时遗传性缺乏IL-3的 $Kit^{W}/Kit^{W\text{-}v}$ 肥大细胞缺陷小鼠抵御线虫类圆线虫属(*Stronggloids venezuelensis*, *S. v*)第一次感染的能力受到很大损害;在感染时这些小鼠骨髓嗜碱性粒细胞也不增加,感染的肠道黏膜肥大细胞也

无增生[230]。然而 $IL\text{-}3^{-/-}$ 小鼠皮肤接触超敏反应受到损害,说明某些 T 细胞功能也受到一定损害[364]。因此,还不可能评估 $Kit^{W}/Kit^{W\text{-}v}$,$IL\text{-}3^{-/-}$ 小鼠对 *S.v*,感染的免疫反应缺陷在多大程度上反映了其肥大细胞和嗜碱性粒细胞缺陷,又在多大程度上反应其 T 细胞或被 SCF/C-*Kit* 和(或)IL-3 影响的其他细胞谱系的障碍。

1156 关于肥大细胞或嗜酸性粒细胞在抗寄生虫中的关键作用最有力的证据来自于对外寄生物如壁虱的免疫反应。然而,嗜碱性粒细胞和肥大细胞在对壁虱反应中的相对重要性因宿主种类和壁虱种类不同而不同[227,365~367]。皮肤肥大细胞和 IgE 看来在获得性的饲喂血蜱属 *longicornis* 壁虱的免疫抵抗力的局部表现是必需的[365],而肥大细胞和嗜碱性粒细胞都参与对多种蜱类壁虱革蜱属变异性幼虫皮肤的免疫应答[366]。对抗嗜碱性细胞和抗嗜酸性细胞抗体进行的研究认为,在豚鼠,嗜碱性和嗜酸性粒细胞都是破坏皮肤饲喂和促进对花蜱属 *americanum* 壁虱幼虫获得性免疫效应的重要效应细胞[367]。

在某些背景下,IgE 相关的免疫反应的一些成分看来是由寄生虫共选择的,其对于这些感染相关病理学的贡献比对有效免疫的贡献要大。如对肥大细胞缺陷的 $Kit^{W}/Kit^{W\text{-}v}$ 研究表明,肥大细胞在抗线虫奈瑟氏菌属(*N.b*)初次感染中并无关键作用[359]。在 C-*Kit* 突变体 W_S/W_S 肥大细胞缺陷大鼠,*N.b* 产卵量高峰感染的第 8 天比相应的 +/+(野生型)大鼠低大约 3.5 倍[368]。相似的,在另一品系的正常大鼠中,用 rrSCF 处理可升高用 *N.b* 初次感染过程的黏膜肥大细胞增生水平和虫卵产量[369]。相反,用抗 SCF 中和抗体处理这些大鼠,可显著降低在 *N.b* 感染中观察到的黏膜肥大细胞增生反应,同时也显著降低寄生虫产卵量。

这些模型中 *N.b* 虫卵产量也受到其他 SCF 反应性细胞谱系的影响,包括负责肠内电的"心律器"活性细胞(Cajal 间质细胞),(它们也表达 *C-Kit*[370])。然而,这些发现与肥大细胞可能确实在 *N.b* 感染中促进寄生虫生殖的效果是一致的。例如,数量增多的肠黏膜肥大细胞活化释放介质,结果升高了肠血管和肠黏膜的通透性,促进了寄生虫的营养。这个假说也与另一发现一致;用 IgE 抗体抑制 IgE 水平可降低小鼠中与 *S. mansoni* 初次感染相关的该寄生虫负荷和卵产量[371]。

在其他情况下,肥大细胞也许对寄生虫活力很少有影响或检测不到,但它们也许可促进与对寄生虫的免疫反应相关的组织病理过程。例如,用选择性修复了皮肤肥大细胞缺陷的肥大细胞遗传性缺陷 $Kit^{W}/Kit^{W\text{-}v}$ 小鼠的研究显示,肥大细胞可显著放大实验性 *L. major* 寄生虫感染部位皮肤损伤的强度和大小,在某些情况下,确实能延长反应持续时间[372]。然而,损伤在肥大细胞缺陷小鼠和同系正常小鼠最终都消退了。肥大细胞的有无对从皮肤损伤中恢复过来的存活寄生虫的数量影响很少或没有影响[372]。

长期以来,一直认为嗜酸性粒细胞是宿主抗蠕虫类寄生虫的重要成分。然而,更近的研究对此提出了疑问,因为抗 IL-5 中和抗体可放弃血液、骨髓和组织中与蠕虫感染有关的嗜酸性粒细胞增多,但并不影响初次或二次感染的严重性[373,374]。这样,即使嗜酸性粒细胞确能在体外起蠕虫毒性效应细胞的作用,其在体内抗寄生虫宿主反应中的有益功能还是不能得到确认。另一方面,嗜酸性粒细胞也参与与某些 IgE 相关免疫反应相关的病理学,因为嗜酸性粒细胞来源的荷正电的蛋白质(对蠕虫有毒性)也能破坏宿主组织(参看"IgE 相关免疫反应效应细胞和递质")。

最后,在被旋毛形线虫感染的大鼠肠固有层内产生的 IgE,>99%的部分不进入血液,而是转运到肠腔,并在那儿很快被降解;这种肠内 IgE 在寄生虫免疫中是否有保护性功能还有待确定[357,375]。

总之,最后的总结看来应该是:寄生虫诱导的 IgE 相关的免疫反应可保护宿主,也可损害宿主(某些情况下,两种情况都有),这取决于特定的寄生虫、遗传决定的或后天决定的宿主免疫效应的性质,可能还有其他许多因素。

针对某些病毒[376,377]或细菌[378~380]的 IgE 效应也有报道。在这种效应还没有任何保护功能得到确认的同时,已经提出对呼吸系统病毒的 IgE 效应也可参与感染过程中呼吸道症状的发展[376,377],针对细菌的 IgE 抗体参与支气管哮喘[378]、由特异反应性的皮炎[379]和慢性支气管炎[380]的恶化。另一方面,最近的工作表明,肥大细胞,特别是肥大细胞依赖的白细胞募集,在对细菌感染的先天性免疫保护中有重要作用[353~355]。然而,看来在这些条件下,肥大细胞细胞因子和其他肥大细胞来源的递质释放以不依赖于 IgE 的方式发生,例如在对补体活化[355]或源于细菌自身[354]的产物产生的反应时发生。

IgE 相关过敏性疾病的特征

过敏性疾病的一般特性

过敏性疾病是一类与环境过敏原特异性 IgE 产生相关的超敏反应疾病，作为它们病理发生的一部分并被认为与 IgE 介导的反应有关。这些疾病很盛行，如过敏性鼻炎（枯草热）影响 22%或更多的美国人[381,382]，而过敏性哮喘据认为影响着至少 2000 万美国人[383,384]。在美国，过敏性疾病引起的经济损失包括治疗费用和生产损失，单 1990 年估计就达 64 亿美元[385]。而且这些疾病的发病率似乎还在不断上升，至少从可获得的数据表明是如此[381~384]。

对过敏性疾病临床特征的详细描述或者对引起其发病的许多因素做全面叙述不是本章讨论范围。不过，我们会对一些主要疾病的性质做简要总结，因为这将有助于说明可引起 IgE 相关超敏反应表现不同的病理机制是怎样在这些疾病的特定临床案例中起作用的。

最好的急性过敏反应例子可能是 IgE 相关的过敏症，这在致敏个体接触过敏原（如被蜇或摄入某些食物）后几分钟内就可诱导严重的全身反应，如不治疗可迅速导致死亡（见下）。

在这个例子中，肥大细胞和嗜碱性粒细胞 IgE 依赖活化后释放的介质可解释几乎其所有病理学改变。相反，与特异反应性的皮炎相关的病理学主要反映了慢性过敏性疾病的结果，而过敏性鼻炎和哮喘也许反映了所有三种 IgE 相关超敏反应的作用：急性、晚期相和慢性。

一个个体发生过敏性疾病的可能性是遗传因素和环境因素的综合作用。单卵双生子发生过敏性疾病的一致性显著高于二卵双生子[386]。然而，单卵双生子过敏性疾病的一致率尽管很高，可并不是 100%[386,389]，单卵双生子也不一定对同一种过敏原都产生敏感性[388]。相似的，双亲都是特异反应性的个体发生过敏性疾病的风险大大高于单亲特异反应性的个体（约 47%：24%）[389]，但这些个体特定的过敏性疾病并不同于其双亲[387,389]。一些可影响 IgE 相关过敏性疾病发生和表现的遗传因素在“IgE 合成的调节”一节讨论。

除了遗传影响和特定过敏原的分子特征外，可能许多环境因素对过敏性疾病发生也有重要影响，并且在这些单因素间可能有复杂的相互作用。这些因素可分为三类：暴露给过敏原的程度和方式；接触过敏原的年龄；影响个体对过敏原的应答本质的因素。

暴露给过敏原的程度和方式

针对昆虫毒素 IgE 反应的诱导可在一次或少量几次接触过敏原后即可发展，典型地，皮内和（或）皮下刺激每次需约 50mg[38]，而且受试个体即使在没有其他特异反应性表现（如过敏性鼻炎或哮喘）也可对昆虫毒素发生具有潜在致命性的超敏反应。据报道，针对灰尘螨过敏原 Der p 1.0 的 IgE 反应的发展，要求暴露给至少 2mg 过敏原/克灰尘，高水平的暴露给过敏原与受影响人群高过敏性哮喘发生率相关[390,391]。再者，与特异反应性的疾病相关的过敏原一般在患者所处环境中长期存在（如花粉、灰尘、蟑螂和其他伴生动物来源的过敏原等）。很明显，许多因素可影响暴露给特异抗原的持续时间和数量：①地形（植物及其花粉分布情况）；②经济条件（处于社会经济下层的个体很难避开蟑螂，这是人哮喘过敏原的一个重要来源[34]，而上层人可以有温暖、湿度适宜的房子；而室内空气换气率低，有利于高水平灰尘相关的过敏原产生[391,392]；③社会因素（长期以来一直暗示童年活动相对较少，使孩子呆在室内，这样就延长了暴露给室内过敏原的时间）（哮喘的电视理论[392]）。

暴露给过敏原时的年龄

几种因素可参与年龄对 IgE 效应发展的影响[393]。例如，胃肠上皮的屏障功能——限制外来抗原穿过上皮到达间质组织的能力——在出生时发育不充分[394]。这可能可以解释这样一个观察结果：幼年时暴露给食

物过敏原的遗传性感染婴儿有更高的早期发生对这些过敏原 IgE 效应的风险[393]。这种暴露可以是婴儿摄入食物的结果，如果婴儿在哺乳期，也可是母亲摄入食物的结果[393,395,396]。这些婴儿以后也表现出对吸入过敏原的过敏反应高发生率，尽管对这种相关性的原因还不完全清楚。

暴露时的年龄也可影响对吸入过敏原的过敏反应的发展。例如，桦树花粉诱导的 IgE 效应和过敏性鼻炎在斯堪的那维亚的儿童比其他季节出生的儿童发生率更高[397,398]，这种升高的对 IgE 效应的敏感性在多大程度上反应了与婴儿呼吸道上皮功能相关而不是与免疫系统本身发育相关，还有待确定。无论如何，现在已很清楚对过敏原的免疫反应可以在婴儿很早时期发生，某些情况下，甚至在子宫内就产生[393,399]。然而，大多数成年后最终发生过敏反应的人并没有早期发生过敏反应的历史。

影响个体对暴露的过敏原发生反应本质的因素

细胞因子在免疫学意义上的过敏反应启动和调节中的关键作用暗示，影响细胞因子产生(或这些分子对其靶细胞的影响)也许是影响这些效应的最终表现。已经提出多种可能的机制。流行病学证据已把日本某些地方由日本雪松花粉所致的过敏性鼻炎和哮喘发生率的大大增加和与此平行的那些地区柴油卡车数量的急剧上升联系起来[400]。柴油颗粒增强 IgE 反应的机制至少已提出了三个：①柴油颗粒吸收花粉蛋白，帮助把它们送到呼吸下段(花粉颗粒本身比柴油颗粒大得多，主要位于鼻甲处[400])；②柴油粒子作为颗粒佐剂，有利于 IgE 效应的发生[400,401]；③柴油粒子含有某些芳基烃类物质，这些物质可在体外增强 B 细胞 IL-4 和 CD40 依赖的 IgE 合成[402]。被动吸烟也与过敏性疾病发生率升高有关，尽管其机制还未完全了解[393,403]。最后，流行病学证据暗示在生命早期诱导 Th1 型反应的感染或免疫可降低以后发生过敏性疾病的危险[404~406]。

IgE 相关过敏疾病举例

过敏症

过敏症是一种急性全身性的对过敏原的超敏反应，典型地涉及多种器官系统，如不治疗，可迅速导致死亡[407,408]。由于这些反应可由源于相对没有毒性的多种试剂(表 35.9)的过敏原引起，因此是宿主免疫系统对外来物发生反应的代价与利益间最不协调的失衡，过去在用过敏症一词指一种急性过敏反应时，其定义只有指 IgE 抗体(在小鼠为 IgE 和(或)IgG1 抗体)有关键病理作用的反应。然而，与 IgE 介导的过敏症无差别的临床表现也可能由许多其他导致肥大细胞——嗜碱性粒细胞递质释放的全身活化的机制引起。这些 IgE 非依赖的过敏症样反应可由免疫复合物(可直接或通过补体活性激活肥大细胞)，其他机制导致的补体活化(包括与透析膜相互作用或是凝血细胞活化的结果)或能直接激活肥大细胞或嗜碱性粒细胞的物质(如 50% 葡萄糖的高渗透溶液、甘露醇或某些放射性造影剂)引起[407,408]。

临床遇到的大部分过敏症或过敏症样反应是由青霉素或其他抗生素、食物或蜇人昆虫的毒素 IgE 依赖反应引起，或者反映对静脉给予的放射性造影剂发生的 IgE 非依赖反应的结果[407,408]。对抗生素或昆虫毒素的过敏症发生看来与特异反应性状态无关，而对以食物过敏原致命的过敏症反应典型地发生在带有其他特异反应性疾病表现的受试者[35~37]。

用相对大量的过敏原(如 100μg)经静脉内给药诱导小鼠过敏症，可以在肥大细胞遗传缺陷小鼠中发生但在 FcεRⅠ和 FcγⅢ共有的 FcRγ 链的小鼠中并不发生[160,161]。小鼠肥大细胞可被 FcεRⅠ或 FcγRⅢ聚集，活化而释放递质[19,168]，用结合 FcγRⅡ/Ⅲ的抗体(2.4G2)静脉内处理正常小鼠可诱导类似于过敏症的综合征[161]。与 2.4G2 诱导的过敏症相关的致死性和生理变化在肥大细胞遗传性缺陷小鼠中减少但不完全缺乏[161]。这个证据表明，在小鼠中，这些过敏症模型的某些性质(包括心肺功能改变和死亡)可不依赖于肥大细胞或 FcγRⅢ，但这些 FcεRⅠ非依赖的效应很大程度上依赖于 FcγRⅢ。尽管还未确定负责这些过敏症模型充分表现的带有 FcγRⅢ非肥大细胞的效应细胞，但单核细胞和巨噬细胞是很可能的候选者[161]。

这些发现与在肥大细胞缺陷型小鼠或 IgE 基因敲除小鼠中发生潜在致命性过敏症的报道一起表明，至

表 35.9　可在人体中诱导 IgE 相关过敏症或过敏样(如 IgE 非依赖性的)反应的药物及其可能机制

机　制	刺激递质的类型	举　例
IgE 介导的对蛋白的反应(初始或转基因的)		
注意:罕见,在变应原免疫治疗过程中引起死亡	毒液[a]	膜翅目昆虫、[a]红蚂蚁,蛇
	空中传播的变应原	花粉、霉、"危险物"
	食物	花生、牛奶、鸡蛋、海鲜食物、谷粒、
	酶	胰蛋白酶、蛋白分解酶、链激酶
	异种血清	破伤风抗毒素、抗淋巴细胞球蛋白
	人蛋白	胰岛素、促皮质素、加压素、血清和精液蛋白
	其他	乳胶、精蛋白
IgE 介导的对蛋白质-半抗原偶合物的反应		
	抗生素[b]	青霉素、头孢菌素、磺胺类药
	消毒剂	环氧乙烷
补活化和过敏毒素的产生(它们诱导嗜碱性肥大细胞递质的释放和其他影响)	人蛋白	γ-球蛋白,其他食物产物
	透析	血与某种透析膜接触
从嗜碱性粒细胞/或肥大细胞释放递质的直接(IgE 非依赖性)活化作用	高渗溶液	放射性造影剂,[b]D-甘露醇
	药物	鸦片制剂、箭毒、右旋筒箭毒、万古霉素
	其他	葡聚糖、荧光素(血管造影术方面)
未知	非类固醇抗炎药	阿斯匹林、吲哚美辛
	麻醉药	赛罗卡因、硫喷妥钠
	防腐剂	焦亚硫酸盐、苯甲酸脂
	类固醇	黄体酮,皮质醇
	运动	
	运动和食物	
	特发性过敏反应	

[a]严重过敏症的常见原因;25%有患病危险,每年有数以万计的病例(但死亡 < 100 例)。
[b]严重过敏性或类过敏性反应的最普遍原因,大约有 1/5000 的患病概率(致死 < 10%,但这些递质说明大部分死亡是由于 IgE 依赖或非依赖的过敏症)。某种食物也说明许多死亡是由于 IgE 依赖的过敏症。

少在一定实验条件下,肥大细胞、FcεRⅠ和 IgE 在小鼠过敏症中并不需要。另一方面,IgG 或 FcγRⅢ依赖的鼠科动物过敏症缺乏与小鼠活动过敏症相关的一些生理变化,包括与这些反应相关的迅速发生且可部分逆转的气道狭窄[160,161]。因此,甚至在小鼠,IgE 和肥大细胞看来在与大剂量过敏原刺激引起的过敏症相关的病理生理变化的充分展现中也是需要的。

然而,小鼠过敏症模型与自然发生的人的过敏症有重要差异。在人类,没有证据表明除 IgE 之外的抗体能诱导过敏症中的 FcεR 依赖的肥大细胞活化。再者,人体中致命的过敏症反应可由很少量的过敏原引起[407,408]。当这些反应由昆虫毒素诱导时(研究得很清楚的一种过敏症),都伴随着血液中高水平肥大细胞类胰酶的出现,这是这类细胞大范围活化的明确证据[410]。在食物引起的过敏症中,血清肥大细胞类胰酶水平正常或只有很小升高[37];这是反映摄入的食物过敏、活化肥大细胞的种类和解剖定位,还是在这种过敏症中嗜碱性粒细胞的作用更大,或者是其他因素,这些还有待确定。

然而,广泛认为人 IgE 相关过敏症大多数(如果不是全部)体征和症状反映了:①全身性的肥大细胞和(或)嗜碱性粒细胞以 FcγRⅢ依赖的方式活化;②这些细胞递质释放的末端器官结果[407,408]。比较温和的急性全身性过敏反应也许主要与皮肤有关,可表现出大面积的血管通透性升高、红斑和瘙痒,这种病状称荨麻疹。一些作者认为这些病例是温和过敏症的例子,而其他作者将过敏症限制为那些有呼吸系统和(或)心血管表现的急性全身性过敏反应。在更严重的病例中,多个器官系统(包括上呼吸道)中血管通透性大大升高,导致喉肿大和上呼吸道阻塞,以及血管内液体迅速丢失。后一种改变,与过敏症中介质释放引起的其他结果(如溶血的血管紧张性降低及心脏收缩减弱)一起,导致低血压和昏迷。呼吸也可因呼吸道低端显著狭窄而被破坏,导致严重的急性哮喘,也可以有明显的胃肠道症征和体征(恶心呕吐)。

在一些严重的过敏症病例中,患者经适当治疗、病情稳定几小时后,可发生病情恶化。这些全身性 LPR,甚至可以发生在过敏症早期治疗中用糖皮质激素治疗的患者中,还不清楚这些反应的病理发生与局部 LPR(如过敏原刺激致敏体后在皮肤或呼吸道产生的 LPR)在多大程度上相似。

过敏性鼻炎

过敏性鼻炎(枯草热)影响着约22%或更多的美国人,是最常见的过敏性疾病[381,382]。症状包括喷嚏、鼻腔阻塞、瘙痒和鼻溢(鼻分泌物增多),可能主要反映在对空气过敏原的反应中IgE依赖的效应细胞(主要是肥大细胞和嗜碱性粒细胞)释放介质的结果。因此,症状可以是季节性的(与青草、杂草或霉菌孢子的存在相关)或全年都有(如对尘螨或动物皮屑过敏的个体)。过敏性鼻炎的一些病理生理明显地反映了局部急性过敏反应的结果,症状在自然或实验性暴露给过敏原后迅速发生,一些症状的严重性可由 H_1 抗组胺剂显著降低,尽管这些试剂只能部分缓解全面症状复合物[337,411]。然而,鼻组织通常表现出明显的嗜酸性粒细胞和其他炎症细胞浸润,实验室研究表明用过敏原实验性刺激后发生的LPR,包括嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的浸润[337,412,413]。这些LPR在用皮质类固醇局部治疗后被大大阻止[413,414],这也是这种疾病临床治疗最有效的药物[337,414]。因此,这种疾病的病理生理看来包括了急性过敏反应、LPR和慢性过敏性炎症的成分。

哮喘

哮喘影响世界上数以百万计的人,单在美国就超过两千万,并且许多发达国家报道发病率正显著升高;这种疾病的人力和经济损失(患病时健康治疗费用、生产损失、最悲惨的是死亡)是巨大的[383,384]。现在并不把哮喘看成一种单一的疾病,认为它是一种综合征(即一组不同的,但有共同临床体征和症状的疾病),典型的具有三个主要特征:①间歇性、可逆的气道阻塞;②呼吸道“高反应性”(即呼吸道对组胺、胆碱能激动剂或冷空气等免疫学上非特异性的刺激有显著升高的敏感性如支气管狭窄反映的);③呼吸道感染。哮喘综合征可是多种遗传和环境因素相互作用的结果[383,384,415,416]。然而,大多数病例(所谓的特异反应性或过敏性哮喘)发生在对明确的环境过敏原立即表现急性超敏反应的受试者,用很少量的过敏原刺激这些个体,呼吸道即可产生可逆的呼吸道阻塞[48,383,384,415,416]。也知道在几个不同人群中的哮喘总发生率与血清IgE浓度有强烈正相关性[48,131,383,384,415]。而且也表明IgE致敏的肥大细胞,在遇到可被其RcεRI结合的IgE识别的特异抗原时,分泌多种能促进可逆的呼吸道阻塞、支气管高反应性和(或)呼吸道炎症的生物活性介质[263,264,384,415,416]。

1160

曾经认为特异反应性或过敏性哮喘是一种主要反映IgE和过敏原依赖的肥大细胞活化结果的疾病[417],现有几个发现已对肥大细胞在哮喘中的中心作用提出了疑问。这些发现之一是其他细胞类型,包括嗜酸性粒细胞[293]和Th2淋巴细胞[418](二者都在哮喘患者呼吸道的慢性炎症浸润物中存在)[384,415,416,419,420],也能产生细胞因子或其他可在这种病中起作用的递质。再者,已经表明,曾经认为仅限于组织肥大细胞和嗜碱性粒细胞表达的高亲和力IgE受体,FcεRⅠ,也能在单核细胞[151]、循环树突细胞[152]、朗格汉斯细胞[154]和嗜酸性粒细胞[157]表面表达,因此这些细胞也是各种IgE依赖的过敏反应中介质的潜在来源。

正如在其他地方[5,6,416]讨论的一样,在过敏性哮喘这样复杂的系统中,很难评估单个效应机制在这种疾病中的相对重要性。然而,对小鼠哮喘模型的研究支持下列结论:①呼吸道对胆碱能刺激的高反应性可由肥大细胞依赖的机制(甚至在没有白细胞募集的情况也可出现)或 $CD4^+$ T细胞依赖的机制(典型地发生在也包含呼吸道嗜酸性粒细胞浸润的情况)引起;②肥大细胞对抗原气雾剂刺激后Th2和嗜酸性粒细胞募集到呼吸道来说并不是必需的,但它们可以参与在次最适度水平的暴露给抗原后这些细胞的募集;③嗜酸性粒细胞在各种鼠科的模型T细胞依赖的呼吸道超敏反应改变中的必需程度还未完全确定;④在许多实验系统中,特别是各种品系的正常小鼠,呼吸道超反应性(及其这些模型其他哮喘样性质)的出现,可能反映了肥大细胞和T细胞依赖途径的联合作用。

在人过敏性哮喘中,IgE依赖的肥大细胞活化很可能在急性的过敏原诱导的支气管狭窄中起重要作用,而且肥大细胞很可能参与与哮喘相关的呼吸道炎症[263,264,273,383,415,416]。然而,许多新的发现表明,IgE能以别的复杂机制影响哮喘和其他与慢性过敏性炎相关疾病的病理发生。例如,人类不像小鼠,FcεRⅠ能在除肥大细胞和嗜碱性粒细胞之外的其他效应细胞表达,包括单核细胞、巨噬细胞[151]和嗜酸性粒细胞[157],在单核细胞和树突细胞(缺乏β链)上表达的FcεRⅠ可通过与IgE结合,增强被细胞表面结合的IgE识别的蛋白质的抗

原片段的加工和呈递[150,152]。IgE 也能上调 FcεR Ⅰ 在肥大细胞和嗜碱性粒细胞的表达,因此使它们在最适的抗原刺激下释放某些递质的量上升。这些介质包括 IL-4、IL-13、MIP-1α 和其他细胞因子(参看"IgE 受体"一节)。因此,在人类,IgE 不仅"武装"获得性免疫反应输出相的肥大细胞和效应细胞,也通过增强 IgE 产生,在这些效应的进一步发展中起作用。

这些新发现的临床意义还远未阐明,但它们指出了以前未预料的(或至少是被低估的)哮喘和其他疾病的慢性过敏性炎症中,IgE 依赖作用与肥大细胞或 T 细胞依赖作用间的联系。这种突出的、更复杂的关于过敏性哮喘病理发生的观点提出,T 细胞和肥大细胞(以及其他 FcεR Ⅰ C^+ 细胞)在这种疾病中既有效应细胞的作用,也有免疫调节的作用。

特应性皮炎

这种流传甚广、令人烦恼的慢性皮肤病可以被看作是特异反应性的皮肤表现。其诊断建立在一组主要和次要的临床和血清学改变之上。为了确认,患者必须表现出 24 个次要特征中至少 3 个(其中一个可以是血清 IgE 升高)以及 4 个主要特征中的 3 个。4 个主要特征是:①皮肤瘙痒;②影响到婴儿或儿童的面部和伸肌表面或皮肤有某些慢性改变;③慢性或长期复发的皮肤炎症;④ 特异反应性个人或家族史(即哮喘、过敏性鼻炎、特异反应性的皮炎)[421,422]。尽管原因还不清楚,该病发生率在过去几十年间升高了[423]。单卵双生子的患病危险与二卵双生子相比为 0.86:0.21,二卵双生子与非双生子无差异[386]。

尽管对其病理发生还未完全了解,但 80%~90%的患者有特异反应性家族史及血清 IgE 升高,85%的患者对多种食物过敏原或空气过敏原马上有阳性皮肤反应(即急性过敏反应)[421]。然而,许多疾病的发病率和病理反映的是慢性皮肤炎症,典型的皮肤损伤包括 T 细胞浸润。这些 T 细胞分泌细胞因子可以是 Th0,Th1 或 Th2 类型的,这部分取决于损伤时的年龄[424~426]。这些 T 细胞中一些包括过敏原特异的、在体外克隆和扩增后表达 Th2 类型细胞因子的 $CD4^+$ T 细胞[427,428];这些 T 细胞也表达皮肤归巢的 T 细胞的一个标记分子 CLA,也可募集到在用了含适当过敏原的 Th 后发生浸润中[429]。自然产生的特异反应性皮肤损伤和斑试验诱导的浸润也包括嗜酸性粒细胞及其产物,但嗜酸性粒细胞在这种失调中的作用还不清楚[430,431]。

1161

在特异反应性皮炎中过敏原是怎样诱导皮肤炎症的? 虽然不止一种机制与之有关,但大部分患者皮肤中都有带 IgE 的朗格汉斯细胞,它们表达 $\alpha\gamma_2$ 型 FcεR Ⅰ 以及 CD23[154,155,432]。而且,这些朗格汉斯细胞在体外能以 IgE 依赖的抗原呈递方式呈递抗原给自体 T 细胞[433]。用表达 CD23 的 EB 病毒转化的 B 细胞进行研究表明,抗原特异性 IgE 与 B 细胞 CD23 结合可增强 B 细胞的抗原呈逆能力约 1000 倍[434,435]。像这样的许多证据暗示,IgE 在与特异反应性皮炎相关慢性炎症中的作用,更多的是与增强朗格汉斯细胞 APC 功能以及其他潜在的 APC 有关,而与肥大细胞介质和细胞因子释放的启动相关较少。另一方面,已明确知道情绪紧张能引发瘙痒和过敏性皮炎损伤加重[421]。这种结果的可能机制是神经肽依赖的皮肤肥大细胞活化的诱导[436]。

IgE 相关过敏性疾病的治疗策略

概述

获得性免疫效应必需的一个基本特征是对最初诱导效应的抗原表现出长期记忆,过敏性疾病典型表现是长期持续的失调。确实,大部分过敏患者如哮喘、过敏性鼻炎和对过敏原的过敏反应,病程会持续数年,许多病例贯穿终生。总体上看,过敏性疾病很少致命(一些过敏症和偶尔过敏性哮喘是最不幸的例外),但它们可导致显著不适和降低生产率。因此,很久以前就需要有效的方法来阻止或减少这些疾病的发生,降低受影响个体与这些疾病相关的病理和症状。然而,尽管功效(即产生预期临床结果的有效性)是任何疾病治疗必需考虑的问题,但其他因素也很重要。第一是安全性,这在过敏性疾病治疗中要特别考虑。理想的方法必须是很方便的(以促进患者依从性)和在经济上合算的。

尽管设计治疗方法必须考虑我们对候选药物或生物分子作用机制的了解和对疾病病理发生的了解，然而我们在这些领域的认识很不完好，因此不必过于强调这一点。例如，色甘酸钠和奈多罗米对一些哮喘患者的治疗是有效、安全的[437~439]。尽管在临床上广泛被看作是肥大细胞稳定剂，可阻止肥大细胞释放介质，但不清楚这是否是这些药物改善过敏性疾病相关病理过程最重要的机制(如奈多罗米，对其他效应细胞如嗜酸性粒细胞，以及很明显对神经都有作用[439])。也未能充分理解这些药物怎样干扰肥大细胞作用，为什么同样的哮喘患者有的效果很好而有的却明显无效[437~439]。目前认为哮喘不单单是反映肥大细胞功能紊乱的结果，奈多罗米对多种潜在效应细胞的作用也对治疗这些疾病有效。

表 35.10 列出了目前用于治疗 IgE 相关过敏性疾病的主要治疗策略，并选择了一些正在研究的新方法。关于这些方法的简短叙述如下。

表 35.10　IgE 相关疾病的治疗策略

策　略	举　例	状　况
改变个体的倾向发展成 Th2 型应答	早期免疫发展为 Th1 型应答	理论上的
减低/调整对变应原的暴露	避开变应原[a]	关键在阻止过敏症；在哮喘、变应性鼻炎方面起重要作用；对一些特异性皮炎有用
	婴儿期减少饮食暴露于过敏原	可使致敏延迟发生，但不能阻止
抑制/调整 IgE 相关应答	针对变应原的传统免疫治疗法[a]	在某些情况下特别有用(如昆虫毒液变态反应)
	用不被 IgE 识别的多肽诱导 T 细胞耐受	在临床实验中(中等作用)
	用不被 IgE 识别的修饰变应原来免疫治疗	临床前研究
	不与 IgE 在 FcεRⅠ交联的抗 IgE 抗体	在临床实验中
	用 IgE 疫苗消除 IgE	临床前研究
	管理、调整和拮抗细胞因子	IFN-γ 在特异性皮炎实验中有效
	阻止 FcεRⅠ与 IgE 的结合	临床前研究
干预效应细胞的活化	色甘酸钠、奈多罗米[a]	某些哮喘病人受益
	通过打靶细胞表面结构增强 FcεRⅠ依赖效应细胞活化作用的负性调节	临床前研究
干预效应细胞产生递质	5-脂加氧酶抑制剂[a]	某些哮喘患者尤其是阿斯匹林敏感哮喘患者受益
	皮质类固醇[a]	临床效应可能也有其他行为反应，参看以下
	环孢素 A、FK506	在一些哮喘和或特异性皮炎患者临床实验中有益
阻止靶细胞上递质的作用	H_1 抗组胺[a]	在变应性鼻炎、视觉变态反应、荨麻疹中有用
	白三烯受体拮抗剂	一些哮喘患者有用
阻止细胞内黏附分子的相互作用	抗 ICAM-1 单抗	临床前研究
抵消变应反应末段器官后果	肾上腺素[a]	过敏症治疗中必需
	β 肾上腺素能激动剂[a]	在治疗哮喘患者急性气道狭窄中有用
	Costico-类固醇[a]	在慢性变应性炎症(哮喘、变应性鼻炎、特异性皮炎等)有用

[a] 在当今管理 IgE 相关失调中广泛使用。

改变个体发生或强烈持续表现过敏性疾病的倾向性

在可预见的将来，还很难想像会有一种经济、实用的方法来解决这个问题(如通过基因治疗)。另一方面，已经报道在早期免疫发生 Th1 型免疫反应后，可通过某种还未充分阐明的机制，降低免疫人群 Th2 和 IgE 相关过敏性疾病的发病率[404~406]，如果有一个有效安全、能显著降低 IgE 相关疾病的发生率或严重程度的普

通免疫方案的话，这确实是这些疾病治疗策略中实际可行的、经济的方法。然而，在婴儿或儿童进行这些操作的有关伦理问题必须仔细考虑。

减少或改变对过敏原的暴露

避开过敏原，特别是在婴儿期(如消除婴儿食物中的潜在过敏原)，可减少儿童期对这些过敏原的过敏反应发生[36]，但这种方法的长期效果还不清楚[393]。然而某些关键的环境过敏原水平降低(如改变家务管理以减少室内尘螨或蟑螂；给猫找个新房等)能降低已经发病的严重性、住院时间和药物治疗的需要[391]。避开过敏原是发生过敏症患者治疗中特别关键的一点[35~39,407,408]。

不幸的是，这些治疗有许多实际问题。要得到最好的结果，患者[和(或)他的家庭]必须很在行，有很高热情而且依从性好(如一些对猫敏感的患者想继续留着他们的猫)。在过敏症中，也许很难避开过敏原(如养蜂者很难避开蜂毒成分)或者甚至很难知道它什么时候存在。例如，对花生或其他食物中的成分有致死过敏性的患者也许会享用那些从标签(也许会列出几种其他的可能成分)上不可能识别是否含这些过敏原的产品[440]。用转基因技术改变食物成分可能将进一步使避开过敏原的方法应用复杂化[441]。 *1162*

抑制或调节 IgE 相关反应本身

在传统的免疫疗法或低免疫治疗外，进攻性过敏原在长达数年时间里，被以剂量不断增大的方式反复给予敏感个体(必须很仔细，以免引起过敏症和其他过敏反应)。治疗效果和治疗后过敏原特异性 IgG(通常为 IgG4)抗体水平是过敏原剂量依赖的，治疗最终会导致过敏原特异性 IgE 水平，在花粉过敏的人中过敏原之后的季节(花已开过)常出现 IgE 水平升高的减少。

曾经认为，由注射过敏原诱导的 IgE 抗体在过敏原被结合在 FcεRⅠ$^+$效应细胞上的 IgE 识别之前结合过敏原，阻断过敏原诱导和 IgE 依赖的肥大细胞和嗜碱性粒细胞的活化[442,443]。另一种可能是，过敏原特异性 IgG 结合到效应细胞表面的 FcγRⅡB 后，对经过 FcεRⅠ的过敏原和 IgE 依赖的信号途径实行负调控[168]。

然而，还不清楚人肥大细胞在多大程度上表达能下调 FcεRⅠ依赖的信号转导的 FcγRⅡB。也不清楚免疫治疗的效果反映了其影响 IgE 还是 IgG4 水平的效果。如一些患者在检查测到过敏原特异性 IgE 水平改变之前就有好转。一些患者甚至在过敏原特异性 IgG 亚型显著改变之前就已好转[442~444]。有证据表明，免疫疗法能改变过敏原诱导的细胞因子产生 IL-4 分泌，并降低鼻腔黏膜内组织肥大细胞和过敏原诱导的嗜酸性粒细胞和 CD4$^+$ T 细胞浸润的水平[442,445,446]，尽管对其机制缺乏完整的了解，在某些背景下，免疫疗法是高度有效而安全的。例如，在过去对昆虫毒素成分有过敏症反应的成年人中，下次被蛰后发生过敏症的危险大约是 50%~60%[447]。然而，在免疫治疗后，危险小于 5%[38,39,447]。 *1163*

在小鼠模型中的大量研究表明，对小鼠给予来源于过敏原的某些抗原性多肽可诱导 T 细胞耐受和特异性 IgE 和 IgE 的显著降低[448~452]。这类多肽的临床试验正在进行，一些早期结果表明，这些方法可以降低过敏性鼻炎或哮喘患者与对猫过敏原的过敏反应相关的体征和症状，但降低不多[453~455]。然而，临床结果不能表明这些治疗方案能消除(或甚至降低)过敏性疾病相关的病理学，也不能表明其优于传统免疫治疗或更经济。这是由于治疗方案还未优化或者是因为这种方法的固有局限还有待确定。

试图通过对过敏原进行化学修饰以保持其被 T 细胞识别的能力而降低与结合在肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的 IgE 的相互作用来改进传统免疫疗法的努力，在某些动物模型中已取得令人鼓舞的结果[456]。而且有报道称，连接主要的房尘螨过敏原 derf2 的 N 和 C 端二硫键的破坏，可有效消除其体外诱导 IgE 依赖的嗜碱性粒细胞组胺释放，体内实验中可消除皮试反应，而改变后的过敏原保留其刺激 T 细胞增殖的能力[457]。这些发现暗示，通过显著降低过敏原被 IgE 识别的能力而保留其大部分 T 细胞表位，有可能为建立在过敏原(而不是多肽)基础上的标准免疫治疗提供某些安全的(至少更安全一些)通用过敏原[457]。从理论上说，这个方法避免了建立在多肽基础上的免疫方法的潜在问题；大量不同的 T 细胞表位可被不同个体表达的 MHC 和 TCR 结构的多样性所识别。

控制Th2细胞和IgE相关的过敏性疾病的另一方法集中在IgE效应本身。治疗要获得成功，很明显这些方法需要两个假设；①IgE直接或间接地引起大量与所治疗疾病相关的病理学；②在接受治疗的人群中，降低疾病相关病理变化所必需的IgE降低不会导致明显负作用，以对感染性疾病敏感性升高。尽管有几种抑制过敏原特异性IgE产生或功能的方法出现并在动物模型中试验，最为领先的一个方法（现正在临床实验）建立在用识别人IgE表位的人源单克隆抗体皮下给药基础之上，这个表位在IgE与FcεRⅠ结合时是被覆盖的[214]。因此，这个单抗[214]与某些其他对产生IgE的B细胞有特异性的单抗[458]一样，没有与结合FcεRⅠ的IgE交联并因此激发“过敏”反应的能力。而且，在动物进行的临床前试验表明这些方法引起的循环IgE水平的全面下降并不伴有病理变化增加，即使在感染某些能诱导Th2细胞和IgE相关免疫反应的寄生虫的动物中也是如此[371]。

在受试人中，用单抗治疗可降低循环中的游离IgE浓度达99%或更多[214]，这又导致嗜碱性粒细胞（可能还有肥大细胞）FcεRⅠ表达降低，这些治疗也能显著降低这些个体血液中分离的嗜碱性粒细胞在过敏原刺激时释放组胺的能力，特别是在有多种过敏原敏感性的受试者中。这种治疗也可显著降低（但不能完全消除）气源性过敏原刺激引起的急性和晚期相支气管阻塞效应[459,460]。还需要进一步研究从更充分地评估这类方法的成本效益及安全性，以及确定其适用的临床病例。

目前的证据表明，以单抗进行的抗IgE治疗是可逆的，在治疗停止后，IgE水平可逐渐回到治疗前水平[214]。已经提出可将毒素与抗IgE抗体交联[461]或用源于IgE的某些多肽免疫受试者[462,463]，而长期消除IgE效应。在第一种例子中提出的机制是产生IgE的B细胞克隆被消除[461]，在第二种例子中是产生了抗IgE自身抗体（但不与IgE交联，因此不能诱导嗜碱性粒细胞和肥大细胞活化）[462~464]。与用单抗进行后抗IgE治疗相比，这类方法在成本和使用方便上有优越。然而，毒素的运用以及IgE长期消除（甚至永远消除）可能引起的负作用暗示其安全性需要仔细考虑评价。

由于细胞因子对IgE效应的调节，已有许多关于以促进IgE效应的细胞因子，这些细胞因子的受体或细胞因子激发的信号途径为靶点对过敏组织给药的潜在价值的考虑。这一领域的主要问题是细胞因子依赖的免疫过程的复杂性和冗余性[455,456]。例如IL-4或IL-13都能促进IgE效应，这暗示，对IL-4/IL-13信号途径具有相对特异性的成分，如STAT6[467]也许是降低IgE效应比IL-4/IL-13自身更有吸引力的靶点。然而以胞内分子为靶点是药物发展的一大挑战。阻断上调Th2细胞效应的途径的另一方法是用细胞因子如IFN-γ下调这些效应。在特异反应性皮炎患者的临床试验已证明这种方法是安全的且部分有效[468,469]。然而，这些方法并不被认为与皮质类固醇疗法同样有效，受试个体在停止IFN-γ注射后很快复发[421]。而且，不管是试图降低IgE效应的正调节因子的产生和活化，还是试图加强其负调控（如给有这些作用的细胞因子或类似物），都必须以适当方式设计和检测这些方法可能对除IgE效应外的其他生物过程的许多潜在结果。

1164 最后一个建立在IgE基础上的治疗过敏性疾病的方法是，干预IgE和FcεRⅠα链间的结合[470]。由于IgE对FcεRⅠ的高亲和性，这里的挑战是找到一种安全的、治疗能达到浓度时（成本效益高的）就能产生期望的生物学效应的（即显著降低FcεRⅠ$^+$效应细胞的IgE依赖的信号转导）的物质。然而，这一方法的潜在优点是停止给药后很快就会逆转。

干预效应细胞活化

虽然色甘酸钠和奈多罗米钠的作用机制还未充分了解，它们在体外可降低一些肥大细胞类群的活化和递质释放，这可以（至少部分）解释其减少某些有过敏性哮喘、过敏性鼻炎或视觉变应性患者的过敏疾病体征和症状[439]。然而，体外研究表明，奈多罗米钠也能抑制嗜酸性粒细胞的递质释放、趋化和存活，并能降低神经介导的实验动物呼吸道收缩[439]。因此，这里化合物的临床效果也许反映了其在多种细胞类型中的作用。

β肾上腺素能激动剂，如肾上腺素，也能降低在FcεRⅠ依赖的刺激对肥大细胞的递质产生，这也可能是由于其升高环腺苷酸（cAMP）水平的能力[471~473]。然而，β肾上腺素能激动剂临床上的有效性主要反映了其诱导支气管扩张的能力（见下文）。

理论上,在治疗过敏性疾病中用建立在能负调节 FcεR Ⅰ 依赖的递质分泌的受体(即 FcγⅡB、P49、CD81)的关联基础上的方法是可能的。这些方法的优点是靶分子表达在细胞表面,因此,潜在的治疗试剂相对容易与其作用。相似地,如果潜在的治疗试剂能获得有效的胞内浓度,这也可能通过作用于连接 FcεR Ⅰ 交联和效应细胞递质产生的信号途径中的重要成分来抑制效应细胞活化。活化途径上相对靠近 FcεR Ⅰ 交联的组分(如 syk),在各类介质产生中起关键作用,是特别有吸引力的靶点。

在所有这些方法中,关键的是其作用要有适当的特异性。因此,如果除肥大细胞和嗜碱性粒细胞外的其他细胞也参与过敏性疾病病理,那这些细胞的作用也是期望有的,但如果这些细胞在促进健康中有重要作用,对它们的作用就不是所期望的了。另一方面,过敏性疾病效应细胞外其他细胞也利用潜在靶分子(不管是)表面或其胞内信号分子,并不一定表明以这些分子为靶点有不可克服的风险。如可以利用一些有利于药物到达病理部位和(或)兴趣的靶细胞的方法(如哮喘病的吸入治疗);足以产生期望结果(即降低效应细胞介质释放)的药物浓度也可能不足以产生不利的效果(如利用同样靶分子的其他细胞的功能降低)。

干预效应细胞递质的产生

用 5-脂加氧酶(5-LO)抑制剂进行的临床实验表明,这种方法对那些通过 5-LO 途径的花生四烯酸代谢产物在疾病病理中起重要作用的个体。这些药物看来在阿斯匹林敏感性哮喘患者中特别有效[474],在一些过敏性哮喘受试者中也显著有益[475,476]。

皮质类固醇(也被称为糖皮质类固醇或类固醇)是目前治疗哮喘最有效的药物;它们在其他慢性过敏性炎症相关疾病(如特异反应性皮炎和过敏性鼻炎)中也有效[281,414,421,477,478]。吸收的类固醇在所有类型哮喘中都有效,并且比全身使用类固醇有更少的副反应。由于认识在甚至比较轻的疾病病例中也有呼吸道炎症,现在这些药在哮喘患者的治疗早期就开始使用。然而,尽管进行了细致的研究,类固醇起作用的机制还未完全理解。它们当然能降低细胞因子基因的转录,也有其他效应以抑制多种参与过敏性疾病的效应细胞(包括 T 细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞以及单核细胞和巨噬细胞)产生细胞因子[281,477]。然而,这些药物对这些细胞及许多其他细胞类群有多种作用,且还不清楚这些药物对某一特定细胞类群的效果在多大程度上贡献于其在过敏性疾病中的疗效。例如,类固醇降低可诱导磷酯酶 A_2、环加氧酶、一氧化氮合酶及黏附分子如 ICAM-1 或 E 选择素基因的转录[477]。类固醇也能降低细胞因子依赖的嗜酸性粒细胞和其他炎症细胞存活[479],并能降低肥大细胞存活[480],这一效应也许(至少部分上)反映了类固醇治疗部位 SCF 产生降低的结果[481]。最后,类固醇对固定组织细胞也能有多种直接或间接作用,如上皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞;其中一些效果与其在慢性过敏性炎症疾病中的疗效有关[477]。

临床研究表明,免疫抑制剂环孢素 A[482~484] 和 FK506[485] 在抑制过敏性炎症及其临床结果的多个方面都有效果。尽管这些研究提供了除皮质类固醇外,免疫抑制剂也能在过敏性炎症相关疾病中发挥作用的原则证据,与这些药物(至少是目前能得到的药物)相关的潜在毒性限制了它们在大多数过敏性疾病患者中的应用。

阻断递质对靶细胞的作用

这一组中用得最广的药物是抗组胺药,它们可以阻断组胺与靶细胞上(如血管内皮细胞和血管、呼吸道、胃肠道平滑肌细胞)受体的结合。组胺在过敏性疾病中的大部分病理作用被认为是其作用 H_1 受体的结果,因此,对组胺和 H_1 结合有相对特异性的拮抗剂是用于过敏性疾病的最常用的有效药物[486]。在血管通透性改变和组胺的局部作用的其他结果(如对出现瘙痒神经纤维的刺激)控制其症状学的情况下抗组胺药特别有效,这些疾病包括过敏性鼻炎、眼的变态反应,荨麻疹和特异反应性皮炎[486,487]。然而,它们在过敏性哮喘中作用很小,这可能是因为它们能诱导"快速免疫"而对这些患者呼吸道过敏性炎症的表现无影响[487~491]。

由于药物在中枢神经系统(CNS)中的非 H_1 效果(即抗胆碱能和抗血清素能的效果),传统抗组胺的烦恼是其最广泛的,且显著的不良反应[486,487]。这可解释为什么新开发的非镇静抗组胺药的流行,它们很少穿过血脑屏障,在 CNS 中只有很少或没有抗胆碱能和抗血清素能效应[486,487]。

几种不同的白三烯受体拮抗剂现正在进行临床试验,这些药物在减少慢性过敏性哮喘的体症和症状显示出良好的前景(至少在部分患者中)[491,492]。虽然这些药物在这种情况里明显优于抗组胺药,但不能完全消除慢性过敏性哮喘的临床表现,这可能反映了除白三烯外多种递质贡献于其病理学。

由于各种细胞因子参与慢性过敏性炎症的有力证据,使用干预特异的细胞因子作用的药物引起了很大兴趣。IL-5(由于其调节嗜酸性粒细胞产生和功能中的重要[493])、TNF-α(由于其在将白细胞募集到 IgE 依赖的肥大细胞活化的部位中的作用[274,494,495])以及嗜酸性粒细胞活化趋化因子和其他超化因子(由于其促进嗜酸性粒细胞和其他白细胞募集到过敏性炎症部位的能力[496])被认为是特别有吸引力的潜在靶点。

根据体外研究及在动物模型中进行的临床前研究,PAF 曾经被认为是哮喘中一个很有吸引力的治疗靶点;然而,用干预 PAF 产生或拮抗其功能的药物在哮喘治疗试验中显示很少有或没有疗效[497]。

以黏附分子为靶点中断过敏反应进程

对调节白细胞募集到炎症部位的多个步骤的分子的确定提出了大量潜在的治疗靶点,抗体或其他能阻断黏附分子(在血管内皮细胞、上皮细胞或其他细胞上)与它们在细胞上配体的结合的其他分子,是特别能引起人们兴趣的。如一个抗 ICAM-1 的单抗,能抑制过敏性哮喘灵长类模型中抗原刺激的很快出现的嗜酸性粒细胞浸润和呼吸道高反应性[11,498]。然而,这种治疗对实验性非人灵长类的慢性呼吸道炎症无效[499],并且还需确定以细胞黏附为靶点的方法在人体中是否有效,是否安全以及是否有较好的经济效益。

抵消过敏反应的终末器官结果

对被作为 IgE 相关过敏反应直接或间接结果而受影响的靶细胞的功能的药理调节是这些疾病临床治疗的一个主要方法。值得注意的是,这种方法是大多数急性和灾难性过敏疾病、过敏症治疗中最重要的成分。在这些患者中最关键的、被认为是必须在症状出现后尽快给的药物是肾上腺素[407,408]。肾上腺素是 α 和 β 肾上腺素能受体的内源激动剂,有许多重要效应,包括那些依赖于 α 肾上腺素能受体(支持血压及心脏功能)的内源激动剂,和 β 肾上腺素能受体(呼吸道平滑肌松弛以打开上下呼吸道而改善呼吸)的效应;通过 β 肾上腺素能受体。这也可以减少肥大细胞和嗜碱性粒细胞进一步释放递质[407,408]。抗组胺药和皮质类固醇在过敏症治疗中也是有用的,但它们应是肾上腺素治疗的附加用药而不能替代肾上腺素[407,408]。

β 肾上腺素激动剂在哮湍治疗中也是一种重要药物,其价值在于促进呼吸道平滑肌松弛[500]。然而,用药必须很小心[501];确实,已经提出这些药物的不当使用可以升高与哮喘相关的死亡风险,这可能部分是由于其延缓了另外更适当的用药程式的建立[500,502]。

在皮质类固醇的众多生物活性中,对慢性过敏性炎症有益的是改变慢性过敏炎症的终末器官结果[281,346,477]。例如,这些药物可以抑制或部分逆转过敏性炎症的一些慢性结构或功能结果[347,348]。然而,长期使用皮质类固醇,特别是全身使用时,对多个器官有大量不希望出现的效果[477]。因此,这些方法的代价和益处之间的平衡是很精细的。

结论

与 IgE 相关的过敏性疾病不仅是重要的发病率和生产损失的流行原因,其发病率和对许多发达国家的人类和经济冲击都在增加。自从此书第一版出版后,我们对引起这些疾病的遗传和环境因子以及其病理分子机制的理解有了明显进展。其中一些进展已成为治疗这些疾病新的实验性方法。然而,这些令人鼓舞的进展不应该掩盖还有许多事要做,以便更完全地了解并更有效地治疗这些复杂并恼人的疾病。

1164

一个重要的发展(也是我们鼓励的)是放弃了试图把所有 IgE 相关过敏疾病归入最初由 Coombs 和 Gell 划分的"Ⅰ型过敏反应"。虽然急性过敏反应如过敏症,还被认为是 IgE、肥大细胞和嗜碱性粒细胞介导的反应,但流行最广的过敏疾病,包括哮喘或特异反应性皮炎,很明显复杂得多,在很大程度上反映了 T 细胞,特

别是 Th2 表型 T 细胞的 IgE 和肥大细胞非依赖的效应细胞活性的显著特征。

另一方面,对慢性炎症反应以及 IgE 依赖的肥大细胞活化的急性结果在过敏性疾病病理发生中的重要作用的评估,也许并没有计划中的结果:把注意力从 IgE 和肥大细胞及其 FcεRⅠ$^+$效应细胞在过敏性疾病的慢性和急性特征中的作用的可能性转开。肥大细胞(和嗜碱性粒细胞)是许多细胞因子(包括那些能促进 IgE 产生和(或)白细胞募集的因子)的潜在来源,肥大细胞在细胞表面表达的 FcεRⅠ被 IgE 依赖上调后产生这些细胞因子的能力增强;这些发现立即暗示出肥大细胞(可能还有其他 FcεRⅠ$^+$效应细胞)参与 Th2 型效应的放大和持续,以及慢性过敏性炎症的局部表现的机制。嗜酸性粒细胞也可产生多种细胞因子,表达 FcεRⅠ,并且与肥大细胞和嗜碱性粒细胞一样能表现出某些允许它们在呈递抗原给 T 细胞和(或)促进 B 细胞产生抗体中发挥作用的性质。

总之,这些对传统的免疫调节细胞(即 T 细胞)和过敏性疾病的效应细胞(即肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞)功能上的能力的新认识暗示对这些疾病的病理发生应该有更为复杂的看法,T 细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞在其中既有效应作用也有免疫调节作用。确实,这一领域的研究中最关键的挑战是确定慢性过敏性炎症的各种潜在效应细胞和(或)免疫调节细胞贡献于过敏性疾病特异的临床上比较重要的特征的程度,以及更明确地确定这些细胞功能是怎样表现和调节的。关注这些问题有重要的临床意义,因为其答案可以为设计预防或治疗 IgE 相关过敏性疾病的新方法所进行的努力提供明显的暗示。

致谢

我们的研究工作受到 United States Public Health Service, National Health Institutes of Health 基金支持。我们感谢 John J. Costa 和 Andrew scharenberg 有益的讨论及对手稿的建设性批评,也要感谢 Ann M. Dvorak 提供的电镜照片。

(许桂莲 译)

参 考 文 献

1. von Pirquet C. Allergie. *Munch Med Wochenschr* (Translated from the German by Prausnitz C.). In: Gell PGH, Coombs RRA, eds. (1963) *Clinical aspects of immunology.* vol 30. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1906:1457.
2. Coombs RRA, Gell PGH. The classification of allergic reactions underlying disease. In: Gell PGH, Coombs RRA, eds. *Clinical aspects of immunology.* Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1963:317–337.
3. Kay AB. Concepts of allergy and hypersensitivity. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 1. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:23–35.
4. Janeway CA Jr, Travers P. *Immunobiology: the immune system in health and disease.* New York: Garland Publishing Inc., 1994;11:2.
5. Kay AB, Frew AJ, Corrigan CJ, Robinson DS. The T-cell hypothesis of chronic asthma. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1379–1394.
6. Galli SJ. Complexity and redundancy in the pathogenesis of asthma: reassessing the roles of mast cells and T cells. *J Exp Med* 1997;186:343–347.
7. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138–148.
8. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787–793.
9. Aebischer I, Stadler BM. Th1–Th2 cells in allergic responses: at the limits of a concept. *Adv Immunol* 1996;61:341–403.
10. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997;18:263–266.
11. Gundel RH. Primate models of allergic asthma. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1037–1044.
12. Abraham WM. Sheep models of allergic bronchoconstriction. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997: 1045–1055.
13. Geba GP, Askenase PW. Murine models of allergy, asthma and hyperresponsiveness. In: Kay AB, Coombs RRA, eds. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1056–1067.
14. Chung KF. The allergic response in rats. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1068–1078.
15. Herd CM, Page CP. The rabbit as an animal model of allergy, asthma and airway hyperresponsiveness. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1079–1092.
16. Minshall E, Sanjar S. The sensitized guinea pigs as a model of allergic asthma. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1093–1102.
17. Emala C, Hirshman CA. Canine models of asthma and hyperresponsiveness. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1103–1110.
18. Oettgen HC, Martin TR, Wynshaw-Boris A, Deng C, Drazen JM, Leder P. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature* 1994;370:367–370.
19. Ravetch JV, Kinet J-P. Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 1991;9:457–492.
20. Platts-Mills TAE, Solomon WR. Aerobiology and inhalant allergens. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice.* vol I. St. Louis: Mosby–Year Book, 1993:469–528.
21. Cromwell O. Biochemistry of allergens. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:797–810.
22. King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TAE, Thomas W. Allergen nomenclature. *Clin Exp Allergy* 1995;25:27–37.
23. Thomas WR. Molecular cloning of allergens. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Malden, MA: Blackwell Science, 1997:811–824.
24. O'Hehir RE, Garman RD, Greenstein JL, Lamb JR. The specificity and regulation of T-cell responsiveness to allergens. *Adv Immunol* 1991;9:67–95.
25. Higgins JA, Lamb JR, Marsh SGE, et al. Peptide-induced nonresponsiveness of HLA-DP restricted human T cells reactive with *Dermatophagoides* spp. (house dust mite). *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:749–756.
26. McReynolds LA, Kennedy MW, Selkirk ME. The polyprotein allergens of nematodes. *Parasitol Today* 1993;9:403–406.
27. Stewart GA, Thompson PJ, McWilliam AS. Biochemical properties of aeroallergens: contributory factors in allergic sensitization? *Pediatr Allergy Immunol* 1993;4:163–172.
28. Smith AM, Dalton JP, Clough KA, et al. Adult *Schistosoma mansoni* express

cathepsin L proteinase activity. *Mol Biochem Parasitol* 1994;57:11–19.
29. Brown A, Burleigh JM, Billett EE, Pritchard DI. An initial characterization of the proteolytic enzymes secreted by the adult stage of the human hookworm *Necator americanus*. *Parasitology* 1995;110:555–563.
30. Hewitt CRA, Brown AP, Hart BJ, Pritchard DI. A major house dust mite allergen disrupts the IgE network by selectively cleaving CD23. *J Exp Med* 1995;82:1143–1145.
31. Pritchard DI, Kumar S, Edmonds P. Soluble CD23 levels in a parasitized population from Papua New Guinea. *Parasite Immunol* 1993;15:205–208.
32. Delespesse G, Sarfati M, Wu CY, Fournier S, Letellier M. The low-affinity receptor for IgE. *Immunol Rev* 1992;125:77–97.
33. Chua KY, Stewart GA, Thomas WR, et al. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. *J Exp Med* 1988;167:175–182.
34. Rosenstreich DL, Eggleston P, Kattan M, et al. The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. *N Engl J Med* 1997;336:1356–1363.
35. Sampson HA. Adverse reactions to foods. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice.* vol II. St. Louis: Mosby–Year Book, 1993:1661–1686.
36. Sampson HA. Food allergy. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1517–1549.
37. Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med* 1992;327:380–384.
38. Valentine MD. Anaphylaxis and stinging insect hypersensitivity. *JAMA* 1992;268:2830–2832.
39. Yunginger JW. Insect allergy. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice.* vol II. St. Louis: Mosby–Year Book, 1993:1511–1524.
40. Adkinson NF Jr. New developments in the assessment of sensitivity in beta lactam antibiotics. In: Postgraduate Education Course and Asthma Consultants Course Syllabus, 48th Annual Meeting, Orlando, Florida, 1992.
41. Pradal M, Vervloet D. Drug reactions. In: Kay AB, ed. *allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1671–1692.
42. Delage C, Irey NS. Anaphylactic deaths: a clinicopathologic study of 43 cases. *J Forensic Sci* 1972;17:215–218.
43. Prausnitz C, Küstner H. Studine uber die Ueberemfindlichkeil. *Zentralbl Bakteriol* 1921;86:160–169.
44. Ishizaka K, Ishizaka T, Hombrook MM. Physico-chemical properties of human reaginic antibody IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 1966;97:75–85.
45. Johansson SGO, Bennich H. Immunochemical studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology* 1967;13:381–394.
46. Waldmann TA. Disorders of immunoglobulin metabolism. *N Engl J Med* 1969;281:1170–1177.
47. Tada T, Okumura K, Platteau B, Beckers A, Bazin H. Half lives of two types of rat homocytotropic antibodies in circulation and in the skin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1975;48:116–131.
48. Ownby DR. Clinical significance of IgE. In: Middleton EJ, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yuninger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice.* vol I. St. Louis: Mosby–Year Book, 1993:1059–1076.
49. Merrett TG. Quantification of IgE both as total immunoglobulin and as allergen-specific antibody. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1012–1034.
50. Constant SL, Bottomly K. Induction of TH1 and TH2 $CD4^+$ T cells: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997;15:297–322.
51. Coffman RL, von der Weid T. Multiple pathways for the initiation of T helper 2 (Th2) responses. *J Exp Med* 1997;185:373–375.
52. Chen YH, Chiu NM, Mandal M, Wang N, Wang CR. Impaired Nkl(+) T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity* 1997;6:459–467.
53. Mendiratta SK, Martin WD, Hong S, Boesteanu A, Joyce S, Vankaer L. CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 1997;6:469–477.
54. Smiley ST, Kaplan MH, Grusby MJ. Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. *Science* 1997;275:977–979.
55. Brown DR, Fowell DJ, Corry DB, et al. Beta-2-microglobulin-dependent Nk1.1(+) T cells are not essential for T helper cell 2 immune responses. *J Exp Med* 1996;184:1295–1304.
56. Sabin EA, Kopf MA, Pearce EJ. *Schistosoma mansoni* egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *J Immunol* 1996;184:1871–1878.
57. Paul WE, Seder RA, Plaut M. Lymphokine and cytokine production by $Fc\epsilon RI^-$ cells. *Adv Immunol* 1993;53:1–29.
58. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing $CD4^+$ T cells. *J Exp Med* 1997;185:461–469.
59. Greenwald RJ, Lu P, Halvorson MJ, et al. Effects of blocking B7-1 and B7-2 interactions during a type 2 in vivo immune response. *J Immunol* 1997;158:4088–4096.
60. Saxon A, Diaz-Sanchez D, Zhang K. Regulation of the expression of distinct human secreted IgE proteins produced by alternative RNA splicing. *Biochem Soc Trans* 1997;25:383–387.
61. Coffman RL, Debman DA, Rothman P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol* 1993;54:229–270.
62. Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991;77:1859–1870.
63. Snapper CM, Paul WE. Interferon-γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987;236:944–947.
64. Coffman RL, Carty JA. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and inhibition by interferon-γ. *J Immunol* 1986;136:949–954.
65. Coffman RL, Ohara J, Bond MW, Carty J, Jlotnik A, Paul WE. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J Immunol* 1986;136:4538–4541.
66. Pene J, Rousset F, Briere F, et al. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons γ and α and prostaglandin E_2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6880–6884.
67. Del Prete G, Maggi E, Parronchi P, et al. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J Immunol* 1988;140:4193–4198.
68. Tepper RI, Levinson DA, Stanger BZ, Campos-Torres J, Abbas AK, Leder P. IL-4 induces allergic-like inflammatory disease and alters T cell development in transgenic mice. *Cell* 1990;62:457–467.
69. Finkelman FD, Urban JFJ, Beckmann MP, Schooley KA, Holmes JM, Katona IM. Regulation of murine in vivo IgG and IgE responses by a monoclonal anti-IL-4 receptor antibody. *Int Immunol* 1991;3:599–607.
70. Finkelman FD, Katona IM, Urban JFJ, Snapper CM, Ohara J, Paul WE. Suppression of in vivo polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B-cell stimulatory factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9675–9678.
71. Kopf M, Gros GL, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993;362:245–248.
72. Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 1991;254:707–710.
73. Morawetz RA, Gabriele L, Rizzo LV, et al. Interleukin (IL)-4-independent immunoglobulin class switch to immunoglobulin (Ig)E in the mouse. *J Exp Med* 1996;184:1651–1661.
74. Noben-Trauth N, Kropf P, Muller I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science* 1996;271:987–990.
75. von der Weid T, Kopf M, Kohler G, Langhorne J. The immune response to *Plasmodium chabaudi* malaria in interleukin-4-deficient mice. *Eur J Immunol* 1994;24:2285–2293.
76. Delphin S, Stavnezer J. Characterization of an interleukin 4 (IL-4) responsive region in the immunoglobulin heavy chain germline ε promoter: regulation by NF-IL-4, a C/EBP family member and NF-κB/p50. *J Exp Med* 1995;181:181–192.
77. Thienes CP, De Monte L, Monticelli S, Busslinger M, Gould HJ, Vercelli D. The transcription factor B cell-specific activator protein (BSAP) enhances both IL-4- and CD40-mediated activation of the human ε germline promoter. *J Immunol* 1997;158:5874–5882.
78. Takeda K, Tanaka T, Shi W, et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 1996;380:627–630.
79. Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, et al. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 1996;380:630–633.
80. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. *Immunity* 1996;4:313–319.
81. Achatz G, Nitschke L, Lamers MC. Effect of transmembrane and cytoplasmic domains of IgE on the IgE response. *Science* 1997;276:409–411.
82. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3730–3734.
83. de Vries JE. Molecular and biological characteristics of interleukin-13. *Chem Immunol* 1996;63:204–218.
84. Burd PR, Thompson WC, Max EE, Mills FC. Activated mast cells produce interleukin 13. *J Exp Med* 1995;181:1373–1380.
85. Gibbs BF, Haas H, Falcone FH, et al. Purified human peripheral blood basophils release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. *Eur J Immunol* 1996;26:2493–2498.
86. Li HM, Sim TC, Alam R. IL-13 released and localized in human basophils. *J Immunol* 1996;156:4833–4838.
87. Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, Hanley-Hyde J, Nordan RP, Paul WE. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of FcεRI or to calcium ionophores. *Nature* 1989;339:64–67.
88. Burd PR, Rogers HW, Gordon JR, et al. Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J Exp Med* 1989;170:245–257.
89. Bradding P, Feather IH, Howarth PH, et al. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J Exp Med* 1992;176:1381–1386.
90. Seder RA, Paul WE, Dvorak AM, et al. Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2835–2839.

91. Brunner T, Heusser CH, Dahinden CA. Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation. *J Exp Med* 1993;177:605–611.
92. Arock M, Merle-Beral H, Dugas B, et al. IL-4 release by human leukemic and activated normal basophils. *J Immunol* 1993;151:1441–1447.
93. Jaffe JS, Raible DG, Post TJ, et al. Human lung mast cell activation leads to IL-13 mRNA expression and protein release. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15: 473–481.
94. Pawankar R, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitics exhibit increased expression of the FcεRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest* 1997;99: 1492–1499.
95. Yamaguchi M, Sayama K, Yano K, et al. IgE enhances FcεRI expression and IgE-dependent release of IL-13 from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell FcεRI expression. 1997 (*submitted*).
96. Callard RE, Matthews DJ, Hibbert L. IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? *Immunol Today* 1996;17:108–110.
97. Worm M, Henz BM. Molecular regulation of human IgE synthesis. *J Mol Med* 1997;75:440–447.
98. Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Fujimoto M, Lindley I, Furusho K. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha selectively enhance immunoglobulin (IgE) and IgG4 production by human B cells. *J Exp Med* 1996;183: 2397–2402.
99. Thyphronitis G, Tsokos GC, June CH, Levine AD, Finkelman FD. IgE secretion by Epstein-Barr virus-infected purified human lymphocytes is stimulated by interleukin 4 and suppressed by interferon-γ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86: 5580–5584.
100. Gascan H, Gauchat JF, Aversa G, van Vlasselaer P, de Vries JE. Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4+ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. *J Immunol* 1991; 147:8–13.
101. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 1994;12:881–922.
102. Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhlmann JE, Noelle RJ. Immune regulation by CD40 and its ligand gp49. *Annu Rev Immunol* 1996;14:591–617.
103. Jabara HH, Fu SM, Geha RH, Vercelli D. CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin-4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B-cells. *J Exp Med* 1990;72:1861–1864.
104. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 1992;357:80–82.
105. Xu J, Foy TM, Laman JD, et al. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* 1994;1:423–431.
106. Renshaw BR, Fanslow WC, Armitage RJ, et al. Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J Exp Med* 1994;180:1889–1900.
107. Kawabe T, Naka T, Yoshida K, et al. The immune response in CD40 deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1994;1:167–78.
108. Castigli E, Alt FW, Davidson L, et al. CD40-deficient mice generated by recombination-activating gene-2-deficient blastocyst complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12135–12139.
109. Gauchat JF, Henchoz S, Fattah D, et al. CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur J Immunol* 1995;25:863.
110. Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, et al. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 1993;365:340–343.
111. Okayama Y, Petit-Frere C, Kassel O, et al. IgE-dependent expression of mRNA for IL-4 and IL-5 in human lung mast cells. *J Immunol* 1995;155:1796–1808.
112. Jaffe JS, Glaum MC, Raible DG, et al. Human lung mast cell IL-5 gene and protein expression: temporal analysis of upregulation following IgE-mediated activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:665–675.
113. Costa JJ, Church MK, Galli SJ. Mast cell cytokines in allergic inflammation. In: Holgate ST, Busse W, eds. *Inflammatory mechanisms in asthma.* vol 199. New York: Marcel Dekker Inc, 1997:111–127.
114. Ha TY, Reed ND, Crowle PK. Immune response potential of mast cell-deficient W/W^v mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1986;80:85–94.
115. Takeishi T, Martin TR, Katona IM, Finkelman FD, Galli SJ. Differences in the expression of the cardiopulmonary alterations associated with anti-immunoglobulin E-induced or active anaphylaxis in mast cell-deficient and normal mice. Mast cells are not required for the cardiopulmonary changes associated with certain fatal anaphylactic responses. *J Clin Invest* 1991;88:598–608.
116. Sutton BJ, Gould HJ. IgE and IgE receptors. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 1. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:81–95.
117. Sutton BJ, Gould HJ. The human IgE network. *Nature* 1993;366:421–428.
118. Bonnefoy J-Y, Lecoanet-Henchoz S, Aubry J-P, Gauchat J-F, Graber P. CD23 and B-cell activation. *Curr Opin Immunol* 1995;7:355–359.
119. Williams J, Johnson S, Mascali JJ, Smith H, Rosenwasser LJ, Borish L. Regulation of low affinity IgE receptor (CD23) expression on mononuclear phagocytes in normal and asthmatic subjects. *J Immunol* 1992;149:2823–2829.
120. Gordon J. B-cell signalling via the C-type lectins CD23 and CD72. *Immunol Today* 1994;15:411–417.
121. Cho SW, Kilmon MA, Studer EJ, Vanderputten H, Conrad DH. B cell activation and Ig, especially IgE, production is inhibited by high CD23 levels in vivo and in vitro. *Cell Immunol* 1997;180:36–46.
122. Texido G, Eibel H, Le Gros G, Van der Putten H. Transgene CD23 expression on lymphoid cells modulates IgE and IgG1 responses. *J Immunol* 1994;153: 3028–3042.
123. Yu P, Kosco-Vilbois M, Richards M, Kohler G, Lamers MC. Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature* 1994;369:753–756.
124. Fujiwara H, Kikutani H, Suematsu S, et al. The absence of IgE antibody-mediated augmentation of immune responses in CD23-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6835–6839.
125. Stief A, Texido G, Sansig G, Eibel H, Le Gros G, Van der Putten H. Mice deficient in CD23 reveal its modulatory role in IgE production but no role in T and B cell development. *J Immunol* 1994;152:3378–3390.
126. Bartlett WC, Conrad DH. Murine soluble FcεRII: a molecule in search of a function. *Res Immunol* 1992;143:431–436.
127. Sarfati M, Delespesse G. Possible role of human lymphocyte receptor for IgE (CD23) or its soluble fragments in the in vitro synthesis of human IgE. *J Immunol* 1988;141:2195–2199.
128. Sherr E, Macy E, Kimata H, Gilly M, Saxon A. Binding the low affinity FcεR on B cells suppresses ongoing human IgE synthesis. *J Immunol* 1989;142:481–489.
129. Flores-Romo L, Shields J, Humbert Y, et al. Inhibition of an in vivo antigen-specific IgE response by antibodies to CD23. *Science* 1993;261:1038–1041.
130. Aubry J-P, Pochon S, Graber P, Jansen KU, Bonnefoy J-Y. CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature* 1992;358:505–507.
131. Burrows B, Martinez ED, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989;320:271–277.
132. Bazaral M, Orgel HA, Hamburger RN. Genetics of IgE and allergy: serum IgE levels in twins. *J Allergy Clin Immunol* 1974;54:288–304.
133. Blumenthal MN, Bonini S. Immunogenetics of specific immune responses to allergens in twins and families. In: Blumenthal MN, Marsh DG, eds. *Genetic and environmental factors in clinical allergy.* Minneapolis: University of Minnesota Press, 1990:20–31.
134. Ruffilli A, Bonini S. Susceptibility genes for allergy and asthma. *Allergy* 1997; 52:256–273.
135. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, et al. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994;264:1152–1155.
136. Meyers DA, Postma DS, Panhuysen CIM, et al. Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5. *Genomics* 1994;23:464–470.
137. Rosenwasser LJ. Genetics of atopy and asthma–promoter-based candidate gene studies for IL-4. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:61–64.
138. Marsh DG. Mapping the genes for IgE production and allergy. In: Sehon A, HayGlass KT, Kraft D, eds. *New horizons in allergy immunotherapy.* New York: Plenum Press, 1996:43–53.
139. Huang S, Marsh DG. Immunogenetics of allergic disease. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice.* vol 1. St. Louis: Mosby–Year Book, 1993:60–72.
140. Cookson WOCM, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1989;i:1292–1295.
141. Cookson WOCM, Young RP, Sandford AJ, et al. Maternal inheritance of atopic, IgE responsiveness on chromosome 11q. *Lancet* 1992;340:381–384.
142. Sandford AJ, Shirakawa T, Moffatt MF, et al. Localisation of atopy and β-subunit of high-affinity IgE receptor (FcεRI) on chromosome 11q. *Lancet* 1993;341: 332–334.
143. Shirakawa T, Li A, Duboowitz M, et al. Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nat Genet* 1994;7:125–130.
144. Hopkin JM. Genetics of atopy. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1187–1195.
145. Barnes KC, Neely JD, Duffy DL, et al. Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from afro-caribbean and caucasian populations. *Genomics* 1996;37:41–50.
146. Marsh DG, Maestri NE, Freidhoff LR, et al. A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. *Nat Genet* 1997;15: 389–392.
147. Daniels SE, Bhattacharrya S, James A, et al. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 1996;383:247–250.
148. Kulczycki A, Metzger H. The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. II. Quantitative aspects of the binding reaction. *J Exp Med* 1974;140:1676.
149. Ishizaka K, Tomioka H. Mechanisms of passive sensitization. I. Presence of IgE and IgG molecules on human leukocytes. *J Immunol* 1970;105:1459–1467.
150. Bieber T. FcεRI-expressing antigen-presenting cells: new players in the atopic game. *Immunol Today* 1997;18:311–313.
151. Maurer D, Fiebiger E, Reininger B, et al. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (FcεRI) on monocytes of atopic individuals. *J Exp Med* 1994;179:745–750.
152. Maurer D, Fiebiger E, Ebmer C, et al. Peripheral blood dendritic cells express FcεRI as a complex composed of FcεRIα- and FcεRIγ-chains; and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J Immunol* 1996;157:607–616.

153. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T. Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 1996;106:446–453.
154. Wang B, Rieger A, Kilgus O, et al. Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via FcεRI. *J Exp Med* 1992;175:1353–1365.
155. Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, et al. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI). *J Exp Med* 1992;175:1285–1290.
156. Sihra BS, Kon OM, Grant JA, Kay AB. Expression of high-affinity IgE receptors (Fc epsilon RI) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic and nonatopic subjects: relationship to total serum IgE concentrations. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:699–706.
157. Gounni AS, Lamkhloued B, Ochiai K, et al. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 1994;367:183–473.
158. Dombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, Koller BH, Kinet J-P. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. *Cell* 1993;75:969–976.
160. Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, Ravetch JV, Kinet JP, Galli SJ. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and FcγRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J Clin Invest* 1997;99:901–914.
161. Dombrowicz D, Flamand V, Miyajima I, Ravetch JV, Galli SJ, Kinet JP. Absence of FcεRI α chain results in upregulation of FcγRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between FcεRI and FcγRIII for limiting amounts of FcR β and γ chains. *J Clin Invest* 1997;99:915–925.
162. Ra C, Jouvin M-HE, Kinet J-P. Complete structure of the mouse mast cell receptor for IgE (FcεRI) and surface expression of chimeric receptors (rat-mouse-human) on transfected cells. *J Biol Chem* 1989;264:15323–15327.
163. Kinet J-P. The γ-ζ dimers of Fc receptors as connectors to signal transduction. *Curr Opin Immunol* 1992;4:43–48.
164. Blank U, Ra C, Miller L, White K, Metzger H, Kinet J-P. Complete structure and expression in transfected cells of the high affinity IgE receptor. *Nature* 1989; 337:187–189.
165. Miller L, Blank U, Metzger H, Kinet J-P. Expression of high-affinity binding of human immunoglobulin E by transfected cells. *Science* 1989;244:334–337.
166. Keegan AD, Paul WE. Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signaling pathways. *Immunol Today* 1992;13:63–68.
167. Cambier JC. Antigen and Fc receptor signaling: the awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* 1995;155: 3281–3285.
168. Daeron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 1997;15:203–234.
169. Takizawa F, Adamezewski M, Kinet J-P. Identification of the low affinity receptor for immunoglobulin E on mouse mast cells and macrophages, as Fc gamma RII and Fc gamma RIII. *J Exp Med* 1992;176:469–476.
170. Metzger H. Transmembrane signaling: the joy of aggregation. *J Immunol* 1992; 149:1477–1487.
171. Dembo M, Goldstein B, Sobotka AK, Lichtenstein LM. Degranulation of human basophils: quantitative analysis of histamine release and desensitization due to a bivalent penicilloyl hapten. *J Immunol* 1979;123:1864–1872.
172. Sterk AR, Ishizaka T. Binding properties of IgE receptors on normal mouse mast cells. *J Immunol* 1982;128:838–843.
173. Malveaux FJ, Conroy MC, Adkinson NF, Lichtenstein LM. IgE receptors on human basophils: relationship to serum IgE concentration. *J Clin Invest* 1978;62: 176–181.
174. Jouvin M-H, Numerof RP, Kinet J-P. Signal transduction through the conserved motifs of the high affinity IgE receptor FcεRI. *Semin Immunol* 1995;7:29–35.
175. Lin S, Cicaia C, Scharenberg AM, Kinet J-P. The FcεRIβ subunit functions as an amplifier of FcεRIγ-mediated cell activation signals. *Cell* 1996;85:985–995.
176. Vonakis BM, Chen H, Haleem-Smith H, Metzger H. The unique domain as the site on lyn kinase for its constitutive association with the high affinity receptor for IgE. *J Biol Chem* 1997;272:24072–24080.
177. Choi OH, Kim J-H, Kinet J-P. Calcium mobilization via sphingosine kinase in signalling by the FcεRI antigen receptor. *Nature* 1996;380:634–636.
178. Tsai M, Chen R-H, Tam S-Y, Blenis J, Galli SJ. Activation of MAP kinases, pp90^{rsk} and pp70-S6 kinases in mouse mast cells by signaling through the *c-kit* receptor tyrosine kinase or FcεRI: rapamycin inhibits activation of pp70-S6 kinase and proliferation in mouse mast cells. *Eur J Immunol* 1993;23:3286–3291.
179. Hirasawa N, Scharenberg A, Yamamura H, Beaven MA, Kinet J-P. A requirement for Syk in the activation of the MAP kinase/phospholipase A_2 pathway by FcεRI is not shared by a G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 1995;270: 10960–10967.
180. Beaven MA, Baumgartner PA. Downstream signals initiated in mast cells by FcεRI and other receptors. *Curr Opin Immunol* 1996;8:766–772.
181. Bolen JB, Brugge JS. Leukocyte protein tyrosine kinases: potential targets for drug discovery. *Annu Rev Immunol* 1997;15:371–404.
182. Hamawy MM, Mergenhagen SE, Siraganian RP. Protein tyrosine phosphorylation as a mechanism of signalling in mast cells and basophils. *Cell Signal* 1995; 7:535–544.
183. Kawakami Y, Yao L, Miura T, Tsukada S, Witte ON, Kawakami T. Tyrosine phosphorylation and activation of bruton tyrosine kinase upon FcεRI cross-linking. *Mol Cell Biol* 1994;14:5108–5113.
184. Eiseman E, Bolen JB. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature* 1992;355:78–80.
185. Penhallow RC, Class K, Sonoda H, Bolen JB, Rowley RB. Temporal activation of nontransmembrane protein-tyrosine kinases following mast cell Fc epsilon RI engagement. *J Biol Chem* 1995;270:23362–23365.
186. Hamawy MM, Mergenhagen SE, Siraganian RP. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK by the aggregation of high affinity immunoglobulin E receptors requires cell adherence. *J Biol Chem* 1993;268:6851–6854.
187. Ota Y, Beitz LO, Scharenberg AM, Donovan JA, Kinet J-P, Samelson LE. Characterization of Cbl tyrosine phosphorylation and a Cbl-Syk complex in RBL-2H3 cells. *J Exp Med* 1996;184:1713–1723.
188. Ota Y, Samelson LE. The product of the proto-oncogene *c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase.* Science 1997;276:418–420.
189. Hamawy MM, Swaim WD, Minoguchi K, de Feijter AW, Mergenhagen SE, Siraganian RP. The aggregation of the high affinity IgE receptor induces tyrosine phosphorylation of paxillin, a focal adhesion protein. *J Immunol* 1994;153: 4655–4662.
190. Berger SA, Mak TW, Paige CJ. Leukocyte common antigen (CD45) is required for immunoglobulin E-mediated degranulation of mast cells. *J Exp Med* 1994;180:471–476.
191. Adamczewski M, Numerof RP, Koretzky GA, Kinet J-P. Regulation by CD45 of the tyrosine phosphorylation of high affinity IgE receptor beta- and gamma-chains. *J Immunol* 1995;154:3047–3055.
192. Jabril-Cuenod B, Zhang C, Scharenberg AM, et al. Syk-dependent phosphorylation of Shc. *J Biol Chem* 1996;271:16268–16272.
193. Turner H, Reif K, Rivera J, Cantrell DA. Regulation of the adapter molecule Grb2 by the Fc epsilon RI in the mast cell line RBL2H3. *J Biol Chem* 1995; 270:9500–9506.
194. Scharenberg AM, Kinet J-P. The emerging field of receptor-mediated inhibitory signaling: SHP or SHIP? *Cell* 1996;87:961–964.
195. Amigorena S, Salamero J, Davoust J, Fridman WH, Bonnerot C. Tyrosine-containing motif that transduces cell activation signals also determines internalization and antigen presentation via type III receptors for IgG. *Nature* 1992;358:337–341.
196. Muta T, Kurosaki T, Misulovin Z, Sanchez M, Nussenzweig MC, Ravetch JV. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of the FcγRIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature* 1994;368:70–73.
197. Vivier E, Daeron M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today* 1997;18:286–291.
198. Daeron M, Latour S, Malbec O, et al. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intra-cytoplasmic domain of FcγRIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity* 1995;3:635–646.
199. Daeron M, Malbec O, Latour S, Arock M, Fridman WH. Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *J Clin Invest* 1995;95:577–585.
200. Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch JV. Augmented humoral and anaphylactic responses in FcγRII-deficient mice. *Nature* 1996;379:346–349.
201. Katz HR, Austen KF. A newly recognized pathway for the negative regulation of mast cell-dependent hypersensitivity and inflammation mediated by an endogenous cell surface receptor of the gp49 family. *J Immunol* 1997;158:5065–5070.
202. Guthmann MD, Tal M, Pecht I. A new member of the C-type lectin family is a modulator of mast cell secretory response. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107:82–86.
203. Ono M, Bolland S, Tempst P, Ravetch JV. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor FcγRIIB. *Nature* 1996;383:263–266.
204. Fleming TJ, Donnadieu E, Song CH, Van Laethem F, Galli SJ, Kinet J-P. Negative regulation of FcεRI-mediated degranulation by CD81. *J Exp Med* 1997;186: 1307–1314.
205. Wright MD, Tomlinson MG. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today* 1994;15:558–594.
206. Rottem M, Barbieri S, Kinet J-P, Metcalfe DD. Kinetics of the appearance of FcεRI-bearing cells in interleukin-3-dependent mouse bone marrow cultures: correlation with histamine content and mast cell maturation. *Blood* 1992;79:972–980.
207. Lantz CS, Huff TF. Murine KIT^{+} lineage^{-} bone marrow progenitors express FcγRII but do not express FcεRI until mast cell granule formation. *J Immunol* 1995;154:355–362.
208. Kinzer CA, Keegan AD, Paul WE. Identification of FcεRI^{neg} mast cells in mouse bone marrow cultures. Use of a monoclonal anti-p161 antibody. *J Exp Med* 1995;182:575–579.
209. Rodewald H-R, Dessing M, Dvorak AM, Galli SJ. Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science* 1996;271:818–822.
210. Conroy MC, Adkinson NF, Lichtenstein LM. Measurement of IgE on human basophils: relation to serum IgE and anti-IgE-induced histamine release. *J Immunol* 1977;118:1317–1321.
211. Stallman PJ, Aalberse RC, Bruhl PC, Van Elven EH. Experiments on the passive sensitization of human basophils, using quantitative immunofluorescence microscopy. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1977;54:364–373.
212. Lantz CS, Yamaguchi M, Oettgen HC, et al. IgE regulates mouse basophil FcεRI expression in vivo. *J Immunol* 1997;158:2517–2521.

213. Yamaguchi M, Lantz CS, Oettgen HC, et al. IgE enhances mouse mast cell FcεRI expression in vitro and in vivo. Evidence for a novel amplification mechanism In IgE-dependent reactions. *J Exp Med* 1997;185:663–672.
214. MacGlashan DW Jr, Bochner BS, Adelman DC, et al. Down-regulation of FcεRI expression on human basophils, during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J Immunol* 1997;158:1438–1445.
215. Shaikh N, Rivera J, Hewlett BR, Stead RH, Zhu F-G, Marshall JS. Mast cell FcεRI expression in the rat intestinal mucosa and tongue is enhanced during *Nippostrongylus brasiliensis* infection and can be up-regulated by in vivo administration of IgE. *J Immunol* 1997;158:3805–3812.
216. Yano K, Yamaguchi M, de Mora F, et al. Production of macrophage inflammatory protein-1α by human mast cells: increased anti-IgE-dependent secretion after IgE-dependent enhancement of mast cell IgE binding ability. *Lab Invest* 1997;77:185–193.
217. Toru H, Ra C, Nonoyama S, Suzuki K, Yata J, Nakahata T. Induction of the high-affinity IgE receptor (FcεRI) on human mast cells by IL-4. *Int Immunol* 1996;8:1367–1373.
218. Xia H-Z, Du Z, Craig S, et al. Effect of recombinant human IL-4 on tryptase, chymase, and Fcε receptor type I expression in recombinant human stem cell factor-dependent fetal liver-derived human mast cells. *J Immunol* 1997;159:2911–2921.
219. Banks EM, Coleman JW. A comparative study of peritoneal mast cells from mutant IL-4 deficient and normal mice: evidence that IL-4 is not essential for mast cell development but enhances secretion via control of IgE binding and passive sensitization. *Cytokine* 1996;8:190–196.
220. Conrad DH, Campbell KA, Bartlett WC, Squire CM, Dierks SE. Structure and function of the low affinity IgE receptor. *Adv Exp Med Biol* 1994;347:17–30.
221. Bonnefoy J-Y, Plater-Zyberk C, Lecoanet-Henchoz S, Gauchat J-F, Aubry J-P, Graber P. A new role for CD23 in inflammation. *Immunol Today* 1996;17:418–420.
222. Lecoanet-Henchoz S, Gauchat J-P, Aubry J-P, et al. CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18. *Immunity* 1995;3:119–125.
223. Yokota A, Kikutani H, Tanaka T, et al. Two species of human Fcε receptor II (FcεRII/CD23): tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene expression. *Cell* 1988;55:611–618.
224. Pirron U, Schlunck T, Prinz JC, Rieber EP. IgE-dependent antigen focusing by human B lymphocytes is mediated by the low-affinity receptor for IgE. *Eur J Immunol* 1990;20:1547–1551.
225. Mudde GC, Bheekha R, Bruijnzeel-Koomen CA. Consequences of IgE/CD23-mediated antigen presentation in allergy. *Immunol Today* 1995;16:380–383.
226. Kehry MR, Yamashita LC. Low-affinity IgE (CD23) function on mouse B cells: role in IgE dependent antigen focusing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7556–7560.
227. Costa JJ, Galli SJ. Mast cells and basophils. In: Rich R, Fleisher TA, Schwartz BD, Shearer WT, Strober W, eds. *Clinical immunology: principles and practice.* St. Louis: Mosby-Year Book, 1996:408–430.
228. Schwartz LB, Huff TF. Biology of mast cells and basophils. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice.* vol I. St. Louis: Mosby–Year Book, 1993:135–168.
229. Valent P, Bettelheim P. The human basophil. *Crit Rev Oncol Hematol* 1990;10:327–352.
230. Lantz CS, Boesiger J, Song CH, et al. Role for interleukin-3 in mast cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 1998;392:90–93.
231. Urbina C, Ortiz C, Hurtado I. A new look at basophils in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1981;66:158–160.
232. Dvorak AM, Nabel G, Pyne K, Cantor H, Dvorak HF, Galli SJ. Ultrastructural identification of the mouse basophil. *Blood* 1982;59:1279–1285.
233. Dvorak AM. Basophil and mast cell degranulation and recovery. In: Harris JR, ed. *Blood cell biochemistry.* vol 4. London: Plenum Press, 1991:1–415.
234. Kirshenbaum AS, Goff JP, Kessler SW, Mican JM, Zsebo KM, Metcalfe DD. Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells. *J Immunol* 1992;148:772–777.
235. Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* 1994;55:1–96.
236. Kitamura Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol* 1989;7:59–76.
237. Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, et al. Stem cell factor (SCF) is encoded at the *Sl* locus of the mouse and is the ligand for the c-*kit* tyrosine kinase receptor. *Cell* 1990;63:213–224.
238. Ando A, Martin TR, Galli SJ. Effects of chronic treatment with the c-*kit* ligand, stem cell factor, on immunoglobulin E-dependent anaphylaxis in mice: genetically mast cell-deficient *Sl/Sl*[d] mice acquire anaphylactic responsiveness, but the congenic normal mice do not exhibit augmented responses. *J Clin Invest* 1993;92:1639–1649.
239. Tsai M, Shih L, Newlands GFJ, et al. The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces the development of connective tissue-type and mucosal mast cells in vivo. Analysis by anatomical distribution, histochemistry, and protease phenotype. *J Exp Med* 1991;174:125–131.
240. Galli SJ, Iemura A, Garlick DS, Gamba-Vitalo C, Zsebo KM, Andrews RG. Reversible expansion of primate mast cell populations *in vivo* by stem cell factor. *J Clin Invest* 1993;91:148–152.
241. Costa JJ, Demetri GD, Harrist TJ, et al. Recombinant human stem cell factor (Kit ligand) promotes human mast cell and melanocyte hyperplasia and functional activation *in vivo*. *J Exp Med* 1996;183:2681–2686.
242. Galli SJ. New insights into "the riddle of the mast cell": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 1990;62:5–33.
243. Stevens RL, Austen KF. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol Today* 1989;10:381–386.
244. Church MK, Benyon RC, Rees PH, et al. Functional heterogeneity of human mast cells. In: Galli SJ, Austen KF, eds. *Mast cell and basophil differentiation and function in health and disease.* New York: Raven Press, 1989:161–170.
245. Bienenstock J, Befus AD, Denburg JA. Mast cell heterogeneity: basic questions and clinical implications. In: Befus AD, Bienenstock J, Denburg JA, eds. *Mast cell differentiation and heterogeneity.* New York: Raven Press, 1986:391–402.
246. Jarrett EEE, Miller HRP. Production and activities of IgE in helminth infection. *Prog Allergy* 1982;31:178–233.
247. Miller HRP, King SJ, Gibson S, Huntley JF, Newlands GFJ, Woodbury RG. Intestinal mucosal mast cells in normal and parasitized rats. In: Befus AD, Bienenstock J, Denburg JA, eds. *Mast cell differentiation and heterogeneity.* New York: Raven Press, 1986:239–255.
248. Ihle JN, Keller J, Orsozlan S, et al. Biological properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, P cell stimulating factor activity and histamine producing factor activity. *J Immunol* 1983;131:282–287.
249. Lee F, Yokota T, Otsuka T, et al. Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B cell stimulatory factor 1 activities and T cell and mast cell stimulating activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2061–2065.
250. Hamaguchi Y, Kanakura Y, Fujita J, et al. Interleukin 4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cells. *J Exp Med* 1987;165:268–273.
251. Madden KB, Urban JF, Ziltener HJ, Schrader JW, Finkelman FD, Katona IM. Antibodies to IL-3 and IL-4 supress helminth-induced intestinal mastocytosis. *J Immunol* 1991;147:1387–1391.
252. Hültner L, Druez C, Moeller J, et al. Mast cell growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P40/TCGFIII (interleukin 9). *Eur J Immunol* 1990;20:1413–1416.
253. Hunt JE, Stevens RL. Mouse mast cell proteases. In: Kitamura Y, Yamamoto S, Galli SJ, Greaves MW, eds. *Biological and molecular aspects of mast cell and basophil differentiation and function.* New York: Raven Press, 1995:149–160.
254. Lutzelschwab C, Pejler G, Aveskogh M, Hellman L. Secretory granule proteases in rat mast cells. Cloning of 10 different serine proteases and a carboxypeptidase A from various rat mast cell populations. *J Exp Med* 1997;185:13–29.
255. Miller HRP, Huntley JF, Newlands GFJ. Mast cell chymases in helminthosis and hypersensitivity. In: Caughey GH, ed. *Mast cell proteases in immunology and biology.* New York: Marcel Dekker Inc, 1995:203–235.
256. Schwartz LB. Heterogeneity of human mast cells. In: Kaliner MA, Metcalfe DD, eds. *The mast cell in health and disease.* New York: Marcel Dekker Inc, 1993:219–236.
257. Murakami M, Austen KF, Arm JP. Cytokine regulation of arachidonic acid metabolism in mast cells. In: Kitamura Y, Yamamoto S, Galli SJ, Greaves MW, eds. *Biological and molecular aspects of mast cell and basophil differentiation and function.* New York: Raven Press, Ltd., 1995:25.
258. Samet JM, Fonteh AN, Galli SJ, Tsai M, Fasano MB, Chilton FH. Alterations in arachidonic acid metabolism in mouse mast cells induced to undergo maturation in vitro in response to stem cell factor. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:1329–1341.
259. Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, Holgate ST. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol* 1995;155:297–307.
260. Gurish MF, Ghildyal N, McNeil HP, Austen KF, Gillis S, Stevens RL. Differential expression of secretory granule proteases in mouse mast cells exposed to interleukin 3 and c-kit ligand. *J Exp Med* 1992;175:1003–1012.
261. Galli SJ, Lichtenstein LM. Biology of mast cells and basophils. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson JNF, Yunginger JW, eds. *Allergy: principles and practice.* St. Louis: Mosby–Year Book, 1988:106–134.
262. Gordon JR, Burd PR, Galli SJ. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol Today* 1990;11:458–464.
263. Holgate ST, Robinson C, Church MK. Mediators of immediate hypersensitivity. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice.* St. Louis: Mosby–Year Book, 1993:267–301.
264. Galli SJ, Costa JJ. Mast cell-leukocyte cytokine cascades in allergic inflammation. *Allergy* 1995;50:851–862.
265. Valone FH, Boggs JM, Goetzl EJ. Lipid mediators of hypersensitivity and inflammation. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice.* St. Louis: Mosby–Year Book, 1993:302–319.
266. Young JD-E, Liu C, Butler G, Cohn ZA, Galli SJ. Identification, purification, and characterization of a mast cell-associated cytolytic factor related to tumor

necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9175–9179.

267. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 1990;346:274–276.
268. Gordon JR, Galli SJ. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated by the FcεRI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *J Exp Med* 1991;174:103–107.
269. Yamatodani A, Maeyama K, Watanabe T, Wada H, Kitamura Y. Tissue distribution of histamine in a mutant mouse deficient in mast cells: clear evidence for the presence of non-mast-cell histamine. *Biochem Pharmacol* 1982;31:305–309.
270. Murakami M, Matsumoto R, Urade Y, Austen KF, Arm JP. c-Kit ligand mediates increased expression of cytosolic phospholipase A2, prostaglandin endoperoxide synthase-1, and hematopoietic prostaglandin D_2 synthase and increased IgE-dependent prostaglandin D_2 generation in immature mouse mast cells. *J Biol Chem* 1995;270:3239–3246.
271. Bochner BS, Schleimer RP. The role of adhesion molecules in human eosinophil and basophil recruitment. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:427–438.
272. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993;11:767–804.
273. Galli SJ. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* 1993;328:257–265.
274. Wershil BK, Wang Z, Gordon JR, Galli SJ. Recruitment of neutrophils during IgE-dependent cutaneous late phase responses in the mouse is mast cell dependent: partial inhibition of the reaction with antiserum against tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 1991;87:446–453.
275. Wershil BK, Furuta GT, Wang Z-S, Galli SJ. Mast cell-dependent neutrophil and mononuclear cell recruitment in immunoglobulin E-induced gastric reactions in mice. *Gastroenterology* 1996;110:1482–1490.
276. Kung TT, Stelts D, Zurcher JA, et al. Mast cells modulate allergic pulmonary eosinophilia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:404–409.
277. Klein LM, Lavker RM, Matis WL, Murphy GF. Degranulation of human mast cells induces an endothelial antigen central to leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8972–8976.
278. Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor α, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4220–4224.
279. Boesiger J, Tsai M, Maurer M, et al. Mast cells can secrete VPF/VEGF and exhibit enhanced release after IgE-dependent upregulation of FcεRI expression (*submitted*).
280. Robinson DS, Durham SR, Kay AB. Cytokines. III. Cytokines in asthma. *Thorax* 1993;148:401–406.
281. Schleimer RP. Glucocorticosteroids. Their mechanisms of action and use in allergic diseases. In: Middleton E Jr, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice.* St. Louis: Mosby–Year Book, 1993:893–925.
282. Wershil BK, Furuta GT, Lavigne JA, Choudhury AR, Wang Z-S, Galli SJ. Dexamethasone or cyclosporin A suppresses mast cell-leukocyte cytokine cascades. *J Immunol* 1995;154:1391–1398.
283. MacDonald SM, Rafnar T, Langdon J, Lichtenstein LM. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* 1995;269:688–690.
284. Wershil BK, Tsai M, Geissler EN, Zsebo KM, Galli SJ. The rat *c-kit* ligand, stem cell factor, induces *c-kit* receptor-dependent mouse mast cell activation in vivo. Evidence that signaling through the *c-kit* receptor can induce expression of cellular function. *J Exp Med* 1992;175:245–255.
285. Nakajima K, Hirai K, Yamaguchi M, et al. Stem cell factor has histamine releasing activity in rat connective tissue-type mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;183:1076–1083.
286. Columbo M, Horowitz EM, Botana LM, et al. The human recombinant *c-kit* receptor ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast cells and enhances IgE-dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils. *J Immunol* 1992;149:599–608.
287. Coleman JW, Holliday MR, Kimber I, Zsebo KM, Galli SJ. Regulation of mouse peritoneal mast cell secretory function by stem cell factor, IL-3 or IL-4. *J Immunol* 1993;150:556–562.
288. Gagari E, Tsai M, Lantz CS, Fox LG, Galli SJ. Differential release of mast cell interleukin-6 via c-kit. *Blood* 1997;89:2654–2663.
289. Leal-Berumen I, Conlon P, Marshall JS. IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994;152:5468–5476.
290. Galli SJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Basophils and mast cells: morphologic insights into their biology, secretory patterns, and function. *Prog Allergy* 1984;34:1–141.
291. Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol* 1986;39:177–253.
292. Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med* 1993;44:85–101.
293. Weller PF. The immunobiology of eosinophils. *N Engl J Med* 1991;324:1110–1118.
294. Weller PF, Dvorak AM. Human eosinophils—development, maturation and functional morphology. In: Busse W, Holgate ST, eds. *Asthma and rhinitis.* Boston: Blackwell Scientific, 1994:225–274.
295. Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med* 1997;186:909–920.
296. Dvorak AM, Dvorak HF, Peters SP, et al. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J Immunol* 1983;131:2965–2976.
297. Hammel I, Dvorak AM, Peters SP, et al. Differences in the volume distributions of human lung mast cell granules and lipid bodies: evidence that the size of these organelles is regulated by distinct mechanisms. *J Cell Biol* 1985;100:1488–1492.
298. Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992;79:3101–3109.
299. Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med* 1995;182:1169–1174.
300. Weller PF. Lipid, peptide and cytokine mediators elaborated by eosinophils. In: Smith H, Cook M, eds. *Immunopharmacology of eosinophils. The handbook of immunopharmacology.* London: Academic Press, 1993:25–42.
301. Galli SJ, Gordon JR, Wershil BK, et al. Mast cell and eosinophil cytokines in allergy and inflammation. In: Gleich GJ, Kay AB, eds. *Eosinophils: immunological and clinical aspects.* New York: Marcel Dekker Inc, 1994:255–280.
302. Moqbel R, Levi-Schaffer F, Kay AB. Cytokine generation by eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:1183–1188.
303. Desreumaux P, Capron M. Eosinophils in allergic reactions. *Curr Opin Immunol* 1996;8:790–795.
304. Kita H. The eosinophil—a cytokine-producing cell. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:889–892.
305. Capron M, Soussi Gounni A, Morita M, et al. Eosinophils: from low- to high-affinity immunoglobulin E receptors. *Allergy* 1995;50:20–23.
306. Humbert M, Grant JA, Taborda-Barata L, et al. High-affinity IgE receptor (FcεRI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1931–1937.
307. Abu-Ghazaleh RI, Fujisawa T, Mestecky J, Kyle RA, Gleich GJ. IgA-induced eosinophil degranulation. *J Immunol* 1989;142:2393–2400.
308. Resnick MB, Weller PF. Mechanisms of eosinophil recruitment. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1993;8:349–355.
309. Wein M, Sterbinsky SA, Bickel CA, Schleimer RP, Bochner BS. Comparison of human eosinophil and neutrophil ligands for P-selectin: ligands for P-selectin differ from those for E-selectin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:315–319.
310. Weller PF, Rand TH, Goelz SE, Chi-Rosso G, Lobb RR. Human eosinophil adherence to vascular endothelium mediated by binding to VCAM-1 and ELAM-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7430–7433.
311. Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA, et al. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* 1991;173:1553–1557.
312. Rott LS, Briskin MJ, Andrew DP, Berg EL, Butcher EC. A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal cell adhesion molecule-1. *J Immunol* 1996;156:3726–3727.
313. Weg VB, Williams TJ, Lobb RR, Nourshargh S. A monoclonal antibody recognizing very late activation antigen-4 inhibits eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med* 1993;177:561–566.
314. Pretolani M, Ruffie C, Lapa e Silva JR, Joseph D, Lobb RR, Vargaftig BB. Antibody to very late activation antigen 4 prevents antigen-induced bronchial hyperreactivity and cellular infiltration in the guinea pig airways. *J Exp Med* 1994;180:795–805.
315. Abraham WM, Sielczak MW, Ahmed A, et al. Alpha 4-integrins mediate antigen-induced late bronchial responses and prolonged airway hyperresponsiveness in sheep. *J Clin Invest* 1994;93:776–787.
316. Weller PF, Rand TH, Barrett T, Elovic A, Wong DT, Finberg RW. Accessory cell function of human eosinophils. HLA-DR-dependent, MHC-restricted antigen-presentation and interleukin-α expression. *J Immunol* 1993;150:2554–2562.
317. Sedgwick JB, Quan SF, Calhoun WJ, Busse WW. Effect of interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor on in vitro eosinophil function: comparison with airway eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:375–385.
318. Gounni AS, Lamkioued B, Delaporte E, et al. The high-affinity IgE receptor on eosinophils: from allergy to parasites or from parasites to allergy? *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:1214–1216.
319. Ohkawara Y, Lim KG, Xing Z, et al. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *J Clin Invest* 1996;97:1761–1766.
320. Robinson DS, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, Durham SR. Activation of CD4+ T cells, increased Th2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:313–324.
321. Bentley AM, Meng Q, Robinson DS, Hamid Q, Kay AB, Durham SR. Increases in activated T lymphocytes, eosinophils and cytokine messenger RNA for IL-5 and GM-CSF in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8:35–42.
322. Takeda K, Hamelmann E, Joetham A, et al. Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mast cell-deficient mice. *J Exp Med* 1997;186:449–454.

323. Nogami M, Suko M, Okidaira. H, et al. Experimental pulmonary eosinophilia in mice by *Ascaris suum* extract. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:1289–1295.
324. Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, et al. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy* 1994;24:73–80.
325. Coyle AJ, Wagner K, Betrand C, Tsuyuki S, Bews J, Heusser C. Central role of immunoglobulin (Ig) E in the induction of lung eosinophil infiltration and T helper 2 cell cytokine production: inhibition by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody. *J Exp Med* 1996;183:1303–1310.
326. Holt PG. Macrophages and dendritic cells in allergic reactions. In: Kay AB, ed. *Allergy and Allergic Diseases.* Vol. 1. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997: 228–243.
327. Rankin JA, Lee TH. Monocytes and macrophages. In: Middleton EJ, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NFJ, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: Principles and Practice.* Vol. 1. St. Louis: Mosby—Year Book, Inc., 1993:226–242.
328. Ovary Z. Quantitative studies in passive cutaneous anaphylaxis of the guinea pig. *Int Arch Allergy App Immunol* 1952;3:162–174.
329. Wershil BK, Mekori YA, Murakami T, Galli SJ. ^{125}I-fibrin deposition in IgE-dependent immediate hypersensitivity reactions in mouse skin. Demonstration of the role of mast cells using genetically mast cell-deficient mice locally reconstituted with cultured mast cells. *J Immunol* 1987;139:2605–2614.
330. Mekori YA, Galli SJ. [^{125}I]fibrin deposition occurs at both early and late intervals of IgE-dependent or contact sensitivity reactions elicited in mouse skin. *J Immunol* 1990;145:3719–3727.
331. Martin TR, Takeishi T, Katz HR, Austen KF, Drazen JM, Galli SJ. Mast cell activation enhances airway responsiveness to methacholine in the mouse. *J Clin Invest* 1993;91:1176–1182.
332. Alter SC, Schwartz LB. Tryptase: An indicator of mast cell-mediated allergic reactions. *Prov Chall Proc* 1989:167–183.
333. Wenzel SE, Fowler AAI, Schwartz LB. Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge. *In vivo* release of histamine and tryptase in atopic subjects with and without asthma. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:1002–1008.
334. Blackley CH. Experimental Researches on the Causes and Nature of Catarrhus Aestivus: Republished by Dawson's of Pall Mall (Ballierre, Tindall and Cox, 1873), 1859:p.80.
335. Bentley AM, Kay AB, Durham SR. Human late asthmatic responses. In: Kay AB, ed. *Allergy and Allergic Diseases.* Vol. 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997: 1113–1130.
336. Frew AJ. Late-phase skin reactions. In: Kay AB, ed. *Allergy and Allergic Diseases.* Vol. 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1131–1138.
337. Peebles RS, Togias A. Late-phase reactions in the nose. In: Kay AB, ed. *Allergy and Allergic Diseases.* Vol. 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1139–1160.
338. Lemanske RFJ, Kaliner MA. Late phase allergic reactions. In: Middleton EJ, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NFJ, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: Principles and Practice.* Vol. 1. St. Louis: Mosby—Year Book, Inc., 1993:320–361.
339. Dolovich J, Denberg J, Kwee YN, Belda T, Blajchman J, Hargreave FE. Does non-immunologic mast cell mediator release/activation elicit a late cutaneous response? *Ann Allergy* 1983;50:241–244.
340. Schleimer RP. The effects of glucocortocoids on mast cells and basophils. In: Schleimer RP, Claman HN, Oronsky A, eds. *Anti-Inflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects.* San Diego: Academic Press, 1989:226.
341. Hatfield SM, Roehm NW. Cyclosporin and FK506 inhibition of murine mast cell cytokine production. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;260:680–688.
342. Kaye RE, Fruman DA, Bierer BE, et al. Effects of cyclosporin A and FK506 on Fc epsilon receptor type I-initiated increases in cytokine mRNA in mouse bone marrow-derived progenitor mast cells: resistance to FK506 is associated with a deficiency in FK506-binding protein FKBP12. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:8542–8546.
343. Sigal NH, Dumont FJ. Cyclosporin A, FK-506, and Rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1992;10:519–560.
344. Hogg JC. Post-mortem pathology in asthma. In: Kay AB. ed. *Allergy and Allergic Diseases.* Vol. 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1360–1365.
345. Holgate ST. Aetiology and pathogenesis of asthma. In: Kay AB, ed. *Allergy and Allergic Diseases.* Vol. 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1366–1378.
346. Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids for asthma. *N Engl J Med* 1995;332:868–875.
347. Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T. A comparative study of the effects of an inhaled corticosteroid, budesonide, and of a β_2-agonist, terbutaline, on airway inflammation in newly diagnosed asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90: 32–42.
348. Trigg CJ, Manolitsas ND, Wang J, et al. Placebo-controlled immunopathologic study of four months of inhaled corticosteroids in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:17–22.
349. Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, Ruddle NH. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J Exp Med* 1996;183: 1461–1472.
350. Koni PA, Sacca R, Lawton P, Browning JL, Ruddle NH, Flavell RA. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* 1997;6:491–500.
351. Gordon JR, Galli SJ. Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via the FcεRI. Role for mast cell-derived transforming growth factor β and tumor necrosis factor α. *J Exp Med* 1994;180:2027–2037.
352. Kendall JC, Li XH, Galli SJ, Gordon JR. Promotion of mouse fibroblast proliferation by IgE-dependent activation of mouse mast cells: Role for mast cell tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:113–123.
353. Echtenacher B, Männel DN, Hültner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 1996;381:75–77.
354. Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-α. *Nature* 1996;381:77–80.
355. Prodeus AP, Zhou X, Maurer M, Galli SJ, Carroll MC. Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. *Nature* 1997;390: 172–175.
356. Galli SJ, Wershil BK. The two faces of the mast cell. *Nature* 1996;381:21–22.
357. Bell RG. IgE, allergies and helminth parasites: A new perspective on an old conundrum. *Immunol Cell Biol* 1996;74:337–345.
358. Woolhouse ME, Taylor P, Matanhire D, Chandiwana SK. Acquired immunity and epidemiology of *Schistosoma haematobium. Nature* 1991;351:757–759.
359. Reed ND. Function and regulation of mast cells in parasite infections. In: Galli SJ, Austen KF, eds. *Mast Cell and Basophil Differentiation and Function in Health and Disease.* New York: Raven Press, 1989:205–215.
360. Abe T, Nawa Y. Localization of mucosal mast cells in *W/W^v* mice after reconstitution with bone marrow cells or cultured mast cells, and its relation to the protective capacity to *Strongyloides ratti* infection. *Parasite Immunol* 1987;9: 477–485.
361. Abe T, Nawa Y. Reconstitution of mucosal mast cells in *W/W^v* mice by adoptive transfer of bone marrow-derived cultured mast cells and its effects on the protective capacity to *Strongyloides ratti*-infection. *Parasite Immunol* 1987;9:31–38.
362. Nawa Y, Kiyota M, Korenaga M, Kotani M. Defective protective capacity of *W/W^v* mice against *Strongyloides ratti* infection and its reconstitution with bone marrow cells. *Parasite Immunol* 1985;7:429–438.
363. King CL, Xianli J, Malhotra I, Liu S, Mahmoud AAF, Oettgen HC. Mice with a targeted deletion of the IgE gene have increased worm burdens and reduced granulomatous inflammation following primary infection with *Schistosoma mansoni. J Immunol* 1997;158:294–300.
364. Mach N, Lantz CS, Galli SJ, et al. Involvement of interleukin-3 in delayed-type hypersensitivity. *Blood* 1998;91:778–783.
365. Matsuda H, Watanabe N, Kiso Y, et al. Necessity of IgE antibodies and mast cells for manifestation of resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks in mice. *J Immunol* 1990;144:259–262.
366. Steeves EB, Allen JR. Basophils in skin reactions of mast cell-deficient mice infested with *Dermacentor variabilis. Int J Parasitol* 1990;20:655–667.
367. Brown SJ, Galli SJ, Gleich GJ, Askenase PW. Ablation of immunity to *Amblyomma americanum* by anti-basophil serum: cooperation between basophils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasites (ticks) in guinea pigs. *J Immunol* 1982;129:790–796.
368. Arizono N, Kasugai T, Yamada M, et al. Infection of *Nippostrongylus brasiliensis* induces development of mucosal-type but not connective tissue-type mast cells in genetically mast cell-deficient Ws/Ws rats. *Blood* 1993;81:2572–2578.
369. Newlands GFJ, Miller HRP, MacKellar A, Galli SJ. Stem cell factor contributes to intestinal mucosal mast cell hyperplasia in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis* or *Trichinella spiralis,* but anti-stem cell factor treatment decreases parasite egg production during *N. brasiliensis* infection. *Blood* 1995;86: 1968–1976.
370. Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, et al. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 1992;116:369–375.
371. Amiri P, Haak-Frendscho M, Robbins K, McKerrow JH, Stewart T, Jardieu P. Anti-immunoglobulin E treatment decreases worm burden and egg production in *Schistosoma mansoni*-infected normal and interferon γ knockout mice. *J Exp Med* 1994;180:43–51.
372. Wershil BK, Theodos CM, Galli SJ, Titus RG. Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania major* infection in the mouse. *J Immunol* 1994;152:4563–4571.
373. Sher A, Coffman RL, Hieny S, Cheever AW. Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J Immunol* 1990;145:3911–3916.
374. Herndon FJ, Kayes SG. Depletion of eosinophils by anti-IL-5 monoclonal antibody treatment of mice infected with *Trichinella spiralis* does not alter parasite burden or immunologic resistance to reinfection. *J Immunol* 1992;149:3642–3647.
375. Negrão-Corrêa D, Adams LS, Bell RG. Intestinal transport and catabolism of IgE: a major blood-independent pathway of IgE dissemination during a *Trichinella spiralis* infection of rats. *J Immunol* 1996;157:4037–4044.
376. Welliver RC, Wong DT, Sun M, Middleton EJ, Vaughan RS, Ogra PL. The development of respiratory syncytial virus-specific IgE and the release of histamine in nasopharyngeal secretions after infection. *N Engl J Med* 1981;305:841–846.
377. Welliver RC, Wong DT, Middleton EJ, Sun M, McCarthy N, Ogra PL. Role of parainfluenza virus-specific IgE in pathogenesis of croup and wheezing subsequent to infection. *J Pediatr* 1982;101:889–896.
378. Pauwels R, Verschraegen G, van der Straeten M. IgE antibodies to bacteria in patients with bronchial asthma. *Allergy* 1980;35:665–669.
379. Abramson JS, Dahl MV, Walsh G, Blumenthal MN, Douglas SD, Quie PG. Antistaphylococcal IgE in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1982; 7:105–110.

380. Kjaergard LL, Larsen FO, Norn S, Clementsen P, Skov PS, Permin H. Basophil-bound IgE and serum IgE directed against Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae in patients with chronic bronchitis during acute exacerbation. *APMIS* 1996;104:61–67.
381. Turkeltaub PC, Gergen PJ. Prevalence of upper and lower respiratory conditions in the U.S. population by social and environmental factors: data from the second National Health and Nutrition Examination Survey, 1976 to 1980: NHANES II. *Ann Allergy* 1991;67:147–154.
382. Nathan RA, Meltzer EO, Selner JC, Storms W. Prevalence of allergic rhinitis in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:S808–S814.
383. Evans R. III. Epidemiology and natural history of asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. In: Middleton EJ, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NFJ, Yuninger W, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice.* vol I. St. Louis: Mosby–Year Book, 1993:1109–1136.
384. Goldstein RA, Paul WE, Metcalfe DD, Busse WW, Reece ER. Asthma. *Ann Intern Med* 1994;121:698–708.
385. Sullivan SD, Weiss KB. Assessing cost-effectiveness in asthma care: building an economic model to study the impact of alternative intervention strategies. *Allergy* 1993;48:146–152.
386. Schultz LF. A genetic epidemiologic study in a population based twin sample. *J Am Acad Dermatol* 1986;15:487–494.
387. Sibbald B. Familial inheritance of asthma and allergy. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1177–1186.
388. Hanson B, McGue M, Roitman-Johnson B, Segal NL, Bouchard TJJ, Blumenthal MN. Atopic disease and immunoglobulin E in twins reared apart and together. *Am J Hum Genet* 1991;48:873–879.
389. Zeiger RS. Development and prevention of allergic disease in childhood. In: Middleton EJ, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NFJ, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice.* vol II. St. Louis: Mosby–Year Book, 1993: 1137–1171.
390. Platts-Mills TAE, Hayden ML, Chapman MD, Wilkins SR. Seasonal variation in dust mite and grass-pollen allergens in dust from the houses of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987;79:781–791.
391. Platts-Mills TAE, Woodfolk JA. Dust mites and asthma. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:888–899.
392. Platts-Mills TAE, Carter MC. Asthma and indoor exposure to allergens. *N Engl J Med* 1997;336:1382–1384.
393. Hide D, Warner JA. Prevention of allergy in the fetus and newborn. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997: 1715–1725.
394. Wershil BK, Walker WA. The mucosal barrier, IgE-mediated gastrointestinal events, and eosinophilic gastroenteritis. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21: 387–404.
395. Warner JO. Food allergy in fully breast-fed infants. *Clin Allergy* 1980;10: 133–136.
396. Stuart CA, Twiselton R, Nicholas MK, Hide DW. Passage of cows' milk protein in breast milk. *Clin Allergy* 1984;14:533–535.
397. Bjorksten F, Suoniemi I, Koski V. Neonatal birch-pollen contact and subsequent allergy to birch pollen. *Clin Allergy* 1980;10:585–591.
398. Bjorksten F, Suoniemi I. Time and intensity of first pollen contacts and risk of subsequent pollen allergies. *Acta Med Scand* 1981;209:299–303.
399. Jones AC, Miles EA, Warner JO, Colwell BM, Bryant TN, Warner A. Fetal peripheral blood mononuclear cell proliferative responses to mitogenic and allergenic stimuli during gestation. *Pediatr Allergy Immunol* 1996;7:109–116.
400. Takafuji S, Suzuki S, Muranaka M, Miyamoto T. Influence of environmental factors on IgE production. *Ciba Found Symp* 1989;147:188–204.
401. Takafuji S, Suzuki S, Koizumi K, et al. Enhancing effect of suspended particulate matter on the IgE antibody production in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989;90:1–7.
402. Takenaka H, Zhang K, Diaz-Sanchez D, Tsien A, Saxon A. Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: direct effects on B-cell IgE production. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95:103–115.
403. Arshad SH, Stevens M, Hide DW. The effect of genetic and environmental factors on the prevalence of allergic disorders at the age of two years. *Clin Exp Allergy* 1993;23:504–511.
404. Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S-i, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997;275:77–79.
405. Cookson WOCM, Moffatt MF. Asthma: an epidemic in the absence of infection? *Science* 1997;275:41–42.
406. Holt PG. A potential vaccine strategy for asthma and allied atopic diseases during early childhood. *Lancet* 1994;344:456–458.
407. Bochner BS, Lichtenstein LM. Anaphylaxis. *N Engl J Med* 1991;324: 1785–1790.
408. Lane SJ, Lee TH. Anaphylaxis. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1550–1572.
409. Martin TR, Ando A, Takeishi T, Katona IM, Drazen JM, Galli SJ. Mast cells contribute to the changes in heart rate, but not hypotension or death, associated with active anaphylaxis in mice. *J Immunol* 1993;151:367–376.
410. Yunginger JW, Nelson DR, Squillace DL, et al. Laboratory investigation of deaths due to anaphylaxis. *J Forensic Sci* 1991;36:857–865.
411. Calderon-Zapata MA, Davies RJ. Treatment and management of allergic rhinitis. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1327–1343.
412. Naclerio RM, Proud D, Togias AG, et al. Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis. *N Engl J Med* 1985;313:65–70.
413. Bascom R, Wachs M, Naclerio RM, Pipkorn U, Galli SJ, Lichtenstein LM. Basophil influx occurs after nasal antigen challenge: effects of topical corticosteroid pretreatment. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:580–589.
414. Naclerio RM. Allergic rhinitis. *N Engl J Med* 1991;325:860–869.
415. Pare PD, Bai TR. The consequences of chronic allergic inflammation. *Thorax* 1995;50:328–332.
416. Drazen JM, Arm JP, Austen KF. Sorting out the cytokines of asthma. *J Exp Med* 1996;183:1–5.
417. Austen KF. In: Kay AB, Austen KF, Lichtenstein LM, eds. *Asthma: physiology, immunopharmacology and treatment.* London: Academic Press, 1984:425.
418. Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 1989;46:111–147.
419. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990;323:1033–1039.
420. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, et al. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326:298–304.
421. Bruijnzeel-Koomen CAFM, Mudde GC, Kapp A. Atopic dermatitis. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science, Ltd., 1997: 1573–1585.
422. Hanifin J, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Dermatol Venereol* 1980;92:44–47.
423. Kay J, Gawkrodger DJ, Mortimer MJ, Jaron AG. The prevalence of childhood atopic eczema via general population. *J Am Acad Dermatol* 1994;30:35–39.
424. Grewe M, Gyufho K, Schopf E, Krutmann J. Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema. *Lancet* 1994;343:25–26.
425. Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DYM. Differential *in situ* cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest* 1994;105:407–410.
426. Thepen T, Langeveld-Wildschut EG, Bihari IC, et al. Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial Th2 response to a Th1 response *in situ: an immunocytochemical study. J Allergy Clin Immunol* 1996;97:828–837.
427. Ramb-Lindhauer C, Feldmann A, Rotte M, Neumann C. Characterization of a grass pollen reactive T cell lines derived from lesional atopic skin. *Arch Dermatol Res* 1991;283:71–76.
428. van der Heyden FL, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg MC. High frequency of IL-4 producing CD4+ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. *J Invest Dermatol* 1991;97:389–394.
429. van Reijsen FC, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Kalthoff FS. Skin-derived aeroallergen-specific T cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:184–193.
430. Kapp A. The role of eosinophils in the pathogenesis of atopic dermatitis-eosinophil granule proteins as markers of disease activity. *Allergy* 1993;48:1–5.
431. Leiferman K, Acherman S, Sampson H, Haugen H, Venencie P, Gleich G. Dermal deposition of eosinophil granule major basic protein in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 1985;313:282–285.
432. Buckley C, Ivison C, Poulter LW, Rustin MH. CD23/FcεRII expression in contact sensitivity reactions: a comparison between aeroallergen patch test reactions in atopic dermatitis and the nickel patch test reaction in non-atopic individuals. *Clin Exp Immunol* 1993;91:357–361.
433. Mudde GC, van Reijsen FC, Boland GJ, de Gast GC, Brunjzeel PLB, Brunjzeel-Koomen CAFM. Allergen presentation by epidermal Langerhans' cells from patients with atopic dermatitis is mediated by IgE. *Immunology* 1990;69: 335–341.
434. Santamaria LF, Bheekha R, van Reijsen FC, et al. Antigen focusing by specific monomeric IgE bound to CD23 on EBV-transformed B cells. *Hum Immunol* 1993;37:23–30.
435. van der Heijden FL, van Neerven RJJ, van Katwijk M, Bos JD, Kapsenberg ML. Serum IgE-facilitated allergen presentation in atopic disease. *J Immunol* 1993; 150:3643–3650.
436. Tobin D, Nabarro G, Baart de la Faille H, van Vloten WV, van der Putte SCJ, Schuurman HJ. Increased immunoreactive fibers in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:613–622.
437. Warner JO. Childhood asthma. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1451–1463.
438. Church MK, Warner JO. Sodium cromoglycate and related drugs. *Clin Allergy* 1985;15:311–320.
439. Eady RP, Norris AA. Nedocromil sodium and sodium cromoglycate: pharmacology and putative modes of action. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 1. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:584–595.
440. Yunginger JW. Lethal food allergy in children. *N Engl J Med* 1992;327:421–422.
441. Nordlee JA, Taylor SL, Townsend JA, Thomas LA, Bush RK. Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *N Engl J Med* 1996;334:726–728.
442. Durham SR, Varney VA. Allergen injection immunotherapy: mechanisms. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1227–1233.
443. Van Metre TEJ, Adkinson NFJ. Immunotherapy for aeroallergen disease. In:

Middleton EJ, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NFJ, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles and practice.* vol II. St. Louis: Mosby–Year Book, 1993: 1489–1509.

444. Hedlin G, Silber G, Naclerio R, Proud D, Eggleston P, Adkinson NFJ. Attenuation of allergen sensitivity early in the course of ragweed immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84:390–399.
445. Otsuka H, Mezawa A, Ohnishi M, Okubo K, Seki H, Okuda M. Changes in nasal metachromatic cells during allergen immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1991;21: 115–120.
446. Durham SR, Ying S, Varney VA, et al. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:1356–1365.
447. Hunt KJ, Valentine MD, Sobotka AK, Benton AW, Amodio FJ, Lichtenstein LM. A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Engl J Med* 1978;299:157 161.
448. Holt PG, Batty JE, Turner KJ. Inhibition of specific IgE responses in mice by pre-exposure to inhaled antigen. *Immunology* 1981;42:409–417.
449. Holt PG, McMenamin C. Defense against allergic sensitization in the healthy lung: the role of inhalation tolerance. *Clin Exp Allergy* 1989;19:255–262.
450. Hoyne GF, Hetzel C, Lamb JR. Immunological tolerance and T-cell anergy. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 1. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:131–146.
451. Hoyne GF, Callow MG, Kuhlman J, Thomas WR. T-cell lymphokine response to orally administered antigens during priming and unresponsiveness. *Immunology* 1993;78:534–540.
452. Briner TJ, Kuo MC, Keating KM, Rogers BL, Greenstein JL. Peripheral T-cell tolerance induced in naive and primed mice by subcutaneous injection of peptides from the major cat allergen Fel d I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 7608–7612.
453. Hoyne GF, Kristensen NM, Yssel H, Lamb JR. Peptide modulation of allergen-specific immune response. *Curr Opin Immunol* 1995;7:757–761.
454. Norman PS, Ohman JLJ, Long AA, et al. Treatment of cat allergy with T-cell reactive peptides. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1623–1628.
455. van Neerven RJJ, Ebner C, Yssel H, Kapsenberg ML, Lamb JR. T-cell responses to allergens: epitope-specificity and clinical relevance. *Immunol Today* 1996;17: 526–532.
456. Kudo K, Okudaira H, Miyamoto T, Nakagawa T, Horiuchi Y. IgE antibody response to mite antigen in the mouse. Suppression of an established IgE antibody response by chemically modified antigen. *J Allergy Clin Immunol* 1978;61: 1–9.
457. Takai T, Yokota T, Yasue M, et al. Engineering of the major house dust mite allergen Der f 2 for allergen-specific immunotherapy. *Nat Biotechnol* 1997;15: 754–758.
458. Chang TW, Davis FM, Sun NC, Sun CR, MacGlashan DW Jr, Hamilton RG. Monoclonal antibodies specific for human IgE-producing B cells: a potential therapeutic for IgE-mediated allergic diseases. *Biotechnology* 1990;8:122–126.
459. Boulet L-P, Chapman KR, Cote J, et al. Inhibitory effects of an anti-IgE antibody E25 on allergen-induced early asthmatic response. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1835–1840.
460. Fahy JV, Fleming HE, Wong HH, et al. The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1828–1834.
461. Lustgarten J, Waks T, Eshhar Z. Prolonged inhibition of IgE production in mice following treatment with an IgE-specific immunotoxin. *Mol Immunol* 1996;33: 245–251.
462. Hellman L. Profound reduction in allergen sensitivity following treatment with a novel allergy vaccine. *Eur J Immunol* 1994;24:415–420.
463. Stadler BM, Rudolf MP, Vogel M, Miescher S, Zurcher AW, Kricek F. Can active immunization redirect an anti-IgE immune response? *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:216–218.
464. Hellman L, Carlsson M. Allergy vaccines—a review of developments. *Clin Immunother* 1996;6:130–142.
465. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241–251.
466. Paul WE. Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response. *Cell* 1989;50:328–332.
467. Takeda K, Kishimoto T, Akira S. STAT6: Its role in interleukin 4-mediated biological functions. *J Mol Med* 1997;75:317–326.
468. Boguniewicz M, Jaffe HS, Izu A, et al. Recombinant gamma interferon in treatment of patients with atopic dermatitis and elevated IgE levels. *Am J Med* 1990;88:365–369.
469. Hanifin JM, Schneider LC, Leung DYM, et al. Recombinant interferon gamma therapy for atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:189–197.
470. Kinet J-P. The high-affinity receptor for IgE. *Curr Opin Immunol* 1990;2:499–505.
471. Church MK, Hiroi J. Inhibition of IgE-dependent histamine release from human dispersed lung mast cells by anti-allergic drugs and salbutamol. *Br J Pharmacol* 1987;90:421–429.
472. Peters SP, Schulman ES, Schleimer RP, MacGlashan DW Jr, Newball HH, Lichtenstein LM. Dispersed human lung mast cells. Pharmacologic aspects and comparison with human lung tissue fragments. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:1034–1039.
473. Undem BJ, Peachell PT, Lichtenstein LM. Isoproterenol-induced inhibition of immunoglobulin E-mediated release of histamine and arachidonic acid metabolites from the human lung mast cell. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;247:209–217.
474. Dahlen SE, Nizankowska E, Dahlen B. The Swedish-Polish treatment study with the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton in aspirin-intolerant asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:A376(abst).
475. Israel E, Rubin P, Kemp JP, et al. The effect of inhibition of 5-lipoxygenase by zileuton in mild-to-moderate asthma. *Ann Intern Med* 1993;119:1059–1066.
476. Israel E, Cohn J, Dube L, Drazen JM. Effect of treatment with zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor, in patients with asthma—a randomized controlled trial. *JAMA* 1996;275:931–936.
477. Barnes PJ. Glucocorticosteroids. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 1. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:619–641.
478. Barnes PJ. Treatment of chronic asthma in adults. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1429–1439.
479. Owens GP, Hahn WE, Cohen JJ. Identification of mRNAs associated with programmed cell death in immature thymocytes. *Mol Cell Biol* 1991;11:4177–4188.
480. Lavker RM, Schechter NM. Cutaneous mast cell depletion results from topical corticosteroid usage. *J Immunol* 1985;135:2368–2373.
481. Finotto S, Mekori YA, Metcalfe DD. Glucocorticoids decrease tissue mast cell number by reducing the production of the c-kit ligand, stem cell factor, by resident cells: in vitro and in vivo evidence in murine systems. *J Clin Invest* 1997;99:1721–1728.
482. Szczeklik A, Nezankowska E, Dworski R, Domagala B, Pinis G. Cyclosporin for steroid-dependent asthma. *Allergy* 1990;46:312.
483. Alexander AG, Barnes NC, Kay AB. Trial of cyclosporin in corticosteroid-dependent chronic severe asthma. *Lancet* 1992;339:324–328.
484. Granlund H, Erkko P, Sinisalo M, Reitamo S. Cyclosporin in atopic dermatitis: time to relapse and effect of intermittent therapy. *Br J Dermatol* 1995;132: 106–112.
485. Ruzicka T, Bieber T, Schopf E, et al. A short-term trial of tacrolimus ointment for atopic dermatitis. *N Engl J Med* 1997;337:816–821.
486. Du Buske LM. Clinical comparison of histamine H_1-receptor antagonist drugs. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:S307–318.
487. Simons FER. Histamine and antihistamines. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 1. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:421–438.
488. Taytard A, Beaumont D, Pujet JC, Sapene M, Lewis PJ. Treatment of bronchial asthma with terfenadine: a randomised controlled trial. *Br J Clin Pharmacol* 1987;24:743–746.
489. Gould CAL, Ollier S, Aurich R, Davies RJ. A study of the clinical efficacy of azelastine in patients with extrinsic asthma and its effect on airway responsiveness. *Br J Clin Pharmacol* 1988;26:515–525.
490. Ulbrich E, Nowak H. Long term, multicentre study with azelastine in patients with intrinsic asthma. *Arzneimittelforschung* 1990;40:1225–1230.
491. Kon OM, Barnes NC. New treatment drugs for asthma. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 2. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:1726–1738.
492. Spector SL, Smith LJ, Glass M. Effects of 6 weeks of therapy with oral doses of ICI 204,219, a leukotriene D4 receptor antagonist, in subjects with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:618–623.
493. Danzig M, Cuss F. Inhibition of interleukin-5 with a monoclonal antibody attenuates allergic inflammation. *Allergy* 1997;52:787–794.
494. Casale TB, Costa JJ, Galli SJ. TNF-alpha is important in human lung allergic reactions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:35–44.
495. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996;14:397–440.
496. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997;15:675–705.
497. Herd CM, Page CP. Platelets. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 1. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:214–227.
498. Wegner CD, Gundel RH, Reilly P, Haynes N, Letts LG, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 1990; 247:456–459.
499. Gundel RH, Wegner CD, Rocellini CA, Letts LG. The role of intercellular adhesion molecule-1 in chronic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 1992;22: 569–575.
500. Bai TR. Adrenergic agonists and antagonists. In: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases.* vol 1. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1997:568–583.
501. Drazen JIM, Israel E, Boushey HA, et al. Comparison of regularly scheduled with as-needed use of albuterol in mild asthma. *N Engl J Med* 1996;335: 841–847.
502. Spitzer WO, Suissa S, Ernest P, et al. The use of beta-agonists and the risk of death and near death from asthma. *N Engl J Med* 1992;326:501–506.

第36章　移植免疫学

Hugh Auchincloss, Jr., Megan Sykes, and David H. Sachs①

1175　因为自然界本身并不存在同种异体间的移植过程,我们不难理解移植所致的排斥反应并不利于种属的生存。所以,同种异体免疫应答,即针对同一种属中不同个体新抗原的免疫应答过程,也非移植排斥反应所专有[1]。但另一方面,移植生物学的研究却也极大程度地丰富并促进了基础免疫学的发展。例如,主要组织相容性复合物MHC的发现,以及广泛运用于T细胞研究的混合淋巴细胞试验等。同时,随着临床移植学的发展,如何将基础免疫学理论运用于控制移植排斥过程,也是我们今后的研究目标。

在移植免疫学研究中,常常存在一个共同的误区,即简单套用经典免疫学的一般原则来认识特殊外源抗原所引起的免疫应答。同种异体间免疫应答与普通免疫应答存在两大基本区别。第一,前者能激发尤为强烈的免疫应答,也许正因为此特殊性,喻示其可能存在更特殊的免疫机制;第二,前者可由两类分别来自于供、受体的抗原呈递细胞(APC)所激发。本章中,我们将着重介绍移植排斥过程中有别于经典免疫学的免疫

① H. Auchincloss, Jr.: Department of Surgery, Harvard Medical School and Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02114-2696. M. Sykes: Department of Surgery, Transplantation Biology Research Center, Harvard Medical School and Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02129. D. H. Sachs: Department of Surgery, Transplantation Biology Research Center, Harvard Medical School and Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02129.

学机制。

移植免疫学的起源

早期历史

历史上可见的最早的组织移植报道可追溯至公元前700年，一位名叫Sushrutu的外科医师首次将一患者的自体前额皮肤移植至折断的鼻子[4]。时至15世纪，意大利的外科医生也开始尝试运用患者自体手臂皮瓣进行鼻成型术[5]。1503年，诞生了第一例同种异体移植——利用一位奴隶的皮肤重建了主人的鼻子。尽管上述移植的记载均获成功，但我们知道不过是夸大其词的神话而已。 1176

到了18世纪末，皮肤移植已成为一个广为接受的临床操作。但当时诸多外科医师甚至还没有来得及分清自体移植、同种异体移植以及异种移植。这些实践形成了被称为“动物园移植术”这一更大范围实践的基础。患者们接受了来自从猪到青蛙多种动物的供体[6]。Billingham指出，无人在意移植皮肤是否被“接受”，或是仅仅促进了伤口的愈合[7]。事实上，这样的实践活动导致移植学出现一个困惑时期。由于当时移植机制尚未明了，尽管医师们满怀信心地尝试着各种移植并报道了今天我们所知的一系列手术，但以我们今天对移植学基本原理的了解，很明显，当时这些努力的结果只能是失败。但是有意思的是，Serge Voronoff医师当时曾因号称能通过移植猿猴睾丸而使男人永驻青春活力，在整个欧洲获得了巨大的声誉及财富[8]。

随着血管吻合术的成熟，人们才渐渐开始了实体器官移植的历程。1908年，作为血管外科开创者之一的Alexis Carrel曾在九只猫之间实施双侧肾移植[9]。虽然某些猫术后最长能维持25天排尿，但最终还是无一幸免。尽管后继者不断重复并改进Carrel的试验，但在以后的30年时间里，无论在同种移植物存活时间的延长研究方面，还是移植失败的原因分析方面，均未获得明显的进展。

可是同一时期，与之密切相关的肿瘤移植研究却获得较大进展。1902年，Jenson发现如果将肿瘤移植至连续19代繁殖的小鼠体内，大约50%的小鼠移植肿瘤能继续生长；但如果某些小鼠体内移植肿瘤呈现先生长后消减的趋势，那么该小鼠则能获得对该肿瘤的抵抗力；进一步，若预先进行正常组织移植，小鼠对随后的移植肿瘤具有抵抗力[7]。

尽管对于今天的我们而言，这些实验结果已揭示了大量移植免疫学中的基本原则，但当时的人们却未清楚地意识到。许多研究者仍推崇Paul Erlich 1906年提出的“瘤营养不良”理论[10]。此假说推断组织生长需依赖于某种完整器官产生的种属特异性的活性物质，于是肿瘤移植后可继续生长至该“营养物质”耗尽。另外一些研究者则接受一种免疫力学说，认为他们正在研究的是针对肿瘤组织的一种特殊免疫现象。正如Sir Peter Medanar[11]在演讲中所述：“几乎所有的人都认为他正在用移植研究肿瘤，而事实上他是在用肿瘤研究移植。”

1936年，一位俄罗斯外科医师Voronoy报道了第一例临床肾移植[5]。很明显由于血型不合，患者在移植肾刚显现功能时就不幸死亡。二次大战后早些年间，全世界多个中心均开展了许多临床同型肾移植的尝试[12,15]。1952年，第一例单卵双生子间肾移植终于在波士顿成功实施[16,19]。

此外，Sir Peter Madawar也获得移植领域中的另一重大突破。1943年，Gibson与Madawar成功地为一位三度重烧伤的女患者实施了自体及异体皮肤移植[20]，其中，异体皮取自患者的同胞兄妹。实施手术过程中，出于临床考虑，手术在间隔一周的时间里分两次进行，结果发现第二次移植术后，移植反应加剧。随后，Madawar继续进行了一系列兔子与小鼠的移植实验[21,22]，并于1945年提出“同种移植皮肤的排斥来源于获得性免疫反应”的结论[23]，至此揭示了临床移植学与免疫学的相关性。

发展史及免疫遗传学的基本原理

近交系

大量啮齿类动物近交系的建立，为移植排斥反应的遗传学研究提供了极其宝贵的动物模型。近交系由

至少20代兄妹反复杂交后的子代组成。它们的遗传学背景相同,同一近交系中的个体除性染色体以外,其余染色体均同源,因此能提供相同遗传背景的子代。

反复近交导致相同遗传背景的机制如图36.1所示。为简单起见,图中所示的第一代动物为常染色体等位基因 AB×AB 的兄妹杂交,自然界中更常见的 AB×CD 型交配子代的遗传背景也能通过稍许复杂的数理统计学加以分析。那么,第二代子代基因型可能性为 AA:AB:BB =1:2:1。这样,在第2代中,任意选择一对兄妹,其基因型均为 AA 的可能性为1/16。同样,第2代交配个体组成 BB×BB 的概率也为1/16。在这两种情况下,则其所有子代均固定成为纯合子(AA 或 BB),因此我们说该基因座被固定。因此,对于单一基因座位而言,第二代杂交获得固定的概率为1/8。

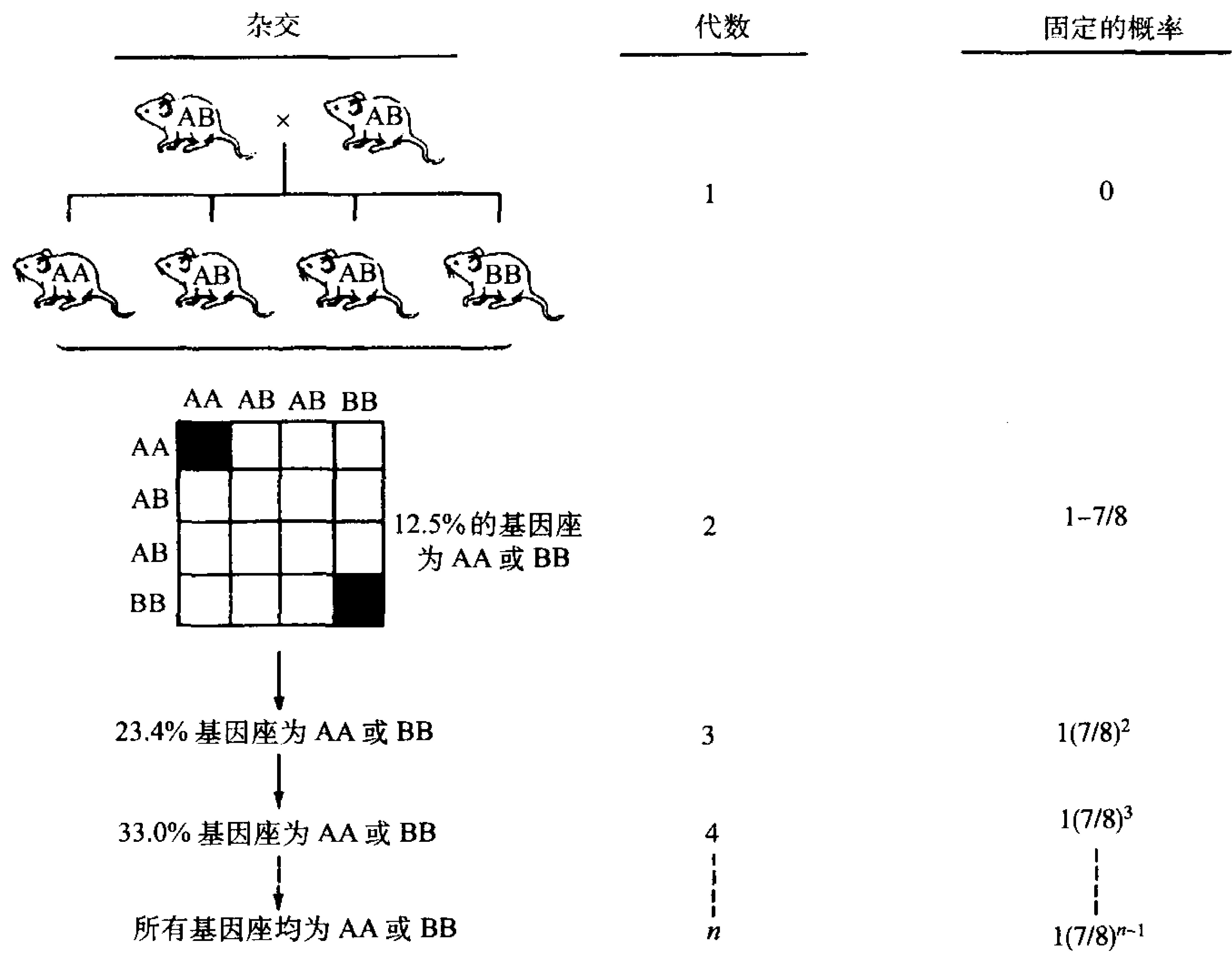


图36.1 近交系培育方案示意图。代表的是近亲繁殖过程。如图所示,每一代随机选择一个雄性和一个雌性进行交配,每次交配其任意一个常染色体位点有1/8的概率被固定为 AA 或 BB;换言之,一次兄妹杂交有1/8独立分离的基因座可被固定。

对于集合在一起的大量独立的基因座而言,每一个给基因座获得固定的数学概率均为1/8,或者说基因座位群的平均固定率为1/8。在兄妹随机杂交中,即便特定基因于某一代未获得固定,其在下一代仍有约1/8的概率。换言之,每一代子代均有1/8的基因座可获得固定,尚未获得固定的基因座中有1/8可望在下一代中固定,依次类推。所以,如图36.1所示,固定率(P_{fix})可用公式表示为

$$P_{fix} = 1 - (7/8)^{n-1}$$

1177

上述公式描述了固定率趋于100%饱和的一条曲线(图36.2)。由于所有基因在群体中以减数分裂的方式遗传,在杂交中有限数量的遗传信息单位发生分离。因此从实践操作的角度考虑,经20代反复兄妹杂交,基因座杂合的概率已非常小,均呈 AA 或 BB 而不再有 AB 型杂合子基因座,这时即实现了近交系的建立。现已成功获得数百个鉴定清楚的近交系。

在兄妹反复杂交以获得近交系的过程中,由于某些致死基因纯合子的形成,可造成某一特定系的丢失。但是鉴于存在大量的兄妹来源,对于某一特定的第一代动物杂交个体,最终也能获得至少数个近交系。举个例子,如果你在最初的第二或三代建立了所有的兄妹交配,然后只挑选出一对兄妹交配产生后代,你可以很

容易地获得10个成功的近交系，虽然90%的近交系在开始时会因为致命的隐性基因而死亡。正因为其体积小，所以多选择小鼠建立近交系。当然，人们还建立了其他种群的近交系，例如大白鼠、豚鼠及兔子。但是，由于饲养空间有限以及生理特性的不同，如妊娠时间、性成熟时间以及一胎动物的数量等因素，均使繁殖一个大动物的近交系有更大的难度。

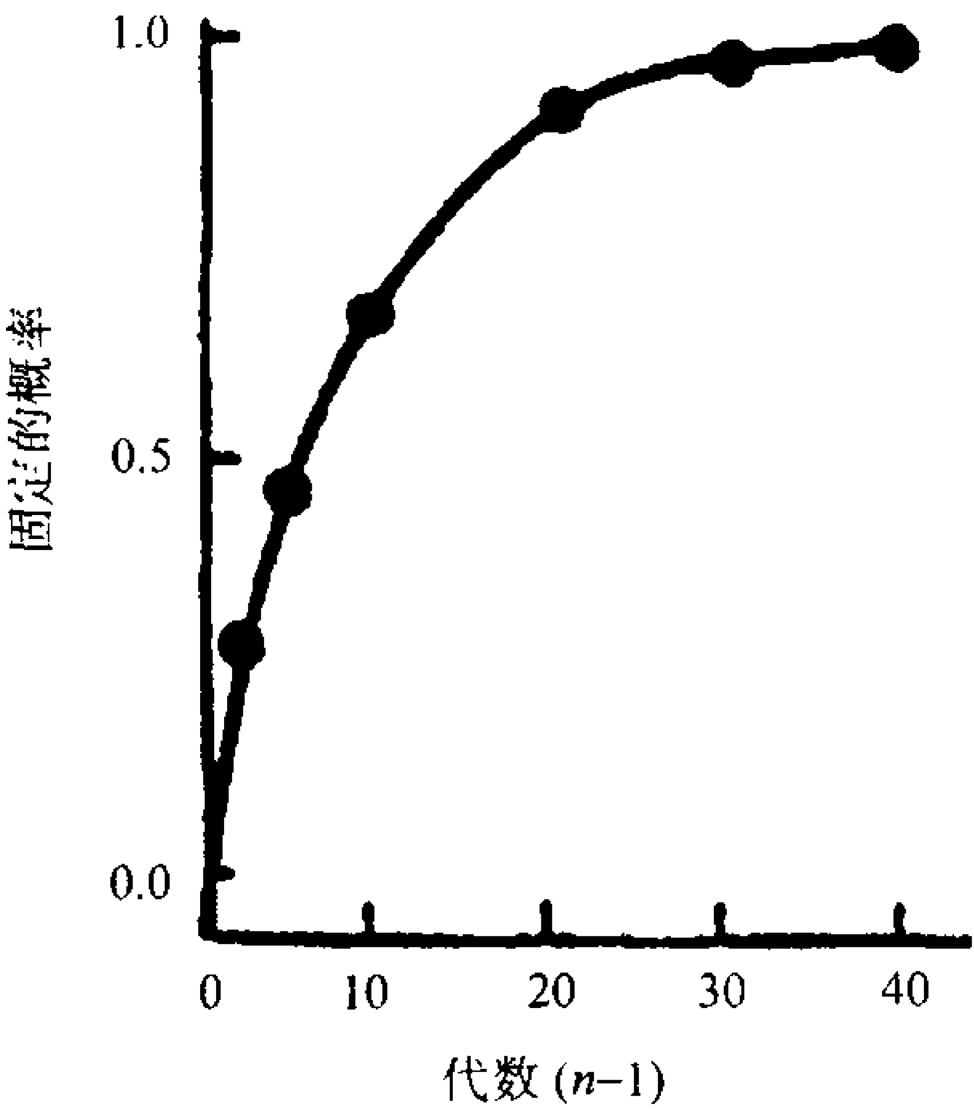


图36.2 固定概率曲线。所有基因座以渐近的方式趋于固定，可用公式描述为：$P = 1 - (7/8)^{n-1}$。

1178

一些因素可影响真正近交系的获得，其中之一是强制性杂合现象。在这种情况下，给定基因座的等位基因均是隐性致死基因，而只有杂合子可以存活。这时，该基因座不能成为纯合子，并且与之紧密连锁的基因座也受到影响而保持杂合状态。这种情况虽然有理论上的可能性，但在培育近交系的实际操作中很少遇到。在获得真正纯合性的过程中，一个更普遍的问题是突变，这当然是一个持续存在、不能避免的现象。哺乳类动物基因每减数分裂一次，每基因座的平均突变率大约为10^{-6}。因为哺乳类动物有多达10^6的基因座，可以推测每一代中其基因组至少发生一处突变。虽然不能避免这种突变可再次引入杂合性，但一旦出现，也不会在近交系基因组中长时间保持。如图36.1所示，近交系的参考谱系以兄妹纯种交配方式进行。这种交配方式可使任何发生的突变或者丢失或者固定成为纯合的等位基因。为了确保近交系动物持续近交，必须保持每个近交系的谱系参考株。从每代中挑出一对兄妹进行交配，这个系的其他动物由这一对或它们的后代产生。实验中所需的大量动物由扩增和克隆获得，但其代数不应距离谱系参考株过多。

如果以两个不同的克隆保存某一特定的近交系，谱系参考株会积聚不同的变异，两个谱系之间也会因此而产生漂移。如果在两种系中施行正确的连续兄妹交配，虽然两个谱系在许多基因位点上有不同，但每一个谱系仍保持真正的近交。独立保存的谱系我们称之为亚系，在系名后加上一些字母对它进行命名。例如，C3H/HeJ及C3H/HeN均为近交系C3H的亚系，二者最初由Heston培育(He)。后来一个亚系转由Jackson实验室保存(C3H/HeJ)，另一个则在国立卫生研究院保存(C3H/HeN)。尽管两者间极其相似，但仍存在一些明显的差别，如不同亚系的淋巴细胞对脂多糖的反应性不同。亚系间的差别常常造成不同实验室同一实验数据的不可重复性。

组织移植的遗传学原则："移植法则"

遗传学家所青睐的近交系动物最早并未用于实验研究，而是出于商业目的。欧洲及日本的众多小鼠爱好者多年来一直渴望能将各种各样令人喜爱的小鼠特征一代代保留下来，比如毛发及行为特征等，他们常常采用小鼠近亲繁殖。19世纪早期，肿瘤生物学家发现小鼠近亲繁殖的子代相互之间肿瘤移植易于成功，而若在两系之间移植，则常常失败。Litter等系统性探究此现象，继而发明了近交系动物培育的生物学流程并发展了一系列近交系小鼠[24]。

表36.1 移植法则

1. 在近交系内进行的移植可以获得成功。
2. 近交系间进行的移植不能成功。
3. 同系母代移植给F_1子代可以成功，但反方向进行的移植将失败。
4. F_2以及后面的所有子代移植给F_1代可获得成功。
5. 同系母代移植给F_2代通常，但并不总是失败。

摘自参考文献[774]，有改动。

根据小鼠肿瘤移植的研究结果，Litter总结出移植学的五大法则(表36.1)。准确地说，这些并不算真正意义上的法则，而是一系列看起来含混不清的实验结果，显示移植排斥能力往往仅只存在于小鼠母代，在F_1代丢失，但在F_2代可重获。上述通过肿瘤(移植物)排斥实验来认识的遗传学法则与孟德尔基本原理不尽吻合。Litter

的杰出贡献在于发现了移植排斥的基本原理及遗传学基础，并以此丰富并发展了孟德尔经典原理[25,26]。Litter 发现了今天每个学习移植免疫学学生必知的原则：如果供体表达的任何组织相容性抗原在受体中不表达，则受体将对移植物发生排斥反应。他对这一不寻常的遗传方式的解释是：①编码组织相容性抗原的基因一定是共显性表达；②一定存在较大数量的组织相容性基因座。在这样的前提下，F_1 代因能获得父母双方的全部组织相容性基因座上的等位基因，因此不会对来自母代、F_2 和其他任何子代的移植物发生排斥反应；F_2 代不能表达母代的全部组织相容性基因，因而对母代的同种移植物通常会发生排斥反应。

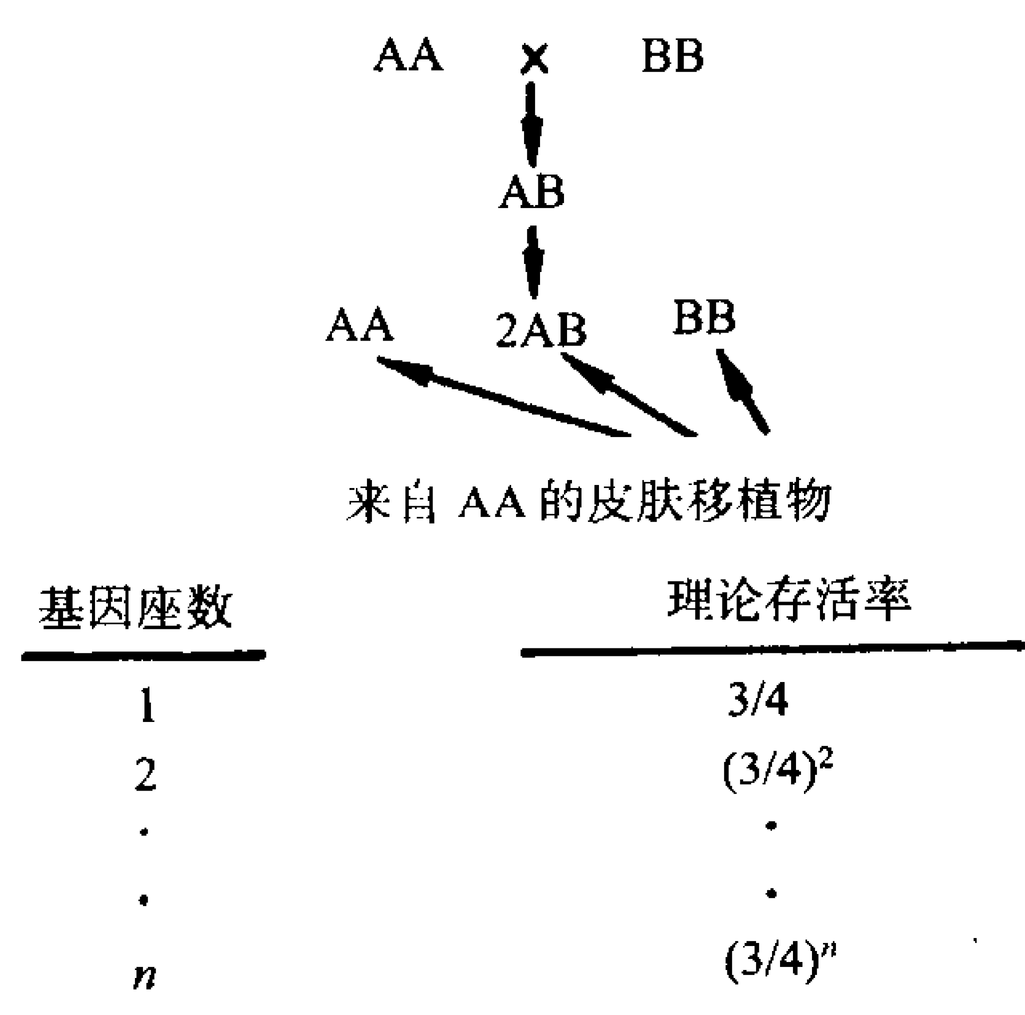


图 36.3 估算组织相容性基因座的数量。两个近交系中，独立分离的组织相容性基因座的数量可以通过观测移植给 F_2 代的皮肤移植物的排斥情况来进行估算。

1179

组织相容性基因数量的估计

基于近交系的建立及上述遗传法则的发现，我们能确定任意两个近交系内组织相容性基因的数量。如图 36.3 所示，首先培育大量 F_2 代子代，随后将任一母代个体组织移植至 F_2 代并计算移植物存活比率，如果 2 个母代个体之间仅存在 1 个组织相容性基因座的差别，那么，移植物存活比率为 3/4；若存在 2 个基因座的差别，移植物存活比率为 $(3/4)^2$；依此类推，若存在 n 个基因座差别，移植物存活比率为 $(3/4)^n$。

最初，通过肿瘤移植可确定小鼠组织相容性基因座数目为 4～10 个；随后换以皮肤移植，则发现了 30～50 个基因座[27～30]。鉴于小鼠基因组只有 20 条染色体，说明一条染色体上含有多个组织相容性基因位点。

同类系小鼠的建立：鉴定 MHC

组织相容性基因有许多，每一个均编码特定的蛋白质以控制移植排斥的发生。Litter 发现了组织相容性基因多态性，同时从遗传法则中，我们可推想培育出只有单一组织相容性基因座差异的小鼠系的可能性。Jakson 实验室的 Snell 等人利用母代皮肤移植手段及连续杂交，成功地筛选出同类系小鼠（congenic strains）（也是一个近交系，其与原近交系只在某一个独立分离的基因座上有差异）[31]。同类系鼠由于相互之间不能接受移植，又称为同类系抵抗小鼠。人们进一步发现，在皮肤移植试验中，众多组织相容性基因中某些特定的基因座显现出更为突出的控制排斥能力，这就是我们现在所称的主要组织相容性复合物——MHC。而其他 30～50 个组织相容性基因，则称为次要组织相容性基因。现已成功培育出大量 H-2 同类系小鼠（表 36.2），以及某些次要组织相容性同类系抵抗性小鼠及大鼠系。

最适用的同类系小鼠建立流程见图 36.4 所示。为了得到除单一主要组织相容性基因型基因座 H-2 与 B 系相同，而其他所有基因组基因均与 A 系相同的同类系（A.B 系小鼠），首先选择两个不同的近交系 A 与 B 个体进行杂交，产生 F_1 代。如图所示，由于所有近交系的常染色体基因座均为纯合状态，F_1 代所有基因座均为杂合子（ab）。然后以 F_1 代兄妹杂交产生 F_2 代，其中 F_2 代的所有常染色体等位基因的分布符合二项式展开公式，即在任何一个基因座，有大约 1/4 的个体基因型为 bb。此时，将 A 系小鼠的皮肤或肿瘤移植至所有 F_2 个体中，若发生移植排斥反应，则该 F_2 个体至少有一个组织相容性基因座的基因型为 bb。显然，由于存在众多组织相容性基因座，F_2 代大部分个体均会发生移植排斥，但若只选择排斥反应最强烈 F_2 个体并选出大量这样的动物，我们可以合理地推测这样做可获得在 H-2 基因座 bb 纯合子基因型个体。

接着，将所筛选的 F_2 子代个体与母代 A 系个体回交，对经筛选的基因座而言，其子代又呈杂合子 ab 型；对于未经筛选的其他基因座，其杂合子与纯合子的概率各为 50%，换言之，50% 的概率可保持 A 系基因。继续进行兄妹杂交和移植，筛选子代排斥阳性小鼠，此时发生排斥反应的个体将低于上一循环，同时经此循环，未经选择的基因座的杂合子概率降为 25%。

1180

表 36.2　H-2 同类系小鼠一览表

品系	H-2 单体型	遗传背景	MHC
A	a	A	?
A.BY	b	A	Brackyury
A.CA	f	A	Caracal
A.SW	s	A	Swiss
BALB/c	d	BALB/c	BALB/c
BALB.B	b	BALB/c	C57BL/10
BALB.K	k	BALB/c	C3H
B6.AKR-H-2k	k	C57BL/6	AKR
B6.SJL	s	C57BL/6	SJL
B10	b	C57BL/10	C57BL/10
B10.A	a	C57BL/10	A
B10.D2	d	C57BL/10	DBA/2
B10.M	f	C57BL/10	Outbred
B10.BR	k	C57BL/10	C57BR
B10.SM	v	C57BL/10	SM
B10.RII	r	C57BL/10	RIII
B10.PL	u	C57BL/10	PL/J
C3H	k	C3H	C3H
C3H.SW	b	C3H	Swiss
C3H.JK	j	C3H	JK
C3H.NB	p	C3H	NB
D1.C	d	DBA/1	BALB/c
D1.LP	b	DBA/1	LP
LP.RIII	r	LP	RIII

上述回交、兄妹杂交以及皮肤移植筛选流程连续进行 9 个循环，可以预期此时的小鼠只有单一的组织相容性基因差异。此时，兄妹杂交子代只有 25% 的个体可发生皮肤移植排斥反应；若始终选择发生强烈排斥反应的个体，则可以推测所选择的基因座是 H-2。其他未经选择的基因呈杂合子的可能性则已降至 0.2% 以下，换言之，大于 99.8% 的未经选择的基因与 A 系小鼠相同。此时选择最后一次兄妹杂交的子代，以 H-2 基因座纯合的一个雄性和一个雌性个体进行交配，建立同类系小鼠 A·B 系。

由于哺乳动物基因以染色体连锁的方式遗传，这将导致许多与所筛选基因位点紧密连锁的基因保留 bb 遗传信息。但是正如下面所述及的，在杂交产生后代的过程中，重组的发生可导致同一染色体上基因座固定于 aa 基因型。例如小鼠的 MHC 位于 17 号染色体，在杂交中与 H-2 距离不等的基因座可发生重组而成为 aa 型。在实际操作中，动物通过至少 9 轮的选择性繁殖，可被认为是同系的。

1181

如表 2 所示，现已成功获得大量不同背景的 H-2 同系异基因小鼠系。一般依据 A·B 的方式命名。A 代表基本基因来源小鼠系名，B 代表组织相容性 H-2 基因座基因来源小鼠系名。表 2 中的小写字母代表 H-2 单体型，例如，C57BL/10，其单体型为 H-2b；DBA/2，其单体型为 H-2d；再则，C57BL/10 简称为 B10，DBA/2 为 D2。所以，同类系 B10．D2 表示其基本基因来源于 C57BL/10 系小鼠，而 MHC 特征来源于 DBA/2 系小鼠。同样，C3H．B10 表示该同类系小鼠来源于两株近交系小鼠 C3H（H-2k）及 C57BL/10（H-2b）。

MHC-内部发生同源重组的同类系小鼠：MHC Ⅰ类和Ⅱ类抗原

如图 36.4 所示，在交配流程中每一交替代均涉及到 H-2 杂合个体的杂交。在杂合子繁殖时，常染色体在减数分裂时始终有可能发生同源重组。在产生同系株时，这种重组可使进入同系基因组、与 H-2 连锁的遗传信息趋于减少。一个同系株回交次数越多，染色体上与 H-2 越接近的位置将被置换为背景株的基因型。由于人们很快就明确了 MHC 实际上由多个基因座组成，因此 H-2 内部在杂交中也可能发生同源重组。事实

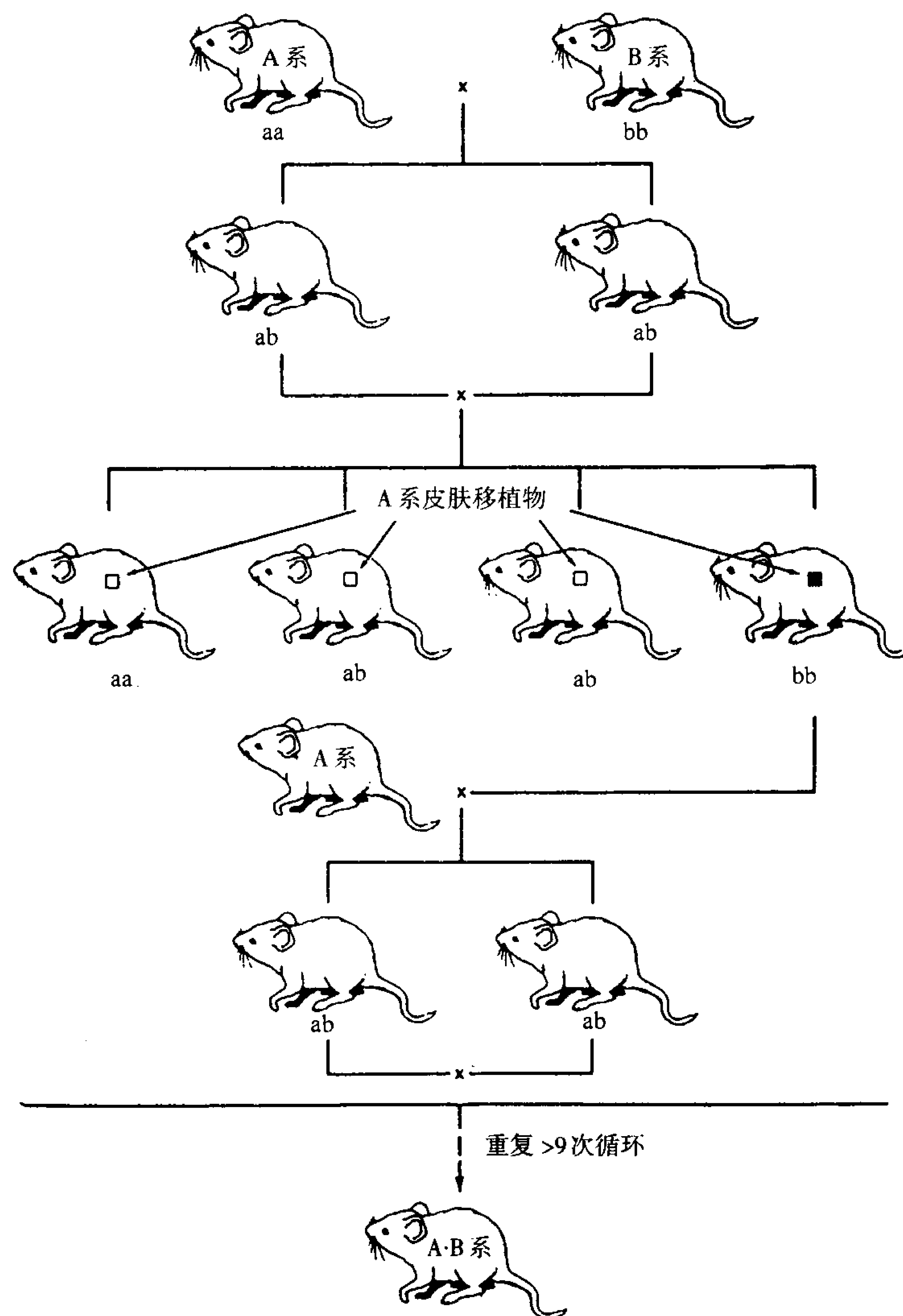


图 36.4 同类系的培育(A,B)。图示为系统性杂交-回交流程,通过对每一杂交子代进行皮肤移植实验、并选择能对 A 系移植物发生排斥反应的动物进行回交。

1182 上检测并鉴定这种重组使人们绘制出 H-2 的连锁图谱。了解如何检测重组以及怎样明确 H-2 基因座精细的遗传结构是有启发意义的。

为了检测重组事件,研究人员必须检测杂交或回交的后代中一个以上的 MHC 显著特征。这是因为只有当所检测的特征在后代中出现了不同,才有可能检测出一个重组事件的发生。这样,假定在产生同类系抵抗性小鼠时,如图 36.5 所示,一个重组发生了,这时,让我们假设所检测的子代均能对 A 系皮肤移植物发生强烈的排斥反应(如组织相容性基因座上为基因型 bb),并存在淋巴细胞表面 a 或 b 基因产物,后者可用补体介导的细胞毒试验检测。用 A 系抗 B 系抗血清检测 bb 产物,或用 B 系抗 A 系抗血清检测 aa 产物。

如图 36.5 所示,一个 H-2 内部的重组事件可导致一个个体经皮肤移植排斥试验判断为 bb,因为它缺乏编码能引起皮肤移植排斥反应的部分 H-2 复合物。但却与 A 抗 B 和 B 抗 A 抗血清均可发生反应,提示其基因型为 ab。这一个动物当然不能满意地获得最终的 A.B 同系株,还需与其他排斥者进行进一步的杂交以产生预期的同系株。但是该动物可被选作一个假定的重组子,并进一步与 A 系回交以产生一个同系重组株,记为 A.B(1R)。所找到的下一个这种推定的重组株被称作 A.B(2R)。依次类推。通过这种方法,可获得一系列同系株。它们在 MHC 上均与背景株不同,并且其相互之间在 MHC 内部的不同基因座上因发生了同源

重组而不同。

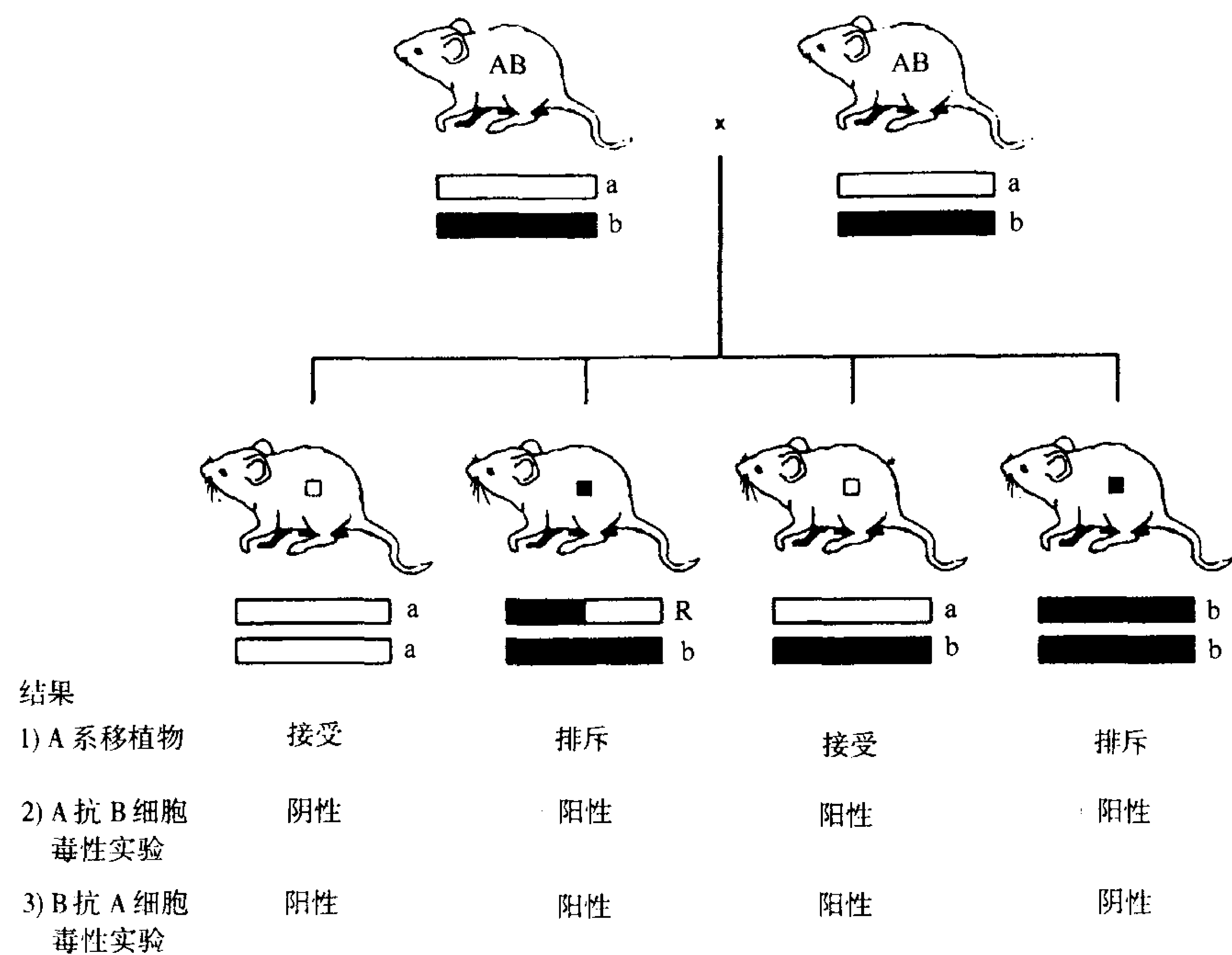


图 36.5 在产生同类系小鼠过程中发生 MHC 内的重组。图中所示为母代中发生了 H-2a 和 H-2b 之间的同源重组，导致子代中产生一个新的重组单体型。

幸运的是，小鼠遗传学家意识到了这种可能性并在产生 H-2 同系株过程中保存了大量重组体。这样，在近交系 C57BL/10(H2b)和 A/WySn(H2a)杂交产生的一系列重组子，由 Stimpfling 在建立 B10. A CR 株时分离，并为 H-2 复合体的基因精细结构提供了大量信息[32]。例如，B10. A(2R)和 B10. A(4R)株被用于鉴定多种 MHC 内的免疫应答基因。表 36.3 列出了目前使用最多的同系重组株以及它们已知的和推定的同源重组位点。研究 MHC 内部重组株最重要的贡献在于，它推动了对 MHC 编码的两种常见类型的 MHC 抗原基因座的认识，它们现在被称为 MHC Ⅰ类和Ⅱ类抗原。

表 36.3 H-2 同源重组株一览表

单体型内重组体	母代单体型	单体型命名	K A E S D	存在其他重组位点	含有重组的品系
K-A	b/m	bq1	b/k k k q	有	B10. MBR
	s/a1	t1	slk k k d	有	A. TL
A-E	a/b	h4	k klb b b	无	B10. A(4R)
	b/a	i5	b blk d d	有	B10. A(5R)
	b/a	i3	b blk d d	有	B10. A(3R)
E-S	k/d	a	k k kld d	无	A, B10. A
S-D	d/b	g	d d d dlb	无	HTG, B10. HTG
	d/k	o2	d d d dlk	无	C3H. OH
	a/b	h1, h2	k k k dlb	有	B10. A(2R)
	k/q	m	k k k klq	无	AKR. M, B10. AKM
	q/a	y2	q q q qld	无	B10. T(6R)
	s/a	t2	s s s sld	无	A. TH

Jackson 实验室保存的同系异基因同源重组单体型。

注意许多重组体至少有一个单体型内有重组位点。

诱导移植排斥反应发生的供体抗原

主要组织相容性抗原

表 36.4 MHC 小结

MHCⅠ类抗原	单一多态性链 α1,2 3 个结构域：α1,2,3 M_r：45 000 与 β2 微球蛋白相结合 在人体位于 A，B，和 C 基因座位 表达在所有的组织和细胞表面
MHCⅡ类抗原	2 条多态性链：α 和 β 每条链有 2 个结构域 α1,2 和 β1,2 M_r：33 000 和 28 000 在人体为 DP、DQ 和 DR 位点 表达在巨噬细胞、树突细胞和 B 细胞血管内皮细胞和活化的人 T 细胞表面

从上述移植排斥反应的遗传学分析中，可知 MHC 抗原在移植排斥中的重要作用。表 36.4 简要概括了 MHC 抗原的重要生化特性，第 8 章对其结构与功能将做更详尽的介绍。

MHC 抗原的基本特性

Ⅰ类及Ⅱ类抗原

组织相容性复合体的不同基因座分别编码两类不同的 MHC 抗原，也就是今天所称的 MHCⅠ及 MHCⅡ类抗原。多年来，两类抗原有多种分类及命名方法。过去由于 MHC Ⅰ类抗原可通过血清学方法鉴定，称之为血清学鉴定抗原（SD）；而 MHCⅡ类抗原则多通过混合淋巴细胞反应实验鉴定，故称之为淋巴细胞鉴定抗原（LD）[33]。后来，MHCⅡ类抗原也能通过血清学方法鉴定，而且发现编码Ⅱ类抗原的基因与Ⅰ类基因紧密连锁[34]，所以又将Ⅱ类抗原称为Ⅰ区相关抗原。在以下的内容中，我们将着重介绍 MHCⅠ类及Ⅱ类抗原在启动同种异型免疫应答时其方式和强度上的不同特性。

1183

多态性

MHC 抗原存在高度多态性。此高度多态性有利于保证种属内个体能游刃有余地对大量不同的外来抗原进行处理及应答。同时，MHC 的高度多态性也直接导致了移植排斥。人类 MHC 基因至少存在 6 个基因座，且每个座均由大量不同的等位基因编码。所以，两个毫不相干的人 MHC 抗原相同的可能性微乎其微，有人估计其概率大约为百万分之一，且不论仍需考虑两个人的具体遗传背景。

组织分布

两类 MHC 抗原组织分布也不尽相同。所有有核细胞表面均表达 MHC Ⅰ类抗原[35, 36]。MHCⅡ类抗原则呈选择性分布[37]，多表达于巨噬细胞、树突细胞及 B 淋巴细胞。在一定条件下，也可表达于某些淋巴样细胞，如血管内皮细胞。此外，MHCⅡ类抗原的组织分布也呈非组成型分布，不同的刺激因素常可上调或下调其表达[38]。同时，MHCⅡ类抗原分布存在种属特异性，其中啮齿类动物与大动物的重要区别就是其血管内皮细胞表面缺乏 MHCⅡ类抗原表达[39]。

MHC 抗原的生理功能

尽管 MHC 抗原并不是为防止移植发生而存在，但其具有诱导移植排斥反应发生的强大能力，故我们称其为组织相容性抗原。虽然此命名着重强调了其在移植领域中的重要性，但实际上，MHC 抗原的中心作用在于对外来抗原的识别、处理以及呈递（见第 9 章）。

MHC 抗原在同种异型反应中的重要性

同种异型反应是指针对同一种属中不同个体间的免疫应答。不论体内或体外实验均证实，MHC 抗原在诱导同种异型反应中起着重要的作用。

针对同种异型抗原强烈的移植排斥反应

在同种异型移植反应中，MHC 抗原是最重要的诱导因素。早期实验发现，小鼠间实施皮肤移植，如果 MHC 抗原不同，排斥反应多发生于术后 8～10 天；如果单一次要组织相容性抗原不同，排斥反应则多延至术后 3 周才发生。其他不同类型的移植实验也得出相同的结论。例如，在猪身上进行血管化器官肾移植，如果

MHC 配型吻合，即使不用免疫抑制药物，部分移植也能获得成功，而 MHC 配型不合者，多于术后 2 周内死亡[40]。

但是，在评价 MHC 抗原诱导同种异型排斥反应发生的能力时，诸多实验均提示，必须同时满足 MHC Ⅰ类及Ⅱ类抗原配型不合。小鼠皮肤移植实验显示，仅仅 MHCⅠ类或 MHCⅡ类抗原不合，都不足以引起移植排斥反应发生[41]。而且，难于判断 MHC 抗原不匹配还是多个次要组织相容性抗原不匹配对移植物排斥更重要，特别是对皮肤移植物而言。

体外 MLR、CML 实验

体外实验证实，同种异型 MHC 抗原能引起异常强烈的 T 细胞应答。通常通过体外检测针对同种异型 MHC 抗原的细胞应答来反映免疫应答强度，此反应强度与同种反应性 T 细胞前体数量多少成正比。同种反应性 T 细胞有别于针对普通外来抗原的 T 细胞。同种异型 MHC 抗原可激活高达占总数 2% 的 T 细胞参与应答；而一般抗原却最多只能激发 1/10 000 的 T 细胞[42, 43]。这极大的差别，并非由于同种异型 MHC 抗原存在种类繁多的抗原决定簇，已有实验证实，即便是 MHC 抗原仅有 1 个氨基酸残基存在差异，同种反应性 T 细胞前体频率仍未减少。

同种异型 MHC 抗原诱导强烈免疫应答机制

过去，人们总是片面强调针对同种异型 MHC 抗原可激发强烈免疫应答现象的正面生物学意义，例如，人们认为，同种反应性应答可有助于防止个体间感染性疾病的传播，以及有助于分娩时终止妊娠。但实际上，随着 MHC 抗原生物学功能的日渐明晰，多数免疫学家认为，针对同种异型 MHC 抗原的强烈免疫应答并非是生理性的，而只是建立在以下两个重要特性基础上的某种巧合：第一，同种异型 MHC 抗原不同于一般外来抗原，不需自身 MHC 抗原的处理、呈递，而能直接激发免疫应答；第二，同种异型 APC 上的同种异型 MHC 抗原能被淋巴细胞识别。

1184

针对同种异型 MHC 抗原的直接识别机制

同种反应性免疫应答异常强烈的机制，关键在于 T 细胞可直接识别同种异型 MHC 抗原，而不需自身 MHC 分子对其的处理及呈递。移植免疫学家称之为同种异型 MHC 抗原的直接识别方式。这种直接识别的发生基础在于同种异型 MHC 抗原与自身 MHC 抗原呈递的外源肽在本质上是相同的，简单概括即“同种异型抗原 = 自身 MHC 抗原 + X”[44, 45]。T 细胞克隆既能特异性识别自身 MHC 分子呈递的抗原肽，又能直接识别同种异型 MHC 抗原的实验结果，证实了以上的推论[44~46]。由于在胸腺中 T 细胞库经过修饰自身 MHC 抗原的识别选择[47]，因此它也具有大量能直接识别同种异型抗原的 T 细胞受体。

尽管大家公认直接识别机制在同种异型反应性应答中的重要作用，但却不好解释为什么同种反应性 T 细胞频率远远高于接受自身 MHC 抗原呈递方式的 T 细胞，也无法简单归结为“同种异型抗原 > 自身 MHC 抗原 + X”。

直接同种反应性的强度

对于同种异型 T 细胞高频率的机制，分别有三种假说。①特异性识别 MHC 抗原的 T 细胞受体基因存在遗传偏向；②同种异型 APC 细胞上同种异型 MHC 抗原决定簇密度更高；③供体 APC 细胞上的同种异型 MHC 抗原决定簇频度更高。

Jerne 首次提出编码 T 细胞受体的基因重排后，该 T 细胞是否存留取决于其编码蛋白与种属 MHC 抗原的反应能力[48]。如果上述假说成立，那么经过胸腺筛选，去除自身反应性 T 细胞，成熟 T 细胞库中应有相当数量的 T 细胞可与其他同种 MHC 抗原反应。虽然 Jerne 的假说早于免疫学家关于胸腺的阳性选择学说，但是此假说解释同种反应性高强度现象却更为有利。因为胸腺只能选择具有一定 MHC 反应性的 T 细胞，那么，T 细胞受体基因库随机重排则会造成大量无用的前体细胞。Jerne 认为更为有限的 T 细胞受体基因库有利于更有效的胸腺选择。目前有一些证据支持 Jerne 的假说[49~55]，虽然胸腺内成熟 T 细胞的选择效率似乎非常低[56]。

高同种异型 MHC 反应性的第二种解释为决定簇密度学说，即认为经自身 APC 细胞处理、由自身 MHC 呈递的普通抗原与表达在同种异型 APC 上的同种异型抗原存在差别[57]。如图 36.6A 所示，表达于自身 APC 细胞表面的普通抗原决定簇数量极低(因为每个 MHC 抗原只呈递一个外源性抗原决定簇)，而同种异型 APC 上的同种异型 MHC 抗原决定簇密度则非常高(因为每个 MHC 抗原均代表一个外源性抗原决定簇)。照此假说，体内并不存在较高频率的同种反应性 T 细胞前体，而是由于同种异型 APC 细胞极强的抗原呈递能力，诱导众多的，包括低亲和力 T 细胞活化，从而导致极强的同种异型免疫应答发生。

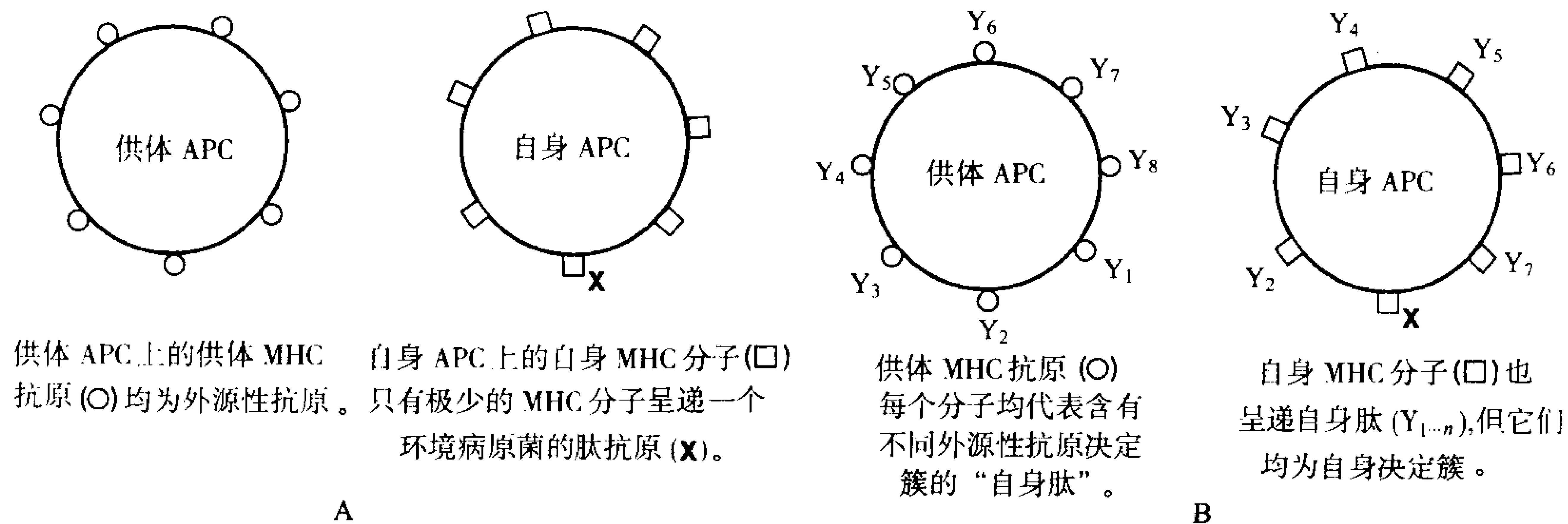


图 36.6　A:决定簇密度假说。供体 APC 上表达有供体 MHC 抗原(○)，均为外源性的(左)。自身 APC 上表达自身 MHC 分子(□)。自身 MHC 分子呈递的环境病原菌抗原肽(×)的频率很低(右)。B:决定簇频率假说。每个供体 MHC 抗原(○)均代表不同的自身肽，产生不同的外源性决定簇(左)。自身 MHC 分子。自身 MHC 分子(□)也呈递自身抗原肽($Y_{1\cdots n}$)，但它们均为自身决定簇。

1185　同种反应性机制的第三种解释为决定簇频率学说。此假说认为，同种异型 MHC 抗原特异性 T 细胞的活化是与同种异型 MHC 抗原所呈递的抗原肽相作用的结果[58]。如图 36.6B 所示，如果自身 APC 细胞的 MHC 分子能够呈递自身蛋白“$X_{1,2\cdots n}$”，那么，同种异型 MHC 也可呈递自身同种异型蛋白抗原“同种异型 MHC + X_1，同种异型 MHC + X_2，……，同种异型 MHC + X_n”。虽然在某些情况下，自身 MHC 分子与同种异型 MHC 分子所呈递的自身 MHC 抗原肽相同，但同种异型 MHC 分子所呈递的自身抗原可与自身 APC 细胞上的不同，即”同种异型 MHC + X_1，X_2，……，X_n”与“自身 MHC + X_1，X_2，……，+ X_n”存在差别。具有自身 APC 细胞所呈递的自身抗原(自身 MHC + X_1，X_2，……，+ X_n) 特异性的 T 细胞克隆通过自身免疫耐受机制得以清除，只有自身 MHC + 外来抗原肽特异性的 T 细胞得以存活。但是，自身耐受却不能影响 T 细胞针对同种异型 APC 细胞所呈递的自身抗原肽成分，即“同种异型 MHC + X_1，同种异型 MHC + X_2，……，同种异型 MHC + X_n” 。基于以上决定簇频率假说推断，由于每一个同种异型 MHC 分子具有众多的外源性抗原决定簇，因此可以激活大量的 T 细胞克隆，此为同种反应性 T 细胞高频率的产生原因。

决定簇密度学说和决定簇频率学说，孰是孰非，取决于同种反应性 T 细胞受同种异型 MHC 分子的影响程度。尽管有证据显示，同种反应性 T 细胞可不通过抗原呈递而直接识别抗原决定簇[59~61]，但更多证据支持“同种异型抗原 + X” 方式[62~67]。尽管尚无法确立最后的结论，但现有的证据大多支持决定簇频率学说。

另一方面，同种反应性可导致强烈免疫应答的现象，却与第 11 章所讲述的 T 细胞发育过程存在某种矛盾之处。人们认为胸腺内 T 细胞库成熟过程存在阳性选择，即只有能与自身 MHC 分子而非同种异型 MHC 分子所呈递的抗原肽结合并反应的 T 细胞克隆才得以存活，换言之，针对同种异型 MHC 分子的免疫应答应当是微弱而非强烈的。例如，A 个体内 T 细胞库经 A 胸腺选择后，能产生对自身抗原及 B 个体的耐受性，其 T 细胞能更有效地识别“A + X” ，而非“B + X”。这一阳性选择的结论是建立在针对同种异型 MHC 分子的同种反应性 T 细胞已得以清除的阴性选择的基础上，但事实上，A 个体仅仅能对 A 个体自身成分产生耐受，其 T 细胞不仅能识别“A + X” ，同样能识别“B + X” ，甚至在未致敏条件下，也能识别 “B” 。所以，阳性选择是指 T 细胞能识别经修饰后的 MHC 分子，而能与自身 MHC 分子及自身抗原分子高亲和力结合的 T 细胞克隆

已得以清除。所以尽管存在T细胞阳性选择，绝大部分能识别同种异型MHC分子的T细胞克隆却未因阴性选择而被去除，同种异型反应从而得以发生。

次要组织相容性抗原

最初，区分"主要"或"次要"组织相容性基因是依据其编码蛋白所引起的排斥反应强度。随着MHC抗原的深入研究，发现上述的分类方法不科学。MHC Ⅰ类或Ⅱ类分子单独常常均不能诱发排斥反应，而几种次要组织相容性抗原不合也能迅速诱发排斥反应[68,69]。所以，主要组织相容性抗原的定义应取决于其编码基因的位置及其MHC I类及II类蛋白结构特点(第8章)。例如，Qa及Tla抗原是依据结构特点而非其诱发移植排斥反应能力的强弱而将之归为I类抗原。所以，次要组织相容性抗原是指与MHC结构不同、能引起细胞介导的排斥反应发生的一系列抗原[70]。这一关于次要组织相容性抗原的定义并不包括所有非MHC同种异型抗原，而是侧重于能引起T细胞免疫应答的抗原。比如某些能引起B细胞免疫应答而诱发排斥反应的糖蛋白，但血型抗原，则不被归为次要组织相容性抗原。

很久以来，人们一直认为次要组织相容性抗原与MHC性质相似，也是等位基因编码的细胞表面蛋白，只是其诱发排斥反应强度较弱。但是，我们现在知道这一认识是错误的。次要组织相容性抗原实际是与普通抗原相同、需经MHC呈递的供体抗原肽[71~78]。这种MHC呈递的抗原肽可触发T细胞应答，机体对来源于自身蛋白的肽耐受，而对来源于其他个体的同种型变异即多态性则发生应答。

经过多年努力，现已分离出数种次要组织相容性抗原[76~78]，并弄清其来源。不出所料，许多次要组织相容性抗原并不是细胞表面糖蛋白，而是细胞内蛋白，如核转录因子。任何一种细胞成分蛋白，只要其具备等位基因变异性，且此变异性能被MHC分子以免疫原形式呈递，则可被称为次要组织相容性抗原。

上述关于次要组织相容性抗原的认识能较好地解释许多长久以来就认识但无法理解的特性[79,80]。第一，由于次要组织相容性抗原多为细胞内蛋白，即使发生了体液免疫应答，如果没有分离鉴定出抗原，也很难检测次要组织相容性抗原所激发的体液免疫应答。第二，次要组织相容性抗原不能在体外诱导细胞介导的初次免疫，而MHC抗原在体外MLR或CML试验中可激发强烈的细胞免疫应答。这与普通抗原肽在没有体内预致敏的条件下，一般很难检测到T细胞应答相一致。第三，次要抗原的识别具有MHC限制性，在再次应答当中，次要相容性抗原必须被相同的MHC分子呈递[71~85]。这是任何一个由MHC分子呈递的抗原触发T细胞应答的特性。第四，由于不同次要组织相容性抗原肽存在MHC竞争性，当存在众多次要组织相容性抗原不相一致时，常常其中某一种抗原显现出某种免疫优势[81~86]。

1186

上述关于次要组织相容性抗原特性的研究实际仍是建立在单个抗原的基础上。通过筛选、研究能诱发较弱排斥反应的同类系小鼠，可分离、鉴定编码次要组织相容性抗原的基因位点，如H-1、H-2、H-41、H-42[87~90]。其中研究最多的是仅存在于雄性小鼠中的H-Y次要组织相容性抗原，其编码基因位于Y染色体[91~93]；不仅未发现其相应抗体存在，体外也无法诱导初次T细胞应答，而且再次应答必须满足MHC限制性。此外，从H-Y抗原诱导排斥反应的研究中发现：第一，并非所有不同的同系异基因小鼠间移植均能诱发排斥反应；第二，决定免疫应答性的免疫应答基因既可位于MHC内，也可位于MHC外；第三，单一H-Y抗原所诱发移植排斥时，H-Y抗原必须同时具备2种不同的抗原决定簇，其中辅助性抗原簇通过MHC II类分子呈递而激活相应的$CD4^+$ T细胞，细胞毒性抗原决定簇通过MHC I类分子呈递激活$CD8^+$ T细胞。上述实验现象提示，作为次要组织相容性抗原必须同时具备至少两种以上具有等位基因多态性的抗原决定簇[94]。

其他抗原

次要组织相容性抗原也不能囊括所有能诱发排斥反应的非MHC抗原。以下，我们将简要介绍其他可能的重要抗原。

超抗原

超抗原同MHC一样，不仅能在体外激发T细胞的原发性增殖反应，而且能活化大量的T细胞。但是，超

抗原与普通抗原不同。首先，超抗原无需APC细胞对其进行处理、暴露抗原肽并结合于MHC的抗原肽结合沟内，而是以整个分子与MHCⅡ类分子结合。同时，不同于T细胞抗原受体多变区与普通抗原肽结合，T细胞以相对恒定的V_β区域与超抗原结合。此外，因为大多数组织中的内皮细胞及实体细胞均不能表达内源性超抗原，故内源性超抗原不能成为某种移植抗原[95~99]。基于以上认识，超抗原也不能归为任何类型的移植抗原。

组织特异性抗原

实验证实，某些经MHC分子呈递的抗原存在某种组织分布的特异性[100~102]。例如，识别某种组织类型的同种异型抗原的T细胞克隆，往往并不能识别同一个体其他类型的组织细胞[103]。

目前已确认的惟一可激发移植排斥反应且具有组织特异性的抗原是皮肤Sk抗原[100]。此种抗原仅表达于皮肤组织，能通过MHC分子的处理、呈递而激发T细胞介导的免疫应答。这种组织特异性抗原不同于次要组织相容性抗原，其抗原决定簇以"同种异型MHC + X_{Sk}"的形式表达，而自身Sk抗原为"自身MHC + X_{Sk}"。所以，T细胞能对自身皮肤特异性抗原Sk产生耐受，而对其他个体的此种抗原发生应答。这一抗原的组织特异性表现在"同种异型MHC + X_{Sk}"只存在于供体皮肤而不出现在供体的其他组织中。

组织特异性抗原的研究的重要性在于以下几点：第一，当采用体外实验研究针对供体抗原的T细胞应答时，应当考虑到供体造血细胞可能作为某种组织特异性抗原，T细胞应答也仅仅是针对相应组织特异性。第二，组织特异性抗原自身耐受的存在，说明除胸腺的中枢耐受途径外，尚有其他诱导耐受途径[104]。第三，组织特异性抗原的存在表明，供体某种细胞诱导的移植耐受并不代表完全耐受，即以同一供体的其他种类细胞进行移植仍可能导致排斥反应发生。

内皮细胞糖蛋白

血型抗原

血型抗原因其不能诱导细胞介导的免疫应答，故不能将其归为次要组织相容性抗原。其广泛表达于诸多细胞表面，尤其表达于血管内皮细胞上，可作为某种靶抗原，引起抗体介导的血管损伤。

血型抗原在输血中的重要性众所周知[105]。它是不同糖基化酶作用的结果。A、B血型个体内存在相应的A型及B型抗原而O型则两者皆无，而且因接触外来微生物，其与血型抗原决定簇有交叉反应，使人体内存在针对A型或B型抗原的天然抗体。所以，O型人体内存在抗A及B型抗原抗体，A型人存在抗B型抗原抗体，B型人存在抗A型抗体，而AB型人体内不存在任何抗血型抗体。于是，O型血人只能接受O型血，A型或B型血人除能接受同一血型的输血，还能接受O型血，AB型血人则能接受任何血型的输血。由于大多数血管内皮细胞上表达血型抗原，所以上述输血原则同样适用于移植过程[106, 107]。除ABO血型外，血细胞表面还有其他血型抗原，但由于不表达于血管内皮细胞上，所以在器官移植中可不予考虑。

1187

其他同种异型内皮细胞糖蛋白

除众所周知的血型抗原外，血管内皮细胞上表达的其他糖蛋白往往也能作为靶抗原，引起相应的体液免疫应答。针对此类抗原的预成抗体偶尔能诱导超急性排斥反应的发生。另外，即使MHC配型相同、ABO血型一致的肾移植术后，也能检测出针对内皮细胞糖蛋白的抗体存在。[108]但是，此类诱导产生的抗体常常与移植排斥反应无关。

种属特异性的糖基决定簇

此种抗原决定簇同血型抗原相似，均为糖基决定簇，且可表达于内皮细胞上。例如，猪体内存在一种人类所没有的糖基转移酶，能产生半乳糖-α-半乳糖抗原决定簇。人体血清中存在针对此种猪抗原的天然抗体。依此类推，天然抗体存在于任意两个种属差异性较大的种属之间[109, 110]。当实施异种器官移植时，能引起相应的超急性排斥反应。此外，种属特异性的糖基决定簇也能激发包括巨噬细胞及NK细胞在内的非特异性天然免疫。

Hh 基因座

人们发现了一个明显违反移植学原则的现象，当 F_1 子代（A×B）接受来自母代的骨髓移植时，可发生排斥反应，同时，同种异体骨髓移植也能发生异常迅速的排斥反应。Cudwkowicz 等对此展开深入研究，发现了 NK 细胞在其中的重要作用[111]。但是迄今尚未鉴定出参与此过程的特异性移植抗原成分。近来，已探明 NK 细胞表面存在能识别靶细胞表面 MHCⅠ类分子的受体，因此能传递抑制 NK 细胞活化的抑制信号。AA 母代造血干细胞表面缺乏 BB 母体的 MHC Ⅰ类分子，造成 A×B F_1 子代 NK 细胞活化，从而启动对 AA 细胞的杀伤。第 17 章将对 NK 细胞识别 MHC I 类分子的机制做详尽的阐述。

参与移植排斥反应过程的免疫系统成分

抗原呈递细胞

APC 细胞种类

APC 细胞在免疫激活过程中的作用在本书其他章节中阐述（第 9、15、16 章）。清除供体 APC 细胞能促进移植物存活的事实，已充分说明 APC 细胞在移植排斥中的重要性[112~116]。

诸多细胞类型均具有抗原呈递作用，包括树突细胞、巨噬细胞以及活化的 B 细胞[117~121]；另外，还包括某些组织特异性细胞，如同为树突细胞亚群的肝组织中的肝巨噬细胞以及皮肤组织中的朗格汉斯细胞等。各类细胞的抗原呈递能力不同，其中树突细胞最强[122]。上述所有的“专职”APC 细胞均起源于骨髓干细胞。

抗原呈递细胞均组成型表达 MHCⅡ类抗原，各种细胞因子包括 IFN-γ、TNF-α 等可上调 APC 细胞表面 MHCⅡ类抗原水平[123~125]。一些 APC 细胞 MHCⅡ类抗原水平相对较低，但细胞却能由此逃避免疫应答对其的杀伤[35]。

移植免疫学中的一个重要特性是激活 T 细胞的 APC 细胞由供、受体 APC 细胞共同组成。在不同移植条件下，虽然受体 APC 细胞均来源于淋巴组织，但由于供体 APC 细胞存在组织特异性（如朗格汉斯细胞），APC 细胞总体组成均不同；同时，由于供、受体 APC 细胞表面 MHC 抗原的差异，两类 APC 细胞所激发的 T 细胞特异性也不同。除非供、受体之间 MHC 抗原完全吻合，移植物实体细胞上表达的抗原决定簇只存在于供体 APC 细胞表面。

直接及间接抗原呈递

为了正确理解移植排斥机制，对两类 APC 细胞差异性的认识非常重要。移植免疫学家由此提出激活 T 细胞的两种不同机制。其中，直接抗原呈递途径是指由供体 APC 细胞所进行的抗原呈递，而间接途径则是指经典免疫学中的受体 APC 细胞对供体抗原的呈递过程[75, 126, 127]。“间接”二字从字面上理解，似乎容易使产生非生理性过程的错觉，但事实上正相反，直接激活途径才是真正意义的非生理性过程。

的确，直接与间接呈递的说法常使人感到混乱。其定义取决于是由供体还是受体 APC 激活 T 细胞，而非依据其机制。所以，无论直接或间接呈递过程必有抗原肽处理和呈递的过程。例如，若供体 MHCⅠ类抗原肽被供体 MHCⅡ类抗原识别、处理，则仍为直接呈递途径。此外，当供、受体某些 MHC 抗原吻合时，这种定义也不恰当，因为这时无论是直接或间接识别的抗原是相同的，但无论怎样，T 细胞的供、受体 APC 细胞的抗原呈递过程是截然不同且相当重要的。最后“间接途径”这一概念本指的是刺激 T 细胞活化的 APC 类型，但往往容易与 T 细胞的效应机制相混淆。其中常遇到的是所谓的移植物排斥可能的间接效应机制，后者是指 T 细胞识别受体 APC 而非供体 APC 细胞所呈递的抗原。由于移植物缺乏靶抗原，T 细胞首先是通过间接识别途径启动免疫应答，然后又间接地对移植物造成排斥破坏。这两个事件是明显相关的，但“间接”一词分别指的是 T 细胞应答的不同阶段。

1188

移植中的 APC 运输

由于 APC 细胞是刺激免疫应答发生的关键性条件，APC 细胞的存在及其定位便成为调节移植排斥反应或免疫耐受的重要因素。在小鼠中进行的研究显示，移植能迅速引起包括供、受体双方 APC 细胞的重新定位。供体 APC 细胞开始从移植物组织向受体淋巴组织，如淋巴结及肝迁移[122]。同时，受体骨髓源性 APC 细胞也开始进入移植物组织，从而逐渐取代供体 APC 细胞。对于不同种类的器官移植，上述过程所需时间不一。对于小鼠皮肤移植，受体 APC 细胞取代供体 APC 细胞大约需数月时间，而猪肾及人肝移植则只需数周时间[128~132]。

致敏部位

尽管异体 APC 细胞具有强大的激活 T 细胞能力，但 T 细胞致敏过程时常并不发生在移植物组织内。供体 APC 细胞可迁移至受体的淋巴组织，而 T 细胞致敏过程也常发生在此部位。Barker 等人[133~136]发现的皮肤移植排斥反应便首先发生于淋巴结中。若皮肤移植在无淋巴引流的血管蒂部进行，受体抗供体的移植排斥反应则无法实现，但是若同时进行一般条件下的皮肤移植，则能启动移植排斥反应。

上述异体抗原引起 T 细胞致敏过程初期发生在淋巴结的推断，是与基础免疫学理论完全吻合的。未致敏的 T 细胞在淋巴循环中不断游走，以等待可能集中在此的外来抗原[137]，其中只有已致敏的 T 细胞才能迁移至抗原来源的非淋巴组织[138, 139]；另外，某些已被“自身 MHC + X”抗原决定簇激活的 T 细胞也可与移植物的异体抗原决定簇发生交叉反应，所以，我们不难理解，同种异体反应性 T 细胞的激活，甚至反应可发生于移植物组织中，尤其是移植物满足血管生成及表达内皮细胞的条件下[135, 140, 141]。

B 细胞及抗体

预成抗体

在许多血管化的实体器官移植中，移植前受体体内预成抗体的存在对于移植排斥的发生非常重要。如果这些预成抗体数量足够且能识别血管内皮细胞上的抗原决定簇，则能启动超急性移植排斥反应发生。预成抗体包括两种类型的抗体：天然抗体及移植术前与移植抗原接触而产生的抗体。

天然抗体

天然抗体包括针对不同血型抗原及种属特异性糖类抗原决定簇的抗体。各种微生物内的糖类抗原决定簇可诱导其产生，而无需事先与移植物组织接触即可存在于机体内。其多数为 IgM，但不排除 IgG 的存在。天然抗体的产生通常是非 T 细胞依赖性，且其受体多呈胚系构象。

预致敏所致的预成抗体

受体若预先与供体抗原接触，也可产生抗供体抗体，例如，妊娠过程中的血型抗原暴露。这类抗体多为 IgG，多针对供体的蛋白质抗原表位（多为 MHC 抗原）而非糖类表位，且与抗原结合的亲和力远远大于天然抗体。可能正因为 MHC 抗原表达的广泛性及此类抗体的高亲和力，较低浓度效价的此类抗体即能产生与较高浓度的天然抗体相同的免疫效应。

诱导产生的抗体

移植术后，受体可针对供体组织抗原产生新的抗体。尽管在受体反复致敏条件下，受体也可针对供受体之间其他不同等位基因所编码的不同抗原而产生抗体，但通常产生的抗体是针对 MHC 抗原的。诱导产生的抗体开始为 IgM，后转化为 T 细胞依赖性的 IgG 类型。

在绝大多数情况下，诱发产生的抗体并不参与急性排斥反应。这是因为：第一，可能是抗体的产生大多发生于 T 细胞排斥反应之后。第二，由于产生的时限性，如果有免疫抑制发生，即使抗体产生也不能有效介

导排斥。但是,种属差异不大的异种血管化实体器官移植过程是一例外[142~144],其诱导产生的抗体能极其迅速地介导对血管内皮细胞表面抗原的免疫应答及排斥过程。同种异体移植过程很少发生上述情况,除非存在某些预致敏的预成抗体。这些诱导产生的抗体多参与慢性移植排斥过程,包括对供体血管的损害。

T 细胞

T 细胞介导的免疫应答参与同种及异种排斥反应大多数的不同阶段。在去胸腺小鼠的研究中,T 细胞的显著重要性已得到充分的显示。实验发现去胸腺小鼠不仅能完全接受同一种属的组织或器官移植,甚至可接受不同种属的移植物[145],但若重新输入纯化的 T 细胞,则可重新启动排斥反应[41, 146, 147]。临床上特异性阻断 T 细胞应答或有效清除 T 细胞等方法的运用,也再次证实了 T 细胞在移植排斥过程中的中心地位[148]。

由于现在仍无法明确 T 细胞亚群功能与其细胞表面标志之间的关系,那么也很难明确各 T 细胞亚群在移植排斥过程中的不同作用。辅助性 T 细胞及效应性 T 细胞功能被明显地区分开来,这对于理解·T 细胞在排斥反应中的作用很重要。在 T 细胞依赖的 B 细胞应答过程中,我们已很清楚 T 细胞作为一种辅助细胞协助 B 细胞产生抗同种异型抗体[149];体内实验也显示,辅助性 T 细胞及效应性 T 细胞在细胞介导的移植排斥过程中发挥着不同的作用。一个特别的例子是第一次的皮肤移植无排斥反应发生,但若在同一受体上进行第二次皮肤移植,且移植物存在第一次移植物的抗原表位以及其他新的抗原表位时,则可发生针对两个移植物的排斥反应[41, 150]。这种排斥反应提示,针对第一个移植物的 T 细胞效应机制需要第二次移植过程所启动的辅助性 T 细胞的帮助方能活化。上述体内实验证实了,移植排斥过程中"辅助性 T 细胞"与"效应性 T 细胞"功能的差异,提示移植物中存在两种不同的抗原表位,即"辅助性抗原决定簇"及"效应性抗原决定簇"。其中,效应性抗原决定簇可能多由 MHC Ⅰ 类抗原呈递,刺激 $CD8^+$ T 细胞应答;而辅助性抗原决定簇则为 MHC Ⅱ 类抗原识别,刺激 $CD4^+$ T 细胞应答。上述实验结果提示两种 T 细胞功能分别由不同的 T 细胞亚群执行,$CD4^+$ T 细胞为 $CD8^+$ T 细胞提供必要的辅助。

其他细胞

自然杀伤细胞

自然杀伤细胞是一类缺乏 T 细胞受体的大颗粒淋巴细胞,但却能介导对肿瘤细胞及造血干细胞的细胞毒作用。NK 细胞可产生大量的促炎细胞因子,如 TNF-α 及 INF-γ。NK 细胞可通过与表达于不同细胞上的大量受体结合而激活(某些受体尚未明确),从而启动细胞毒杀伤机制,构成抗微生物的第一道防线。现已发现人及小鼠 NK 细胞均表达能识别特异性 MHC Ⅰ 类抗原的表面受体,称为杀伤细胞抑制受体(KIR)。这些受体呈克隆性分布,在小鼠中即为小鼠Ⅱ型凝集素(Ly-49 家族),在人体中由免疫球蛋白超家族成员(p58/p70)以及 NKG2 凝集素与 CD94 形成的二聚体组成。KIR 与 MHC Ⅰ 类分子结合,进一步通过免疫受体抑制基序(ITIM)与酪氨酸磷酸酶作用,拮抗其他细胞表面分子传递的活化信号,从而向 NK 细胞内传递抑制性信号。NK 细胞通过 KIR 识别自身 MHC Ⅰ 类分子,在防止 NK 细胞杀伤自身细胞中发挥了重要的作用[151, 152]。

尽管 NK 细胞能介导异体骨髓移植排斥反应,但其对异体多能骨髓干细胞的排斥作用是有限的,若增加供体干细胞数量,则可克服此作用[153];反之,由于人类 NK 细胞能以 MHC Ⅰ 类分子依赖的识别机制防止对表达该种 MHC Ⅰ 类分子细胞的杀伤,那么 NK 细胞在异体骨髓移植排斥发生的作用又究竟如何?至少,现在的研究提示,NK 细胞在异种骨髓移植中的作用[154]超过同种异体移植过程[153, 155]。

NK 细胞在异体器官移植排斥过程中表现出明显的浸润,但并不能断言 NK 细胞就参与异体器官移植排斥反应。假设上述断言成立,NK 细胞活性一定依赖于 T 细胞,因为缺乏 T 细胞的小鼠是不能发生非造血干细胞性异体移植排斥的;同时人们发现,若以 MHC Ⅰ 类分子缺失的供体[β_2 微球蛋白(β_2m)缺失]进行骨髓移植实验,由于供体细胞无法与宿主 NK 细胞表面 KIR 结合,从而能启动很强的 NK 细胞介导的排斥反应[156],

但是，β_2m^- 皮肤却能成功移植至 β_2m^+ 宿主[157]，说明 NK 细胞可能并不参与实体器官移植排斥过程。

NK 细胞表面抑制受体具有相当广谱的 MHC Ⅰ类分子特异性[158]，相对于 MHC Ⅰ类抗原完全缺失情况，即便是 MHC Ⅰ配型相差甚远的异体骨髓移植，仍能一定程度地通过 MHC Ⅰ-KIR 防止 NK 细胞介导的骨髓损伤[156, 159]。由于相对于同种异体 MHC 分子，异种个体间 MHC 分子差异更大，所以估计 NK 细胞在异种移植排斥反应中的作用更大，事实上小鼠实验也证明了这一点[154, 155]。

与上述假说一致的是，实验发现 NK 细胞参与速发性排斥反应[160]。因为 NK 细胞细胞毒作用的机制之一是抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用，即 ADCC 作用，那么 IgG 天然抗体的存在就能启动 NK 细胞介导的排斥反应。NK 细胞同样能分泌许多细胞因子，如 IFN-γ 及 TNF-α，能进一步激活巨噬细胞和内皮细胞，从而引起炎症过程。除上述异种移植过程中 NK 细胞抑制信号失活的机制，NK 细胞自身也能通过对异种移植物的某些抗原决定簇的直接识别而激活。例如，最新研究发现，人体内 NK 细胞可通过表面的凝集素识别异种移植物的糖基决定簇，如 α-1,3-半乳糖，从而激活 NK 细胞[161]。

最近有研究显示同种异体骨髓嵌合体可产生 NK 细胞的耐受，此时 NK 细胞将供、受体 MHC Ⅰ类抗原均视为自身。同 T 细胞耐受一样，自身耐受性 NK 细胞也属获得性[159, 162~164]，是通过细胞表面的某些特殊成分（如小鼠 Ly-49 分子）与 MHC Ⅰ抗原的相互识别而获得的[162]。造血干细胞具有诱导宿主 NK 细胞耐受形成的能力，这为异种器官移植中利用嵌合体诱导耐受提供了重要的线索。

表达 NK 细胞相关表面标志的 T 细胞

近几年，发现一类小鼠 T 细胞亚群，其细胞表面表达 NK 细胞相关的表面标志，这些细胞部分为胸腺依赖性[165]，而另一些则否[166, 167]。这类细胞能分泌诸多细胞因子，包括 IFN-γ 及 IL-4[168]，它们能识别非经典的 MHC Ⅰ类分子[169]，如 CD1；同时，能通过 IL-4 诱导未致敏 T 细胞向 Th2 免疫应答类型转化。这些细胞可以是 $CD4^+CD8^-$ 或 $CD4^-CD8^-$ 表型。人体内也有类似的 T 细胞亚群[170, 171]，其细胞表面表达具有相同 α 链及有限变异 V_β 基因的抗原受体[172, 173]。

单核巨噬细胞

单核细胞在移植排斥过程尤其在异种移植排斥反应中[175]，发挥着非特异性杀伤作用[160]，其机制可能是通过单核巨噬细胞分泌的炎性细胞因子，如 IL-1、TINF-α 等激活内皮细胞所致，而炎症过程中的化学趋化用能导致单核细胞的募集。

移植排斥反应机制

现已阐明至少 4 种移植排斥机制，当然不排除将继续发现更多的机制。为了阐述方便，人们习惯依据临床排斥反应发生时间的阶段性，将其分为超急性排斥反应、速发性排斥反应、急性排斥反应以及慢性排斥反应等 4 种机制，但是，人们正倾向于以参与排斥反应的细胞类型和反应过程对之进行分类。

预存抗体介导的排斥反应（超急性排斥反应）

血管化器官移植术后数分钟至数小时内便可启动超急性排斥反应。这种反应是非常强烈的。术后血管化一旦形成，移植肾便可迅速变蓝且斑点化，尿液输出终止，功能完全丧失。显微镜下可观察到组织内广泛的血管内血栓形成、出血以及单核细胞浸润等现象[176]。

超急性排斥反应发生机制由以下几个方面因素决定：第一，供体内皮细胞上表达 MHC 抗原或糖基抗原决定簇；第二，预存抗体；第三，预存抗体与供体抗原结合所活化的补体级联反应；第四，补体调节蛋白调节补体活化和凝血过程。无论何种机制，超急性排斥反应的靶细胞均是血管皮内皮细胞。

上述各组分参与超急排斥的过程见图 36.7，其关键环节在于补体 C5～9 组成的膜攻击复合物（MAC）形

成。同种异体移植条件下,超急性排斥反应主要通过抗原-抗体结合所活化的补体经典途径实现[177,178]。在某些异种移植情况下,补体也可由替代途径激活而无需抗体协助[179]。某些补体调节蛋白可调节补体激活过程,如补体受体Ⅰ型、衰变加速因子(DAF、CD55)、膜辅蛋白(CD46)以及CD59,它们分别作用于补体级联反应的不同环节。这些补体调节蛋白均可由血管内皮细胞表达,由于补体调节蛋白能抑制过度的补体活化,初始的补体活化必须十分强烈,以对抗补体调节蛋白的这种向下调节作用。所以,预存抗体都必须具有相对较高的效价或亲和力。针对MHC抗原的预存抗体能完全实现补体活化,但针对不同血型抗原的低亲和力抗体则只有大约25%能诱发超急排反应。超急排反应问题在异种移植过程中尤为突出,其原因是由于某一种属供体血管内皮细胞表达的补体调节蛋白不能有效地调节另一种属的补体分子的活化[180]。正因为这种同源限制作用,即便是较低水平的初始启动也能爆发强烈的补体活化。

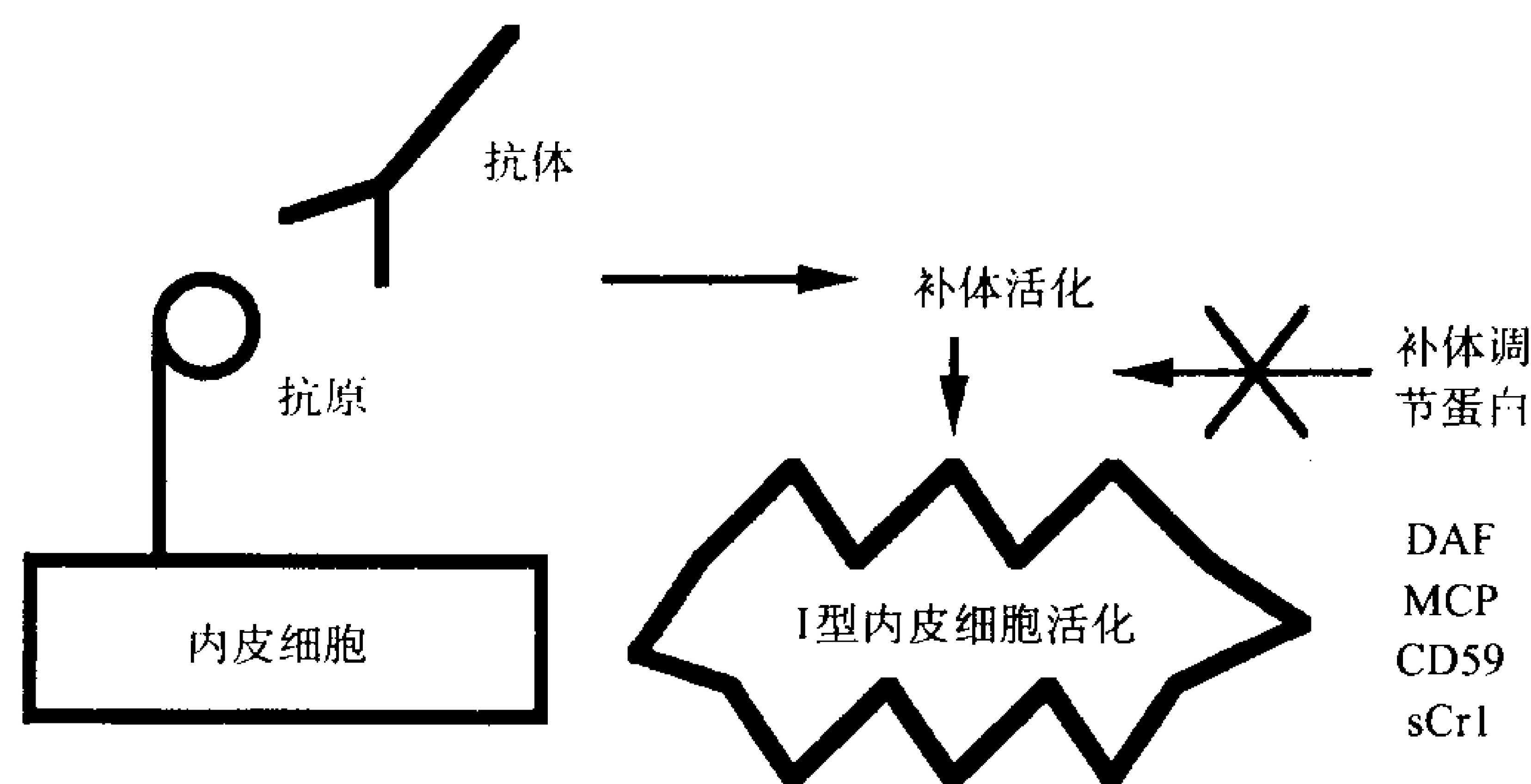


图 36.7 超急性排斥反应示意图。

尽管MAC通常被视为一溶破分子,作用于供体血管内皮细胞,但在介导细胞溶破之前,却能诱发内皮细胞活化[181]。这种反应十分迅速,在没有基因转录及蛋白质合成的情况下,引起Ⅰ型内皮细胞活化,导致细胞皱缩,内皮细胞间缝隙增大,细胞表面抗血栓形成分子丢失等[182]。所以,Ⅰ型内皮细胞活化可直接导致急性排斥反应的两大主要病理过程——血管外出血、水肿和血管内血栓形成。

超急排反应一旦启动就很难控制,所以应当寻找阻止其发生的方法。实验研究中已成功地利用短时间使用蛇毒因子清除补体[183];临床实践中,多采用避免预存抗体存在的手段。其一,避免血型抗原不合;其二,移植前进行供、受体交叉配型,即用受体血清与供体淋巴细胞混合,再施以外源性补体成分,观察细胞的溶解程度,以确定受体体内是否存在抗供体MHC抗原的预存抗体[184]。少数情况下,通过血浆置换法可去除预存抗体[185]。该方法适用于某些血型抗原不合的情况下,但不适用于抗MHC预存抗体存在的情况。异种移植中由于天然存在预存抗体,若不努力控制超急排反应的发生,则移植必然失败。

不同的组织或器官移植激发的超急排反应程度不同。大部分血管化器官,如肾、心能引起强烈的超急排反应,相反,尽管预存抗体的存在,肝移植却能逃避超急排反应[186~188]。肝的这种特殊性,究竟是由于其血管内皮细胞的表面积较大,还是由于其内皮细胞某种特异性所致,现在尚不清楚,有可能是由于肝位于循环中的特殊解剖位置,使得其具有某种强大的机制防止抗原-抗体复合物对内皮细胞的活化;但是,肝移植在某些情况下(尤其是异种移植条件下)也能发生超急排反应,说明肝阻止超急排发生也不是绝对的。另外一种避免超急排发生的情况是由于受体血循环未及时接触到供体血管内皮细胞。例如,皮肤移植中常可避免超急排发生[189],就是因为移植后一周,受体血清才与供体血管相通,这时才可发生抗供体抗体活化补体、介导皮肤移植物损伤[190]。异种皮肤能长期存活的成功事例,说明上述抗体介导的排斥过程在皮肤移植中难于发生[191]。同样,胰腺移植也类似于皮肤移植,而且培养的胰腺细胞(不含内皮细胞)将可完全避免超急排反应。对于细胞移植过程,如骨髓移植或肝细胞移植,由于缺乏内皮细胞,也可避免超急排的攻击[192~194]。但是,在大多数情况下,即便是细胞移植,由于供体细胞表面也表达能与预存抗体结合的抗原,所以仍能启动排斥反

应[195]。但是由于此种排斥反应可通过增加移植供体细胞的数量而克服，提示此时预存抗体介导的细胞排斥机制不同于超急性排斥反应机制。

尽管超急性排斥反应强烈、迅猛，但临床实践却能有效避免。由于其机制较清楚，并且临床可对预存抗体进行有效检测，所以可有效地防止其发生。超急排反应的防治是免疫学理论对临床移植实践发挥重要指导作用的最好例证之一。

诱发抗体所介导的早期排斥反应（速发性排斥反应）

这是第二种由抗体介导的排斥反应机制，实际与超急排一样发生率并不高，是由移植术后迅速产生的诱发抗体所介导的，由于典型者发生于术后5天之内，所以称之为速发性排斥反应。激发的病理过程主要以供体小动脉纤维坏死及血管内血栓形成为特点[196]。

速发性排斥反应在同种异体移植中并不常见。由于此效应必须发生在介导早期排斥反应的T细胞应答之前，所以，实际上在同种异体移植中这种类型排斥反应很少发生，以致人们甚至怀疑其是否真的存在。其他科学家在异种移植模型中研究该机制，又称之为急性血管排斥反应[197]或迟发性异种排斥[198]。Ⅰ型内皮细胞激活后，是否还存在另一种单独激活内皮细胞的机制，实际上仍不清楚。在某些异种移植过程中，即便体内无抗体应答发生，仍能发生速发性排斥反应，可能是NK细胞或其他天然免疫成分共同激活内皮细胞所致。

其实很难明确定义速发性排斥应过程及机制。首先，由于临床实践中发现受体很难在T细胞介导的排斥反应前产生诱发抗体；其次，某些患者即便没有遭遇速发性排斥反应，术后数周至数月体内仍能诱发抗供体同种异型抗原抗体；另外，若无T细胞应答的辅助，在实验中难于诱导B细胞免疫应答，所以不能断言单纯的B细胞应答能完全导致速发性排斥反应。

1192

速发性排斥反应机制的最好解释，体现在种属差异性不大的异种血管化实体器官移植中[142]。在此过程中，如果预存抗体不足以引起超急性排斥反应，但抗供体的抗体在3～4天内能迅速产生[142～144]，强烈的抗T细胞免疫抑制对控制这种早期排斥过程作用不大，而抗B细胞应答的免疫抑制药物，如环磷酰胺，能抑制速发性排斥反应发生，直至机体启动T细胞介导的排斥反应。联合应用上述T、B细胞两类免疫抑制，则能大大延长移植物存活时间。而若去除B细胞抑制，则可诱发抗供体抗体产生而启动排斥反应[142]。速发性排斥反应在异种移植过程中，也表现出移植物周围淋巴细胞浸润，抗体与供体血管内皮细胞结合，从而导致供体血管内纤维素样坏死的病理学特征性表现。

上述种属相关性异种移植排斥过程的研究提示，速发性排斥反应发生的关键因素在于早期产生抗供体抗体。这类抗体产生太早，并且抗T细胞免疫抑制对其无影响，提示这种排斥反应不大可能是宿主针对供体抗原的免疫应答。对于异种移植，受体内天然抗体虽然迅速增高，但数量仍达不到检测水平；而对于同种异体移植，尽管预先暴露供体MHC抗原可获得低水平的预成抗体，但往往在交叉配型试验中很难显现阳性，所以，可能只有某些特殊情况下迅速发生的高水平抗体应答才能启动所谓的速发性移植排斥反应。

同超急性排斥反应相同，速发性排斥反应也是通过抗体与血管内皮细胞上的抗原结合所诱发。但是，内皮细胞的病理改变却相对较慢，且必须首先有新基因的转录及蛋白合成，这一内皮细胞激活方式称为Ⅱ型内皮细胞激活方式[198]，其机制与介导诸多炎性应答的转录因子NF-κB相关，它能介导许多炎性细胞因子的分泌，例如IL-1、IL-8的分泌，介导细胞表面黏附的E选择素以及细胞间黏附分子ICAM-1的表达[199]；另外，Ⅱ型内皮细胞激活方式还可引起血小板调节素的丢失以及凝血酶原的改变[200]。所以，Ⅱ型内皮细胞激活方式与速发性排斥反应所引起的病理改变密切相关，包括引起血管内血栓形成、炎性介质对供体血管的损害。

如同补体激活过程存在诸多调节机制，针对血管内凝血以及Ⅱ型内皮细胞激活过程，也存在相应的调节分子。例如，血管内皮细胞表达的组织反应蛋白抑制物能抑制Xa因子从而抑制凝血级联反应[201]，此外，bcl-xl，bcl-2及A20等分子也具有抑制Ⅱ型内皮细胞活化的功能[198]。尽管上述分子通常被称为凋亡抑制分子，但同样具有抑制NF-κB的作用。同补体调节蛋白具有种属特异性一样，绝大多数调节Ⅱ型内皮细胞活化的

分子也具有同源限制性[201]。所以，除了抗供体抗体的迅速上调之外，异种移植中内皮细胞活化调节作用的丧失也是速发性排斥反应发生的另一重要因素（当实现超急排逃避时），但在同种异体移植中，速发性排斥反应却较少由此发生。

尽管早期组织的抗体应答能引起Ⅱ型内皮细胞活化，从而启动速发性排斥反应，但后期抗体应答却很难再参与排斥过程。供体内皮细胞抗原与受体相应抗体共存，而移植物却保持良好状态，我们称之为免疫适应（accommodation）。在异体移植及血型抗原不合的同种异体移植过程中，在去除预存抗体1～2周后，可达到免疫适应状态。同样，若预先施以少量的抗内皮细胞抗体，Ⅱ型内皮细胞活化也能得到有效控制[202]。免疫适应状态的获得与凋亡抑制分子表达的上调以及受体的抗体应答型别转换有关[203]。

尽管超急性排斥反应与速发性排斥反应均发生于移植术后早期，且均与抗供体抗体相关，但两者之间仍存在诸多差别。首先速发性排斥反应一般无补体成分的参与；其次，速发性排斥反应多由许多不同种类的次级细胞介导，如单核、巨噬细胞等。在异种移植过程中，由于MHCⅠ类抗原对NK细胞的抑制机制失效，NK细胞也可通过抗体介导ADCC效应，或在无抗供体抗体存在的情况下，NK细胞通过凝集素识别异种糖基决定簇而活化，单独启动Ⅱ型内皮细胞活化[161]。

此外，两种排斥反应的不同也体现在治疗上存在差异。超急性排斥反应一旦启动，则无法阻止其对移植物造成损害，但是对于速发性排斥反应，有时却能获得有效控制。例如采用血浆置换法去除体内抗供体抗体，或采用抗B细胞药物，如环磷酰胺等[142～144]。上述治疗方法均能直接抑制Ⅱ型内皮细胞活化。尽管上述治疗速发排斥反应方法理论上是可行的，但临床实际应用效果并不总是十分理想。目前临床实践中，有少部分患者可因体液免疫所介导的排斥反应而导致移植术后数月的移植失败。

T细胞介导的排斥反应（急性排斥反应）

尽管临床实践中通过精细的交叉配型可有效地避免超急性排斥反应及速发性排斥反应的发生，但移植术后一周，即使使用免疫抑制药物，往往仍可有明显的排斥反应发生。第一，其反应发生时间较迟；第二，受体内常无抗供体抗体存在；第三，常可见明显的细胞浸润。所以急性排斥反应与体液免疫所介导的排斥反应无关。临床医师采取对症治疗多是针对此型排斥反应。此反应多发生于移植术后数天内，术后3个月后反应强度逐渐减弱，但在某些情况下，尤其是免疫抑制药物使用减量时，或者有时在术后很长时间后仍可发生类似反应。

由于急性排斥反应是由T细胞介导的，故治疗上多采用高剂量的免疫抑制药物或抗胸腺细胞抗体，而且治疗效果不错。因为T细胞介导的同种异体移植排斥反应在临床移植过程的重要性，阐明其机制也显得尤其重要。但以下的讨论表明，尽管此过程的机制并不十分清楚，诸多关键问题尚待研究，但临床许多控制急性排斥反应的治疗手段却已相当有效[148]。

30年前，大多数接受移植手术的患者只能支撑1～2个免疫排斥阶段，只有大约50%的患者能存活1年以上，但由于免疫抑制药物的日益更新以及抗T细胞单克隆抗体等治疗手段的运用，患者存活率明显增高，存活时间大大延长。最新研究报告显示，多达80%的肾移植患者已可避免急性排斥反应[203]，并且术后1年内也很少发生由于急性排斥反应而致的移植失败。这些临床上令人振奋的进展，几乎使人相信细胞介导的排斥反应的深入研究似乎无助于提高移植的成功率。

但是，基于以下理由，深入研究细胞介导的排斥反应的机制值得引起高度重视：第一，T细胞介导的排斥反应还包括慢性排斥反应。第二，T细胞介导的排斥反应机制的充分了解将有助于精确分析受体对移植器官的免疫状态，以确定免疫抑制药物的用量。第三，更重要的是，对其机制的探明能有助于寻找诱导特异性免疫耐受的方法以彻底消灭此反应。这是移植免疫学研究的终极目标。

关于细胞介导的排斥反应机制的体内实验，包括4种类型。①临床移植过程的研究。其具备自然状态的优点，但缺点在于多有免疫抑制药物的干扰以及无法任意对某些重要因素进行控制。②啮齿类动物的皮肤或胰岛移植的研究，虽然可获得大样本数据，但却无法准确反映血管化实体器官移植过程。③啮齿类动物

心脏或其他血管化实体器官移植实验研究,其缺点在于动物试验中的移植排斥反应程度远比在人体中发生的轻。④大动物血管化实体器官移植的研究,如猪或猴。其优点在于接近人体自然状态,但由于费用高昂,很难获得大样本数据。上述各种方法的研究结果常不一致。所以,对于细胞介导的排斥反应的一般规律的探明,由于种属特异性的存在而显得更为艰难复杂。

T细胞介导的同种异体排斥的简明经典模型

从以上与移植排斥相关的供体抗原的阐述中可以看到,同种异体 MHC 抗原在介导 T 细胞应答中发挥了重要作用,特别是其以直接识别方式刺激 T 细胞活化。此外,对参与移植排斥过程免疫系统不同组分的分析揭示了 APC 细胞在移植排斥发生中的重要作用。APC 细胞能介导辅助性 T 细胞活化,后者可进一步辅助 T 细胞介导的移植排斥反应。依据上述观点,T 细胞介导的排斥反应机制最简明的模式图见图 36.8。这一模式图着重强调了受体 $CD4^+$ T 细胞通过对供体 MHCⅡ类抗原的直接识别而活化,并作为辅助细胞刺激经直接识别供体 MHCⅠ类抗原而致敏的 $CD8^+$ T 细胞活化。$CD8^+$ 细胞作为效应细胞,通过直接识别表达于供体移植物实质细胞表面的 MHCⅠ类抗原而发挥排斥效应。

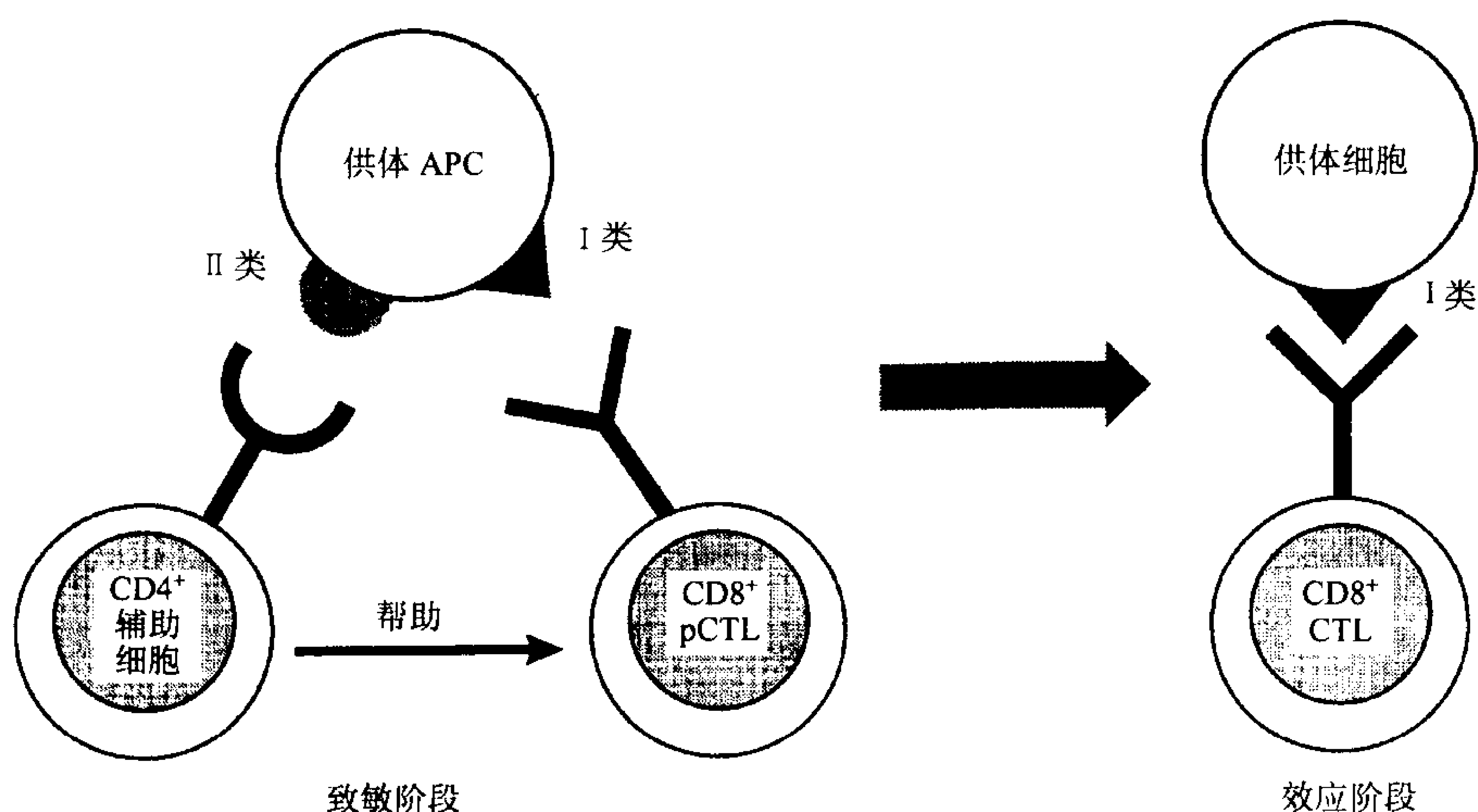


图 36.8 T细胞介导的排斥反应的简明模式图。

这一模式图突出地强调了同种异体移植过程中的 T 细胞应答,超越了基础免疫学教科书中有关 T 细胞激活过程中严格的 MHC 限制性理论;揭示了在同种异体免疫应答过程中,T 细胞应答的启动并不一定需要受体 MHC 分子对供体 MHC 分子的处理及呈递。针对供体 MHC 抗原的直接识别方式,图 36.8 所示的模式图抓住了同体异体移植过程免疫应答的本质特点,简明地显示出其与一般免疫过程机制的差别,以及与其他供体抗原相比 MHC 分子的重要性。但是,图 36.8 模式图并不能解释不同实验条件下造成不同移植结果的原因。例如,根据这一简明模式图可以推断,无论是清除受体的 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T 细胞均可防止移植排斥反应的发生,但事实上 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T 细胞亚群均可单独介导 MHC 配型不合的皮肤移植排斥反应[149, 204]。这一例子和以下更多的例子很清楚地表明,图 36.8 所示的简单模式图并没有勾画出 T 细胞介导的移植排斥反应的全貌。

此模式图至少存在两方面基本的缺陷。一方面,没有突出强调直接识别方式的重要性及其介导排斥反应的强度。由于体内存在高频率的同种异型反应性 T 细胞前体,因此 T 细胞亚群的功能重要性较普通免疫应答更为突出。例如,$CD8^+$ 细胞对同种异体移植物 MHCⅠ类抗原的直接识别,能刺激其自身分泌 IL-2 而无需 $CD4^+$ T 细胞的辅助。另一方面,图 36.8 模式图单纯强调了直接识别方式,却忽视了受体 APC 细胞对供体抗原的呈递介导的经典免疫应答过程。

关于T细胞介导的排斥反应的许多研究均揭示，无论是T细胞被供体抗原致敏还是其介导移植物损伤的效应过程均存在多种途径及多种机制。因此人们进行了许多实验对这些机制进行探讨，并通过设计不同的实验体系以单独研究间接识别方式或无需CD4$^+$ T细胞辅助的CD8$^+$细胞直接识别方式介导的移植物排斥反应。利用抗体选择性清除受体体内某一特定T细胞亚群，或利用突变技术或基因工程方法修饰供体小鼠以获得特定的MHCⅠ、MHCⅡ类抗原，或使其细胞表面MHCⅠ、MHCⅡ类分子选择性缺失。通过这些方法简化实验条件，来分析T细胞介导的排斥。上述无论体内或体外的各种实验，均揭示了同种异体移植过程中T细胞介导的排斥过程包含如下所述的更为复杂的机制模式。 *1194*

同种异型免疫应答途径(辅助性T细胞应答)

同种反应性辅助细胞活化的体外检测

细胞免疫中辅助细胞功能体外检测的标准方法是MLR，即检测经异体抗原刺激的T淋巴细胞增殖反应。近来，人们发现通过检测特定细胞因子产生水平，如运用生物学方法，酶联免疫吸附试验或半定量PCR等方法检测IL-2水平，可以更精确地反映辅助性T细胞应答水平。应用这些体外检测手段，人们对同种反应性辅助细胞的活化途径进行了广泛的研究[205~210]。一系列的实验证实，不同的T细胞亚群针对不同类型的同种异型抗原产生的辅助性应答反应的强度是不同的(表36.5)。

表36.5 体外同种反应性途径

	辅助性途径				细胞毒途径	
	直接		间接			
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅰ	Ⅱ
CD4$^+$	-	++++	-	+++	-	++
CD8$^+$	++	-	±	-	++++	++

总结起来，同种异体反应性辅助性T细胞的体外活化过程存在三条途径：第一，CD4$^+$ T细胞对同种异体MHCⅡ类抗原的直接应答。第二，CD4$^+$ T细胞对受体MHCⅡ类分子/供体抗原肽复合物的应答。第三，CD8$^+$ T细胞对供体MHCⅠ类抗原的直接应答。其中，CD4$^+$ T细胞的直接应答较易检测，CD4$^+$ T细胞的间接应答的检测通常需要体内预致敏，且程度相对较弱。CD8$^+$的直接应答的检测中，测定IL-2分泌比测定T细胞增殖更敏感，特别是应用抗IL-2R抗体以阻止IL-2耗竭[207]。并且由于辅助性T细胞应答主要由CD4$^+$ T细胞介导，所以若需检测CD8$^+$ T细胞的直接应答，还必须纯化反应体系，只有满足仅MHCⅠ类而非Ⅱ类分子配型不合的实验体系，才能排除CD4$^+$ T细胞的应答过程[211]。尽管CD8$^+$ T细胞在体外能够直接识别同种抗原而活化，CD8$^+$ T细胞却很难识别TNP修饰的自身MHCⅠ类分子[205]。但有实验证实，CD8$^+$ T细胞经体内预致敏原在体外能对经病毒作用而改变的自身MHCⅠ类分子产生应答[212]，同时发现辅助性CD8$^+$ T细胞与同种异体MHCⅠ类抗原具有极高的亲和力[213]。 *1195*

同种反应辅助性T细胞活化的体内检测

检测同种反应辅助性T细胞的体内活化情况多采用两种基本方法。第一，选择性清除某一特定T细胞亚群[149, 204, 214~221]。第二，将某一特定T细胞亚群细胞转移至本身不能产生排斥反应的重度联合免疫缺陷小鼠(SCID)体内[41, 146, 147, 217, 222~224]。经过以上两种方法处理后，再施以某种特定MHC抗原配型不合移植或不同组织、器官的移植过程。大量的研究结果显示，体外试验探明的三条同种反应性辅助细胞活化途径均在体内存在。

体内CD4$^+$细胞直接活化的检测 CD4$^+$ T细胞单独便能诱发多种排斥过程，包括对配型不合的MHCⅡ类抗原或多种次要抗原的应答[204, 223, 225]，所以，CD4$^+$ T细胞在这些过程中一定执行着某种辅助性作用。进一步研究发现，CD4$^+$ T细胞几乎参与所有不同类型的移植排斥过程。只有在某些特殊的小鼠皮肤移植过程中，由于只存在MHCⅠ类抗原的配型不合，CD4$^+$ T细胞不发挥作用[41, 146]。因此，CD4$^+$ T细胞的辅助作用在

移植排斥的绝大多数情况下发挥着重要作用[226]。

若采用敲除 MHC Ⅱ 类基因的敲基因小鼠作为移植受体进行研究，由于受体 APC 细胞不表达 MHC Ⅱ 类分子，那么移植排斥反应则不包含间接应答过程。换言之，这些受体中 $CD4^+$ T 细胞所介导的移植物排斥反应反映的是体内 $CD4^+$ T 细胞通过直接识别机制活化的情况[227]。

体内 $CD4^+$ 细胞间接活化的检测 虽然体外实验已证实 $CD4^+$ T 细胞的间接活化方式，但一直很难明确该途径在体内移植物排斥反应中贡献的大小。由于体内 $CD4^+$ T 细胞直接活化过程占较大优势，故很难区分间接活化过程的效应作用。此外，小鼠皮肤移植试验（MHC Ⅱ 类抗原吻合，MHCI 类抗原配型不合）中，甚至发现根本不存在间接激活过程[41, 146]。但是，以下更多的实验却证实间接活化过程的确参与了移植排斥反应。

① 内分泌腺体移植实验中发现，若清除 MHC 配型不合的受体 APC 细胞则不发生移植排斥反应，证实了对供体移植物表面抗原的间接识别过程在移植排斥中的作用[228, 229]。

② 即便体外实验发现异种移植 $CD4^+$ T 细胞直接激活反应非常低下，但排斥反应仍有赖于 $CD4^+$ T 细胞的参与[230]。

③ 抗受体 MHC Ⅱ 类抗原抗体有时能阻止体内排斥反应发生[231]。

④ 在移植前以供体抗原肽免疫受体能加速随后的移植排斥反应[232]。

⑤ 一些移植物细胞表面缺乏 MHC Ⅱ 类抗原的表达，但其排斥反应的发生仍需 $CD4^+$ T 细胞参与[234]。

⑥ 改变供体 MHC 抗原肽，能有效抑制排斥反应，提示间接活化过程程度超过直接活化过程[235, 236]。

体内 $CD8^+$ T 细胞的直接活化 $CD8^+$ T 细胞可单独执行某些移植排斥过程，如 MHC Ⅰ 类抗原配型不合的皮肤移植[41, 146, 149, 236]，说明 $CD8^+$ T 细胞的直接活化机制参与移植排斥过程。

仅仅由于 MHC-Ⅰ 类配型不合而导致的排斥反应往往晚于 MHC Ⅱ 类抗原。所以，通过直接活化过程激活的 $CD8^+$ T 细胞作用似乎不及 $CD4^+$ T 细胞。而且，$CD8^+$ 辅助性 T 细胞所介导的排斥反应更易为环孢素所抑制[237~239]，也许正因为此反应程度较弱，所以更易为一些无法干扰 $CD4^+$ 直接活化过程的因素或药物所抑制。由于 $CD8^+$ 细胞的直接活化过程有赖于供体 APC 细胞的大量存在[149, 233]，所以即使是 MHC Ⅰ 类抗原配型不合的实体血管化器官移植的排斥反应的发生仍需 $CD4^+$ T 细胞参与。此外，$CD8^+$ 辅助性 T 细胞无法识别经修饰改变的自身 MHC Ⅰ 类抗原[87, 205]。所以，仅仅少量次要抗原配型不合的情况下，$CD8^+$ T 细胞的直接活化过程根本无法启动移植排斥反应，即使有大量次要抗原不合，$CD8^+$ T 细胞的辅助效应也是很微弱的。

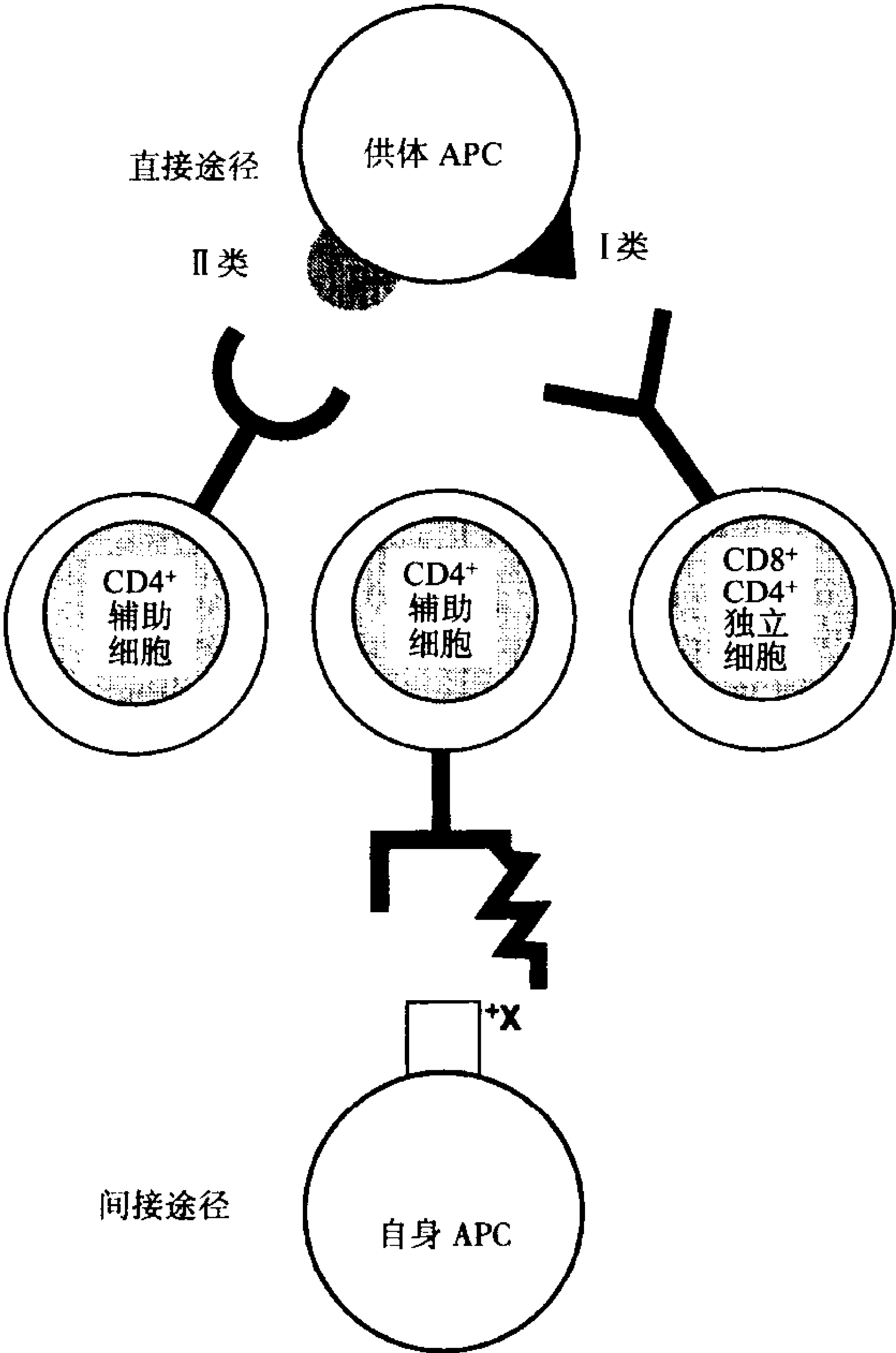


图 36.9 T 细胞致敏途径的复杂模式图。

此外，$CD8^+$ 辅助性 T 细胞与 $CD4^+$ 辅助性 T 细胞的差别表现在 $CD8^+$ T 细胞无法为其他细胞亚群提供辅助作用[240]。显然，其分泌的 IL-2 只能作用于自身细胞，促其分化和发挥效应。所以，$CD8^+$ 辅助性 T 细胞并不能为其他不同特异性的 $CD8^+$ T 细胞或 B 细胞应答提供必要的帮助。

同种异体移植排斥中致敏过程的较精确模式

正如以上实验所提示的，图 36.8 所示的致敏过程机制是不准确的，而图 36.9 的模式图能更精确地展示

移植排斥反应中T细胞致敏阶段的机制。但需要说明的是,并不是任何条件下均包含所有途径,而且随着移植时间的延长,尤其是受体APC细胞逐渐取代供体APC细胞后,各种途径均可改变。如今,探明究竟哪条途径作用更突出,已成为移植免疫学关注的问题之一。

移植排斥反应中哪条途径更重要?

至今我们仍不能断言三条途径中究竟哪条激活T细胞途径更重要。其中的影响因素很多,包括移植类型、抗原差异性、移植术后时间、受体的感染史等等。但总体而言,除清除 $CD4^+$ T细胞或供受体之间只有MHC Ⅰ类抗原不相吻合等特殊情况以外,无论体内或体外实验均提示,$CD4^+$ T细胞的直接活化途径在介导移植排斥反应中较 $CD8^+$ T细胞重要。另外,体外实验证实,不仅 $CD4^+$ T细胞的间接活化途径最难抑制,而且 $CD4^+$ T细胞直接活化效应也较 $CD8^+$ T细胞更难抑制[237, 241];同时在多种辅助途径中,大多数实验结果均显示 $CD8^+$ T细胞直接活化效应在体内排斥反应中程度最弱,提示 $CD4^+$ T细胞在启动排斥反应中的中心地位。

间接识别在介导排斥反应中的突出作用

虽然如图36.9所示,同种异体移植排斥T细胞激活存在许多途径,但图36.8所示的 $CD4^+$ T细胞直接激活途径无疑是主要途径。尽管如此,过去数年中,人们已开始逐步强调间接激活途径的重要性[242~246]。以下的不同实验均显示其重要性。首先,移植临床实践中发现,大量能延长移植物存活的免疫抑制药物并不造成移植受体免疫系统瘫痪。这一结果与图36.8所示机制存在矛盾之处,因为若直接激活机制占据主要地位,那么移植排斥反应的免疫应答强度应大大超过普通免疫应答;其次,许多着力于评价T细胞致敏与排斥反应强度的临床研究提示,间接识别过程激活的T细胞前体数量的多少直接与排斥反应强度密切相关[247~254];此外,以MHC Ⅱ类抗原敲除小鼠进行研究,已获得只有直接或间接活化途径活化的实验模型,也直接证实了间接活化过程在介导排斥反应中的重要性,其效应与直接活化过程一样很难控制。甚至有实验显示两者之间存在竞争性抑制效应[227]。再则,改造同种异体MHC分子抗原肽成功实现抑制排斥反应发生的事实,也提示我们间接活化过程在介导排斥反应中的关键性作用[255~258]。上述实验结果不仅证实了间接活化途径在介导移植排斥反应中的重要作用,而且提示其重要性已高于直接活化过程。另一方面,对间接活化途径重要性的认识也将重新改写移植免疫学的某些重要理论。

间接识别机制的几个相关问题

MHC抗原吻合的重要性　图36.8所示的经典模式图已很好地说明了MHC抗原在介导移植排斥反应过程中的重要性。如前所述,对同种异体完整MHC抗原的直接识别将启动超强的免疫应答,而供体的一般抗原引发的免疫应答则较弱。但是如果近来对间接活化过程重要性的认识成立,那么同种异体MHC抗原分子在介导移植排斥中的突出地位尚需新的解释。

间接呈递作用与供体特异性免疫耐受　间接识别也将直接影响诱导供体特异性免疫耐受方法的策略制定。人们寻找将供体抗原呈递给受体免疫系统但诱导T细胞下调而非T细胞活化的方法,但如果这些策略仅仅针对供体APC,那么很难防止受体APC细胞介导的间接免疫应答过程[246]。

清除供体APC细胞为什么能延长移植物存活　大量的研究显示去除供体APC细胞能有助于移植物存活[122~126, 259]。虽然这一结果与APC细胞在移植排斥中的中心地位的推论相吻合,但却不好解释为什么既然间接活化途径可诱导移植物排斥反应,去除供体APC细胞还能有效地控制排斥反应。其中第一个可能的解释是,供体APC细胞可通过淋巴循环携带移植物抗原至受体APC细胞,所以去除供体APC可有效防止直接或间接活化两条途径,直至受体APC细胞在移植物内的重新分布。另一个解释是,效应细胞致敏过程中必须有供体APC细胞的存在,而间接识别只介导辅助细胞的致敏。若效应细胞识别的只是移植物实质细胞上的、而非供体APC细胞上的抗原,则将导致T细胞无反应性,所以,供体APC细胞对于间接活化过程也是非常重要的。

间接辅助细胞与直接效应细胞之间的关系　受体APC细胞导致辅助性T细胞致敏,而供体APC细胞导致效应性T细胞致敏的推论预示着同种异体移植免疫学的特殊性,即表面表达两种不同MHC分子的不同种类的APC细胞均参与移植排斥过程。那么这种特殊性随即向人们提出移植免疫学的基本问题:是否不同T

1197

细胞亚群的致敏过程无需满足对同一 APC 细胞上不同表位识别的生理限制？而这种生理性限制的缺如有助于限制某一 T 细胞亚群对另一亚群致敏过程发挥辅助作用。关于此点，在本章移植排斥调节的相关内容中将做进一步的阐述。

受体 MHCⅠ类及Ⅱ类分子对供体抗原的呈递作用 作为基础免疫学的一般原则，我们知道外源性抗原肽通过 MHC Ⅱ类抗原呈递，而内源性抗原肽则通过 MHCⅠ类抗原。但间接激活途径的认识却向这一原则提出质疑[260, 261]。如果严格遵照上述原则，那么间接激活途径中供体抗原肽只能通过受体 MHCⅡ类抗原呈递，而通过 MHCⅠ类抗原呈递的供体肽只能经直接识别途径致敏受体 T 细胞。但是事实上，大量的实验已证实此原则的局限性，同时充分证实外源性同种异体抗原肽亦可通过受体 MHCⅠ类抗原呈递[262~264]。

Beven 指出，$CD8^+$ T 细胞的间接致敏过程在体内确实存在[75]。他采用具备 MHC A 型抗原以及次要抗原配型不合的移植供体，受体采用 MHC A×B 杂交的 F_1 代，结果发现，受体体内 $CD8^+$ T 细胞能同时识别 MHC A 型Ⅰ类抗原以及 MHC B 型Ⅰ类抗原所呈递的次要抗原并致敏。但是，所谓的间接激活过程，更常见的仍是 $CD4^+$ T 细胞作为辅助性 T 细胞的致敏机制，$CD8^+$ T 细胞的间接致敏并不十分重要。由于致敏 $CD8^+$ T 细胞只能对 $CD8^+$ T 细胞提供辅助作用，而通过间接途径致敏的 $CD8^+$ 效应细胞无法识别移植物上的 MHC 表位，所以 $CD8^+$ T 细胞的辅助效应似乎与移植排斥反应无关。但越来越多的实验却发现，事实上间接致敏的 $CD8^+$ T 细胞参与移植排斥反应。即使退一步讲，间接致敏 $CD8^+$ T 细胞也可通过分泌的细胞因子参与整个免疫应答的调节[265]。所以，明确间接致敏 $CD8^+$ T 细胞的作用仍是移植免疫学的一大难题。

间接效应机制 图 36.8 所示的经典模式图显示，效应性 T 细胞可与辅助性 T 细胞一样，通过直接激活途径而致敏。由于辅助性 T 细胞亦可通过间接激活途径而致敏，人们很自然地联想到效应性 T 细胞也可间接致敏。另外，辅助性 T 细胞所介导的炎性过程本身即可介导移植排斥，甚至无需效应性 T 细胞参与，这种效应亦称为移植排斥过程的间接效应机制。我们将在以下的内容中做详尽的阐述。

同种异体反应性途径：效应机制

虽然关于辅助性 T 细胞的功能存在许多相互矛盾的结论，关于细胞介导的移植排斥的效应机制也不甚清楚；并且过去只有迟发性超敏反应（DHT）体内实验已证实确能介导组织损害，因此多年来移植免疫学家认为 DHT 为排斥反应的效应机制。但随着 T 细胞细胞毒作用的阐明，并且人们认识到 T 细胞可介导一个对移植物有精确选择性的损伤机制。因此，移植免疫学家又提出 CTL 细胞是重要的效应细胞的推断。图 36.8 模式图所阐述的辅助性 T 细胞的途径或效应机制均过于简单。关于 T 细胞效应机制，突出的矛盾在于 T 细胞是否必需特异性识别供体组织抗原，或能通过间接效应机制识别经修饰改变的自身 MHC 抗原。在以下的讨论中，大量相关的实验结果相互矛盾，说明可能在不同的条件下，存在多种不同的效应机制。

效应机制的体外实验研究

如同对辅助功能的分析一样，人们应用各种不同的体外实验检测移植免疫中的 T 细胞效应功能。检测同种异体反应性 T 细胞效应功能的标准实验是细胞毒性 T 淋巴细胞（cytotoxic T-lymphocyte，CTL）或细胞介导的淋巴细胞溶解作用（cell-mediated lympholysis CML）分析，该实验检测的是 T 细胞对同种异体靶细胞的细胞毒作用。在体外以 MHC 组织配型不合的同种细胞刺激 5~7 天，即可获得同种异体反应性 CTL；而要获得针对自身 MHC 呈递的次要抗原的 CTL，则 T 细胞必须预先在体内致敏。实际上，体外检测到的细胞毒功能活性，由体系中辅助细胞功能活性和可反应的 CTL 前体细胞数量共同决定。因此，为了只体现细胞毒效应功能，检测时通常采用外源性辅助因子如 IL-2 提供额外的辅助作用。另外，通过有限稀释法可对细胞毒性 T 细胞的频率进行定量。

由于动物体内天然存在着可识别同种 MHC 抗原的同种异体反应性 T 细胞，那么标准的 CML 实验就无法判断所检测到的 CTL 是否的确是受体体内介导 MHC 不合的排斥反应的 CTL 细胞。所以，有必要改进此方法以适应体内进程的检测。例如，发生排斥反应的小鼠，其外周血 T 细胞无需体外致敏过程即可杀伤供体靶细胞。在一些改进的条件下检测反应性 T 细胞前体的频率，可以将初始型细胞毒性 T 细胞与近期活化 T

细胞区分开来[266]。但总的来说很难确切地检测体内预致敏的CTL细胞。另一方面,产生针对次要组织相容性抗原的细胞毒性T细胞必需体内的预致敏过程,因此,此时的CML可反映体内的效应细胞致敏情况。 *1198*

体外CML法仍不失为检测同种异体反应性细胞毒性T细胞功能的常用方法。大量实验结果总结见表36.5。与供体MHCⅠ类抗原反应的 $CD8^+$ 细胞毒性T细胞是体外检测中最常见的效应细胞类型,而通过体内预致敏,也可检测到与自身MHCⅠ类抗原呈递的供体同种异体抗原反应的 $CD8^+$ T细胞[267~269]。另外还可检测到识别同种异体MHCⅡ类分子的 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ 细胞毒性T细胞[211]。因此,对辅助性T细胞而言,它在体外可通过多种途径激活同种异体反应性T细胞。

细胞效应机制的体内实验

同种移植物排斥的选择性 体内移植物排斥反应效应机制的突出特点就是能选择性杀伤外源而非自身的组织。当自体皮与异体皮相邻移植时,排斥反应引起的炎症反应在两者之间存在明显的界限[270, 271]。这种选择性在下面的实验中得到更好的展示。融合分别来自两对双亲的胚胎细胞获得嵌合体,以此作为皮肤移植供体,那么移植物则是两种细胞的嵌合体,分别表达各自亲代MHC抗原的细胞散在分布于整个皮肤组织当中。当其移植至某一亲代体内后,首先发生波及整个组织的炎性反应,但当排斥反应消退后则发现,MHC与供体同源的细胞能够存活,而同种异体细胞则遭到排斥[272~274]。所以,即便是不同种类细胞紧密相邻,排斥反应也能选择性进行。

这些实验提示,移植物排斥反应对同种组织的破坏是以细胞为单位进行的。但这并不是惟一的解释。因为嵌合体移植物中同源细胞的存活,可能实际上反映了同源细胞形成小岛而其周围组织死亡。而且嵌合体皮肤移植后早期的排斥反应的确首先发生一个非特异性的炎症反应[274]。人们还进行了其他类似的实验,如将供体和受体的细胞混合后形成一个皮肤移植物进行移植,或从骨髓嵌合体的个体中取皮肤,此时皮肤中的APC已被供体骨髓取代[275]。当将这些移植物移植给同源受体时,这些来源于嵌合体的皮肤移植物代表了一种只有APC表达同种抗原的移植物。这些实验的结果显示,当APC是外源性的,则整个皮肤移植物均被排斥,当有大量的MHC配型不合或当受体预先被供体抗原致敏时,排斥反应更易发生。因此,移植物非选择性破坏也可以发生,特别是如果炎症反应足够剧烈时。

对浸润同种移植物细胞及移植免疫病理的分析 另一种研究移植物排斥反应效应机制的方法是通过免疫组化染色鉴定浸润移植物的细胞,这些研究中通常使用具有海绵状基质的移植物。结果显示许多类型的细胞参与介导移植物排斥反应,包括 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞、NK细胞、巨噬细胞[276~284],但是移植物中B细胞和某些T细胞亚群(包括L选择素细胞)罕见[285,286]。因此,招募细胞浸润移植物的过程一定存在着选择性。

移植物中浸润的T细胞数量与排斥反应发生的速度并不直接相关,但MHC全部或Ⅱ类分子配型不合的移植物通常可诱发大量密集的细胞浸润,而MHCⅠ类分子不合则通常只引起散在的细胞浸润。的确,只有MHCⅠ类分子不合的细胞浸润密度与MHC配型相同的移植细胞浸润程度无显著性差异[285],且浸润的细胞数小于移植物靶细胞数量。这一发现提示,移植物某些关键性因素如血管是移植物易遭到攻击的部位。的确,内皮炎的临床活动性是排斥反应的重要标志[287]。次要抗原不合的移植物中,浸润细胞数通常远远高于仅MHCⅠ类分子不合时,虽然后者发生的排斥反应速度更快[285]。除了细胞浸润的程度与活动性排斥反应强度无直接相关性以外,这些发现也提示这样一种可能性,即移植物中只有一小部分T细胞是真正能与同种异体抗原发生特异性反应的细胞。如果是这样,那么其他的浸润淋巴细胞所发挥的效应仍不清楚。

人们还通过体外扩增的方法进一步分析同种异体移植物中的T细胞[283, 288~295]。大多数这方面的报道均提示这些细胞是多克隆的,并且既有细胞毒性T细胞,也有IL-2产生细胞。它们可以是 $CD4^+$ 也可以是 $CD8^+$ 细胞[296, 297]。有一些报道则认为介导排斥反应发生的是有限克隆的T细胞应答[298]。总而言之,由于具有多种功能的多种细胞被鉴定参与同种移植物排斥反应,这种关于浸润细胞的表型和功能分析对于阐明移植物排斥反应的效应机制没有太大帮助。

除了对浸润T细胞的表型和功能进行分析,人们还检测了浸润淋巴细胞中的免疫活性蛋白产生情况,并对其与排斥发生的相关关系进行了研究[297~307]。例如,PCR显示肝移植物中高水平的IL-5 mRNA可提示临

床排斥反应发生，虽然这一细胞因子在排斥反应中的作用机制仍不清楚[308]。另外，穿孔素、颗粒酶和蛋白水解酶等参与细胞介导的细胞毒作用的分子与移植物排斥反应相关联[309~316]。

敲基因小鼠模型中进行的效应机制研究 至少可通过两种不同的策略利用敲基因小鼠模型研究移植排斥机制。首先，可通过部分 MHC 抗原缺失的敲基因小鼠作为移植供体，观察当这些受体效应性 T 细胞的识别表位缺失时，移植排斥反应是否发生。例如：以 MHCⅡ类基因敲除的小鼠作为皮肤移植供体，将其皮肤移植至 SCID 小鼠或裸鼠，再以 $CD4^+$ T 细胞重建其免疫系统，发现单独 $CD4^+$ T 细胞可介导Ⅱ类抗原缺如的移植物排斥反应。但若同时存在 $CD8^+$ T 细胞，则排斥反应发生时间提前[224]，说明此时 $CD4^+$ T 细胞间接识别机制所介导的排斥反应远不如直接识别供体抗原有效[317]。而探明间接识别机制效应程度的直接证据来自于以 MHC 抗原完全缺如的动物，如 MHCⅡ类基因和 β_2m 基因敲除小鼠为供体进行的实验[318]。但不幸的是，由于双基因敲除小鼠还有足够残留的Ⅰ类抗原表达，皮肤移植物的排斥反应仍可通过Ⅰ类抗原活化 $CD8^+$ 效应细胞介导。因此用这类实验动物的皮肤移植物不能满意地解答上述问题[227, 319]。但是，若换用胰腺移植，除非进行的是异种移植，同种异体排斥反应由于供体的 MHC 抗原缺乏而大大减弱[320~324]。所以，以上实验再次证实间接识别机制在对移植物的排斥攻击过程中作用不大，除非其导致的炎性反应极其强烈。

此外，还可利用基因工程技术改造受体小鼠，使其缺失表达某种与排斥反应相关的分子。其中很有意义的一个实验研究成果显示，即便 T 细胞细胞毒作用的关键分子如穿孔素或 Fas 配体表达缺如，各种类型的器官排斥反应仍可发生[325, 326]。因此，尽管上面提到表达穿孔素与临床排斥反应有相关性，但这些实验强烈地提示细胞毒作用不是移植排斥反应所必需的，也许 T 细胞的细胞毒作用只是移植物损伤的几种机制之一，或者在发生排斥反应的移植物中存在的细胞毒性 T 细胞只是致敏的效应性 T 细胞的一个标志，后者实际上利用另一种机制杀伤靶细胞。应用缺乏各种细胞因子的敲除基因小鼠作为受体进行的研究中，没有发现任何单一分子是移植物损伤机制所必需的[327~330]。

体内及体外实验相关性

另一种分析效应机制的方法是检测体内移植物排斥反应与体外细胞介导的细胞毒作用强度的相关性。如果两者显著相关，则支持 T 细胞介导的细胞毒效应机制存在；如果两者无相关性，提示可能存在其他机制。

在进行移植前选择性去除受体 T 细胞可验证这种相关性。皮肤移植中已发现，若供、受体只存在 MHC Ⅱ类抗原配型不合，单独 $CD4^+$ T 细胞即可介导排斥反应发生，而 $CD8^+$ T 细胞则否[41, 146, 147, 221]。这一结果与体外实验相吻合，即针对同种异体 MHCⅡ类抗原的细胞毒性 T 细胞前体既有 $CD4^+$ 也有 $CD8^+$ 细胞，但只有 $CD4^+$ T 细胞亚群能提供 MHCⅡ类抗原特异性 CTL 细胞增殖、分化所需的辅助作用。其他许多类似的体外实验也得出相同的结论。

这类实验中最具争议的是，已经去除了 $CD8^+$ T 细胞的受体常能对仅有 MHCⅠ类抗原配型不合的移植物发生排斥反应[41, 146, 147, 214, 221, 331]，但体外实验通常不能检测到针对同种异体 MHCⅠ类抗原的细胞毒性 $CD4^+$ T 细胞。所以，体外细胞毒作用反应强度与排斥反应程度之间是否一定存在某种相关性就不禁令人怀疑。但 Rosenberg 和 Singer 等人证明，尽管受体小鼠在移植前用抗体将 $CD8^+$ T 细胞清除，但体内仍可发现细胞毒性 T 细胞前体（似乎仍属 $CD8^+$ T 细胞系，但无 $CD8^+$ 分子表达）。但是其激活仍需体内预致敏及 $CD4^+$ T 细胞的辅助。这些研究者证明以抗 $CD8^+$ 抗体处理，移植后小鼠体内仍可有 $CD4^+$、$CD8^+$、$\alpha\beta^+$ 细胞毒性 T 细胞参与移植排斥反应[222, 332]，说明清除体内 $CD8^+$ 细胞并不能清除该系所有的细胞毒性 T 细胞。而 MHCⅠ类抗原不合的皮肤移植试验中，$CD4^+$ T 细胞可单独介导排斥反应，也从另一侧面反映体外 CTL 活性的高低并不一定代表体内排斥反应的强弱。但是针对上述 Rosenberg 及 Singer 的结论也存在不少争论。其他研究人员认为，他们所用的实验动物 H-2^{bm} 小鼠是野生型 H-2b 小鼠的突变株，两者 MHCⅠ类抗原差异非常有限。若供、受体之间 MHCⅠ类抗原存在更多更明显的不同，则可产生由 MHCⅡ类分子呈递的 MHCⅠ类抗原肽，从而激活 $CD4^+$ T 细胞的效应机制[333]。虽然此实验并不能为间接效应机制提供直接证据（因为供、受体 MHCⅡ类分子完全相同），但是这些实验结果提示体内移植反应与体外细胞毒作用并无完全的必然联系，因为即使在排斥反应发生后，体外也检测不到 $CD4^+$ 细胞毒性 T 细胞活性。

针对细胞毒性 T 细胞能导致移植排斥反应的假说，另一重要的质疑来自于次要组织相容性抗原不符条件下，移植排斥发生后的体外细胞毒作用的研究结果。因为针对次要抗原的 CTL 活性有赖于体内的预致敏过程，所以次要抗原所诱导的排斥反应的研究，能验证是否排斥反应的发生一定与形成 CTL 活性有关。在此有一个很好的实验模型。由于小鼠某些品系之间可仅存在单一次要抗原——H-Y 抗原的差别，并可因此而发生皮肤移植排斥反应。Simpson 实验小组的结果发现，移植排斥反应的发生并不一定总能在体外检测到明显的细胞毒活性。而另一些时候，有体外的 CTL 活性但并无体内移植物排斥反应[334~336]。显然，上述结果对移植排斥反应中的 CTL 细胞的作用提出了质疑，同时它们也是十分混乱不清的。

移植排斥效应机制的不确定性

现有的所有方法均不能为任何一个排斥反应效应机制提供明确的证据。尽管发现 CTL 细胞并不是惟一的效应细胞，但是至今也未能找到其他的效应机制，并且无法解答是否效应性 T 细胞必须通过对供体 MHC 抗原的直接识别而获得对移植物的选择性杀伤。如图 36.10 所示，移植排斥反应存在诸多效应机制，可以包括或不包括细胞毒作用，或可以通过对供体抗原的直接识别作用而实现，也可以一个间接效应机制介导[221, 281, 337~346]。相关的实验结果提示，间接效应机制介导的排斥反应强度往往弱于直接识别过程，除非间接效应机制所产生的非特异性炎性反应过于强烈。但是，现在下结论尚为时过早。

1200

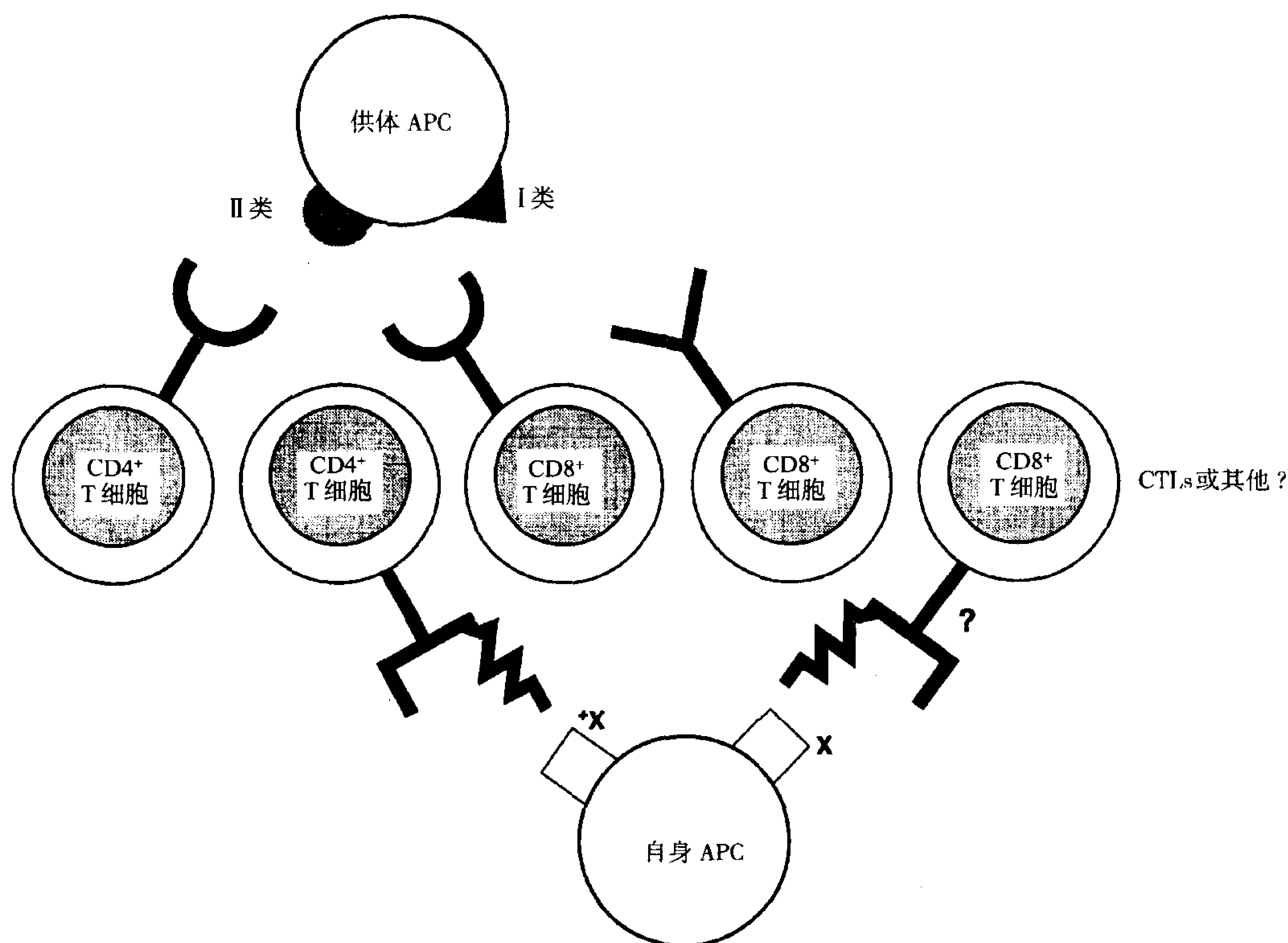


图 36.10　T 细胞效应途径的复杂模式。

T 细胞依赖的效应机制中的终末介质

不管移植排斥过程是否存在间接效应机制，细胞介导的排斥反应的终末介质绝不仅仅只有 T 细胞，还包括免疫系统由辅助性 T 细胞激活的其他组分。几种成分均可成为移植物损伤介导者。经典 DHT 反应由活化的巨噬细胞介导，后者由 Th 细胞分泌的 IFN-γ 活化。反过来，活化的巨噬细胞通过产生毒性分子，如一氧

化氮介导组织损伤[347]。虽然巨噬细胞效应缺乏选择性,但由于供体细胞,如胰岛细胞往往对某些炎性介质特别敏感,或者与活化细胞紧邻的供体血管尤其易遭受炎性反应的损伤,所以在一定程度上发生的仍是对供体的局限性组织损伤。细胞因子已公认参与移植排斥过程,但绝大多数实验表明其主要发挥辅助 T 细胞致敏的效应,少数细胞因子如 TNF-α 等对移植物有直接的毒性作用。

T 细胞和 B 细胞介导的慢性排斥反应

由于大多数移植排斥的实验研究均不采用免疫抑制方法,所以移植物的排斥损害反应也大多发生于术后的头几周内。但是在实际临床中,免疫抑制药物的运用常能有效地延长移植物的存活。但统计显示,即使术后已存活 1 年,移植器官仍以每年 3% ~ 5% 的速度逐步丧失功能,而且此现象主要由免疫机制介导。"慢性排斥反应"这一术语指的是较晚发生的移植物损伤。由于免疫抑制药物比以前能更有效地控制急性排斥反应,慢性排斥反应已逐渐成为临床中最重要的难题。图 36.11 的统计数字已显示,尽管过去 30 年中,肾移植术后 1 年的移植物存活率逐年上升,但肾的半衰期仍为 1 年这一状况并未显著改变[348]。由于存在这种持续性的功能丧失,只有 50% 的移植物在术后 10 年仍有功能。

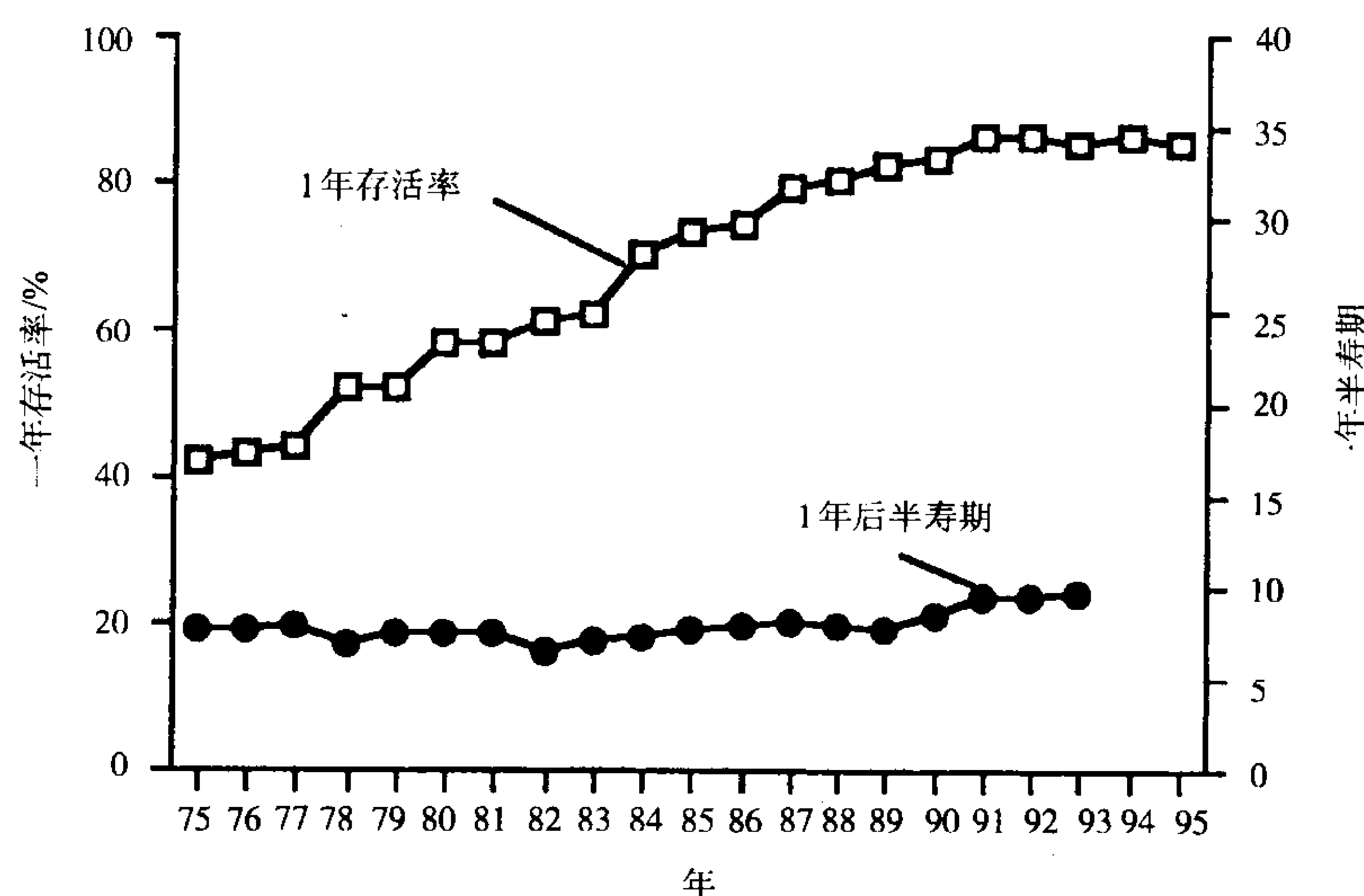


图 36.11　肾移植的移植物一年存活率及慢性半寿期。

1201　虽然几乎每种类型的器官移植物均有慢性排斥反应发生,但不同移植物的病理表现可不同。肾组织活检显示肾移植物的主要病变表现为间质纤维化和动脉狭窄、纤维样变。心脏移植物似乎主要表现为广泛的心肌增生、冠状动脉纤维化,这些病变通常导致加速的动脉粥样硬化。肺移植物中的慢性排斥反应主要影响细支气管,使之进行性狭窄,并导致细支气管炎性闭塞。肝是移植中慢性排斥反应发生率相对较低的器官,但胆道的进行性破坏并最终形成胆道闭锁综合征是肝慢性排斥反应的临床表现。

一些慢性移植物破坏的原因可能开始不是免疫性因素[349, 350],例如早期的血管损伤、移植组织功能下降(特别是肾移植中的超滤损伤)、移植器官的去神经支配、免疫抑制药物引起的高脂血症和高血压,免疫抑制药物自身毒性和慢性病毒损伤。但是虽然上述因素无疑参与介导了慢性排斥反应的发生,但在动物实验中,配型吻合的移植术后存活情况与配型不合者相比,存在显著差异。另外,肾移植受体的心脏并没有慢性排斥反应表现,反之亦然。因此,几乎可以肯定绝大多数慢性排斥反应中有重要的免疫成分参与。

对于慢性排斥反应的几个重要发现来自于临床实践的观察。首先,慢性排斥反应通常与抗供体抗体存在相关联。这一现象首先在肾移植中被观察到。人们发现晚期活组织标本中同种抗体的存在与肾动脉玻璃样变表现出高度的相关性[351]。其他器官也有这种相关性[352]。第二,与急性排斥反应相反,慢性排斥反应过

程在应用免疫抑制治疗时仍然很明显，而急性排斥反应通常有良好的治疗反应。第三，慢性排斥反应发生通常与早期急性排斥反应发作相关联[353]。综合这三项临床观察提示，一些慢性排斥反应是由慢性 B 细胞同种抗体介导的；而另一些人则认为慢性排斥反应发生需要供体抗原对受体的早期致敏过程。两种看法也许都对，但目前尚无理论或实验的证据完全支持这些结论。同种抗体的产生首先反映的是 T 细胞间接致敏。因此，除了作为慢性排斥反应的原因，同种抗体的产生也可作为其他排斥反应机制的良好的标志。此外，早期排斥反应发作可能初步反映了抗供体免疫应答的程度，而不是慢性排斥反应发生必需的前提。因此，即使应用充分的免疫抑制防止急性排斥反应发生，相当长的一段时间后，即使急性排斥反应从未发生，慢性排斥反应仍可能发生。最后，实验性研究也提示，慢性排斥反应并不绝对依赖抗体形成或急性排斥反应发生[354, 355]。

对临床数据的解释中出现的不确定性，使人们有必要建立探讨慢性排斥机制的实验模型，但是实验研究很难模拟应用免疫抑制药物状态下移植患者长达 5～10 年的病理过程。所以，实验研究只能选择能反映慢性排斥反应长期病理损害的早期病理改变，对之进行检测。例如，目前许多研究多是检测能反映患者常见的慢性血管损害的内膜增生性改变。在啮齿类动物或猪动物模型上进行的心脏移植研究中，常应用免疫抑制药物防止急性排斥反应后观察上述内膜增生性改变[354]。但是所有这些实验选择的代表性病理改变其发生远远早于临床慢性排斥反应的发生时间，所以不难看出，实验研究并不等同于临床实际过程。

实验模型中的慢性排斥反应的病理改变

1202

图 36.12 显示的是与慢性排斥相关的典型病理损害——血管腔明显狭窄[356]。这是由于内皮细胞及平滑肌细胞增生所致，并且伴随有间质的进行性损害，随着时间推移，细胞增生逐渐趋于静止，代之以纤维化过程，造成血管腔狭窄。免疫组化染色显示，病变早期几种黏附分子表达增高，同时可检测到几种细胞因子或其他介质水平增高[357～361]，包括酸性成纤维细胞生长因子[363]、胰岛素样生长因子[364]、内皮素[365, 366]以及一氧化氮合成酶[362]。

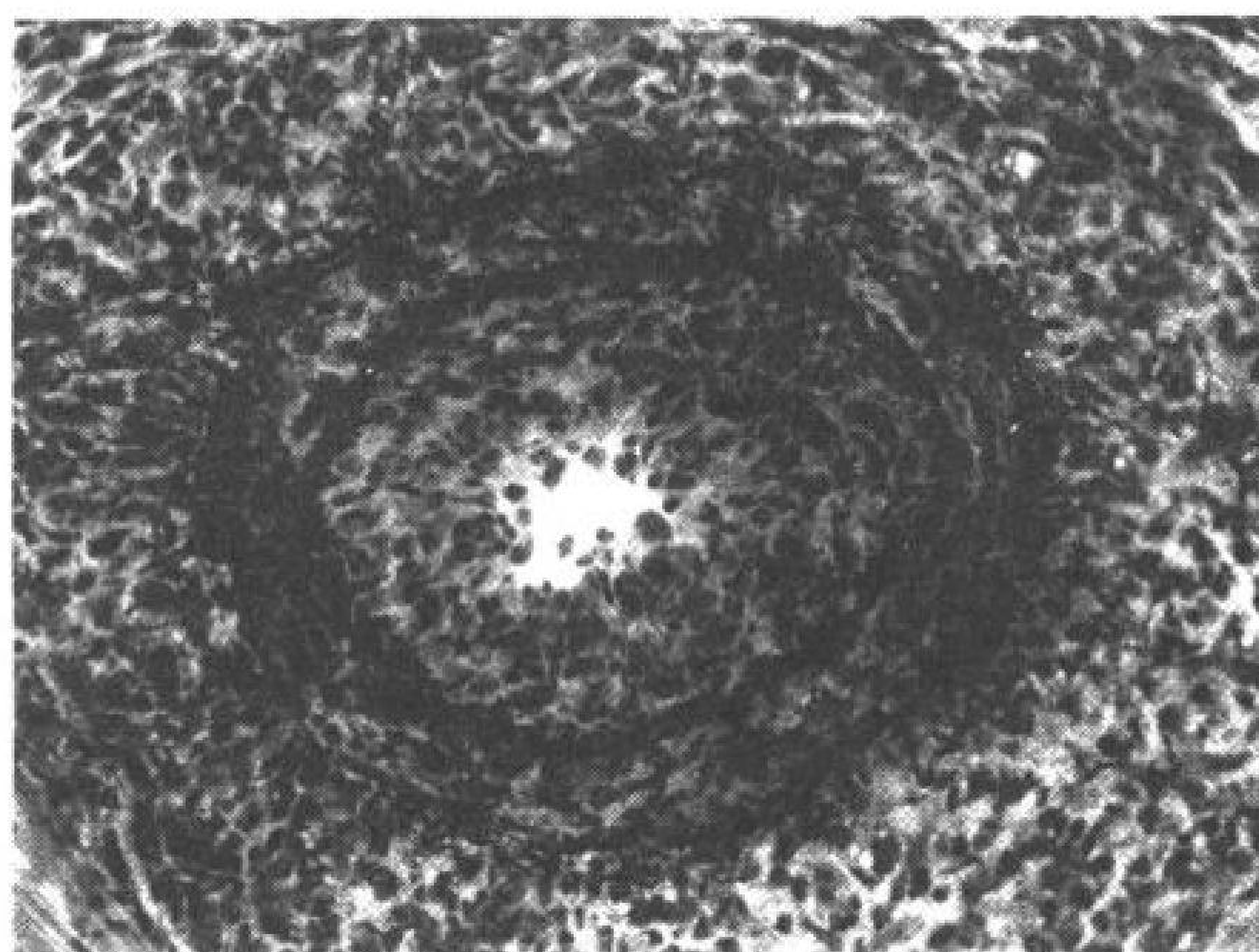


图 36.12　实验性慢性排斥反应模型中的中度动脉损伤（第 3 期），显示内膜中细胞增生显著，管腔狭窄，动脉外膜有明显的浸润并侵入中膜。B10.A 小鼠心脏移植给 B10.BR，术后 56、200 天弹性组织染色。经许可引自参考文献[354]。

慢性排斥反应的免疫机制

通过建立动物模型，并利用其他排斥反应机制研究中已建立的各种手段，同样可进行慢性排斥反应机制的研究。在猪体内进行的实验发现，MHC Ⅰ 类抗原配型不合较 MHC Ⅱ 类抗原更易引起血管的病理改变，说明 $CD8^+$ T 细胞在介导损伤中的突出作用[367]；而小鼠的研究却显示无论是 MHC Ⅰ 还是 MHC Ⅱ 类抗原配型不合均可导致慢性排斥反应[368]，而且虽然小鼠血管内皮细胞不表达 MHC Ⅱ 类分子，但 MHC Ⅱ 类抗原不吻合也能诱发血管内皮细胞增生的慢性排斥病理改变，提示不表达靶抗原的细胞也能发生显著的损伤[354]。同许多临床发现相一致的是，利用 SCID 小鼠模型，人们发现在去除 T 细胞状态下的抗同种异体抗原抗体能介导典型血管病理改变[369]。与之相矛盾的是，另有实验证实 T 细胞自己也能介导此过程，但对终末纤维化形成作用不大[355]。虽然不是所有的防止急性排斥反应发生的方法均能有效抑制慢性排斥反应，但供体特异性免疫耐受的形成有助于防止慢性排斥中的血管病理改变。

从上述研究中很难明确慢性排斥反应的某一机制，也许存在多种免疫应答途径，或者存在某种器官特异性。其中，大多数研究多集中于血管改变，但针对肺或肝组织，慢性排斥损害则多发生于支气管或胆小管的

改变。假设直接激活途径可渐渐消失的前提成立，由于供体 APC 细胞逐渐为受体 APC 取代，那么慢性排斥反应的主要效应应通过间接激活途径实现，但是对此推论至今仍缺乏足够的证据。

移植排斥反应的生理调节机制

以下的内容将介绍供体抗原与受体免疫系统之间如何通过其相互作用而介导移植物排斥，并着重介绍控制此过程的调节因子。由于补体及内皮细胞活化的调节机制在排斥反应的体液免疫机制章节中已作阐述，此节重点介绍 T 细胞应答的调节过程。我们按 T 细胞致敏、辅助性 T 细胞与效应性 T 细胞的相互作用、效应反应的顺序逐一阐述。

致敏阶段的调节

组织损伤及炎性信号

尽管静止的树突细胞也可激活 T 细胞，但多数 APC 细胞仍需活化才能实现抗原呈递作用。鉴于此，以及黏附分子的表达改变与细胞募集的事实存在，T 细胞致敏过程的重要因素应包括炎性细胞因子，如 IFN-γ(可激活巨噬细胞)[370]。任何来源的组织损伤均可促进细胞因子的合成分泌，包括移植物的缺血及水肿等病理损伤，从一个侧面也说明为什么组织损伤多早于慢性排斥反应的发生[371]。此外，发生在移植器官或身体其他部位的晚期非免疫性炎症，可以触发晚期排斥反应。另一方面，将非特异性的危险信号作为主要控制目标以控制排斥反应是行不通的。例如，在免疫重建之前植入受体中的皮肤移植物能够长期存活，但免疫重建后，排斥反应仍可发生。相类似的，在临床上即使移植器官已存活多年，仍不能停止免疫抑制治疗。因此，最好能将组织抗原不合与受体免疫抑制作为控制排斥针对的主要环节，而危险信号可以影响免疫应答的时间、强度和特性。

1203

参与 T 细胞活化的共刺激信号

APC 的特殊性不仅在于它们能将外源性抗原呈递到细胞表面，它们还能为 T 细胞活化提供额外的信号。这些参与 T 细胞活化的第二类成分常被称为第二信号，虽然它可能包含了几种不同的成分[372~375]。第二信号的成分包括 APC 分泌的淋巴因子，如 IL-1，以及 T 细胞表面辅助分子与 APC 表面相应配基结合后介导的信号转导。这包括 CD4 或 CD8 与 MHC 抗原非多态性位点的相互作用，LFA1 与 ICAM1、2 或 3，CD2 与 LFA3 (CD48)，CD40 与 CD40 配体，CD28 与 B7.1、B7.2 以及 4-1BB 功能。另外，T 细胞分泌的淋巴因子如 IL-2 可以进一步以自分泌或旁分泌的方式提供第二信号[376~378]。

第二信号的一个重要特征是当它们中部分或全部成分缺如时，刺激 T 细胞的抗原受体可使细胞失能(在下面耐受诱导部分中进行讨论)。因为移植器官的许多细胞不是 APC，移植器官可以诱导这种失能产生。这一过程与 APC 刺激的活化事件相竞争，移植早期 APC 活化在竞争中占上风，因为通常患者出现排斥。但在移植后数月或数年，当供体 APC 逐渐为受体 APC 所替代，活化与失能将趋于平衡。

T 细胞活化的向下调节信号

近年来，人们越来越关注 T 细胞介导的细胞免疫应答过程的下调因素，如 CTLA-4 的配对结合以及 Fas-FasL 的相互作用[379~381]。已有证据显示，供体组织中某些甚至全体细胞的 FasL 高表达有助于防止排斥反应的发生[382]；而某些免疫隔离部位，如精子及眼角膜之所以无免疫排斥，也部分地与 FasL 相关[382]。以上发现提示，利用这些分子机制可以探索新的防止免疫排斥反应的方法。但是，依据我们现今对抑制因素的粗浅了解，还不能设计出真正有效的策略。例如，胰岛细胞的 FasL 的高表达不仅不能阻止排斥反应发生，反而增高了排斥反应发生的易感性，而 CD28 基因敲除小鼠仍可导致同种异体移植反应[383]。所以，只有进一步深入

探讨调控免疫应答的下调机制，才能真正获得防止排斥反应发生的新方法。

调节性细胞因子

许多细胞因子均参与移植排斥，但是至今任何单一细胞因子或细胞因子受体的基因敲除小鼠均未显示能明显地抵抗排斥发生，所以，尚不能精确地阐明某一特定细胞因子的调节作用。即便是具有辅助效应性 T 细胞作用的重要细胞因子 IL-2，现已发现其作用仍可为其他细胞因子所代替[377]。IFN-γ 也因为能活化其他细胞及上调细胞表面，尤其是供体血管内皮细胞表面的抗原表达，一直被视为移植排斥过程中的重要因子[384]，但 IFN-γ 基因敲除小鼠仍可迅速发生排斥反应[385, 386]。关于抗炎性反应细胞因子的作用，也有相互矛盾的实验结果。一方面，有证据显示 IL-10 或 TGF-β 能抑制移植物的损伤过程，而促炎因子 TNF-α 被认为可增强此过程[387~389]。但另一方面，IL-10 又被发现能促进细胞毒作用介导的胰岛排斥[390]。此外，耐受诱导研究发现，在某些情况下，Th1 和 Th2 细胞因子平衡被打破是决定移植物排斥或耐受的重要因素[391]，但以 Th1 和 Th2 反应介导的不同后果还远未清楚[392~397]。综上所述，细胞因子无疑在排斥反应的发生及调节中均发挥了巨大的作用，但具体的机制仍模糊不清。

移植器官的调节作用

虽然大多数类型的器官移植过程中发生急性排斥反应，但仍有少数例外。例如，小鼠肝移植及肾移植中，在 MHC 配型不合条件下应用免疫抑制药物，移植器官仍可存活相当长时间[398~400]，同样，小鼠心脏移植也只需要短时间使用免疫抑制药物即可延长移植心脏存活[401]。进一步在动物实验中发现，第一次移植的器官长时间存活，便可消除或防止第二次相同供、受体之间的皮肤移植排斥反应[402, 403]，而在首次接受的个体中则很快发生排斥[398, 404]。临床研究也发现，移植器官的长期存活也可消除排斥反应，因为在移植晚期可以大幅度减少免疫抑制药物的使用。所以很明显，移植器官的存活本身就是调节排斥反应的重要因素，它可抑制特异性抗供体免疫应答。

正如前面所讨论的，供体移植物 APC 被置换也可能是诱导 T 细胞失能的机制之一。但是，也可能这种移植晚期的下调信号是由同种移植物介导的，或者存活移植器官使细胞因子谱的改变导致排斥反应下调。关于移植器官存活的调节，有两大问题需着重强调：第一，此作用的存在使一些检验耐受诱导策略的实验结果变得难于解释。例如，经常有报道称，在鼠的心脏移植中给予某一特定形式的免疫抑制可以诱导耐受。虽然这一结果可能是准确的，但认为该种形式的免疫抑制可以诱导耐受的结论并不确切，因为移植心脏的长期存活可能比免疫抑制更可能介导耐受形成。在去除移植器官的条件下检测耐受是否存在，或以供体其他形式的抗原与受体相作用，检测特定形式的免疫抑制诱导耐受形成情况可进一步明确这一问题。第二，临床上为了获得良好的移植存活而采用标准形式的免疫抑制，可以抑制长期存活移植物的下调移植排斥作用。理解这一点很重要[405]。这一现象产生的原因可能是许多常规的免疫抑制药物抑制 T 细胞信号，从而也抑制了诱导耐受的过程。换言之，如果 T 细胞从未对它们遇到的供体抗原发生反应，它们就不能产生供体特异性机制抑制移植物排斥。

1204

辅助细胞与效应细胞的相互作用

APC 是辅助细胞与效应细胞相互作用的交叉点，并因此在免疫应答中发挥调节作用。

辅助细胞与效应细胞相互作用的 4 个三细胞模型

基础免疫学的一个重要原则是细胞-细胞相互作用产生免疫应答通常需要参加反应的细胞紧密接触。Mitchison 在 T 细胞协同产生抗体的研究中证明了这一原则。他发现，T 细胞、B 细胞、APC 受刺激后，必须形成三细胞聚合体，以获得辅助 T 细胞和效应 B 细胞之间有效的协同[406]。这样的发现使我们形成了这样的概念，即发挥辅助作用的淋巴因子像神经递质一样发挥功能，似乎只作用于两个空间位置上紧邻的细胞，而不

像激素一样可作用于远距离细胞[407~409]。

除了 Mitchison,其他研究人员的结果提示,三细胞成簇模型在移植排斥中的辅助性 T 细胞、效应性 T 细胞和 APC 的相互作用中也适用[146, 215, 410, 411]。例如,Ⅰ类抗原突变的小鼠(bm7)的尾部皮肤移植给 B6 受体后不被排斥,可能因为缺乏辅助刺激;另一方面,来源于 F_1 小鼠(bm12、bm7)的移植物有一个额外的Ⅱ类抗原不合,可以被排斥。移植在 B6 小鼠一侧的 bm12 移植物虽然自己被排斥,但不能诱导同一个个体另一侧的 bm7 移植物发生排斥。与之相反,(bm12、bm7)F_1 移植物可以诱导对侧 bm7 移植物发生排斥。这一结果提示,介导 bm12 移植物排斥的辅助因子不能在远距离发挥功能,辅助针对 bm7 的效应细胞,而 bm12 和 bm7 抗原共同表达在移植物和 APC 上,产生的效应细胞可以在身体的其他部位发挥功能。如图 36.13 所示,似乎辅助细胞和刺激性 APC 必须聚集在一起形成三细胞成簇后,才能产生针对移植物排斥的有效的辅助[150, 412]。这一三细胞模型为调节辅助提供了一个机制。在身体其他部位发生的应答,如被环境病原菌所诱导的免疫应答,不会触发对供体的免疫反应。

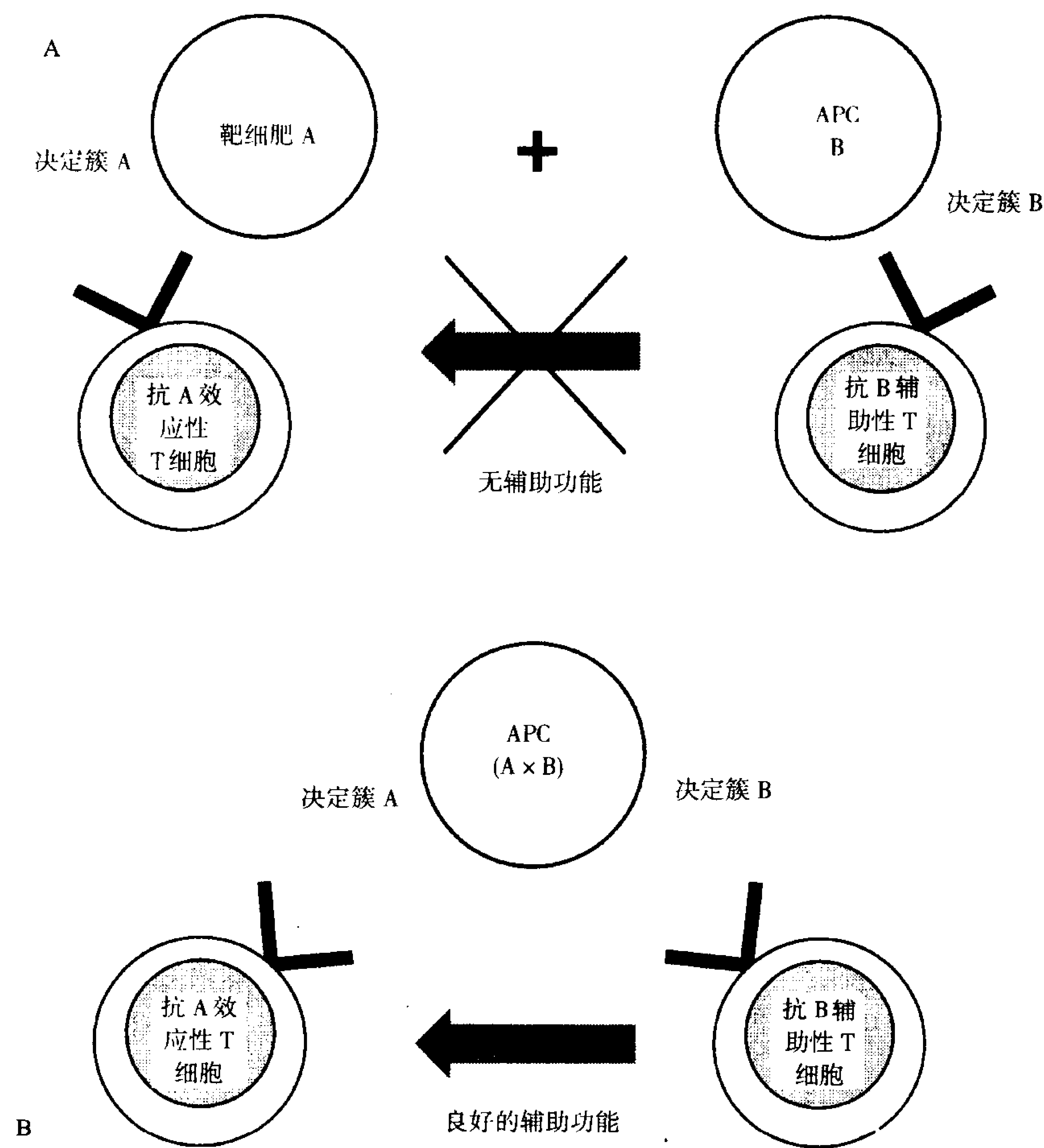


图 36.13　细胞致敏的三细胞成簇模型。A:两类 APC 在体内不能刺激针对相互决定簇的辅助效应;B:一类 APC 能刺激针对表达在同一 APC 上不同抗原决定簇的辅助效应。

T 细胞辅助 B 细胞产生同种抗体

T 细胞辅助 B 细胞产生同种抗体是几种不同类型细胞相互作用产生免疫应答的一个例子。虽然通常认为 B 细胞产生的针对蛋白抗原(通常为 MHC)的抗体最初是 IgM,以一个不依赖 T 细胞的过程,后来转变为 IgG 抗体 T 细胞辅助。但对皮肤的排斥中同种抗体产生的研究显示,最初 IgM 应答也需 $CD4^+$ T 细胞辅

助[149]。但 CD4⁺ T 细胞可以通过两条途径辅助同种反应性 B 细胞[413]。首先,如图 36.14 所示,受体 CD4⁺ T 细胞可以直接识别供体Ⅱ类抗原,而受体 B 细胞识别供体 MHCⅠ类抗原。另外,受体 CD4⁺ T 细胞可以通过间接途径识别受体 APC 呈递的供体肽,然后为直接识别供体抗原的 B 细胞提供辅助。在第一种情况下,T、B 细胞有很近的接触,但在第二种情况下,通过识别 B 细胞Ⅱ类抗原呈递的供体肽,T 细胞和 B 细胞将发生更紧密的接触。人们应用 MHCⅡ类抗原基因敲除小鼠作为供体或受体,检测同种抗体的产生情况以验证上面的两种可能性[414]。结果提示,CD4⁺ T 细胞可为 B 细胞提供两个层次的辅助:第一,T 细胞可以通过与 B 细胞发生直接的物理接触,而辅助 B 细胞 IgM 的产生。第二,T 细胞的间接致敏可辅助 B 细胞产生 IgM,并发生型别转换,产生 IgG。除了间接途径致敏辅助性 T 细胞的重要性,这些结果也提示型别转换、产生 IgG 同种抗体可以作为是否发生 CD4⁺ T 细胞间接致敏的标志[415~417]。

四细胞聚合物能否活化效应性 T 细胞?

很容易勾画供体 APC 通过直接呈递刺激 T 细胞应答,在 T 细胞介导的排斥反应中作为三细胞相互作用的交叉点。因为供体 APC 同时表达辅助性决定簇和效应性决定簇,能够将两种 T 细胞亚群桥连在一起。另一方面,辅助细胞通过间接途径致敏时,受体 APC 无需表达供体 MHC 抗原,因此它并无与移植物相同的效应性决定簇。因此,如果通过间接途径辅助产生能直接识别供体抗原的效应细胞,受体 APC 刺激活化的 CD4⁺ T 细胞必须为供体 APC 致敏的 CD8⁺ T 细胞提供辅助。三细胞模型没有包括这种辅助细胞-效应细胞相互作用的机制。然而研究显示,来源于移植物的 APC 不能与另一移植物的 APC 共同工作,但供体 APC 和受体 APC 能够与辅助细胞和效应细胞聚集,产生一个四细胞成簇而触发排斥反应[227~418]。

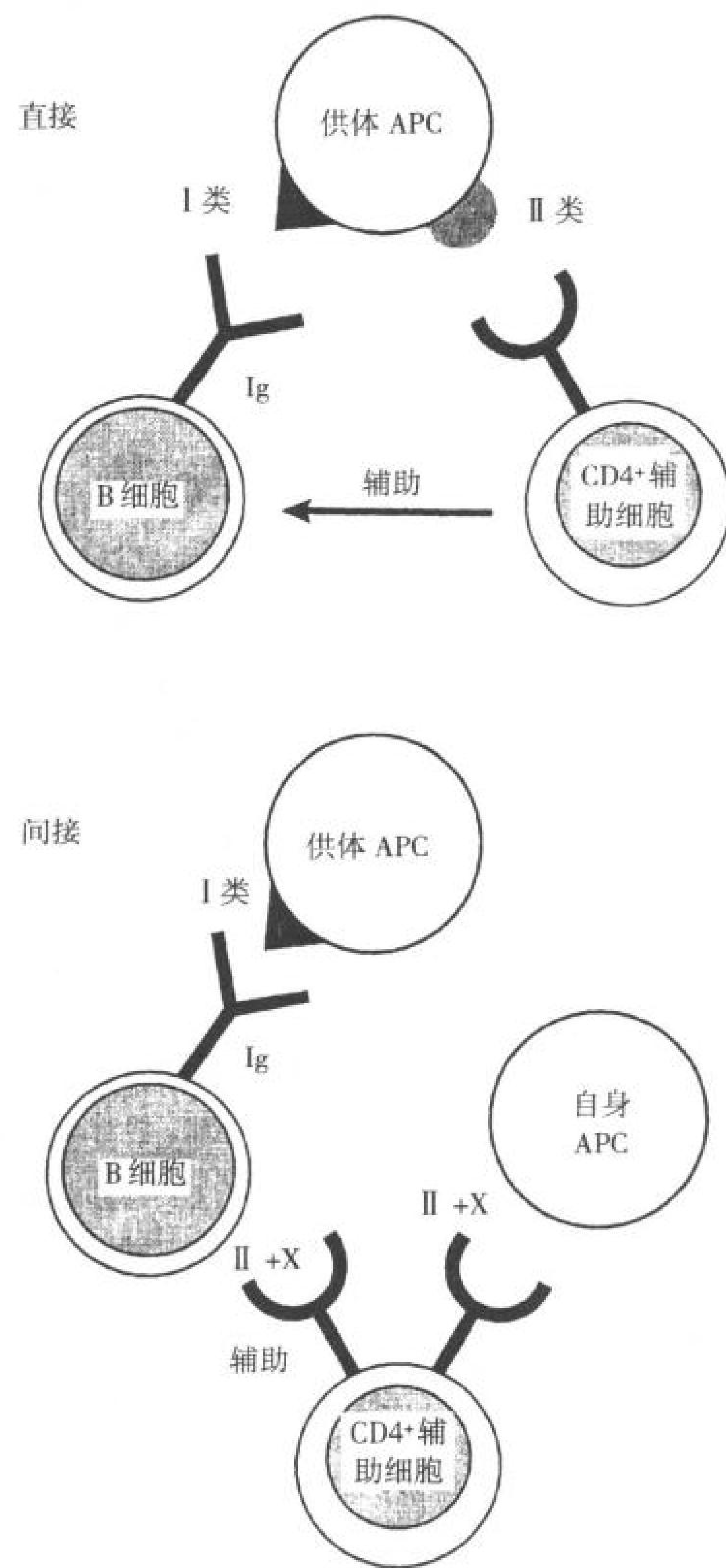


图 36.14 T 细胞辅助 B 细胞产生同种抗体。

1205

效应性细胞的调节

在移植物排斥中第三个层次的调节性相互作用是效应细胞在被供体抗原致敏后,其效应可被活化的辅助细胞增强。一旦活化,效应细胞可以在受体体内遇到受体抗原的任何地方发挥效应。这与辅助效应的局限性不同[112, 419~422]。但是,效应 T 细胞的功能受效应细胞迁移和当效应细胞与靶细胞相互作用时辅助分子的调节。

黏附分子调节效应细胞的迁移

通过黏附分子调节淋巴细胞迁移是基础免疫学正在认识的一个领域(第 14 章)。这一调节的关键性特征之一是,初始 T 细胞被滞留在淋巴组织中而只有活化或记忆性 T 细胞可以在外周组织中循环。这一模式由初始 T 细胞上表达的 L 选择素和其他黏附分子控制[423]。活化细胞上这些分子表达缺如,故被释放到外周组织中[138]。

除了允许活化细胞迁移出淋巴组织,黏附分子还控制细胞进入外周组织,炎症状态下血管内皮细胞表面

表达 ICAM1、ELAM、VCAM1 以及其他一些黏附分子，从而改变淋巴细胞的迁移规律[424~427]。因为这些分子可以介导淋巴细胞、多形核白细胞及巨噬细胞穿过血管壁，进入炎症部位。内皮细胞表面这些分子的表达受多种细胞因子和其他介质的调节[308, 424, 425, 428]。

移植排斥中的细胞浸润是一种特殊类型的炎症。人们研究了与同系移植物(syngeneic grafts)相比，同种移植物独有的排斥反应特征[429]。在移植后数天内，两种移植物均有细胞浸润发生，并且两种移植物的内皮细胞均表达 ICAM 和 ELAM。但大约在移植后第 4 天，同种移植物开始表达 VCAM，并出现 IL-2、IL-4、IFN-γ，而同系移植物则否[430]。进一步研究这些反应可能对阐明排斥反应中效应细胞功能的调节因素有帮助。

靶细胞辅助分子与效应细胞功能

除了改变细胞迁移，细胞表面分子对控制效应细胞与靶细胞相互作用有重要的调控作用。T 细胞抗原受体和 CD3 蛋白是这一相互作用中的中心事件，CD4 和 CD8 共受体与 MHC 抗原非多态性位点结合，在相互作用中也十分重要[431]。此外重要的分子间相互作用还包括 ICAM1 和 LFA1[432]。当然相同的分子间相互作用也在 T 细胞早期致敏阶段发挥作用，但它们在效应阶段的作用提示，干扰这些分子间相互作用可能可以改变移植排斥反应，即使在 T 细胞活化以后[433, 434]。

移植排斥反应的防治措施

移植免疫学的重要性最终体现在其原理如何应用于临床移植过程中，所以，最重要的一点是确立什么样的调节成分或调节机制可导致移植物的存活。一种是通过非特异的免疫抑制方法，降低宿主对所有外来抗原的免疫应答能力；而另一种则是寻找降低针对特定供体抗原的免疫应答能力方法，达到免疫耐受的目的，从而获得针对供体的特异性无应答状态。

非特异性方法

常规药物

在此讨论常用于临床移植中的非特异性免疫抑制药物的药理作用，其实已超出本章的讨论内容。但我们必须清楚地认识到，临床移植正因为这些药物的发现及应用才得以获得巨大的进展。大多数接受同种异体移植的患者均使用了此类免疫抑制药物，如类固醇、硫唑嘌呤、霉酚盐(mycophenolate)、环孢素及 FK-506。总的来说，一般临床或实验用免疫抑制药物的作用机制，包括抑制淋巴细胞基因转录(如环孢素，FK-506)，抑制细胞因子信号传导(雷帕霉素；雷抑素)、抑制核酸合成(硫唑嘌呤；mycophenolate mofetil)或细胞分化(15-脱氧精胍菌素)。

其中，皮质类固醇具有多种药理作用，包括抑制 T 细胞增殖、细胞因子基因转录[435]，而硫唑嘌呤是 6-巯基嘌呤类似物，可通过抑制嘌呤代谢，从而阻止细胞分化。mycoplenolate mofetil 则类似硫唑嘌呤，可抑制嘌呤的合成。上述药物的作用一般仅限于控制淋巴细胞增殖的某些酶学途径，理论上讲，不影响其他造血干细胞的正常发育，但是随机双盲实验研究发现，在同种异体肾移植患者中使用霉酚盐或硫唑嘌呤均存在明显的不良反应，如白细胞减少等。同时，霉酚盐虽能明显抑制排斥反应的发生，但早期移植物的存活率并未因此增高[436, 437]。环孢素因其阻断 T 细胞 IL-2 的产生而抑制 T 细胞致敏[438~440]，从而在心或肝的移植中发挥重要的作用，并已成为许多免疫抑制药物的核心成分。环孢素与其胞质受体环孢素 A 受体结合形成复合物，该复合物能结合并阻断钙调磷酸酶活性，而后者是 IL-2 基因转录活化所需的胞浆信号转导蛋白。FK-506 是一种大环内酯类化合物，可与胞膜上的跨膜蛋白 FK-506 结合蛋白(FK-506 Binding Protein，FKBP)家族中某一蛋白结合，所形成的 FK-506-FKBP12 复合体则能与钙调磷酸酶结合并使之失活，从而达到与环孢素相同的药理作用[441]。

除上述应用于临床移植过程的常用药物外，尚有其他一些药物也在被应用。环磷酰胺与硫唑嘌呤作用

相同，有时为减轻硫唑嘌呤的不良反应及控制 B 细胞免疫应答，可将之作为硫唑嘌呤的替代品。前列腺素 E 也已在实验中被证实具有免疫抑制效应，并且与其他药物相比，某些毒性作用相对较弱。另外，放线菌素 D 也因可抑制骨髓功能，偶尔应用于临床过程。

实验性药物

可以肯定地说，常用药物的名单在不久的将来会因如今称为实验性药物的加入而重新修订。雷帕霉素是一种类似于 FK-506 的大环三烯抗菌素[442]，尽管如 FK-506 一样，能与 FKBP12 结合，但 FKBP12-雷帕霉素复合体不能抑制钙调磷酸酶活性，却作用于完全不同的另一靶蛋白，并通过抑制 IL-2 的信号传导而非 IL-2 的合成，从而抑制 T 细胞的增殖。动物实验已证实雷帕霉素尽管存在明显的毒性作用，但具有很强的免疫抑制效应。雷帕霉素现在处于临床前研究阶段。15-脱氧精胍菌素则是另一类完全不同的药物，它对 IL-2 的合成与活性无影响[443]，它能阻断激活的 T、B 淋巴细胞向效应细胞的转化过程，此药物也正处于临床前研究阶段以评价其防止高敏患者排斥反应发生及预防能力。霉抑素(leflunomicle)是一种具有双效的药物前体，可转化为活化药物成分 A771726，动物实验已证实后者可治疗急性或慢性排斥反应，它既能抑制嘧啶二氮三烯陆环(pyrimiclie)的离体合成，又能抑制与细胞因子受体相关的酪氨酸蛋白激酶活性，两方面均可抑制淋巴细胞的增殖[435]。霉抑素因其可抑制平滑肌细胞增殖，故能抑制移植物的血管病变，它不仅能延长同种异体或异种移植物的存活，同时发现可抑制抗供体抗体的产生[445, 446]。

抗 T 细胞抗体

另一种已运用于临床的非特异性免疫抑制治疗方法则是应用抗受体 T 细胞的抗体。一般可通过针对受体种属的 T 细胞或胸腺细胞制备异源抗血清，从而获得抗 T 细胞抗体[446, 447]，但此种有效的免疫抑制手段一般仍仅限于治疗排斥反应，它们主要的不良反应包括血清病及感染。近来一种鼠源性抗人 CD3 的单克隆抗体 OKT3，已广泛运用于临床移植中[148]。同多克隆血清一样，OKT3 具有很强的抑制排斥反应发生的能力。许多医疗中心在移植术后 1～2 周应用之，以防止移植排斥的发生。其他一些抗 T 细胞抗体也已应用于临床，如 CAMPATh1、T12、CBL1 及 BT1-322 等，但均无 OKT3 作用显著。

大量实验包括一些临床研究，旨在探讨选择性作用于 T 细胞某些亚群的单克隆抗体[448～451]，而此种亚群特异性抗体，如抗 $CD4^+$ 或抗 $CD8^+$ 抗体的动物实验的研究，虽有助于我们弄清楚同种异体排斥反应的具体途径，但并不等同于我们就因此了解在临床应用中究竟哪种抗体的应用更有效。抗 IL-2 受体 α 链(CD25)的单克隆抗体已证实比抗 T 细胞抗体具有更高的抗原特异性[452～456]，因为 CD25 仅短暂表达于活化的 T 细胞表面，所以抗 CD25 抗体能选择性地清除经同种异体抗原激活的 T 细胞。尽管临床应用中啮齿类抗 CD25 单抗的效果不尽如人意，但最近人源化抗 CD25 抗体的研究已获得了较大的改进[457]。

此外，单克隆抗体同样应用于阻断排斥反应的效应阶段。抗 ICAM 单抗及抗 TNF 单抗在猴子试验中已证实能在效应阶段发挥免疫抑制作用[434]。另外，经动物实验证实，抑制 T 细胞共刺激效应，如抗 CD28、CD40L 及 CD2 的单抗也具有抑制排斥反应的作用，尤其是联合应用作用更显著[458～460]。相信在不久的将来，上述单抗均将进行临床前的进一步验证。

尽管单克隆抗体治疗已显示出显著的疗效[461, 462]，但仍存在一些问题：第一，OKT3 单抗与 CD3 的相互作用，本身即能在清除 T 细胞之前激活 T 细胞[463]，从而释放包括 TNF-α 在内的细胞因子，引起一系列的临床症状，如发热、寒战、肺水肿等。当然，这些不良反应通常能有效控制且较少致命。第二，OKT3 和其他许多单抗均为鼠源性蛋白，当注射进入人体，人体则可针对其恒定区和独特型决定簇产生相应的单克隆抗体，不仅能阻碍上述单抗发挥作用，同时能阻碍其他种属特异性单抗的作用，但通常应用高剂量的抗体治疗可对抗受体的相应抗体应答。第三，单抗治疗并不能时时有效地清除靶细胞。例如，OKT3 的应用中发现，表达 $CD4^+$ 且 $CD8^+$，但不表达 $CD3^+$ 的 T 细胞则能幸免重回血循环，这种现象也就是所说的靶抗原的调理作用[464]。对于 OKT3，CD3 分子的缺失可导致 T 细胞免疫失能，但其他膜表面分子的缺失却不一定造成免疫抑制。最后，

OKT3 可造成广泛的、非特异性免疫抑制,使患者处于免疫低下状态。虽然 OKT3 不会造成机体外来抗原的永久性免疫无应答,但同时也不能使机体获得对移植物抗原的永久性耐受。

1208 应用单抗治疗的另一显著问题在于其恒定区具有抗原性,去除 Fc 段的 F(ab)'2 片段不仅能有效抑制 T 细胞活化,同时能明显减弱 Fc 激发的抗抗体反应[465]。人们正着力研制更为理想的治疗性抗体,其中一种方案即研制构建鼠与人 Fc 段相连的嵌合鼠源性抗体,或将鼠源性超变区 CDR3 片段移入人源性抗体,也可通过相同的方法将其他种属来源的抗体人源化。而另一方案则是制备免疫毒素,即将某些毒素,如白喉毒素或蓖麻毒素与抗体偶联[466,467]。

供体特异性移植耐受的诱导

免疫耐受形成的必要性

移植免疫学中的特异性免疫抑制是指,针对同种异体或异种供体抗原而非其他抗原的特异性免疫抑制,这种特异性免疫无应答状态最终即是免疫耐受状态,即无需其他辅助治疗的、永久性的供体特异性无应答状态。为什么说移植耐受一直是 40 年来移植免疫研究的最终目标呢? 第一,尽管免疫抑制剂的应用戏剧性地大大推进了临床器官移植的应用,但伴随这些药物的是感染及肿瘤易感性的增高;若能获得免疫耐受,则无需长期的药物治疗。第二,尽管免疫抑制获得很大进展,慢性排斥仍是不可避免的问题,长时间同种异体器官移植存活率并不高。第三,由于同种异体器官的日益短缺,异种器官移植正日益受到人们的重视,但是,异种移植比同种异体移植能激发更强烈的免疫应答[468],所以,只有诱发 T、B 细胞的免疫耐受才能最终获得异种移植成功。

中枢及外周免疫耐受

本书的其他章节已介绍了免疫系统获得对自身抗原免疫耐受的机制(第 20 章)。由于胸腺是 T 细胞发育的中枢器官,所以诱导发育中的 T 细胞的免疫耐受则称为"中枢性"耐受;相对的,外周性免疫耐受即指发育成熟的 T 细胞在外周组织中遭遇抗原时所诱发的耐受状态。

B 细胞在骨髓发育阶段中也可通过一系列机制而获得免疫耐受,但是"中枢性免疫耐受"在本文中一般不指 B 细胞。因为作为哺乳动物 B 细胞发育的场所,骨髓并不仅仅专有此功能。

移植耐受机制

已知诱导 T、B 细胞耐受的机制包括免疫清除、免疫无反应性及免疫抑制,另外,移植物还可被受体淋巴细胞忽视。下面将简要介绍上述机制并讨论依据上述机制而可能获得的免疫耐受策略。

克隆清除

最近的研究表明,自身耐受形成的主要机制在于 T、B 细胞发育过程中对自身抗原特异性淋巴细胞的清除。

Ig 受体转基因小鼠的研究显示,B 细胞可在发育过程中的某些特定阶段通过识别膜结合抗原而得以清除[469]。表达于对放射线不敏感的体细胞或小部分造血细胞上的抗原,均可有效地介导抗原特异性 B 细胞清除[470];其中,B1 细胞亚群作为异种移植超急性排斥反应天然抗体的主要产生细胞,可通过膜表面 Ig 与细胞表面抗原的交联,以凋亡的方式获得克隆清除[471]。

自身反应性 T 细胞克隆的清除,则取决于不成熟胸腺内淋巴细胞与胸腺内 APC 细胞相互作用的亲合力是否足以诱导细胞凋亡[472,473]。高亲合力主要或至少部分取决于重排后的 TCR 与自身抗原肽-MHC 复合物之间相互作用的亲和力。一些骨髓源性细胞,包括树突细胞[474]、B 细胞[475]、胸腺细胞[476,477]及胸腺间质中的一些非造血细胞[371,478,479],均可通过克隆清除或非清除机制而诱导胸腺内免疫耐受。胸腺内免疫清除所导致的免疫耐受具有永久性,因为供体淋巴细胞克隆的缺失可保证在任何条件下的对供体抗原的特异性无应

答状态。

成熟 T 细胞在体内遭遇相应抗原时可发生外周的克隆清除[480~482]。此外，反抑细胞也可清除同种反应性 CTL 细胞前体。

克隆无反应性

T 细胞在识别抗原肽 MHC 复合体时，若缺乏足够的辅助/共刺激信号，则可形成失能。所谓失能 T 细胞，是指 T 细胞不能与 APC 所呈递的相应特异性抗原反应。对于 T 细胞，失能状态通常与 IL-2 合成受阻有关，并且失能状态可通过给予外源性 IL-2 而逆转[373]；在某些情况下，失能与 TCR 或 Ig 受体的下调有关。大量诱导 T、B 细胞失能的方法参见参考文献[469]、[483]~[486]。对于 B 细胞失能，则通常与抗原浓度有关[469,482,487~489]。典型的 T 细胞失能是由于缺乏共刺激信号作用，但如果抗原肽与 TCR 之间的亲和力较低，亦可诱发免疫失能[472,473]。除外周成熟淋巴细胞，胸腺细胞同样也易于诱导形成失能状态，尤其接触胸腺内上皮细胞或树突细胞所呈递的抗原。失能状态在体内是一可逆性过程，可因感染[490]或抗原因素的去除[491,492]而解除。

免疫抑制

1209

抗体介导的免疫抑制可以通过识别抗供体受体的独特型来实现。独特型是决定抗体结合部位或 TCR 特异性的抗原决定簇，能被抗独特型抗体识别[493,494]。在移植反应中，抗独特型抗体则可能参与调节移植排斥反应，所以，过去人们对抗独特型抗体所引起的特异性免疫耐受予以相当的关注。但我们现在已明白，由于 B 细胞所识别的抗原决定簇及编码 BCR 的基因均与 T 细胞不同，所以细胞免疫是不可能因为 B 细胞编码的抗独特型抗体而改变，况且究竟是否如 Jerne 所述，抗独特型抗体参与 B 细胞反应的正常调节机制尚是一持续争论的问题。同时，事实也证明运用外源性抗独特型抗体试图控制移植排斥的努力是令人失望的[495]。

另外，抗体介导的免疫耐受亦可通过另一途径而获得，即免疫增强，是指利用抗移植物抗体来延长移植物存活时间[496]。这种现象最早在同种异体肿瘤移植实验中发现[497]，随后，Stuar[498]及 Batchelor[499]等人在啮齿类动物肾移植中也发现，抗 MHC 或某些可溶性抗原抗体可导致上述的耐受[500]。可能的解释是抗 MHC 抗体与抗原的结合可阻断免疫反应的发生。但这种解释似乎过于简单，例如，我们发现免疫增强所导致的免疫耐受可随受体的细胞而非受体的血清转移。显然，抗体可通过宿主的免疫反应而建立特异性的免疫抑制状态，也许独特型-抗独特型网络系统能为此现象提供更好的解释。但遗憾的是，在小鼠肾移植实验中成功运用免疫增强所致免疫抑制的事实，并未在其他动物模型中得到重复。

其他导致免疫抑制而延长移植物存活的方法则是通过细胞机制获得的。T 细胞反应的免疫抑制均可由不同特异性的 T 细胞及非 T 细胞诱导；此外，在一定条件下，某些非特异性的免疫抑制效应分子能与特异性的抗原结合，于是也称之为特异性分子免疫抑制，下面的讨论中，我们依据介导移植排斥免疫抑制特异性程度的不同，分别介绍不同的免疫抑制机制。

非特异性免疫抑制　细胞分泌的某些非抗原特异性的可溶性分子，如细胞因子[501,502]、一氧化氮[503,504]，前列腺素[505,506]等，均可下调免疫功能而达到非特异性免疫抑制；同时，某些非特异性抑制细胞如天然抑制细胞(NS)，至少可通过分泌可溶性因子诱导免疫抑制[507~511]。显然，由于非特异性免疫抑制只能引起暂时性的免疫耐受，所以只适用于已发生的同种异体排斥反应的某些关键阶段。如果不能保证特异性耐受状态，非特异性抑制细胞与非特异性免疫抑制药物相比，并无明显的优越性，所以，人们现在正进一步进行使非特异性原始表型的天然抑制细胞向特异性抑制细胞转化的尝试[512~514]。

免疫反抑　免疫反抑效应是指当 CTL 前体细胞与反抑细胞表面的同种异体抗原结合后，能阻碍 CTL 前体细胞免疫反应，此效应发生的前提条件是 CTL 与反抑细胞上的抗原结合[515,516]。CTL 细胞[517]，包括激活的 NK 细胞[518]及某些难以归类的造血干细胞[515]，均发现存在此免疫反抑现象，尽管机制尚不清楚，但现已发现反抑细胞的 CD8 分子与 CTL 前体细胞的 MHC Ⅰ类分子结合，可介导反抑信号转导入胞[519~521]，但是由于并非所有的反抑细胞均表达 CD8 分子，所以尚存在其他机制，例如，已有实验提示反抑机制可能与抑制性细胞因子 TGF-β 有关[501]。

抗原特异的免疫抑制 尽管在一些移植动物模型中,功能实验证实了同种抗原特异性抑制细胞的存在[450, 522~529],但只有少数例子获得了细胞克隆[530],并且至今仍未确立特异性的细胞表面标志。此外,特异性同种反应性抑制机制仍未明确。其中,其他T细胞的抗独特型T细胞识别,被认为参与介导宿主抗移植物排斥及移植物抗宿主排斥反应的特异性免疫抑制[523, 526, 529]。

如今,Th细胞不同亚群功能的认识可能为抗原特异性免疫抑制现象提供新的解释[531]。Th1细胞(分泌IL-2,IFN-γ)向Th2型细胞(分泌IL-4、IL-10等)的极化与同种异体移植物耐受形成相关[532~537]。由于Th1与Th2细胞亚群间相互向下调节,人们随之提出Th2细胞应答能诱导免疫耐受的假说,此假说认为Th2细胞反应能通过阻碍APC细胞的共刺激信号,从而影响初始T细胞向Th1的分化,APC细胞由此而成为介导免疫耐受形成的重要的中介细胞。从实际角度上讲,如果某种免疫应答本身无害且能抑制其他对供体有害的应答发生,那么这种应答定能有助于移植物的存活。但大多数研究结果也只是证明了Th2优势免疫反应与移植物存活之间的相关性,只有有限的数据提示Th2细胞在诱导免疫耐受形成中的积极作用[538, 539]。我们也很清楚,Th2型免疫应答并非总是"良性"的,Th2细胞与Th2细胞相关的细胞因子也可参与移植排斥反应过程[540~543]。最近已发现,至少在某一种属的异种移植排斥过程中呈Th2优势免疫反应[544]。但与之相矛盾的是,也有大量实验证实,在被成功接受的异种移植物中可检测到Th2细胞相关细胞因子。其实我们本来就难以将Th1和Th2细胞所分泌的细胞因子截然分开,那么也许将来研究应进一步明确某一特定细胞因子在参与移植的排斥或耐受过程中的作用。最近小鼠及人$CD4^+$ T细胞中分泌IL-10而不分泌IL-4的某一亚群,不仅已体外证实能诱导免疫耐受,同时体内实验证实具有抗炎性肠病的能力[545]。

淋巴细胞忽视移植物抗原(免疫忽视)

T、B细胞在某种条件下"不识别"本应识别的相关抗原,即免疫忽视[469, 489, 546, 547]。这种免疫忽视现象可能通过两种途径产生。第一,此类"忽视"抗原由非专职APC细胞呈递而不能激活T细胞;第二,受体的T细胞未能成功地迁移至移植组织而不能与相关抗原接触。外周抗原水平、相应T细胞从胸腺内的迁出情况[489, 548]、促炎细胞因子[549, 550]及外周组织共刺激分子表达上调[551]等因素,均能直接影响T细胞产生对外周抗原或"反应"或"忽视"的结局。但是,与中枢性免疫耐受不同的是,免疫忽视具有突出的可逆性特点,可因某些因素的改变而逆转,如感染[547]引起的免疫刺激或专职APC细胞呈递抗原。因此在一些内分泌器官的同种异体移植中,常在移植前去除APC[552]。

1210

诱导移植耐受的策略

获得中枢性耐受的策略

嵌合体 早在50年前,Owen、Medawar等人已开始了嵌合体的研究,他们发现造血干细胞嵌合体可造成供体特异性的免疫耐受[553]。造血干细胞之所以能诱导免疫耐受,是因为造血干细胞可诱导胸腺内对造血干细胞表面抗原特异性的胸腺淋巴细胞克隆的清除,所以骨髓移植可诱导受体对多种同种移植物产生耐受,如MHC配型不合的皮肤和小肠移植物[155, 554]。但是尽管骨髓具有很强的诱导耐受能力,令人吃惊的是,在人体中造血干细胞移植并不能成功地诱导耐受,而若辅助以受体全身放射线照射以去除受体成熟T细胞后施行骨髓同种异体移植,则能成功诱导耐受;或者在移植术前去除成熟的供体T细胞,也可防止移植物抗宿主反应(GVHD)[555~558]。在上述情况下,受体机体重新建立了一套崭新的免疫系统,能同时对受体及供体抗原成分产生耐受。尽管这种方法在啮齿类动物实验中获得成功,但是在MHC配型不合的大动物模型以及人体实验中,成功率却并不高,并且隐含巨大危险性,包括骨髓破坏状态下的不可耐受的毒性作用、GVHD产生及移植失败的高风险性[559],所以非常有必要探讨更特异更有效的克服骨髓移植障碍的方法。要达到这个目的,首先必须弄清楚同种异体及异种造血干细胞不同的功能及移植过程中的免疫学或生理学障碍,最理想的状态是获得造血干细胞的混合嵌合体,而不是采用单纯的MHC配型不合的同种细胞重建受体的整个系统。混合嵌合体中免疫应答能力大大增加,外周组织中包含宿主特异性的APC细胞,那么在宿主胸腺中,也就存在宿主MHC分子优势性抗原呈递的过程[560, 561]。

关于在骨髓移植中如何获得嵌合体和特异性免疫耐受，已开始了一些有益的尝试。例如，全胸腺照射合并骨髓移植的实验已在啮齿类动物体内大量进行[562, 563]；当保护长骨免受照射时，后继骨髓移植则能形成嵌合体，而非全供体重建。用此方法，小鼠能获得对 GVHD 的抵抗力，供体特异性皮肤移植实验亦获成功。迄今，胸腺照射所诱导的耐受机制尚未完全清楚，并且成功率与动物种属特异性有关。此外，在啮齿类动物模型中发现，胸腺照射后呈现 Th2 细胞优势应答现象。这种 Th1 向 Th2 细胞转化可能有助于移植物的存活[564, 565]，同时也发现出现能抑制 IL-2 合成的天然抑制细胞，可以提示全身放射线照射后诱导耐受形成[566]。进一步在临床移植实践中，胸腺照射处理法也获得成功，即使在某些方面尤其在心脏移植中仍存在较大问题[567, 568]，但是运用胸腺照射法施行的肾移植的少数患者获得供体特异性耐受，甚至达到术后停用免疫抑制药物[569]。另外，也有实验显示，若移植术后哺乳动物胸腺照射加抗胸腺细胞球蛋白联合应用也能获得良好效果[570]。

经致死剂量照射的受体，再输注去除 T 细胞的自体或异体骨髓细胞，亦可构建混合嵌合体，同样能获得很强的免疫应答能力[560]并成功地实现供体特异性的皮肤移植[571, 572]。甚至最近，建立无需骨髓破坏的小鼠嵌合体也获得成功。它首先运用抗 T 细胞单抗处理宿主细胞，再经亚致死剂量的全身照射结合稍高剂量的胸腺照射，以保证清除抗 T 细胞单抗“漏网”的 T 细胞。围绕如何结合抗 T 细胞抗体、放射线照射以及免疫抑制药物等获得嵌合体及特异性耐受，现已开展了大量的研究，并在大[573]、小动物模型[574~577]中均获得成功，哺乳类动物中运用上述非骨髓破坏方法成功获得嵌合体及特异性免疫耐受的实验基础，已经成为当今临床移植前沿技术。

在小鼠骨髓移植中应用单抗进行的深入研究将有助于进一步清除移植中的免疫障碍[155, 578, 579]。众所周知，$CD4^+$ T 细胞，能对抗 MHC Ⅱ 配型不合的骨髓移植，$CD8^+$ T 细胞则针对 MHC Ⅰ 配型不合；反之，$CD8^+$ 细胞也能对 MHC Ⅱ 配型不合发生强烈反应，而 $CD4^+$ T 细胞则对 MHC Ⅰ 配型不合反应较弱[578, 579]。同时，NK 细胞的研究发现虽然 NK 细胞能对同种异体的骨髓祖细胞移植产生排斥，但却对同种异体多能干细胞应答较弱[153, 580]，并且在异种骨髓移植排斥中，NK 细胞发挥了显著的作用[154]。

自体骨髓诱导免疫耐受的基因治疗 另一种利用造血干细胞移植而获得免疫耐受的方法，即通过转染编码外源移植抗原基因的自体骨髓细胞而重建自体受体免疫系统。例如，将编码移植抗原 MHC Ⅰ 基因导入自体骨髓细胞，成功地实现 MHC Ⅰ 类配型不合的皮肤移植[581]。所以，若选择某些移植排斥过程重要基因（如 MHC Ⅱ 类基因）导入自体骨髓，所引发的对编码抗原的特异性耐受将极大程度地诱发移植耐受[582]。

混合嵌合体在异种移植中的运用 在大鼠向小鼠的异种骨髓移植中，抗 T 细胞和 NK 细胞抗体结合亚致死量的放射线照射，同样能获得混合异种嵌合体及供体特异性耐受从而获得移植成功[154]。但是，由于造血细胞发挥功能依赖于其表面的诸多黏附分子与其受体的相互作用，以及造血干细胞与大量间质细胞表面分子的相互作用[583]，并且其中某些相互作用过程具有种属特异性（细胞因子、黏附分子及其他细胞表面信号转导分子）。当全身放射性照射剂量较低时，由于受体骨髓系统比异源性鼠骨髓系统具有更强的免疫优势，而可能自体骨髓系统逐渐恢复造成嵌合体最终失败[584, 585]。

1211

对于种属差异性较大的异种器官移植，获得异种造血干细胞的存活及扩增，就将是更大的挑战；人及猪的骨髓祖细胞已证实能在小鼠受体内少量生长[586~588]，但是重要的调节分子的种属特异性将限制供体细胞的生长，也许外源给予供体种属特异性细胞因子不失为部分克服此问题的方法[587, 589]。

异种胸腺移植 由于很难实现异种造血干细胞迁移至受体胸腺而诱导中枢耐受过程，那么另一种可能的解决方法是预先将受体 T 细胞清除后，切除受体胸腺，代之以供体胸腺。对小鼠进行小型猪胸腺移植，能重获 $CD4^+$ T 细胞及免疫应答能力[590]，上述细胞不仅能在外周血中正常生长并具有抗感染能力[591]，而且能产生对供体抗原的免疫耐受，甚至能实现困难的异种皮肤移植[592]。供体与受体共同耐受性的获得，至少部分有赖于胸腺内克隆清除机制，同时反映在此胸腺移植过程中，胸腺内存在来自两个种属的高表达 MHC Ⅱ 类分子的细胞[592, 593]。虽然 MHC 限制性严格体现在胸腺 T 细胞发育阶段，令人不解的是，在异种胸腺内发育分化的 T 细胞却能识别与宿主 MHC 分子结合的抗原肽。人类在治疗先天性胸腺发育不全（DiGeorge 综合

征）时，成功地采用同种异体间 HLA 配型不合胸腺移植重获免疫功能的事实提示，也许 MHC 限制性的不符并不是获得免疫功能的主要障碍[594]。也许种属之间也存在较大的交叉反应性，反映了 MHC 反应性是由胚系 TCR 序列决定的[61]。

如果取造血干细胞尚未转移至胸腺的胚胎胸腺组织进行同种异体[595]或异种胸腺移植[596]，也可成功地实现后继的相应皮肤移植，但所引起的免疫耐受则不能用克隆清除机制予以解释，因为尚存明显的混合淋巴细胞反应[597,598]，或许免疫抑制可能为其提供较为合理的解释。

不经细胞清除及类固醇免疫抑制治疗的嵌合体形成　理论上讲胚胎完全能接受同种异体的造血干细胞，不仅因为此时免疫系统尚未成熟，同时造血系统本身尚在发育，不存在宿主或供-受体问题，能自然地接受移植。既然现在大量遗传性疾病均能在出生前诊断，那么向免疫分化前的胚胎注射可分化为胸腺细胞的造血干细胞（PHSC）重新引起人们的兴趣。子宫内注射同种异体造血干细胞通常可用于治疗某些产前诊断的免疫缺陷性疾病[599,600]，但是，所形成的嵌合体往往仅限于某些遗传缺陷的 T 细胞亚群，而非其他造血干细胞分化细胞。针对这样的现象，那么在免疫系统成熟前的胚胎造血干细胞微环境究竟如何，尚是一难以解释的问题，尽管经动物胚胎中注入人骨髓干细胞，人 PHSC 细胞能“安然无恙”地存活并得以扩增，同时又避免了 GVHD 的发生[602]，这一实验的成功为治疗诸多人类胚胎疾病提供了新的治疗手段，但胚胎内骨髓移植是否真能介导耐受尚不能断言[601,603]。

未经处理的新生小鼠当输入同种异体造血干细胞时，较易获得免疫耐受，这种新生期耐受现象的机制正逐渐明确。在某些新生期耐受小鼠中可证实嵌合体的长期存在，胸腺内克隆清除机制只能部分解释其机制[604]。有意思的是，胚胎期造血干细胞的输注所致嵌合体的存在并不能保证皮肤移植耐受的实现；反之，非耐受状态的小鼠接受供体皮肤移植后，却也有嵌合体形成的现象[605,606]。所以，必然存在其他更多的新生期免疫耐受机制。第一，由于新生期耐受状态并不能轻易地为非耐受宿主的淋巴细胞所打破，抑制性 T 细胞亚群的存在为其提供了新的解释[523,604,607]。新生期抗移植物反应的能力足以诱导抑制性 T 细胞的产生。相反，当克隆清除所致耐受发生时，外周 T 细胞应答完全清除（如前所述的预先致死剂量或非致死剂量的放射性照射所致嵌合体）。当然，如果抑制性 T 细胞缺失，非宿主淋巴细胞则能很容易地打破耐受状态[608,609]。第二，新生期小鼠容易产生 Th2 免疫应答，有助于供体特异性皮肤移植物存活[537,610]，但是在某些条件下，新生期小鼠也能激发 CTL 细胞而产生 Th1 细胞免疫应答[611,612]。第三，新生期同种异体脾细胞所致耐受，常伴随高比率的非共刺激性 APC 细胞（T、B 细胞）产生而不是耐受状态的易感性[613]。

成人受体　在造血干细胞移植前，人们已观察到器官移植中微嵌合体的存在[614]，并提出移植物中的过路白细胞可诱发特异性耐受状态的假说[615]。但这一假说却充满许多矛盾[616]，至少尚不清楚究竟是嵌合体导致免疫耐受，抑或仅仅是免疫抑制药物的免疫抑制作用。嵌合体理论上可诱发外周 T 细胞免疫耐受的机制，不仅包括供体 T、B 细胞源性的非专职 APC 可致受体反应性 T 细胞耐受[617~619]，另外，反抑细胞表面的抗原对 T 细胞、NK 细胞及其他细胞的反抑效应使其 CTL 活性被清除[620]。除了上述诱导外周耐受的机制外，迁移至胸腺的供体细胞可诱发中枢免疫耐受。最近的研究显示，啮齿类动物的肝移植中存在具有自我更新能力的造血干细胞[621,622]，树突祖细胞也能在肝移植术后立即在骨髓中检测到[623]。但是，进一步试验却显示微嵌合体似乎与免疫耐受关系不大[624~626]，而且现在人们越来越清楚地认识到微嵌合体既与诱发耐受状态无关，同样也无助于移植物的存活[616,627~629]。

近来，在不使用类固醇免疫抑制药物或 T 细胞清除的条件下，人们通过输注供体骨髓细胞延长移植物存活。尽管此方法是否有效下结论尚为时过早[630,631]，但很清楚这种方法至少可避免 GVHD 及免疫抑制的高风险[632~634]。这种方法不需要清除宿主外周血 T 细胞。在哺乳类细胞移植模型中，若预先用抗淋巴细胞血清以清除 T 细胞，同时为达到更理想效果，加上全淋巴组织照射，以及以供体骨髓反抑细胞抑制受体 CTL 前体细胞[501]。但实际上，只有少部分受体能获得移植物长时间存活，其中如果供、受体 MHCⅡ类分子 DR 相同则移植效果最好[635]。

在哺乳类动物骨髓移植中，如果不辅之以类固醇类免疫抑制药物，则很难形成嵌合体；但是若以亚致死

剂量照射，则能形成嵌合骨髓体[573]。对于类固醇类免疫抑制药物为供体造血干细胞移植制造有利微环境的认识，人们早已达成共识，但是通过怎样的机制却不很清楚，可能包括宿主造血干细胞的破坏而建立有益于移植的生理环境，或上调某些细胞因子以促进造血细胞分化。在种属相近的骨髓移植受体中采用低剂量的全身照射，可造成有利于异种骨髓干细胞移植的生理环境，使其移植数量能与同种异体干细胞相差无几[635]，但不适用于大剂量异种骨髓移植[636, 637]。若单纯运用清除T细胞的单抗而不使用类固醇类免疫抑制药物，此类同种异体移植也可获得成功，但是，必须改造胸腺内环境使供体T细胞获得大量的增殖、分化，才能保证皮肤移植耐受[639]。显然，骨髓造血微环境及胸腺微环境是由不同机制调节的[638]。

获得外周免疫耐受的策略

尽管机制尚未完全明了，大量的动物实验均显示能诱导外周T细胞免疫耐受形成。能作为外周免疫耐受的机制之一，已经过大量实验验证，其中包括T细胞预先经抗 $CD4^+$ 单抗处理后将 $I-E^+$ 胰岛移植至 $I-E^-$ 受体[451]，以及T细胞清除性单抗使用后的同种异体骨髓移植[640]。

阻断共刺激作用 移植实验中，诱发失能的方法包括非专职APC细胞对同种异体抗原的呈递，例如运用紫外线照射细胞以改变其抗原呈递过程[641]。供体特异性的骨髓移植能有助于耐受形成[642]，可能是由于其中的供体T、B细胞以易于诱导耐受的方式呈递抗原而导致细胞失能[618, 643]。利用CTLA4 Ig阻断B7-CD28共刺激途径，已成功地在同种异体实体器官移植及胰岛异种移植中实现免疫耐受[644~647]。CTLA4 Ig是人工构建的可溶性分子，包含与T细胞上B7分子结合的配体之一——CTLA4。CTLA4 Ig能阻断CD28与B7-1、B7-2结合[113, 649~652]，但若单独使用抗B7-1或B7-2的特异性单抗，却发现能选择性启动Th1或Th2细胞免疫应答[653, 654]，这与上述CTLA4Ig的实验结果存在矛盾之处。同时，B7各个分子本身的功能也尚不十分清楚，且已有鼠肾移植实验显示CTLA4Ig并不能诱导耐受形成，而是启动Th2免疫应答[646]。

近来，人们也相当关注T细胞CD40L与APC及活化B细胞上表达的CD40分子之间的相互作用，CD40L-CD40相互作用以及随后的信号传导，是某些非专职APC，如B细胞向功能性APC转化的必要条件，其中机制之一为B细胞的B7分子表达水平上调。除了在B细胞活化及活化APC细胞中发挥作用外，在T细胞激活中，CD40-CD40L相互作用同样充当了共刺激信号。阻断CD40L-CD40相互作用也能延长移植物存活，其机制可能与选择性Th2优势免疫应答有关，或者降低能活化巨噬细胞的一氧化氮的合成[376, 655, 656]。若联合使用CTLA4Ig与CD40L抗体，则能极大程度诱导免疫抑制，从而可大大延长异体皮肤移植[459, 460]，但是是否在此过程中是否形成耐受仍是一个悬而未决的问题。移植过程中T细胞耐受也可通过抗黏附分子单抗得以实现[553]。在小鼠心脏异体移植中，联合使用抗LFA-1及其配体ICAM1单抗，也有报道可成功实现免疫耐受[657]。

非清除性抗T细胞抗体 在小鼠次要组织相容性抗原不合的皮肤移植中，若运用非清除性抗T细胞单抗[658~660]诱导Th2类细胞因子的产生，能有效诱导耐受。Waldman等发现，耐受的 $CD4^+$ T细胞不仅阻止同种异体移植一级受体的排斥反应，而且可造成二级受体未致敏T细胞的无反应性，进一步，又造成三级受体T细胞耐受。显然，Th1向Th2细胞转化并不能简单地涵盖上述现象机制[659]。

1213

诱导外周免疫耐受的大动物模型

猪肾移植的实验中发现，只要MHC抗原吻合，大动物间器官移植术后可自然形成免疫耐受[40]，此耐受的形成取决于受体体内1~2个非MHC连锁的基因座位[494]；如果供-受体之间MHCⅠ类基因单倍体相同，也可诱发自然耐受。同时，移植物耐受亦与CTL无应答状态有关，其机制似乎与缺乏CTL辅助信号有关，而非清除机制所致[105]。供-受体之间MHCⅠ类抗原分子必须吻合方能符合耐受形成的原则，可能更适用于MHC差异较大的大、小动物间移植过程。与大动物及人体所不同的是，啮齿类动物内皮细胞表面不仅无组成型表达的MHCⅡ 类抗原[44]，即便在启动移植排斥时也不表达。基于上述发现，移植术后短期使用环孢菌素A可克服MHC配型不合的障碍，有助于小鼠肾移植的耐受形成[661, 662]，但在猪移植实验中却未获成功[663]。进一步发现，MHCⅠ类而非Ⅱ类抗原吻合条件下，若实施移植，再辅以每日10mg/kg的环孢菌素A，连续使用12d，则能获得100%长时间耐受；而且受体能获得对供体MHCⅠ类抗原及次要抗原的共同耐受，那么，若实施供

体的另一器官移植，仍然能获得存活。因为观察到 Th1 细胞分泌的细胞因子减少，如 IFN-γ 等，因此认为环孢菌素 A 之所以能促进耐受形成，可能与 CTL 细胞缺乏足够的 Th 细胞辅助有关；若外源性给予 IL-2，则可打破此耐受状态[664]。与 Th1 相关的细胞因子 IFN-γ 分泌减少相一致的是 Th2 细胞因子 IL-10 的分泌在这些耐受移植物中增高[665, 666]。同时，胸腺似乎在外周 T 细胞耐受中也发挥了一定的作用[667]，因为若在肾移植前摘除胸腺，则无法形成耐受，那么究竟胸腺在外周耐受中起什么作用，将在本章其他部分阐述。

外周 T 细胞耐受与中枢耐受的关系

中枢与外周耐受之间其实并不存在截然的界限，在某些条件下，供体的过路白细胞可从移植物中游出迁入受体胸腺，从而诱导中枢耐受；此外，如上述猪移植实验证实，胸腺也可诱导外周 T 细胞耐受[667]，可能是由于外周中激活的 T 细胞可重新循环回到胸腺[668]，并在其内遭遇供体抗原，后者可经多种途径使 T 细胞失活。这可能是由于胸腺内白细胞呈递相同的抗原可将外周活化的 T 细胞逆转。此外，供体抗原迁移至胸腺，能通过促进特异性识别供体抗原的 T 细胞发育，从而抑制同种异体反应性 T 细胞活性[522, 665]。

现在直接将供体抗原进行胸腺内注射的方法，使外周与中枢耐受的界限更加模糊不清。开始人们企图运用抗体清除外周 T 细胞，然后施以胸腺内注射供体抗原以获得中枢耐受，但现在人们发现无需外周 T 细胞清除也可获得中枢耐受[669]。因为如前所述，无论在术前或术后几天摘除胸腺，均导致排斥反应[255]，所以，胸腺在外周 T 细胞耐受中仍发挥重要的作用。此外，小鼠胸腺内注射同种异体骨髓细胞的实验发现，外周存在活化的调节细胞亚群[670]，这一结果与同种异体或异种胸腺移植中抑制性细胞亚群存在的结果完全吻合[597, 598]。

同种异体移植过程本身也有助于使胸腺内注射诱导的耐受形成，换言之，单纯使用胸腺内注射异体抗原，若无后续的移植过程，是不能造成耐受状态的[670]，说明移植物本身对外周 T 细胞耐受非常重要。相反，单纯胸腺内的克隆清除性耐受不依赖外周异体抗原的持续存在[609]。但遗憾的是，在高应答品系小鼠，胸腺内注射抗原不仅耐受形成失败，还会造成高致敏状态[671, 672]。

诱导移植耐受的策略

尽管临床上已开始将诱导耐受形成与免疫抑制药物相结合的各种尝试，但至今仍没有找到一种诱导耐受形成的方法能取代传统的长期使用免疫抑制药物。总的说来，由于异体移植的短期效果均不错，为获得长期存活，寻找有效的免疫耐受方法以取代传统的免疫抑制药物就显得尤为重要。尽管造血干细胞移植导致的中枢克隆清除性耐受的方法不失为一种可靠而又有效的方法，但运用于移植过程，却存在造血系统功能瘫痪的高风险性。所以，真正运用于临床，主要需要解决的问题就是如何做到高特异性且无毒性作用；另外，骨髓造血干细胞移植所致的免疫耐受效果，大动物远不如啮齿动物。若使用外周耐受策略，不仅单纯外周耐受并不能克服 MHC 配型完全不合的皮肤移植障碍，而且外周耐受中最大的问题是无法阻止针对供体抗原的受体效应性 T 细胞产生。虽然移植物的非刺激细胞可将效应细胞持续地转为无反应性细胞或将之清除，但专职 APC 通过间接途径持续刺激辅助细胞可以打破耐受。那么从理论上讲，专职 APC 细胞通过受体 MHC 抗原对供体抗原实现胸腺内呈递，才能彻底清除这些间接途径，但实际上胸腺内 APC 细胞似乎并不能从淋巴样细胞中摄取并再次呈递这些抗原，以诱导通过间接途径识别这些抗原的 T 细胞产生耐受。超抗原的实验已发现，通过胸腺内 APC 细胞的呈递超抗原能通过克隆清除实现胸腺内耐受[673]，并且进一步发现，间接呈递造血细胞来源的抗原是诱导胸腺内清除过程所必需的。此外，感染状态下所致的免疫耐受或抑制状态，似乎也为人们提供了一种新方法，但现在也很难评说。总之，似乎只有将诱导中枢与外周耐受形成的方法结合使用，才是获得临床移植免疫耐受的最佳策略。

1214

特定器官及组织的移植

皮肤移植

尽管异体皮肤移植常作为一种实验模型[674]，但人体中却并不常见。大多数人体皮肤移植均采用自体移植。近来，人工皮肤已研制成功，包括基质层以及同种或异种培养细胞，尽管移植后一段时间后，皮肤移植物仍会为受体组织所取代，但却成功地逃避了排斥反应。

皮肤移植之所以常用于小动物实验以评价排斥过程，是由于能大批量操作，但另一方面，也存在突出的缺点。首先，皮肤组织在移植之初是非血管化的，所以皮肤移植排斥反应并不能等同于实体器官移植；其次，啮齿类动物中的皮肤移植同大动物的实体器官移植一样难以存活，甚至难于实体器官移植。

肾移植

肾移植是最常见的移植过程。现在美国每年平均施行 10 000 例肾移植手术。移植后 1 年肾功能良好的可能性现正逐渐地提高；患者术后一年存活率 90%。一年以上移植肾功能良好者也达到 85%，上述数字甚至包括并无亲属关系的肾移植。

但是，即便是配型吻合良好的肾移植术后，仍需终身使用免疫抑制药物。患者将终身忍受药物的不良反应，包括感染、肿瘤、高血压及代谢性骨病。因为我们无法攻克特异性免疫抑制的难题。接受移植的患者，一方面获得了新器官，一方面却付出了高昂的代价，所以说，器官移植是一把“双刃剑”。尽管新型特异性免疫抑制疗法可提高患者初期存活率，但却不能取代免疫抑制药物的使用。

因为非特异性免疫抑制药物的巨大成功，肾移植是否成功的主要障碍也不再是移植排斥反应，而是器官短缺及敏感性的问题。正因为肾移植的成功率逐年上升，越来越多的患者要求实施肾移植手术，已大大超过器官的供给；肝或心脏病患者可能因为器官来源不足，无法实施移植手术而迅速死亡，肾病患者却面临长期的透析生活，他们常常为尸肾源等待 3 年或更长的时间。第二个影响肾移植成功的主要障碍就是高敏感性患者的存在。其体内存在不同特异性的反应性抗体，他们将等待更长的时间寻求配型成功，有时甚至至死也无法施行移植手术。

肝移植

肝移植面临的主要是技术上的挑战。由于这个原因，移植器官及患者存活率不及肾移植，尽管如此，目前 2/3 的受者能存活近一年[675, 676]。

从免疫学的观点来看，肝移植的特别之处首先在于器官本身对抗体介导的免疫排斥反应有相当显著的抗性[677]。通过回顾性分析发现，血型不合的肝移植，通常并不影响其短期存活[186]，但长期存活率则大为降低[187]。其次，即便是 HLA 配型吻合程度高的移植，也并不显现更长的存活时间(当然，也有相反的实验结果)。这种配型吻合程度与移植成功率成反比的现象，可能是由于被自身 MHC 呈递的病毒抗原的致敏的受体 T 细胞，在供肝中接触到由供体 HLA 抗原呈递的相应病原体时导致 T 细胞失活所致，所以，配型不合的肝移植反而能逃避肝炎病毒所致免疫应答的攻击。第三，由于肝移植将携带大量的供体淋巴样细胞，所以能激发强烈的 GVHD，当供、受体血型不合时，供体淋巴细胞能激发对受体抗体依赖的溶血反应[678]。受体血型为 A 或 B，而供体为 O 型的肝移植，术后早期容易出现溶血性贫血。当然，即使在血型相容的受体内，也可能出现 GVHD 的其他表现[679]。

心肺移植

心脏移植也是相对比较标准的临床移植过程，其一年存活率常 80%[680, 681]。心脏移植中特别重要的免疫学问题之一在于供者心脏冠状动脉粥样硬化的高发生率[682]。这种冠状动脉粥样硬化病可能是慢性排斥

反应的某种表现。

肺移植，无论是心肺联合移植或是单独移植，一直尚未普及[683]。受者术后呈现支气管闭塞的病理性改变趋势。同样，这种病理改变也被认为是慢性排斥反应的某种表现。

胰腺及胰岛移植

在1980年之前，由于技术原因，全胰腺移植几乎100%失败。而最近，运用新的技术手段，成功的胰腺移植已成为治疗糖尿病的新方法。若采用胰腺联合肾移植，胰腺移植的成功率已接近肾移植[684]；而单独胰腺移植，则生存率较低，反映其诊断排斥反应存在困难。当血糖开始增高时，胰腺的损坏已达到免疫治疗无法逆转的程度。但是，血肌酐的监测却可及时地反映肾功能损害，从而能早期发现肾移植的排斥活动[685]。另一方面，胰腺联合肾移植表现出一个有趣的现象，那就是某一器官的排斥反应并不与另一器官有直接联系[686]，是否与特定器官存在特定的组织相容性抗原及局部免疫有关，现在尚无定论。

当然，全胰腺移植能提供更多的组织以治疗糖尿病。但单独胰岛细胞移植用于治疗糖尿病，被认为是更具潜力及有效的治疗方法[422]。虽然胰岛细胞移植已在动物实验中获得成功，但在人体中成功率还相当有限[687]。除同种异体排斥反应外，胰岛细胞移植失败的部分原因取决于受体的自身免疫状态。因此，对于无糖尿病史的患者，若实施全胰腺切除及接受胰岛细胞移植时，比糖尿病患者具有更高的手术成功率。

即使胰岛细胞移植能够用现有的免疫抑制药物常规控制，仍然不能使糖尿病进程有根本改变。胰岛移植的主要目的仅仅在于防止糖尿病的神经、血管和视网膜的继发性病理改变。但是，若糖尿病早期实施胰岛移植，则可能改变其病理进程，从而实现免疫抑制药物替代胰岛素，但20～30年坚持使用免疫抑制药物，至少也对人体造成伤害。所以，成功的胰岛移植比其他种类移植更有赖于免疫耐受的形成。

造血干细胞移植

骨髓移植，以及近来分离骨髓中的干细胞或祖细胞以输入外周血，并辅以细胞因子的治疗方法，通常用于治疗难愈的白血病、淋巴瘤以及先天性免疫缺陷状态。虽然自体干细胞移植目前已广泛应用于恶性肿瘤的治疗，但由于其移植过程不存在任何免疫屏障，所以我们将不在此进行讨论。

造血干细胞移植与其他器官移植的根本区别之一在于，患者在实施移植术以前，由于抗肿瘤药物的使用，机体的免疫及造血系统已处于瘫痪状态。过去，造血干细胞移植仅仅用于替代上述瘫痪的系统的功能。免疫缺陷状态下的干细胞移植，则无需人为地制造某种免疫抑制，而能顺利地获得同种异体骨髓移植以替代缺陷的免疫系统，但无需替代其他造血干细胞系。骨髓移植（bones marrow transplants，BMT）与实体器官移植的另一主要区别是，一旦成功克服了术后之初的同种异体移植排斥反应，骨髓移植受体内重建的免疫系统对供体抗原自然产生耐受，也就不需免疫抑制维持治疗。骨髓移植以及某些富含淋巴组织的器官移植，如小肠移植及其次的肝移植，第三个共同的重要特性就是供体T细胞能引起针对受体的免疫性攻击，即移植物抗宿主反应（GVHD）。当供、受体为HLA配型吻合的同胞姊妹时，通过使用非特异性免疫抑制药物可将GVHD反应强度降至可接受的程度。但一般条件下，众多HLA屏障的存在可导致GVHD的发生，其发生频率及强度足以破坏移植物的正常功能，造成惟一能拯救患者性命的骨髓移植术的失败。现在大规模骨髓库的建立，可从不相关的人群中筛选HLA配型，使更多的患者获得福音；但由于运用传统的血清学技术无法发现某些HLA配型不合，所以大多仍能发生高强度的GVHD。

骨髓移植运用于白血病的治疗，主要基于对治疗性细胞减少患者造血干细胞的挽救。其中，移植物抗宿主的免疫应答也有其有利的一面。例如，供体T细胞对表达于受体白血病细胞上的同种异型抗原的识别，于是同种异型骨髓移植也可作为一种针对细胞减少法治疗后，对尚存白血病细胞杀伤的免疫治疗方法。我们不难发现T细胞清除法并不是解决GVHD的首选，GVHD的发生率降低，相反白血病细胞却可能逆转[688, 689]。最理想的方法达到移植物抗白血病细胞免疫应答（graft-versus-leukemia，GVL）而非移植物抗宿主正常组织。

1216

现已发现几种抑制 GVHD 的手段。首先可采用某些已在实体器官移植中作用经证实的免疫抑制手段，例如，共刺激信号阻断[690, 691]或者联合黏附分子阻断[692]，或者 CD4 分子的 CDR3 肽段及抗 CD40L 单抗也表现出抑制 GVHD[693]及延长移植物存活的作用[694]。由于上述方法均非特异性阻断供体抗宿主免疫应答，随之也阻断了对残余白血病细胞的清除，即减弱了 GVL 程度。相反，另一种似乎不可思议的手段是运用某些具有免疫刺激作用的细胞因子，如 IL-2、IFN-γ 或 IL-12，小鼠实验证实这些细胞因子能抑制 GVHD 的发生[695~697]。而且更令人关注的是，上述细胞因子在抑制 GVHD 的同时，却能激发有效的 GVL 反应[698~700]。此外，在小鼠体内实验中，非清除性抗 CD3 F(ab)'2 抗体片段也显示出同样的抑制 GVHD 激发 GVL 的作用[701]。而无论是鼠源性[702]或人源性[703]抗 CD25 抗体对 GVHD 的抑制作用均较弱。其次，针对促炎细胞因子如 TNF-α 的单抗[704]或 IL-1 受体拮抗剂[705]在初期临床研究中也表现出一定的预防 GVHD 发生的作用。

另一种使 MHC 介导的同种反应性 GVHD 与 GVL 相分离的手段，就是先进行造血干细胞移植，然后再在术后及时补充供体 T 细胞[706~708]，这样由于受体从最初的免疫力低下状态有所恢复或者其调节性细胞亚群的恢复，可以使受体在 BMT 术后长时间不发生 GVHD。这种较强的 GVHD 抵抗性解释了为什么在治疗慢性髓性白血病时，推迟供体白细胞的输注可以减轻 GVHD 的程度[709~711]。一些实验室对 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ 细胞亚群启动 GVL 而非 GVHD 反应的可能性进行了研究[712~714]。临床实践也证实，若清除 $CD8^+$ 细胞，即便在 HLA 相同条件下的骨髓移植，失败率甚至高于未进行 HLA 配型的移植过程；但若将 T 细胞全部清除，不仅移植成功率增高，而且有证据显示仍保留抗白血病细胞的功能[715]。

另一种利用有害性同种异型 T 细胞应答的有利因素的手段，即体外分离并克隆选择性识别受体白血病相关抗原而非正常细胞抗原的 T 细胞。此种 CTL T 细胞克隆在小鼠[716]及人类[717~719]中均已发现。但是此种 T 细胞数量很少，所以必需体外进行一系列的选择、克隆及扩增。如此漫长的培养过程，使得对抗白血病细胞的 T 细胞数量很难对付呈指数生长的白血病细胞，所以此方法很难运用于临床。现在研究相当热门的白血病特异性抗原之一为表达于 B、T 恶性淋巴细胞瘤上、与 Ig 受体或 TCR 受体相关的同种型抗原，这些抗原能有效地通过专职 APC 细胞，如树突细胞呈递而产生抗体[720~722]。

异种移植

尸体供体器官的日益短缺使人们的兴趣转向异种器官移植，即从其他种属获得器官和组织以取代人类器官和组织。尽管距离临床应用还很遥远，但下面简要介绍的现有进展会给我们带来一些乐观的情绪。

相似型或非相似型的异种器官移植

以种属发生远近、排斥反应速度及可检测的预存抗体水平为标准，异种器官移植可分为两种类型：相似型及非相似型。若动物种属间进化相近，彼此间没有特异性预存抗体，则称为相似型；相反，若种系相距较远，且能以超急排方式进行器官排斥的动物称为非相似型。当然，关于这两类异种器官移植的分类，还存在许多过渡型，也有一些变异违背此原则，所以，此种分类方法并不可取。

临床异种器官移植的供体种属选择

从种系发生的观点来看，非人类的灵长类动物作为移植供体无疑最类似于同种异体移植。但是，由于考虑到移植器官大小、可获得性和传染病等因素，大部分研究者放弃利用灵长类动物作为未来异种移植器官来源的想法。猪，作为一非相似型种属，被选为最合适的异种器官移植供体。猪不仅来源不断、繁殖力强，而且许多脏器与人类似。其中，由于体型小（最大体重 120kg）、生理特性（许多器官特性与人类相似）以及生殖特性，部分近交的小型猪引起人们特别的关注[723]。

异种器官移植排斥的机制

异种器官移植过程同样符合本章中较前所述的移植排斥反应的 4 种机制，只是相对于同种异体移植过程，每一种排斥机制中均能产生更强的免疫应答。这一发现有两个基本原因。首先，异种移植因有更多的外 1217

来抗原能为免疫应答提供更多的靶抗原；其次，由于不同种属间常见的分子不相容性，可阻止正常的受体-配体间相互作用。因为受体-配体间相互作用同源限制性的存在，常减弱控制免疫及感染过程的调节过程，结果是同种异体移植中较弱的排斥活动，在异种器官移植中变得异常强烈。

众所周知，异种器官移植特别容易发生超急性排斥反应，此现象表明了两大基本问题。如前所述，猪表达某种人类所没有的内皮细胞糖类决定簇——半乳糖-1,3-半乳糖[724]，结果猪相对于人，具有某种新的血型抗原，能与人体内的预存抗体结合而启动超急性排斥反应；同时，猪内皮表面的补体调节蛋白不能有效地控制人体的补体激活[180]，因此，这些分子不相容性更增加了超急性排斥反应的强度。

同样对于速发性排斥反应的有关因素，在异种器官移植中比同种异体移植显得更为突出。尽管某些异种抗原及预存抗体水平较低，不足以引起超急性排斥反应，但却能迅速地诱导针对移植物的抗体反应[142~144]。此外，在异种器官移植过程中，某些调节蛋白，如组织蛋白抑制剂不能有效作用于人 Xa 因子，因而易形成血管内血栓[200]。另一方面，NK 细胞参与异种器官移植过程的可能性，也反映了额外外来抗原的存在及分子不相容性的重要性。其一，猪内皮细胞上糖基决定簇能激活 NK 细胞；其二，人 NK 细胞抑制受体与猪 MHC Ⅰ类分子的不相容性，导致人 NK 细胞的活化处于无抑制状态[725]。

已有证据推测，细胞介导的免疫反应在异种器官移植中比同种移植更强烈。最初关于这一点尚有不肯定之处，小鼠体外实验中，由于种属间分子不相容性的存在，异种移植物抗原的直接呈递弱于同种移植物抗原[726]，因此，似乎在体内也应激发较弱的细胞应答。但事实上，即使是小鼠，异种器官移植所诱发的细胞介导的排斥反应尤其强烈，显然是通过 $CD4^+$ T 细胞对异种抗原的间接呈递的方式[727]。

表 36.6　人、猪分子间相互作用

人	猪
至少有部分功能的分子间相互作用	
人	猪
TCR	SLA
CD4	SLA Ⅱ类
CD8	SLA Ⅰ类(±)
CD2	LFA-3(±)
LFA-1	ICAM
CD28	B7
VLA-4	VCAM
Fas	Fas L
介导明显损伤的分子间相互作用	
人	猪
NH KIRs	SLA Ⅰ类
CD8	SLA Ⅰ类
IFN-γ	IFN-γR

最近，临床上有关人抗猪细胞应答的研究引起相当的重视。与鼠的研究相比较，人体 T 细胞对猪抗原的直接应答易于体外检测[728, 729]；此外，体外实验也证实，NK 细胞能溶解猪的靶细胞[728, 730]，也参与了细胞介导的免疫反应。其中，分子的不相容性导致人体 NK 细胞抑制受体无法与猪 MHC Ⅰ 类分子结合。其他在人抗猪免疫应答中发挥重要作用的分子间相互作用程度见表 36.6 所示。除 CD8 分子与猪 MHC Ⅰ 类分子的亲和力明显下降外，其他分子至少保持部分功能[731]。

上述研究结果提示，人抗猪的 T 细胞应答至少不低于同种异体移植。一些研究已证明，人 T 细胞针对猪抗原的间接反应强于同种异体移植[732]。如果小鼠实验正确，同样也提示细胞介导的异种器官移植排斥反应取决于间接致敏的程度。这种强烈的间接活化效应，提示针对异种猪抗原，无论是急性的或慢性的人细胞介导的排斥反应，都将比同种异体移植更难控制。

异种器官移植的治疗策略

为获得异种移植物的长期存活，现有三种不同的策略。第一，寻找针对异种器官移植特别有效的免疫抑制药物。这种治疗途径在现有的同种异体移植的临床实践中已获得满意的疗效。虽然每一种针对同种异体移植具有较好疗效的新药，均用于异种器官移植试验，但没有一种药物能对异种器官移植排斥反应的控制产生魔力。基于我们对异种器官移植免疫障碍的科学认识，事实上不可能存在这样的药物。退一步说，与同种异体移植相比，异种器官移植更强烈的排斥反应也提示，需要更大量的外源免疫抑制才能达到与同种异体移植一样的存活效果。仅仅从现有的临床移植免疫治疗的视野来看，大多数学者相信不仅限于免疫抑制药物，

1218

还将会发现更多的新药广泛应用于异种器官移植中。

第二种治疗途径,即通过基因工程改造供体动物,以减少对异种移植物的免疫屏障。由于异种移植不同于同种移植的重要特性在于存在大量的外来抗原及分子间不相容性,那么,如图 36.15 所示,运用基因工程改造供体就是旨在修正这两大缺点。在小鼠实验中,运用同源重组技术,已成功地实现去除某些有害基因。例如,已获得敲除能产生 α-1,3-半乳糖的半乳糖转移酶基因的基因敲除小鼠[733, 734]。但是,该技术在包括猪在内的大动物中尚未获得成功,使得只能采取插入基因遗传修饰的转基因技术。在转基因技术中,最令人兴奋的应用成果是 hDAF 猪的建立,此种猪能表达人补体调节蛋白 DAF[735, 736]。源于这些动物的器官移植,其超急性排斥反应的易感性明显低于野生型猪。其他许多具有潜力的转基因猪正在研制之中,包括导入编码其他补体调节蛋白、编码人岩藻糖基转移酶的基因(该酶能从半乳糖转移酶的底物中产生人 O 型血型抗原决定簇)以及编码糖苷酶的基因(该酶可去除 α-半乳糖)。同时,几乎可以肯定尚有其他转基因可有效地改变速发性排斥反应进程(也许通过重建血栓调节或促进免疫适应形成)或影响细胞介导的移植物损伤过程(也许通过表达人 MHC Ⅰ 类分子以抑制 NK 细胞活化,或减少 T 细胞某些分子,如 Fas 抗原的表达)。

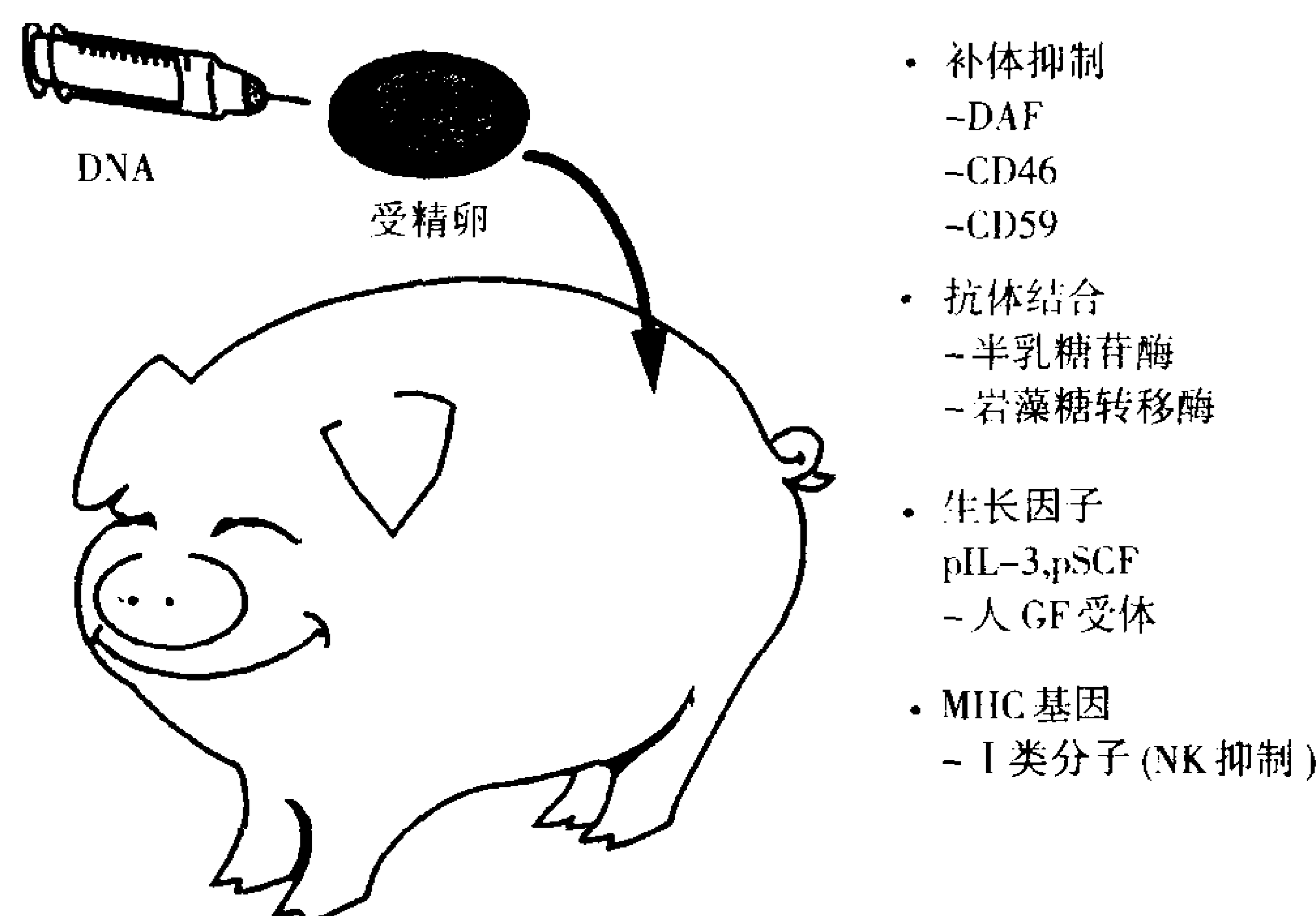


图 36.15 转基因猪作为异种移植物供体。一些基因被用于或被考虑用于制造转基因动物作为异种移植物供体。

第三个策略是诱导对供体抗原的免疫耐受。关于此策略的应用已在本章前面有所阐述,这种策略的关键特征在于获得外周免疫耐受。外周免疫耐受虽然在同种移植中较易获得,但即便是种属相近的异种器官移植却很难达到。在皮肤异种移植中,只有清除性耐受能真正实现异种移植物长期存活[153, 154]。

当然,没有理由推测这三种策略是等量齐观的。许多研究者相信,将上述三种策略结合起来可有助于大规模地推行异种器官移植。

异种器官移植的非免疫障碍

除了上述阻碍异种移植物存活的免疫因素外,尚有其他两大重要障碍。第一,分子间的不匹配性,不仅造成免疫应答,同样能导致异种器官的生理异常。例如,猪肾产生的红细胞生成素在哺乳类动物中无功能活性,从而引起猪肾移植长期存活患者进行性贫血[737]。另一方面,也有许多异种移植生理功能超越种属差异而保持完整的情况,如猪胰岛素能有效地调节人体血糖。此外,针对生理功能异常,将来可能通过转基因技术予以克服。而且,尽管异种移植能造成某些移植脏器或组织的功能异常,但对所有的异种器官移植而言,这并不是无法超越及克服的困难。

异种器官移植的另一个非免疫障碍,在于组织移植成功所可能带来的种属间交叉感染,甚至造成对整个社会的公共健康危害。其可能的危害性最近已经引起人们的重视,但真实危险的极大不确定性,又使人们对

此问题的看法混乱不清。

"动物传染病"一词有时被用于表述普通的种属间交叉感染,最近,"异种动物传染病"已逐渐发展成为描述异种移植中可能发生的交叉感染。从个体移植接受者的角度来看,异种移植传播传染性疾病的可能性比目前临床实施的同种移植小,主要是因为不仅人体存在对异种传染病的自然抵抗性,而且可对异种供体进行长时间的检测。此外,传染病的危险,不会来自已知的病原体,因为病原体一旦发现,就可以马上获得清除。

因此,异种移植传染病的主要问题在于供体细胞内内源性反转录病毒序列能感染受体细胞,或自我繁殖,或通过与人内源性反转录病毒序列重组后繁殖,从而可能产生未曾认识的病原性病毒。这种新型病毒不仅对移植受体个体有害,甚至能产生对其他个体的危害。尽管这种种属间反转录病毒的交叉传播在自然界中也可能发生,但另外一些学者指出,异种器官移植可能是惟一满足其传播条件的过程。尤其是使用免疫抑制药物或免疫耐受形成的患者,体内长期两种不同种属的细胞并存,有利于发生内源性逆转录病毒的交叉传播。体外实验已证实,当混合细胞培养时,猪的原病毒能感染人的细胞[738],从而提示上述担心不无道理。但与此同时,也没有任何证据表明,猪-人异种器官移植后的交叉传播能产生具有传染性或致病性的病毒。因为迄今尚未发生异种移植传染病,所以要精确评价这种危险的发生频率不太可能。因而,目前一些健康团体和移植机构正试图设计合理的途径来鉴定异种移植的真正危险性及可能的不良结果,以此促进具有巨大前景的异种器官移植的研究进程。

异种器官移植的临床进展

尽管异种移植存在上述诸多障碍,但令人惊奇的是,动物-人的异种器官移植的临床试验却一直进行着。早在20世纪60年代,人们已开始由非哺乳类动物-人的异种器官移植尝试[183]。其中,一个患者接受猩猩的肾移植后,该移植肾功能保持正常达9个月患者才死亡[739]。最近,人们又尝试进行胚胎猪脑细胞移植,以治疗帕金森病或亨廷顿病。文献报道移植后患者只需使用小剂量的环孢素,移植猪组织可存活8个月,提示血脑屏障在此提供了一定程度的免疫保护[740]。上述研究结果提示,细胞异种移植可能比器官异种移植相对容易,因为细胞移植中无血管内皮细胞参与,由于靶细胞缺如而无法激活超急性及速发性排斥反应。

临床移植中的一些免疫话题

抗原配对对移植物存活的影响

临床证据

移植抗原的定义是能够产生移植物排斥的抗原;如果缺少移植抗原的差异,移植排斥反应将不能发生。所以,无需争论,通过抗原配型可以改善移植物的存活。尽管上述结论十分简单,但在实际临床操作中,关于抗原配型的重要性却常常存在相互矛盾的争论。其争论的焦点往往集中在受现有临床条件及技术的限制,经改进但不完全的抗原配型是否能有效地影响移植转归。

表 36.7　肾移植后1年移植物的功能

	1996	1986	1976
HLA相同的移植物	100%	100%	100%
一个单体型匹配的移植物	94%	92%	78%
尸体肾供体	86%	83%	58%

数据来自波士顿马萨诸塞州综合医院移植部。

亲代相关的临床肾移植已表明抗原配型对于移植物存活的重要性。两个兄妹个体间,其HLA抗原完全相同的可能性为25%,HLA一半相同的可能性为50%,而HLA完全不同的可能性为25%。双生子间拥有完全等同的移植抗原,但同胞间即使HLA完全相同,通常只有大约一半的次要抗原相匹配[741, 742]。表36.7为某一机构统计的HLA完全吻合或单体型吻合条件下的肾移植一年存活率;UCLA的肾移植登记也得出与表36.7相似的结果,表36.7数据显示,即使移植发生在HLA完全相同的兄妹之间,即使使用免疫抑制药物,可能由于次要组织相容性抗原的不合,仍有一部分移植失败;但无论如何,HLA配型完全吻合相对于单体型

吻合,其肾移植的成功率更高。上述数据支持一个基本原则:MHC 配型有助于改善亲属相关性的移植存活。

在缺乏亲属供体时,移植脏器来源于非亲属个体,其来源通常为尸体。因为 MHC 抗原存在广泛的多态性,随机选择的非亲属供体与患者之间不太可能有较多相同的 HLA 抗原,同理,也仅仅只有一些散发的次要组织相容性抗原相同,因而尸体供体器官的存活率往往低于 HLA 配型完全吻合或单体型吻合的兄妹供体。在这种情况下,临床中是否能非随机地获得较大程度的抗原吻合,将直接影响移植的转归。

图 36.16 显示了根据 UCLA 肾移植登记的尸肾抗原配型与移植成功率的关系[741]。其数据显示,在尸体肾移植中,抗原配型近乎完全匹配条件,其一年存活率能获得 10% 的优势,但是,并不是所有的实验结果均支持此数据[743~748]。许多因素都能影响我们量度抗原配型的能力,例如,针对抗原配型吻合程度差条件下的移植过程,用不同的方法总结其成功率,其结果往往不同。移植成功率较低的移植中心总结病例,抗原配型高匹配性的存活优势往往大于移植成功率高的移植中心。因此,尽管抗原配型理论上对移植生物学非常重要,但在实际临床中似乎意义不大。

1220

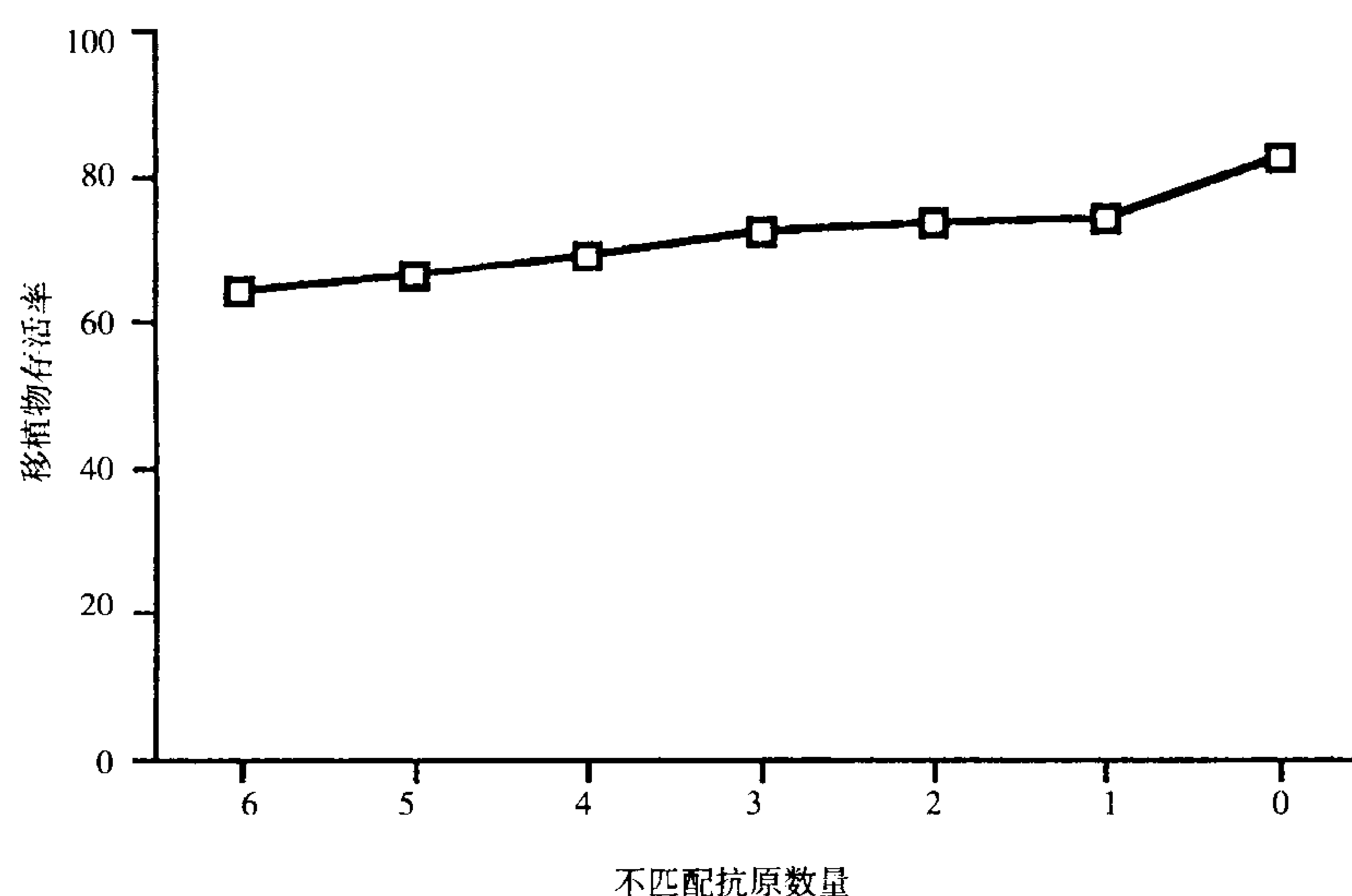


图 36.16 抗原匹配对移植物存活的影响。图中所示为不匹配抗原数量与移植物 3 年存活率的关系。

多年来关于抗原配型意义的争论已集中在几个特殊方面。一些研究者推测,编码 HLA 抗原的某些特定的等位基因是否吻合,对抗原配型相对更重要;而另一些学者则进一步推测某些特定基因位点的相对重要性[749,750]。最近,争论进一步集中在比较 MHC Ⅰ类分子匹配与 MHC Ⅱ类分子匹配的重要性。临床数据提示若Ⅱ类抗原配型吻合,将更大程度地提高移植成功率[751~753]。现在精确的分子生物学方法已取代传统的血清学方法,用于检测 MHC Ⅱ类分子类型。尽管理论上新技术将更有利于实施 MHC Ⅱ 类分子配型,从而将有助于移植成功,但实际上也会因其严格的标准而减少发现匹配供体的概率,以及拖长配型的时间。所以,很难评价究竟强调移植过程中抗原配型带来的好处是否能抵消由此所付出的更多的努力、费用以及器官缺血时间延长可能导致的严重后果。

实验性证据

现在已经建立了一个用于研究抗原配型重要性的相当实用的大动物模型。过去 20 年来,已有 3 群部分近交系小型猪用于移植生物学的研究。每一种群中除 MHC (在猪体内称为 SLA)存在某一不同的等位基因,其他基因均呈纯合子[40];随后繁殖的子代采取随机种群内交配,以保证编码次要组织相容性抗原的基因位点的多样性。这样产生的种群内动物间器官移植过程,能模拟人类亲属间移植活动,如 HLA 配型相同或不

同的兄妹间移植。

在上述动物间进行皮肤及肾移植的研究结果见表 36.8 所示。对于皮肤移植，SLA 是否匹配对移植物存活影响不大；肾移植则不同，若 SLA 配型吻合，即使存在众多的次要组织相容性抗原不合，1/3 的肾移植在不用免疫抑制药物的条件下仍能存活。这种跨越次要组织相容性抗原差异性而介导肾移植排斥的能力，依赖于位于常染色体上具有显性遗传特点的 Ir 基因，该基因与 MHC 无关[494]。

现已鉴定出几类 NIH 小型猪单体型间 MHC 内重组子，从而可通过大动物间肾移植实验，实现关于 MHC Ⅰ 类及Ⅱ 类分子的匹配性对同种异体肾移植成功的影响力的研究[40]。MHC Ⅰ 类分子或 MHC Ⅱ类分子不匹配条件下的不同移植存活率见表 36.8 所示。在小鼠实验中，发现无论 MHC Ⅰ 类或 MHC Ⅱ 类分子不匹配均可诱导迅速的排斥反应；但肾移植中，MHC Ⅱ 类分子配型对移植转归则具有突出的作用。而且，往往很难区分次要组织相容性抗原及 MHC Ⅰ类分子的联合配型不合与 MHC Ⅰ 类分子单独配型不合对移植转归的影响。

表 36.8 小型猪未用免疫抑制治疗移植物存活与抗原不匹配的关系

	不匹配			
移植物	仅次要抗原	主要和次要抗原	Ⅰ类抗原[a]	Ⅱ类抗原[a]
皮肤	11.8±0.9	7.0±0.4	10.8±2.3	7.8±1.0
肾	30.0±15.0(2/3)	12±1.9	19.5±6.8(2/3)	21.8±10.4
	>120(1/3)	12.0	>120(1/3)	

[a]单一单体型不匹配。显示的存活时间单位为天。引自参考文献[40]。

这些未使用免疫抑制药物情况下的实验数据有助于指导临床研究。其表明了抗原配型有利于移植物存活的生物学基本原则，并进一步提示 MHC Ⅱ 类分子的配型可能尤为重要。虽然没有任何实验系统能完全解决临床的经验性问题，但从中获得的益处却是无法估量的。

1221

交叉配型

现有多种方法检测移植受体血清中是否预先存在特异性抗供体抗原抗体。首先，必须鉴定其血型。由于交叉血型移植特别易于诱发超急性排斥反应，所以临床移植必须满足供、受体血型相配。其中 A2 血型为一例外，能与其他任何血型相配[754]。其次，直接用受体移植前血清进行抗供体淋巴细胞试验，即交叉配型试验。交叉配型试验并不等同于以上讨论的抗原配型。如果交叉配型阴性，只能表明受体体内预先不存在抗供体细胞的抗体，但 HLA 配型却可能完全不吻合；相反，HLA 配型吻合却能增大供、受体交叉配型阴性的机会。因为若 HLA 不合，针对不同的 HLA 抗原就能产生大量的抗体。交叉反应通常采用抗体介导的补体依赖的细胞毒反应试验“二步法”。在许多医学中心，常采用间接加入抗人免疫球蛋白抗体以增加其细胞溶解敏感性[184, 755]。最近，流式细胞仪也可用于检测受体内预存抗体，但由于其敏感性过高，常无法更好地指导临床实践[756~758]。

器官移植中的致敏反应

因为肾和其他血管化脏器均不能植入有预存抗体的受体体内，那么，在临床移植中，或者避免能与供体抗原反应的抗体形成，或者选择某种供体，其不表达已致敏的受体中预存抗体所针对的 HLA 抗原。除抗血型抗原的抗体，受体对于移植抗原的敏感性通常是由于预先接触同种异型组织所致。此种情况常发生于输血后、前次器官移植术后，或者女性在妊娠及分娩时接触胚胎抗原。受体肾移植的敏感性可以通过检测其血清与携带诸多不同 HLA 抗原的淋巴细胞板的反应性来测量。此淋巴细胞板可通过筛选广泛携带不同 HLA 抗原的个体而获得其淋巴细胞。如果某移植候选人的血清能与板内大部分淋巴细胞反应，则称之为“高度致敏”。这一名词易引起免疫学的混乱，因为临床中“致敏”通常仅仅指 B 细胞的致敏过程，而不包括细胞介导的效应机制的致敏过程。高度致敏的肾移植候选人往往需要等待许多年乃至终生。

如果受体体内检测出抗 HLA 抗原的抗体，那么则不能接受表达此种 HLA 抗原的器官移植。将受体预先与 HLA 板反应能确定与预存抗体反应的抗原决定簇。大多数高度致敏的个体其体内的预存抗体主要可与 HLA 的公共表位结合，所以其异质性实际也很有限[759]。所以，对于特定受体，供体 HLA 抗原是否适合是可以精确预测的。所以，HLA 组织配型有助于交叉配型阴性的高敏感性候选受体选择供体肾脏。

移植候选受体的敏感性程度时常不稳定。所以，候选受体的交叉反应结果也可能随检验时间不同而截然不同。甚至，交叉配型阳性条件下的移植也有成功的事例[760]。

对于高敏感性的患者，现在可能的主要方法，或者耐心等待配型匹配的供体器官，或者等待敏感性的下降；至今，尚没有一种成熟的积极治疗方法，能有效地去除其体内的预存抗体。

排斥的诊断

在临床器官移植中，排斥反应最显著的后果就是移植器官的功能异常。虽然造成移植物功能异常的原因很多，但在增加免疫抑制治疗前弄清其免疫方面的因素尤为重要。临床上常依据移植物的功能情况协助诊断排斥反应的程度，但是，并没有任何临床现象能直接诊断移植排斥反应。所以，有必要建立一种基于系统性免疫机制的诊断来判断移植排斥反应的不同阶段。但遗憾的是，迄今尚无一种能很好监测移植排斥反应的手段，理想的方法应当包括：①抗供体抗体的检测；②抗供体抗原的细胞介导的免疫应答的检测。临床上常常是移植排斥反应一发生就进行抗体应答的检测，但实际上抗体应答往往发生于排斥反应完全启动后。同时，在体外实验中，当移植物在体内存在时，即使临床上发生排斥反应，体外实验常不一定能检测到增殖性或细胞毒性细胞反应，或检测到的反应强度与实际临床排斥反应发生的程度不相平行[761, 762]。另一方面，由于无论是体液免疫或细胞免疫的有效成分在体内可能被特异性的供体抗原所吸收，体外检测可能存在假阴性。当利用供体淋巴细胞作为免疫刺激成分体外检测免疫应答时，往往无法检测组织特异性抗原所引起的 T 细胞免疫应答。

1222

标准的同种异体移植排斥反应的诊断程序通常是进行移植器官活检。病理学家可鉴定移植物内异常的淋巴细胞浸润及其程度，对于某些器官，甚至可描述其免疫损伤的组织学特点[763~769]。一些病理学改变，包括血管内壁淋巴细胞浸润，常与排斥反应密切相关[769]。而对于非免疫因素病理改变的发现，也同样有助于临床治疗。

尽管全世界都依赖于病理活检监测排斥反应的发生，但是尤其是使用环孢素等免疫抑制药物后，鉴定排斥反应是否发生仍很困难。由于大多数活检时，移植脏器功能已有不同程度的下降，所以组织切片常观察到移植器官已发生排斥反应。但即便只能在某些病例的病理学检测中发现无排斥反应发生的情况，仍然能较好地反映排斥反应的诊断与治疗效果。当常规进行移植脏器的病理活检时，无论脏器功能是否异常，组织学改变并不能很好地反映移植排斥反应过程[770, 771]。在实验性研究中，同种异体皮肤移植中的淋巴细胞浸润程度，只能较好地反映个体间抗原差异，而不能很好地反映移植排斥反应的程度[285]。同时，在免疫耐受的实验性模型中，若已形成对供体的免疫耐受，即使严重的淋巴细胞浸润也不影响受体的存活[772]。这些研究结果提示，从病理学上检测的淋巴细胞浸润程度可能对诊断排斥的帮助并不大，但能反映治疗的需要。

免疫抑制的合适标准

尽管大多数移植受体患者即使使用免疫抑制药物仍可发生排斥反应，但也有某些患者在较小剂量的免疫抑制药物辅助下，不仅不发生排斥反应，而且移植器官功能良好，甚至，某些患者终止任何辅助治疗手段也能确保移植器官的存活。同时，临床上既有大剂量外源性免疫抑制药物也不能阻止的排斥反应，也有小剂量药物就造成显著免疫适应的情况。因此，免疫抑制药物的安全剂量是因人而异的。但迄今还没有一个很好的方法能确定个体的免疫抑制药物的需要用量及安全用量。

最近，关于环孢素免疫活性的生物学鉴定已见报道。受体的淋巴细胞用于检测其针对外来抗原诱发 $CD4^+$ 直接辅助应答、$CD8^+$ 直接辅助应答以及 $CD4^+$ 间接辅助应答。其中，产生直接应答的患者比仅仅发生

间接应答者将经历更严重的排斥反应[36, 773]。像这样改良的实验,尤其是针对供体的特异性反应实验,将有助于为某一特定患者制定更适合的免疫抑制治疗方案。

结论

编写任何教科书的最大的困难在于总结我们自以为已了解的知识,但这些知识却往往阻碍我们对于更多的未知知识的认识。近年来,在主要组织相容性抗原的研究领域中取得了巨大的进展,但是对于大量编码次要组织相容性抗原的基因,我们还知之甚少。尽管最近我们已认识到 APC 细胞在 T 细胞致敏过程中的重要作用,但仍不能很好地解释同种异型抗原的间接识别机制在移植排斥反应中的作用。在过去的 20 年里,关于 CTL 细胞的发育及其在移植排斥反应中可能发挥的作用,我们也已有所了解,可也不能排除非细胞毒性因素,如细胞因子的作用。在本章的最后,我们简要地介绍了实验性诱导同种异型免疫耐受的几种技术手段,但在人体常规的器官移植中,还是不能离开非特异性免疫抑制治疗。当然,勿庸质疑,移植免疫学及免疫学其他基础领域中的重大突破终将指引临床器官移植的进步。

(杨　劲 译　周镜然 校)

参考文献

1. Russell PS, Monaco AP, eds. *The biology of tissue transplantation.* Boston: Little, Brown, 1965.
2. Morris PS. *Tissue transplantation.* New York: Churchill Livingstone, 1982.
3. Bach FH, Sachs DH. Transplantation immunology. *N Engl J Med* 1987;317:489–492.
4. Rogers BO. Transplantation of skin. In: Peer LA, ed. *Transplantation of tissues.* Baltimore: Williams and Wilkins, 1959:75.
5. Woodruff MFA, ed. *The transplantation of tissues and organs.* Springfield, IL: Charles C. Thomas Publisher, 1960.
6. Gibson T. Zoografting: a curious chapter in the history of plastic surgery. *Br J Plast Surg* 1955;8:234.
7. Billingham RE. Transplantation: past, present and future. *J Invest Dermatol* 1963;41:165.
8. Voronoff S, ed. *Rejuvenation by grafting.* London: George Allen and Unwin, 1925.
9. Carrel A. Transplantation in mass of the kidneys. *J Exp Med* 1908;10:98.
10. Converse JM, Casson PR. The historical background of transplantation. In: Rapaport FT, Dausset J, eds. *Human transplantation.* New York: Grune & Stratton, 1968:7.
11. Medawar PB. The immunology of transplantation. *Harvey Lectures* 1958; 1956–1957:144.
12. Lawler RH, et al. Homotransplantation of the kidney in the human. *JAMA* 1950;147:844.
13. Servelle M. La greffe du rein. *Rev Chir* 1951;70:186.
14. DuBost C. Resultats d'une tentative de greffe renale. *Bull Memoirs Soc Med* 1951;67:1372.
15. Kuss R. Quelques essais de greffe du rein chez l'homme. *Mem Acad Chir* 1951;77:755.
16. Hume DM, Merrill JP, Miller BF. Homologous transplantation of the human kidney. *J Clin Invest* 1952;31:640.
17. Hume DM, Merrill JP, Miller BF, Thorn GW. Experience with renal homotransplantation in the human: report of 9 cases. *J Clin Invest* 1955;34:327–382.
18. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. Successful homotransplantation of human kidney between identical twins. *JAMA* 1956;160:277–282.
19. Groth CG. Landmarks in clinical renal transplantation. *Surg Gynecol Obstet* 1972;134:323.
20. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat* 1943;77:299.
21. Medawar PB. The behavior and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. *J Anat* 1944;78:176–199.
22. Billingham RE, Brent L, Medawar PB, Sparrow EM. Quantitative studies of transplantation immunity. I. Survival times of skin homografts exchanged between members of different inbred strains of mice. *Proc R Soc Lond [Biol]* 1954;143:43–58.
23. Medawar PB. Second study of behaviour and fate of skin homografts in rabbits. *J Anat* 1945;79:157.
24. Little CC. The genetics of tissue transplantation in mammals. *Cancer Res* 1924;8:75–95.
25. Little CC. A possible mendelian explanation for a type of inheritance apparently non-Mendelian in nature. *Science* 1914;40:904–906.
26. Little CC, Typper EE. Further studies on inheritance of susceptibility to a transplantable tumor of Japanese waltzing mice. *J Med Res* 1916;33:393.
27. Bailey DW. Four approaches to estimating number of histocompatibility loci. *Transplant Proc* 1970;2:32–38.
28. Bailey DW, Mobraaten LE. Estimates of the number of loci contributing to the histoincompatibility between C57BL/6 and BALB/c strains of mice. *Transplantation* 1969;7:394–400.
29. Barnes AD, Krohn PL. Estimation of number of histocompatibility genes controlling successful transplantation of normal skin in mice. *Proc R Soc Lond [Biol]* 1957;146:505–526.
30. Billingham RE, Hodge BA, Silvers WK. Estimate of number of hitocompatibiltiy loci in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962;48:422–433.
31. Little CC. The genetics of tumor transplantation. In: Snell GD, ed. Biology of the laboratory mouse, 1st ed. New York: Dover Publications, 1941:279–309.
32. Stimpfling JH, Reichert AE. Strain C57BL/10ScSn and its congenic resistant sublines. *Transplant Proc* 1970;2:39.
33. Bach FH, Widmer MB, Bach ML, Klein J. Serologically defined and lymphocyte-defined components of the major histocompatibility complex in the mouse. *J Exp Med* 1972;136:1430.
34. Lerner EA, Matis LA, Janeway CA, Jones PP, Schwartz RH, Murphy DB. Monoclonal antibody against an Ir gene product. *J Exp Med* 1980;152:1085.
35. Caughman SW, Sharrow SO, Shimad S, et al. Ia+ murine epidermal Langerhans cells are deficient in surface expression of class I MHC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:7438–7442.
36. Harris HW, Gill TJ. Expression of class I transplantation antigens. *Transplantation* 1986;42:109.
37. Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris PJ. The detailed distribution of MHC class II antigens in normal human organs. *Transplantation* 1984;38:293.
38. Glimcher LH, Kara CJ. Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Ann Rev Immunol* 1992;10:13–49.
39. Pescovitz MD, Sachs DH, Lunney JK, Hsu S-M. Localization of class II MHC antigens on porcine renal vascular endothelium. *Transplantation* 1984;37:627–30.
40. Pescovitz MD, Thistlethwaite JR Jr, Auchincloss H Jr, et al. Effect of class II antigen matching of renal allograft survival in miniature swine. *J Exp Med* 1984;160:1495–1508.
41. Rosenberg A, Mizuochi T, Singer A. Analysis of T-cell subsets in rejection of Kb mutant skin allografts differing at class I MHC. *Nature* 1986;322:829–831.
42. Fischer Lindahl K, Wilson DB. Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes II. Estimates of frequency and specificity of precursors. *J Exp Med* 1977;145:508–522.
43. Teh HS, Harley E, Phillips RA, Miller RG. Quantitative studies on the precursors of cytotoxic lymphocytes I. Characterization of a clonal assay and determination of the size of clones derived from single precursors. *J Immunol* 1977;118:1049–1056.
44. Heber-Katz E, Schwartz RH, Matis LA, et al. Contribution of antigen-presenting cell major histocompatibility complex gene products to the specificity of

antigen-induced T cell activation. *J Exp Med* 1982;155:1086–1099.
45. Hunig T, Bevan MJ. Specificity of T-cell clones illustrates altered self hypothesis. *Nature* 1981;294:460–62.
46. Ben-Nun A, Lando Z, Dorf MA, Burakoff SJ. Analysis of cross-reactive antigen-specific T cell clones: specific recognition of two major histocompatibility complex (MHC) and two non-MHC antigens by a single clone. *J Exp Med* 1983; 157:2147–2153.
47. Zinkernagel RM, Callahan GN, Cooper AS, Klein PA, Klein J. On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition. *J Exp Med* 1978;147:882.
48. Jerne NK. The somatic generation of immune recognition. *Eur J Immunol* 1971;1:1–9.
49. Blackman M, Yague J, Kubo R, et al. The T cell repertoire may be biased in favor of MHC recognition. *Cell* 1986;47:349–57.
50. Kappler JW, Wade T, White J, et al. A T cell receptor V beta segment that imparts reactivity to a class II major histocompatibility complex product. *Cell* 1987;49:263–271.
51. Zerrahn J, Held W, Raulet DH. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell* 1997;88:627.
52. Surh CD, Lee D-S, Fung-Leung W, Karlsson L, Sprent J. Thymic selection by a single MHC/peptide ligand produces a semidiverse repertoire of CD4+ T cells. *Immunity* 1997;7:209.
53. Bevan MJ. In thymic selection, peptide diversity gives and takes away. *Immunity* 1997;7:175.
54. Tourne S, Miyazaki T, Oxenius A, et al. Selection of a broad repertoire of CD4+ T cells in H-2Ma0/0 mice. *Immunity* 1997;7:187.
55. Grubin CE, Kovats S, deRoos P, Rudensky AY. Deficient positive selection of CD4 T cells in mice displaying altered repertoires of MHC class II-bound self-peptides. *Immunity* 1997;7:197.
56. Sprent J, Lo D, Gao EK, Ron Y. T cell selection in the thymus. *Immunol Rev* 1988;101:173–190.
57. Bevan MJ. High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunol Today* 1984;5:128–30.
58. Matzinger P, Bevan MJ. Why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility complex antigens? *Cell Immunol* 1977;29:1.
59. Berkowitz N, Braunstein NS. T cell responses specific for subregions of allogenic MHC molecules. *J Immunol* 1992;148:309–317.
60. Muellbacher A, Hill AB, Blanden RV, Cowden WB, King NJC, Tha Hla R. Alloreactive cytotoxic T cells recognize MHC class I antigen without peptide specificity. *J Immunol* 1991;147:1765–1772.
61. Smith PA, Brunmark A, Jackson MR, Potter TA. Peptide-independent recognition by alloreactive cytotoxic T lymphocytes (CTL). *J Exp Med* 1997;185: 1023–1033.
62. Demotz S, Sette A, Sakaguchi K, Buchner R, Appella E, Grey HM. Self peptide requirement for class II major histocompatibility complex allorecognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:8730–8734.
63. Heath WR, Kane KP, Mescher MF, Sherman LA. Alloreactive T cells discriminate among a diverse set of endogenous peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5101–5105.
64. Roetzschke O, Falk K, Faath S, Rammensee H-G. On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity. *J Exp Med* 1991;174:1059–1071.
65. Weber DA, Terrell NK, Zhang Y, et al. Requirement for peptide in alloreactive CD4+ T cell recognition of class II MHC molecules. *J Immunol* 1995;154: 5153–5164.
66. Alexander-Miller MA, Burke K, Koszinowski UH, Hansen TH, Connolly JM. Alloreactive cytotoxic T lymphocytes generated in the presence of viral-derived peptides show exquisite peptide and MHC specificity. *J Immunol* 1993;151: 1–10.
67. Smith KD, Huczko E, Engelhard VH, Li Y-Y, Lutz CT. Alloreactive cytotoxic T lymphocytes focus on specific major histocompatibility complex-bound peptides. *Transplantation* 1997;64:351–9.
68. Graff RJ, Bailey DW. The non-H-2 histocompatibility loci and their antigens. *Transplant Rev* 1973;15:26.
69. Loveland B, Simpson E. The non-MHC transplantation antigens: neither weak nor minor. *Immunol Today* 1986;7:223–229.
70. Simpson E. Non–H-2 histocompatibiltiy antigens: can they be retroviral products? *Immunol Today* 1987;8:176–177.
71. Roopenian DC, Widmer MB, Orosz CG, Bach FH. Response against single minor histocompatibility antigens. I. Functional immunogenetic analysis of cloned cytolytic T cells. *J Immunol* 1983;131:2135–2140.
72. Roopenian DC, Orosz CG, Bach FH. Responses against single histocompatibility antigens. II. Analysis of cloned helper T cells. *J Immunol* 1984;132: 1080–1084.
73. Tekolf WA, Shaw S. Primary in vitro generation of cytotoxic cells specific for human minor histocompatibility antigens between HLA-identical siblings. *J Immunol* 1984;132:1756–1760.
74. Czitrom AA, Gascoigne NR, Edwards S, Waterfield DJ. Induction of minor alloantigen-specific T cell subsets in vivo: recognition of processed antigen by helper but not by cytotoxic T cell precursors. *J Immunol* 1984;133:33–39.
75. Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 1976;143:1283.
76. Wallny H-J, Rammensee H-G. Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide. *Nature* 1990;343:275–278.
77. Elliott T, Townsend A, Cerundolo V. Naturally processed peptides. *Nature* 1990;348:195–197.
78. Falk K, Rotzschke O, Rammensee H-G. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 1990;348: 248–251.
79. Lai PK. Waterfield JD, Gascoigne NR, Sharrock CE, Mitchison NA. T-cell responses to minor histocompatibility antigens. *Immunology* 1982;47:371–81.
80. Roopenian DC. What are minor histocompatibility loci? A new look at an old question. *Immunol Today* 1992;13:7–10.
81. Elkins WL. Decreased immunogenicity of a transplantation antigen in hosts sensitized to other isoantigens of its cellular vehicle. *J Immunol* 1964;92:275.
82. Johnson LL, Bailey DW, Mobraaten LE. Antigenic competition between minor (non–H-2) histocompatibility antigens. *Immunogenetics* 1981;13:451–455.
83. Wettstein PJ, Bailey DW. Immunodominance in the immune response to "multiple" histocompatibility antigens. *Immunogenetics* 1982;16:47–58.
84. Wettstein PJ. Immunodominance in the T cell response to multiple non–H-2 histocompatibility antigens III. Single histocompatibility antigens dominate the male antigen. *J Immunol* 1986;137:2073.
85. Lai PK. Antigen competition in cytotoxic T cell response to minor histocompatibility antigens. *Transplantation* 1985;39:638–643.
86. Nevala WK, Wettstein PJ. The preferential cytolytic T lymphocyte response to immunodominant minor histocompatibility antigen peptides. *Transplantation* 1996;62:283–291.
87. Roopenian DC, Widmer MB, Orosz CG, Bach FH. Helper cell-independent cytolytic T lymphocytes specific for a minor histocompatibility antigen. *J Immunol* 1983;130:542–545.
88. Rammensee HG, Klein J. Complexity of the histocompatibility-3 region in the mouse. *J Immunol* 1983;130:2926–2929.
89. Juretic A, Vucak I, Malenica B, Nagy ZA, Klein J. H-41, a new histocompatibility locus. I. Histogenetic analysis. *J Immunol* 1984;133:2950–2954.
90. Ichikawa H, Suzuki H, Hino T, Kubota E, Saito K. In vivo priming of mouse CTL precursors directed to product of a newly defined minor H-42 locus is under a novel control of class II MHC gene. *J Immunol* 1985;135:3681–3685.
91. Gordon RD, Simpson E, Samelson LE. In vitro cell-mediated immune responses to the male specific (H-Y) antigen in mice. *J Exp Med* 1975;142:1108.
92. Simpson E, Gordon RD. Responsiveness to H-Y antigen, Ir gene complementation, and target cell specificity. *Immunol Rev* 1977;35:59.
93. Simpson E. The role of H-Y as a minor transplantation antigen. *Immunol Today* 1982;3:97–106.
94. Roopenian DC, Davis AP, Christianson GJ, Mobraaten LE. The functional basis of minor histocompatibility loci. *J Immunol* 1993;151:4595–4605.
95. Schorle H, Holtschke T, Hunig T, Schimpl A, Horak I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 1991;352:621–624.
96. Arase-Fukushi N, Arase H, Ogasawara K, Good RA, Onoe K. Production of minor lymphocyte stimulatory-1a antigen from activated CD4- or CD8- T cells. *J Immunol* 1993;151:4445–4454.
97. Jarvis CD, Germain RN, Hager GL, Damschroder M, Matis LA. Tissue-specific expression of messenger RNAs encoding endogenous viral superantigens. *J Immunol* 1994;152:1032–1038.
98. Moore NC, Anderson G, McLoughlin DEJ, Owen JJT, Jenkinson EJ. Differential expression of Mtv loci in MHC class II-positive thymic stromal cells. *J Immunol* 1994;152:4826–4831.
99. Ardavin C, Waanders G, Ferrero I, Anjurere F, Acha-Orbea H, MacDonald HR. Expression and presentation of endogenous mouse mammary tumor virus superantigens by thymic and splenic dendritic cells and B cells. *J Immunol* 1996;157: 2789–2794.
100. Steinmuller D, Wachtel SS. Transplantation biology and immunogenetics of murine skin-specific (Sk) alloantigens. *Transplant Proc* 1980;12:100.
101. Rosengard BR, Kortz EO, Ojikutu CA, et al. The failure of skin grafting to break tolerance to class I–disparate renal allografts in miniature swine despite inducing marked antidonor cellular immunity. *Transplantation* 1991;52: 1044–1052.
102. Lorenz R, Allen PM. Processing and presentation of self proteins. *Immunol Rev* 1988;106:115–127.
103. Hadley GA, Rostapshova EA, Bartlett ST. Dominance of tissue-restricted cytotoxic T lymphocytes in the response to allogeneic renal epithelial cell lines. *Transplantation* 1996;62:75–83.
104. Bonomo A, Matzinger P. Thymus epithelium induces tissue-specific tolerance. *J Exp Med* 1993;177:1153–1164.
105. Race RR, Sanger R, eds. Blood groups in man. Oxford, England: Blackwell Scientific, 1958.
106. Oriol R. Tissular expression of ABH and Lewis antigens in humans and animals: expected value of different animal models in the study of ABO-incompatible organ transplants. *Transplant Proc* 1987;19:4416.
107. Szulman AE. The histological distribution of the blood group substances in man as disclosed by immunofluorescence. II. The H antigen and its relation to A and B antigens. *J Exp Med* 1962;115:977–996.

108. Joyce S, Mathew JM, Flye MW, Mohanakumar T. A polymorphic human kidney-specific non-MHC alloantigen. Its possible role in tissue-specific allograft immunity. *Transplantation* 1992;53:1119–1127.
109. Platt JL, Bach FH. The barrier to xenotransplantation. *Transplantation* 1991;52: 937–947.
110. Fischel RJ, Bolman RM III, Platt JL, Najarian JS, Bach FH, Matas AJ. Removal of IgM anti-endothelial antibodies results in prolonged cardiac xenograft survival. *Transplant Proc* 1990;22:1077–1078.
111. Kiessling R, Hochman PS, Haller O, Shearer GM, Wigzell H, Cudkowicz G. Evidence for a similar or common mechanism for natural killer activity and resistance to hemopoietic grafts. *Eur J Immunol* 1977;7:655–663.
112. Lafferty KJ, Bootes A, Dart G, Talmage DW. Effect of organ culture on the survival of thyroid allografts in mice. *Transplantation* 1976;22:138–149.
113. Lafferty K, Prowse S, Simeonovic C, Warren HS. Immunobioloby of tissue transplantation: a return to the passenger leucocyte concept. In: Paul WE, Fathman CG, Metzgar H, eds. *Annual review of immunology*. Palo Alto, CA: Annual Reviews, Inc., 1983:143–173.
114. Sollinger HW, Burkholder PM, Rasmus WR, Bach FH. Prolonged survival of xenografts after organ culture. *Surgery* 1977;81:74.
115. Lechler R, Batchelor J. Restoration of immunogeneity to passenger cell depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med* 1982;155:31–41.
116. Faustman D, Hauptfeld V, Lacy P, Davie J. Prolongation of murine islet allograft survival by pretreatment of islets with antibody directed to Ia determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:5156–5159.
117. Steinman RM. Dendritic cells. *Transplantation* 1981;31:151.
118. Faustman D, Steinman R, Gebel H, Hauptfeld V, Davie J, Lacy P. Prevention of rejection of murine islet allografts by pre-treatment with anti-dendritic cell antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:3864–3868.
119. Glimcher LH, Kim KJ, Green I, Paul WE. Ia antigen-bearing B cell tumor lines can present protein antigen and alloantigen in a major histocompatibility complex–restricted fashion to antigen-reactive T cells. *J Exp Med* 1982;155:445–59.
120. Janeway CA, Ron J, Katz ME. The B cell is the initiating antigen-presenting cell in peripheral lymph nodes. *J Immunol* 1987;138:1051–1055.
121. Ron Y, Sprent J. T cell priming in vivo: a major role for B cells in presenting antigen to T cells in lymph nodes. *J Immunol* 1987;138:2848–2856.
122. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271–296.
123. Skoskievicz MJ, Colvin RB, Schneeberger EE, Russell PS. Widespread and selective induction of MHC-determined antigens in vivo by interferon-gamma. *J Exp Med* 1985;162:1645–1664.
124. Benson EM, Colvin RB, Russell PS. Induction of Ia antigens in murine renal transplants. *J Immunol* 1985;134:7.
125. Pober JS, Collins T, Gimbrone MA Jr, Libby P, Reiss CS. Inducible expression of class II major histocompatibility complex antigens and the immunogeneicity of vascular endothelium. *Transplantation* 1986;41:141–146.
126. La Rosa FG, Talmage DW. Synergism between minor and major histocompatibility antigens in the rejection of cultured allografts. *Transplantation* 1985;39: 480–485.
127. Parker KE, Dalchau R, Fowler VJ, Priestley CA, Carter CA, Fabre JW. Stimulation of $CD4^+$ T lymphocytes by allogenic MHC peptides presented on autologous antigen-presenting cells. *Transplantation* 1992;53:918–924.
128. Woodward JG, Shegekawa JA, Frelinger JA. Bone marrow–derived cells are responsible for stimulating I region-incompatible skin graft rejection. *Transplantation* 1982;33:254.
129. Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 1979;282:324–326.
130. Chen H-D, Raab S, Silvers WK. Influence of major-histocompatibility-complex–compatible and incompatibile Langerhans cells on the survival of H-Y–incompatible skin grafts in rats. *Transplantation* 1985;40:194.
131. Chen H-D, Silvers WK. Influence of Langerhans cells on the survival of H-Y incompatible skin grafts in rats. *J Invest Dermatol* 1983;81:20–23.
132. Gouw AS, Houthoff HJ, Huitema S, Beelen JM, Gips CH, Poppema S. Expression of major histocompatibility complex antigens and replacement of donor cells by recipient ones in human liver grafts. *Transplantation* 1987;43:291–296.
133. Barker CF, Billingham RE. The role of regional lymphatics in the skin homograft response. *Transplantation* 1967;5:962.
134. Tilney NL, Gowans JL. The sensitization of rats by allografts transplanted to alymphatic pedicles of skin. *J Exp Med* 1971;133:951.
135. Hume DM, Egdahl RH. Progressive destruction of renal homografts isolated from the regional lymphatics of the host. *Surgery* 1955;38:194.
136. Pedersen NC, Morris B. The role of the lymphatic system in the rejection of homografts: a study of lymph from renal transplants. *J Exp Med* 1970;131: 936–969.
137. Kraal G, Breel M, Janse M, Bruin G. Langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1986;163:981–997.
138. Dustin ML, Springer TA. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Ann Rev Immunol* 1991;9:27–66.
139. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425–34.
140. Kirby JA, Cunningham AC. Intragraft antigen presentation: the contribution of bone-marrow derived, epithelial and endothelial presenting cells. *Transplant Rev* 1997;11:127–140.
141. Strober S, Gowans JL. The role of lymphocytes in the sensitization of rats to renal allografts. *J Exp Med* 1965;122:347.
142. van den Bogaerde J, Aspinall R, Wang M-W, et al. Induction of long-term survival of hamster heart xenografts in rats. *Transplantation* 1991;52:15–20.
143. Cramer DV, Chapman FA, Jaffee BD, et al. The prolongation of concordant hamster-to-rat cardiac xenografts by brequinar sodium. *Transplantation* 1992;54: 403–408.
144. Xiao F, Chong AS, Foster P, et al. Leflunomide controls rejection in hamster to rat cardiac xenografts. *Transplantation* 1994;58:828–834.
145. Manning DD, Reed ND, Shaffer CF. Maintenance of skin xenografts of widely divergent phylogenetic origin on congenitally athymic (nude) mice. *J Exp Med* 1973;138:488.
146. Rosenberg AS, Mizuochi T, Sharrow SO, Singer A. Phenotype, specificity, and function of T cell subsets and T cell interactions involved in skin allograft rejection. *J Exp Med* 1987;165:1296.
147. Sprent J, Schaefer M, Lo D, Korngold R. Properties of purified T cell subsets. II. In vivo responses to class I vs. class II H-2 differences. *J Exp Med* 1986;163: 998–1011.
148. Cosimi AB, Burton RC, Colvin RB, et al. Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. *Transplantation* 1981;32:535–539.
149. Auchincloss H Jr, Ghobrial RRM, Russell PS, Winn HJ. Anti-L3T4 in vivo prevents alloantibody formation after skin grafting without prolonging graft survival. *Transplantation* 1988;45:1118–1123.
150. Keene J-A, Forman J. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1982;155:768.
151. Karlhofer FM, Ribaudo RK, Yokoyama WM. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49- IL-2–activated natural killer cells. *Nature* 1992;358:66–70.
152. Moretta L, Ciccone E, Moretta A, Hoglund P, Ohlen C, Karre K. Allorecognition by NK cells: nonself or no self? *Immunol Today* 1992;13:300–306.
153. Lee LA, Sergio JJ, Sykes M. Natural killer cells weakly resist engraftment of allogeneic long-term multilineage-repopulating hematopoietic stem cells. *Transplantation* 1996;61:125–132.
154. Sharabi Y, Aksentijevich I, Sundt TM III, Sachs DH, Sykes M. Specific tolerance induction across a xenogeneic barrier: production of mixed rat/mouse lymphohematopoietic chimeras using a nonlethal preparative regimen. *J Exp Med* 1990;172:195–202.
155. Sharabi Y, Sachs DH. Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a non-lethal preparative regimen. *J Exp Med* 1989;169: 493–502.
156. Bix M, Liao NS, Zijlstra M, Loring J, Jaenisch R, Raulet DH. Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature* 1991;349:329.
157. Zijlstra M, Auchincloss H Jr, Loring JM, Chase CM, Russell PS, Jaenisch R. Skin graft rejection by beta2-microglobulin–deficient mice. *J Exp Med* 1992;175:885–893.
158. Renard V, Cambiaggi A, Vely F, et al. Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol Rev* 1997;155:205–221.
159. Hoglund P, Sundback J, Olsson-Alheim MY, et al. Host MHC class I gene control of NK cell specificity in the mouse. *Immunol Rev* 1997;155:11–28.
160. Goodman DJ, Millan MT, Ferran C, Bach FH. Mechanisms of delayed xenograft rejection. In: Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG, eds. *Xenotransplantation*. Heidelberg: Springer, 1997:77.
161. Inverardi L, PC, Stolzer AL, Bender JR, Sandrin MS, Pardi R. Human natural killer lymphocytes directly recognize evolutionarily conserved oligosaccharide ligands expressed by xenogeneic tissue. *Transplantation* 1997;63:1318–1330.
162. Sykes M, Harty MW, Karlhofer FM, Pearson DA, Szot G, Yokoyama W. Hematopoietic cells and radioresistant host elements influence natural killer cell differentiation. *J Exp Med* 1993;178:223–229.
163. Johansson MH, Bieberich C, Jay G, Karre K, Hoglund P. Natural killer cell tolerance in mice with mosaic expression of major histocompatibility complex I transgene. *J Exp Med* 1997;186:353–364.
164. Held W, Raulet DH. Ly49A transgenic mice provide evidence for a major histocompatibility complex-dependent education process in natural killer cell development. *J Exp Med* 1997;185:2079–2088.
165. Sykes M. Unusual T cell populations in adult murine bone marrow: prevalence of $CD3^+CD4^-CD8^-$ and $\alpha\beta TCR^+NK1.1^+$ cells. *J Immunol* 1990;145:3209–3215.
166. Kikly K, Dennert G. Evidence for extrathymic development of TNK cells. $NK1^+CD3^+$ cells responsible for acute marrow graft rejection are present in thymus-deficient mice. *J Immunol* 1992;149:403–412.
167. Sato K, Ohtsuka K, Hasegawa K, et al. Evidence for extrathymic generation of intermediate T cell receptor cells in the liver revealed in thymectomized, irradiated mice subjected to bone marrow transplantation. *J Exp Med* 1995;182:759–767.
168. Yoshimoto T, Paul WE. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med* 1994;179: 1285–1295.
169. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse $NK1^+$ T lymphocytes. *Science* 1995;268:863–865.

170. Porcelli S, Brenner MB, Greenstein JL, Balk SP, Terhorst C, Bleicher PA. Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4⁻CD8⁻ cytolytic T lymphocytes. *Nature* 1989;341:447–450.
171. Schmidt-Wolf IGH, Lefterova P, Johnston V, Huhn D, Blume KG, Negrin RS. Propagation of large numbers of T cells with natural killer cell markers. *Br J Hematol* 1994;87:453–458.
172. Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor α chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4⁺ and CD4⁻8⁻ T cells in mice and humans. *J Exp Med* 1994;180:1097–1106.
173. Bendelac A. CD1: presenting unusual antigens to unusual T lymphocytes. *Science* 1995;269:185–186.
174. Yankelevich B, Knobloch C, Nowicki M, Dennert G. A novel cell type responsible for marrow graft rejection in mice. T cells with NK phenotype cause acute rejection of marrow grafts. *J Immunol* 1989;142:3423–3430.
175. Blakely ML, Van Der Werf W, Berndt MC, Dalmasso AP, Bach FH, Hancock WW. Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection. *Transplantation* 1994;58:1059–1066.
176. Myburgh JA, Cohen I, Gecelter L, et al. Hyperacute rejection in human-kidney allografts: Shwartzman or Arthus reaction? *N Engl J Med* 1969;281:131–135.
177. Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, Reif SA, Bolman RM, Bach FH. Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation* 1991;52:214–220.
178. Platt JL, Bach FH. The barrier to xenotransplantation. *Transplantation* 1991; 52:937–947.
179. Pruitt SK, Baldwin WM III, Barth RN, Sanfilippo F. The effect of xenoreactive antibody and B cell depletion on hyperacute rejection of guinea pig-to-rat cardiac xenografts. *Transplantation* 1993;56:1318–1324.
180. Dalmasso AP, Vercellotti GM, Platt JL, Bach FH. Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. *Transplantation* 1991;52:530–533.
181. Borche L, Thibaudeau K, Navenot J-M, Soulillou J-P, Blanchard D. Cytolytic effect of human anti-Gal IgM and complement on porcine endothelial cells: a kinetic analysis. *Xenotransplantation* 1994;1:125–131.
182. Platt JL, Vercellotti GM, Lindman BJ, Oegema TR Jr, Bach FH, Dalmasso AP. Release of heparan sulfate from endothelial cells: implications for pathogenesis of hyperacute rejection. *J Exp Med* 1990;171:1363–1368.
183. Auchincloss H Jr. Xenogeneic transplantation. A review. *Transplantation* 1988; 46:1–20.
184. Fuller TC, Cosimi AB, Russell PS. Use of an antiglobulin-ATG reagent for detection of low levels of alloantibody—improvement of allograft survival in presensitized recipients. *Transplant Proc* 1978;10:463.
185. Alexandre GPJ, Squifflet JP, De Bruyere M, et al. Present experiences in a series of 26 ABO-incompatible living donor renal allografts. *Transplant Proc* 1987;19: 4538.
186. Gordon RD, Fung JJ, Markus B, et al. The antibody crossmatch in liver transplantation. *Surgery* 1986;100:705–715.
187. Gordon RD, Iwatsuki S, Esquivel CO, Tzakis A, Todo S, Starzl TE. Liver transplantation across blood groups. *Surgery* 1986;100:342–348.
188. Doyle HR, Marino IR, Morelli F, et al. Assessing risk in liver transplantation: special reference to the significance of a positive cytotoxic crossmatch. *Ann Surg* 1996;224:168–177.
189. Jooste SV, Colvin RB, Soper WD, Winn HJ. The vascular bed as the primary target in the destruction of skin grafts by antiserum. I. Resistance of freshly-placed skin grafts to antiserum. *J Exp Med* 1981;154:1319–1331.
190. Baldamus CA, McKenzie IFC, Winn HJ, Russell PS. Acute destruction by humoral antibody of rat skin grafted to mice. *J Immunol* 1973;110:1532–1541.
191. Pierson RN III, Winn HJ, Russell PS, Auchincloss H Jr. Xenogeneic skin graft rejection is expecially dependent on CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1989;170: 991–996.
192. Ricordi C, Kneteman NM, Scharp DW, Lacy PE. Transplantation of cryopreserved human pancreatic islets into diabetic nude mice. *World J Surg* 1988;12: 861–865.
193. Ricordi C, Scharp DW, Lacy PE. Reversal of diabetes in nude mice after transplantation of fresh and 7-day-cultured (24 degrees C) human pancreatic islets. *Transplantation* 1988;45:994–996.
194. Falqui L, Finke EH, Carel J-C, Scharp DW, Lacy PE. Marked prolongation of human islet xenograft survival (human-to-mouse) by low-temperature culture and temporary immunosuppression with human and mouse anti-lymphocyte sera. *Transplantation* 1991;51:1322–1324.
195. Aksentijevich I, Sachs DH, Sykes M. Natural antibodies against bone marrow cells of a concordant xenogeneic species. *J Immunol* 1991;147:79–85.
196. Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody. Analysis using the Banff grading schema. *Transplantation* 1996;61: 1586–1592.
197. Platt JL. The immunological barriers to xenotransplantation. *Crit Rev Immunol* 1996;16:331–358.
198. Bach FH, Ferran C, Hechenleitner P, et al. Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nature Med* 1997;3:196–204.
199. Millan MT, Geczy C, Stuhlmeier KM, Goodman DJ, Ferran C, Bach FH. Human monocytes activate porcine endothelial cells, resulting in increased E-selectin, interleukin-8, monocyte chemotactic protein-1, and plasminogen activator inhibitor-type-1 expression. *Transplantation* 1997;63:421–429.
200. Kopp CW, Siegel JB, Hancock WW, et al. Effect of porcine endothelial tissue factor pathway inhibitor on human coagulation factors. *Transplantation* 1997; 63:749–758.
201. Lesnikoski B-A, Candinas D, Otsu I, Metternich R, Bach FH, Robson SC. Thrombin inhibition in discordant xenograft rejection. *Xenotransplantation* 1997;4:140–146.
202. Dorling A, Stocker C, Tsao T, Haskard DO, Lechler RI. In vitro accommodation of immortalized porcine endothelial cells: resistance to complement mediated lysis and down-regulation of VCAM expression induced by low concentrations of polyclonal human IgG antipig antibodies. *Transplantation* 1996;62: 1127–1136.
203. The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1996;61: 1029–1037.
204. Auchincloss H Jr, Mayer T, Ghobrial R, Winn HJ. T cell subsets, bm mutants, and the mechanism of allogeneic skin graft rejection. *Immunol Res* 1989;8:149–164.
205. Mizuochi T, Golding H, Rosenberg AS, Glimcher LH, Malek TR, Singer A. Both L3T4⁺ and Lyt-2⁺ helper T cells initiate cytotoxic T lymphocyte responses against allogeneic major histocompatibility antigens but not against trinitrophenyl-modified self. *J Exp Med* 1985;162:427–443.
206. Mizuochi T, Munitz TI, McCarthy S, et al. Differential helper and effector responses of Lyt-2 T cells to H-2Kb mutant (Kbm) determinants and the appearance of thymic influence on anti-Kbm CTL responsiveness. *J Immunol* 1986; 137:2740–2747.
207. Mizuochi T, Ono S, Malek TR, Singer A. Characterization of two distinct primary T cell populations that secrete interleukin 2 upon recognition of class I or class II major histocompatibility antigens. *J Exp Med* 1986;163:603–619.
208. Golding H, Mizuochi T, McCarthy SA, Cleveland CA, Singer A. Relationship among function, phenotype, and specificity in primary allospecific T cell populations: identification of phenotypically identical but functionally distinct primary T cell subsets that differ in their recognition of MHC class I and class II allodeterminants. *J Immunol* 1987;138:10–17.
209. Singer A, Munitz TI, Golding H, Rosenberg AS, Mizuochi T. Recognition requirements for the activation, differentiation, and function of T-helper cells specific for class I MHC alloantigens. *Immunol Rev* 1987;98:143–170.
210. Sprent J, Schaefer M. Properties of purified T cell subsets. I. In vitro responses to class I and class II H-2 alloantigens. *J Exp Med* 1985;162:2068–2088.
211. McCarthy SA, Singer A. Recognition of MHC class I allodeterminants regulates the generation of MHC class II-specific CTL. *J Immunol* 1986;137:3087–3092.
212. Mizuochi T, Hugin AW, Morse HC, Singer A, Buller RML. Role of lymphokine-secreting CD8⁺ T cells in cytotoxic T lymphocyte responses against vaccinia virus. *J Immunol* 1989;142:270–273.
213. Heath WR, Kjer-Nielsen L, Hoffmann MW. Avidity for antigen can influence the helper dependence of CD8- T lymphocytes. *J Immunol* 1993;151:5993–6001.
214. Wheelahan J, McKenzie IFC. The role of T4⁺ and Ly-2⁺ cells in skin graft rejection in the mouse. *Transplantation* 1987;44:273–280.
215. Cobbold SP, Jayasuriya A, Nash A, Prospero TD, Waldmann H. Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T cell subsets in vivo. *Nature* 1984;312:548–551.
216. Cobbold S, Waldmann H. Skin allograft rejection by L3T4⁺ and Lyt-2⁺ T cell subsets. *Transplantation* 1986;41:634–639.
217. Woodcock J, Wofsy D, Eriksson E, Scott JH, Seaman WE. Rejection of skin grafts and generation of cytotoxic T cells by mice depleted of L3T4⁺ cells. *Transplantation* 1986;42:636–642.
218. Madsen JC, Peugh WN, Wood KJ, Morris PJ. The effect of anti-L3T4 monoclonal antibody treatment on first-set rejection of murine cardiac allografts. *Transplantation* 1987;44:849–852.
219. Shizuru JA, Gregory AK, Chao CT, Fathman CG. Islet allograft survival after a single course of treatment of recipient with antibody to L3T4. *Science* 1987; 237:278–280.
220. Smith DM, Stuart FP, Wemhoff GA, Quintas J, Fitch FW. Cellular pathways for rejection of class-I MHC-disparate skin and tumor allografts. *Transplantation* 1988;45:168–175.
221. Ichikawa T, Nakayama E, Uenaka A, Monden M, Mori T. Effector cells in allelic H-2 class I–incompatible skin graft rejection. *J Exp Med* 1987;166:982–990.
222. Rosenberg AS, Munitz TI, Maniero TG, Singer A. Cellular basis of skin allograft rejection across a class I major histocompatibility barrier in mice depleted of CD8⁺ T cells in vivo. *J Exp Med* 1991;173:1463–1471.
223. Rosenberg AS, Singer A. Cellular basis of skin allograft rejection: an in vivo model of immune-mediated tissue destruction. *Annu Rev Immunol* 1992;10: 333–358.
224. Wecker H, Grusby MJ, Auchincloss HJr. Effector cells must recognize antigens expressed in the graft to cause efficient skin graft rejection in SCID mice. *Transplantation* 1995;59:1223–1227.
225. Braun YM, McCormack A, Webb G, Batchelor RJ. Mediation of acute but not chronic rejection of MHC-incompatible rat kidney grafts by alloreactive CD4 T cells activated by the direct pathway of sensitization. *Transplantation* 1993;55:

117.
226. Krieger NR, Yin DP, Fathman CG. CD4⁺ but not CD8⁺ cells are essential for allorejection. *J Exp Med* 1996;184:2013–2018.
227. Lee RS, Grusby MJ, Laufer TM, Colvin R, Glimcher LH, Auchincloss H Jr. CD8⁺ effector cells responding to residual class I antigens, with help from CD4⁺ cells stimulated indirectly, cause rejection of "major histocompatibility complex-deficient" skin grafts. *Transplantation* 1997;63:1123–1133.
228. La Rosa FG, Talmage DW. The failure of a major histocompatibility antigen to stimulate a thyroid allograft reaction after culture in oxygen. *J Exp Med* 1983; 157:898–906.
229. Bartlett ST, Jennings AS, Yu C, Naji A, Barker CF, Silvers WK. Influence of culturing on the survival of major histocompatibility complex–compatible and –incompatible thyroid grafts in rats. *J Exp Med* 1983;157:348.
230. Gill RG, Rosenberg AS, Lafferty KJ, Singer A. Characterization of primary T cell subsets mediating rejection of pancreatic islet grafts. *J Immunol* 1989; 143:2176–2178.
231. Priestley CA, Spencer SC, Sawyer GJ, Fabre JW. Suppression of kidney allograft rejection across full MHC barriers by recipient-specific antibodies to class II MHC antigens. *Transplantation* 1992;53:1024–1032.
232. Fangmann J, Dalchau R, Fabre JW. Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *J Exp Med* 1992;175:1521–1529.
233. Auchincloss H Jr, Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II–deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3373–3377.
234. Bradley JA, Mowat AM, Bolton EM. Processed MHC class I alloantigen as the stimulus for CD4⁺ T-cell dependent antibody-mediated graft rejection. *Immunol Today* 1992;13:434–438.
235. Kobayashi E, Kawai K, Ikarashi Y, Fujiwara M. Mechanism of the rejection of major histocompatibility complex class I–disparate murine skin grafts: rejection can be mediated by CD4⁺ cells activated by allo-class I + II antigen in CD8⁻ cell-depleted hosts. *J Exp Med* 1992;176:617–621.
236. Kitagawa S, Sato S, Hori S, Hamaoka T, Fujiwara H. Induction of anti-allo-class I H-2 tolerance by inactivation of CD8⁺ helper T cells, and reversal of tolerance through introduction of third-party helper T cells. *J Exp Med* 1990;172:105–113.
237. Auchincloss H Jr, Winn HJ. Murine CD8⁺ T cell helper function is particularly sensitive to CsA suppression in vivo. *J Immunol* 1989;143:3940–3943.
238. Fidelus RK, Ferguson RM, Widmer MB, Wee S-L, Bach FH, Orosz CG. Effect of cyclosporin A on murine and human T helper cell clones. *Transplantation* 1982;34:308–311.
239. Orosz CG, Roopenian DC, Widmer MB, Bach FM. Analysis of cloned T cell function. II. Differential blockade of various cloned T cell functions by cyclosporine. *Transplantation* 1983;36:706–711.
240. Rosenberg AS, Mizuochi T, Singer A. Evidence for involvement of dual-function T cells in rejection of MHC class I disparate skin grafts. Assessment of MHC class I alloantigens as in vivo helper determinants. *J Exp Med* 1988;168:33–45.
241. Muluk SC, Clerici M, Via CS, Weir MR, Kimmel PL, Shearer GM. Correlation of in vitro CD4⁺ T helper cell function with clinical graft status in immunosuppressed kidney transplant recipients. *Transplantation* 1991;52:284–291.
242. Susskind B, Iannotti MR, Shornick MD, Steward NS, Gorka J, Mohanakumar T. Indirect allorecognition of HLA class I peptides by CD4⁺ cytolytic T lymphocytes. *Hum Immunol* 1996;46:1–9.
243. Benham AM, Sawyer GJ, Fabre JW. Indirect T cell allorecognition of donor antigens contributes to the rejection of vascularized kidney allografts. *Transplantation* 1995;59:1028–1032.
244. Sayegh MH, Watschinger B, Carpenter CB. Mechanisms of T cell recognition of alloantigen: the role of peptides. *Transplantation* 1994;57:1295.
245. Liu Z, Sun Y-K, Xi Y-P, Maffei A, Reed E, Harris P, Suciu-Foca N. Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity. *J Exp Med* 1993;177:1643–1650.
246. Benichou G, Tam RC, Soares LRB, Popov IA, Garovoy MR, Fedoseyeva EV. The influence of two distinct alloresponse pathways on the design of peptide-based strategies for allograft tolerance. *Res Immunol* 1996;147:377–387.
247. Gallon L, Watschinger B, Murphy B, Akalin E, Sayegh MH, Carpenter CB. The indirect pathway of allorecognition: the occurrence of self-restricted T cell recognition of allo-MHC peptides early in acute renal allograft rejection and its inhibition by conventional immunosuppression. *Transplantation* 1995;59: 612–616.
248. Shirwan H, Leamer M, Wang HK, Makowka L, Cramer DV. Peptides derived from α-helices of allogeneic class I major histocompatibility complex antigens are potent inducers of CD4⁺ and CD8⁺ T cell and B cell responses after cardiac allograft rejection. *Transplantation* 1995;59:401–410.
249. Benichou G, Fedoseyeva E, Lehmann PV, et al. Limited T cell response to donor MHC peptides during allograft rejection: implications for selective immune therapy in transplantation. *J Immunol* 1994;153:938–945.
250. Liu Z, Harris PE, Colovai AI, Reed EF, Maffei A, Suciu-Foca N. Indirect recognition of donor MHC class II antigens in human transplantation. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;78:228–235.
251. Molajoni ER, Cinti P, Orlandini A, et al. Mechanisms of liver allograft rejection: the indirect recognition pathway. *Hum Immunol* 1997;53:57–63.
252. Liu Z, Colovai AI, Tugulea S, et al. Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *J Clin Invest* 1996;98:1150–1157.
253. Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B, et al. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation* 1997;64:795–800.
254. Tugulea S, Ciubotariu R, Colovai AI, et al. New strategies for early diagnosis of heart allograft rejection. *Transplantation* 1997;64:842–847.
255. Sayegh MH, Perico N, Gallon L, et al. Mechanisms of acquired thymic unresponsiveness to renal allografts. *Transplantation* 1994;58:125–132.
256. Oluwole SF, Chowdhury NC, Jin M, Hardy MA. Induction of transplantation tolerance in rat cardiac allografts by intrathymic inoculation of allogeneic soluble peptides. *Transplantation* 1993;56:1523.
257. Sayegh MH, Perico N, Imberti O, Hancock WW, Carpenter CB, Remuzzi G. Thymic recognition of class II MHC allopeptides induces donor specific unresponsiveness to renal allografts. *Transplantation* 1993;56:461.
258. Sayegh MH, Khoury SK, Hancock WW, Weiner HL, Carpenter CB. Induction of immunity and oral tolerance with polymorphic class II MHC allopeptides in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:7762–7766.
259. Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med* 1982;155:31–41.
260. Monaco JJ. A molecular model of MHC class-I–restricted antigen processing. *Immunol Today* 1992;13:173–178.
261. Neefjes JJ, Ploegh HL. Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol Today* 1992;13:179–183.
262. Grant EP, Rock KL. MHC class I–restricted presentation of exogenous antigen by thymic antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Immunol* 1992;148: 13–18.
263. Michalek MT, Benacerraf B, Rock KL. The class II MHC-restricted presentation of endogenously synthesized ovalbumin displays clonal variation, requires endosomal/lysosomal processing, and is upregulated by heat shock. *J Immunol* 1992;148:1016–1024.
264. Kurts C, Heath WR, Carbone FR, Allison J, Miller JFAP, Kosaka H. Constitutive class I–restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* 1996;184:923–930.
265. Williams NS, Engelhard VH. Perforin-dependent cytotoxic activity and lymphokine secretion by CD4⁺ T cells are regulated by CD8⁻ T cells. *J Immunol* 1997;159:2091–2099.
266. Orosz CG, Bishop DK. Limiting dilution analysis of alloreactive T-cell status and distribution during allograft rejection. *Hum Immunol* 1990;28:72–81.
267. Swain SL. Significance of Lyt phenotypes: Lyt2 antibodies block activities of T cells that recognize class I MHC antigens regardless of their function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7101.
268. Swain SL. T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol Rev* 1983; 74:129–142.
269. Swain SL, Bakke A, English M, Dutton RW. Ly phenotypes and MHC recognition: the alloheper that recognizes K or D is a mature Ly123 cell. *J Immunol* 1979;123:2716–2724.
270. Rosenberg AS, Katz SI, Singer A. Rejection of skin allografts by CD4⁺ T cells is antigen-specific and requires expression of target alloantigen on Ia⁻ epidermal cells. *J Immunol* 1989;143:2452–2456.
271. Rosenberg AS, Finbloom DS, Maniero TG, Van der Meide PH, Singer A. Specific prolongation of MHC class II disparate skin allografts by in vivo administration of anti-IFN-gamma monoclonal antibody. *J Immunol* 1990;144: 4648–4650.
272. Mintz B, Silvers WK. Histocompatiblity antigens on melanoblasts and hair follicle cells: cell-localized homograft rejection in allophenic skin grafts. *Transplantation* 1970;9:497–505.
273. Mintz B, Silvers WK. "Intrinsic" immunological tolerance in allophenic mice. *Science* 1967;158:1484–1486.
274. Rosenberg AS, Singer A. Evidence that the effector mechanism of skin allograft rejection is antigen-specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:7739.
275. Doody DP, Stenger KS, Winn HJ. Immunologically nonspecific mechanisms of tissue destruction in the rejection of skin grafts. *J Exp Med* 1994;179: 1645–1652.
276. Roberts PJ, Hayry P. Sponge matrix allografts. A model for analysis of killer cells infiltrating mouse allografts. *Transplantation* 1976;21:437.
277. Strom TB, Tilney NL, Paradyez J, Banceqicz J, Carpenter CB. Cellular components of allograft rejection: Identity, specificity, and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. *J Immunol* 1977;118:2020–2026.
278. Hall B, Dorsch S. Cells mediating allograft rejection. *Immunol Rev* 1984;77:570.
279. Ascher NL, Hoffman R, Hanto D, Simmons R. Cellular basis of allograft rejection. *Immunol Rev* 1984;77:217–232.
280. Hall B, Bishop G, Farnsworth A, et al. Identification of the cellular subpopulations infiltrating rejecting cadaver renal allografts: preponderance of the T4 subset of T cells. *Transplantation* 1984;37:564–570.
281. Hayry P, von Willebrand E, Parthenais E, et al. The inflammatory mechanisms of allograft rejection. *Immunol Rev* 1984;77:85–142.
282. Bradley JA, Bolton EM. The T-cell requirements for allograft rejection. *Transplant Rev* 1992;6:115–129.
283. Preffer FI, Colvin RB, Leary CP, et al. Two color flow cytometry and functional

analysis of lymphocytes cultured from human renal allografts: identification of a Leu 2+3+ subpopulation. *J Immunol* 1986;137:2823–2830.
284. Tilney NL, Strom TB, MacPherson SG, Carpenter CB. Surface properties and functional characteristics of infiltrating cells harvested from acutely rejecting cardiac allografts in inbred rats. *Transplantation* 1975;20:323–330.
285. Mayer TG, Bhan AK, Winn HJ. Immunohistochemical analysis of skin graft rejection in mice: kinetics of lymphocyte infiltration in grafts of limited immunogenetic disparity. *Transplantation* 1988;46:890–899.
286. Mueller C, Gershenfeld HK, Lobe CG, Okada CY, Bleackley RC, Weissman IL. A high proportion of T lymphocytes that infiltrate H-2–incompatible heart allografts in vivo express genes encoding cytotoxic cell-specific serine proteases, but do not express the Mel-14–defined lymph node homing receptor. *J Exp Med* 1988;167:1124–1136.
287. Colvin RB. The renal allograft biopsy. *Kidney Int.* 1996;50:1069–1082.
288. Kim B, Rosenstein M, Weiland D, Eberlein TJ, Rosenberg SA. Clonal analysis of the lymphoid cells mediating skin allograft rejection. *Transplantation* 1983;36:525–532.
289. Kilbeck PC, Miceli C, Finn OJ, Bollinger RR, Sanfilippo F. Relationships among renal allograft biopsy infiltrates, growth of T cell lines, and irreversible rejection. *Transplant Proc* 1988;20:303–305.
290. Kilbeck PC, Tatum AH, Sanfillipo F. Relationships among the histologic pattern, intensity, and phenotypes of T cells infiltrating renal allografts. *Transplantation* 1984;38:709–713.
291. Sanfilippo F, Kilbeck PC, Vaughn WK, Bollinger RR. Renal allograft cell infiltrates associated with irreversible rejection. *Transplantation* 1985;40:679–685.
292. Knechtle SJ, Wolfe JA, Burchette J, Sanfilippo F, Bollinger RR. Infiltrating cell phenotypes and patterns associated with hepatic allograft rejection or acceptance. *Transplantation* 1987;43:169–172.
293. Wolfe JA, Knechtle SJ, Burchette J, Bollinger RR, Sanfillipo F. Phenotype and patterns of inflammatory cell infiltration associated with rejection or acceptance of rat liver allografts. *Transplant Proc* 1987;19:364–368.
294. Straznickas J, Howell D, Ruiz P, Sanfillipo F. Phenotype and function of T cells propagated from donor-specific blood transfusion enhanced and autologous blood transfused rejecting rat renal allografts. *Transplant Proc* 1988;20: 276–280.
295. Miceli MC, Finn OJ. T cell receptor beta-chain selection in human allograft rejection. *J Immunol* 1989;142:81–86.
296. Moreau JF, Peyrat MA, Vie H, Bonneville M, Soulillou JP. T cell colony-forming frequency of mononucleated cells extracted from rejected human kidney transplants. *Transplantation* 1985;39:649.
297. Bonneville M, Moreau JF, Blokland E, et al. T lymphocyte cloning from rejected human kidney allograft. Recognition repertoire of alloreactive T cell clones. *J Immunol* 1988;141:4187–4195.
298. Miceli MC, Barry TS, Finn OJ. Human renal allograft infiltrating T cells: phenotype-function correlation and clonal heterogeneity. *Transplant Proc* 1988;20: 199.
299. Chen RH, Bushell A, Fuggle SV, Wood KJ, Morris PJ. Expression of granzyme A and perforin in mouse heart transplants immunosuppressed with donor-specific transfusion and anti-CD4 monoclonal antibodies. *Transplantation* 1996; 61:625–629.
300. Kondo T, Novick AC, Toma H, Fairchild RL. Induction of chemokine gene expression during allogeneic skin graft rejection. *Transplantation* 1996;61: 1750–1757.
301. Pavlakis M, Strehlau J, Lipman M, Shapiro M, Maslinski W, Strom TB. Intragraft IL-15 transcripts are increased in human renal allograft rejection. *Transplantation* 1996;62:543–545.
302. Truong LD, Shappell S, Barrios R, Gonzalez J, Suki WN, Solez K. Immunohistochemistry and molecular biology markers of renal transplant rejection: diagnostic applications. *Transplant Rev* 1996;10:187–208.
303. Carlquist JF, Edelman LS, White W, Shelby J, Anderson JL. Cytokines and rejection of mouse cardiac allografts. *Transplantation* 1996;62:1160–1166.
304. O'Connell PJ, Pacheco-Silva A, Nickerson PW, et al. Unmodified pancreatic islet allograft rejection results in the preferential expression of certain T cell activation transcripts. *J Immunol* 1993;150:1093–1104.
305. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:695–700.
306. Fairchild RL, VanBuskirk AM, Kondo T, Wakely ME, Orosz CG. Expression of chemokine genes during rejection and long-term acceptance of cardiac allografts. *Transplantation* 1997;63:1807–1812.
307. Sharma VK, Bologa RM, Li B, et al. Molecular executors of cell death—differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* 1996;62:1860–1866.
308. Martinez OM, Krams SM, Sterneck M, et al. Intragraft cytokine profile during human liver allograft rejection. *Transplantation* 1992;53:449–456.
309. Griffiths GM, Mueller C. Expression of perforin and granzymes in vivo: potential diagnostic markers for activated cytotoxic cells. *Immunol Today* 1991;12: 415–418.
310. Griffiths GM, Namikawa R, Mueller C, et al. Granzyme A and perforin as markers for rejection in cardiac transplantation. *Eur J Immunol* 1991;21:687–692.
311. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 1991;174: 561–569.
312. Lipman ML, Stevens CA, Bleackley CR, et al. The strong correlation of cytotoxic T lymphocyte-specific serine protease gene transcripts with renal allograft rejection. *Transplantation* 1992;53:73–79.
313. Thiele DL, Geissler GH, Williams FH, Lipsky PE. The role of leucyl-leucine methyl ester-sensitive cytotoxic cells in skin allograft rejection. *Transplantation* 1992;53:1334–1340.
314. Chen RH, Ivens KW, Alpert S, et al. The use of granzyme A as a marker of heart transplant rejection in cyclosporine or anti-CD4 monoclonal antibody-treated rats. *Transplantation* 1993;55:146–153.
315. Sharma VK, Bologa RM, Li B, et al. Molecular executors of cell death-differential intrarenal expression of Fas ligand. Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* 1996; 62:1860–1866.
316. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 1994;152:5120–5127.
317. Grusby MJ, Auchincloss H Jr, Lee R, et al. Mice lacking major histocompatibility complex class I and class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:3919.
318. Campos L, Naji A, Deli BC, et al. Survival of MHC-deficient mouse heterotopic cardiac allografts. *Transplantation* 1995;59:187–191.
319. Glas R, Franksson L, Ohlen C, et al. Major histocompatibility complex class I–specific and –restricted killing of β2-microglobulin–deficient cells by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;89:11381.
320. Markmann JF, Bassiri H, Desai NM, et al. Indefinite survival of MHC class I–deficient murine pancreatic islet allografts. *Transplantation* 1992;54: 1085–1089.
321. Markmann JF, Jacobson JD, Choti MA, et al. Modulation of major histocompatibility complex antigens and the immunogenicity of islet allografts. *Transplantation* 1989;48:478–486.
322. Markmann JF, Campos L, Bhandoola A, et al. Genetically engineered grafts to study xenoimmunity: a role for indirect antigen presentation in the destruction of major histocompatibility complex antigen deficient xenografts. *Surgery* 1994; 116:242–249.
323. Osorio RW, Ascher NL, Jaenisch R, Freise CE, Roberts JP, Stock PG. Major histocompatibility complex class I deficiency prolongs islet allograft survival. *Diabetes* 1993;42:1520–1527.
324. Munn SR, Marjoribanks C. Current limitations to use of major histocompatibility complex transgenic donors for islet transplantation. *Transplantation* 1994;57: 760–763.
325. Schulz M, Schuurman H-J, Joergensen J, et al. Acute rejection of vascular heart allografts by perforin-deficient mice. *Eur J Immunol* 1995;25:474–480.
326. Selvaggi G, Ricordi C, Podack ER, Inverardi L. The role of the perforin and Fas pathways of cytotoxicity in skin graft rejection. *Transplantation* 1996;62: 1912–1915.
327. Steiger J, Nickerson PW, Steurer W, Moscovitch-Lopatin M, Strom TB. IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. *J Immunol* 1995;155: 489–498.
328. Dalloul AH, Chmouzis E, Ngo K, Fung-Leung W-P. Adoptively transferred CD4+ lymphocytes from CD8-/- mice are sufficient to mediate the rejection of MHC class II or class I disparate skin grafts. *J Immunol* 1996;156:4114–4119.
329. Nickerson P, Zheng XX, Steiger J, et al. Prolonged islet allograft acceptance in the absence of interleukin 4 expression. *Transplant Immunol* 1996;4:81–85.
330. Roy-Chaudhury P, Manfro RC, Steiger J, et al. IL-2 and IL-4 double knock-out mice reject islet allografts: a role for novel T-cell growth factors? *Transplant Proc* 1997;29:1083–1084.
331. Bradley AJ, Bolton EM. The T-cell requirements for allograft rejection. *Transplant Rev* 1992;6:115–129.
332. McCarthy SA, Kaldjian E, Singer A. Induction of anti-CD8 resistant cytotoxic T lymphocytes by anti-CD8 antibodies. Functional evidence for T cell signaling induced by multi-valent cross-linking of CD8 on precursor cells. *J Immunol* 1988;141:3737–3746.
333. Sawada T, Wu Y, Sachs DH, Iacomini J. CD4+ T cells are able to reject class I disparate allografts. *Transplantation* 1997;64:335–340.
334. Hurme M, Hetherington CM, Simpson E. Cytotoxic T-cell responses to H-Y: correlation with the rejection of syngeneic male skin grafts. *J Exp Med* 1978;147:768–775.
335. McKenzie IFC, Henning MM, Michaelides M. Skin graft rejection and delayed-type hypersensitivity responses to H-Y in an I-Ab mutant. *Immunogenetics* 1984; 20:475.
336. Gordon RD, Mathieson BJ, Samelson LE, Boyse EA, Simpson E. The effect of allogeneic presensitization on H-Y graft survival and in vitro cell-mediated responses to H-Y antigen. *J Exp Med* 1976;144:810.
337. Bradley JA, Mason DW, Morris PJ. Evidence that rat renal allografts are rejected by cytotoxic T cells and not by nonspecific effectors. *Transplantation* 1985;39:169–175.
338. Hall BM. Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* 1991;51: 1141–1151.
339. Kitagawa S, Iwata H, Sato S, Shimizu J, Hamaoka T, Fujiwara H. Heterogenous

graft rejection pathways in class I major histocompatibility complex–disparate combinations and their differential susceptibility to immunomodulation induced by intravenous presensitization with relevant alloantigens. *J Exp Med* 1991; 174:571–581.

340. Mason DW, Dallman MJ, Arthur RP, Morris PJ. Mechanisms of allograft rejection: the roles of cytotoxic T-cells and delayed-type hypersensitivity. *Immunol Rev* 1984;77:177.
341. Mason DW, Morris PJ. Effector mechanisms in allograft rejection. *Ann Rev Immunol* 1986;4:119–145.
342. Peeler JS, Niederkorn JY. Antigen presentation by Langerhans cells in vivo: donor-derived Ia+ Langerhans cells are required for induction of delayed-type hypersenitivity but not for cytotoxic T lymphocyte responses to alloantigens. *J Immunol* 1986;136:4362.
343. Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, et al. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 1994;178:1541–1554.
344. Walsh CM, Hayashi F, Saffran DC, Ju S-T, Berke G, Clark WR. Cell-mediated cytotoxicity results from, but may not be critical for, primary allograft rejection. *J Immunol* 1996;156:1436–1441.
345. VanBuskirk AM, Wakely ME, Orosz CG. Acute rejection of cardiac allografts by noncytolytic CD4+ T cell populations. *Transplantation* 1996;62:300–302.
346. Sirak J, Orosz CG, Wakely E, VanBuskirk AM. Alloreactive delayed-type hypersensitivity in graft recipients: complexity of responses and divergence from acute rejection. *Transplantation* 1997;63:1300–1307.
347. Beckerman KP, Rogers HW, Corbett JA, Schreiber RD, McDaniel ML, Unanue ER. Release of nitric oxide during the T cell–independent pathway of macrophage activation. *J Immunol* 1993;150:888.
348. Cecka JM, Terasaki PI, eds. *Clinical transplants 1995*. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1995.
349. Russell PS, Chase CM, Colvin RB. Accelerated atheromatous lesions in mouse hearts transplanted to apolipoprotein-E–deficient recipients. *Am J Pathol* 1996; 149:91–99.
350. Schmid C, Heeman U, Tilney NL. Factors contributing to the development of chronic rejection in heterotopic rat heart transplantation. *Transplantation* 1997; 64:222–228.
351. Petersen VP, Olsen TS, Kissmeyer-Nielsen F, et al. Late failure of human renal transplants. An analysis of transplant disease and graft failure among 125 recipients surviving for one to eight years. *Medicine* 1975;54:45–71.
352. Reed EF, Hong B, Ho E, Harris PE, Weinberger J, Suciu-Foca N. Monitoring of soluble HLA alloantigens and anti-HLA antibodies identifies heart allograft recipients at risk of transplant-associated coronary artery disease. *Transplantation* 1996;61:566–572.
353. Cosio FG, Pelletier RP, Falkenhain ME, et al. Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63: 1611–1615.
354. Russell PS, Chase CM, Winn HJ, Colvin RB. Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. I. Time course and immunogenetic and immunopathological considerations. *Am J Pathol* 1994;144:260–274.
355. Russell PS, Chase CM, Colvin RB. Insights regarding the pathogenesis of transplant arteriopathy from experiments with animals. *Transplantation* 1997;64 (*in press*).
356. Geraghty JG, Stoltenberg RL, Sollinger HW, Hullett DA. Vascular smooth muscle cells and neointimal hyperplasia in chronic transplant rejection. *Transplantation* 1996;62:502–509.
357. Utans U, Quist WC, McManus BM, et al. Allograft inflammatory factory-1. A cytokine-responsive macrophage molecule expressed in transplanted human hearts. *Transplantation* 1996;61:1387–1392.
358. Sharma VK, Bologa RM, Xu GP, et al. Intragraft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996; 49:1297–1303.
359. Molossi S, Clausell N, Sett S, Rabinovitch M. ICAM-1 and VCAM-1 expression in accelerated cardiac allograft arteriopathy and myocardial rejection are influenced differently by cyclosporine A and tumor necrosis factor-α blockade. *J Pathol* 1995;176:175.
360. Russell PS, Chase CM, Colvin RB. Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. IV. Effects of treatment with monoclonal antibodies to intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1. *Transplantation* 1995;60:724–729.
361. Suthanthiran M. Molecular analyses of human renal allografts: differential intragraft gene expression during rejection. *Kidney Int Suppl* 1997;58:15–21.
362. Russell ME, Wallace AF, Wyner LR, Newell JB, Karnovsky MJ. Upregulation and modulation of inducible nitric oxide synthase in rat cardiac allografts with chronic rejection and transplant atherosclerosis. *Circulation* 1995;92:457–464.
363. Zhao X-M, Blanton RH, Becker YT, et al. Increased expression of acidic fibroblast growth factor (aFGF) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in rat cardiac allografts versus isografts and normal hearts. *Circulation* 1994;90(suppl I):361.
364. Motomura N, Lou H, Maurice P, Foegh ML. Acceleration of arteriosclerosis of the rat aorta allograft by insulin growth factor-I. *Transplantation* 1997;63: 932–936.
365. Forbes RD, Cernacek P, Zheng S, Gomersall M, Guttmann RD. Increased endothelin expression in a rat cardiac allograft model of chronic vascular rejection. *Transplantation* 1996;61:791–797.
366. Watschinger B, Sayegh MH, Hancock WW, Russell ME. Upregulation of endothelin-1 mRNA and peptide expression in rat cardiac allografts with rejection and arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1995;146:1065.
367. Madsen JC, Sachs DH, Fallon JT, Weissman NJ. Cardiac allograft vasculopathy in partially inbred miniature swine. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111: 1230–1239.
368. Russell PS, Chase CM, Winn HJ, Colvin RB. Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. III. Effects of recipient treatment with a monoclonal antibody to interferon-γ. *Transplantation* 1994;57:1367–1371.
369. Russell PS, Chase CM, Winn HJ, Colvin RB. Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. II. Importance of humoral immunity. *J Immunol* 1994; 152:5135–5141.
370. McLean AG, Hughes M, Welsh KI, et al. Patterns of graft infiltration and cytokine gene expression during the first 10 days of kidney transplantation. *Transplantation* 1997;63:374–379.
371. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994;12:991–1045.
372. Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992;356:607–609.
373. Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 1992;71: 1065–1068.
374. Coulombe M, Yang H, Guerder S, Flavell RA, Lafferty KJ, Gill RG. Tissue immunogenicity: the role of MHC antigen and the lymphocyte costimulator B7-1. *J Immunol* 1996;157:4790–4795.
375. Shuford WW, Klussman K, Tritchler DD, et al. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* 1997;186:47–55.
376. Larsen CP, Alexander DZ, Hollenbaugh D, et al. CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. *Transplantation* 1996;61:4–9.
377. Grewel IS, Foellmer HG, Grewel KD, et al. Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 1996;273:1864–1867.
378. Yang Y, Wilson JM. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 1996;273:1862–1864.
379. Bluestone JA. New perspectives of CD28-B7–mediated T cell costimulation. *Immunity* 1995;2:555–559.
380. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WA, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995;3:541–547.
381. Lu L, Qian S, Hershberger PA, Rudert WA, Lynch DH, Thomson AW. Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation. *J Immunol* 1997;158:5676–5684.
382. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995;377:630–632.
383. Kawai K, Shahinian A, Mak TW, Ohashi PS. Skin allograft rejection in CD28-deficient mice. *Transplantation* 1996;61:352.
384. Russell PS, Chase CM, Winn HJ, Colvin RB. Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. III. Effects of recipient treatment with a monoclonal antibody to interferon-gamma. *Transplantation* 1994;57:1367–1371.
385. Saleem S, Konieczny BT, Lowry RP, Baddoura FK, Lakkis FG. Acute rejection of vascularized heart allografts in the absence of IFNγ[1,2]. *Transplantation* 1996; 62:1908–1911.
386. Goes N, Urmson J, Vincent D, Halloran PF. Acute renal injury in the interferon-gamma gene knockout mouse: effect on cytokine gene expression. *Transplantation* 1995;60:1560–1564.
387. Qin L, Chavin KD, Ding Y, Woodward JE, Favaro JP, Lin J, Bromberg JS. Gene transfer for transplantation: prolongation of allograft survival with transforming growth factor-β1. *Ann Surg* 1994;220:508–519.
388. Qin L, Chavin KD, Ding Y, et al. Retrovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene prolongs murine cardiac allograft survival. *J Immunol* 1996;156: 2316–2323.
389. Weimer R, Zipperle S, Daniel V, Carl S, Staehler G, Opelz G. Pretransplant CD4 helper function and Interleukin 10 response predict risk of acute kidney graft rejection. *Transplantation* 1996;62:1606–1614.
390. Zheng XX, Steele AW, Nickerson PW, Steurer W, Steiger J, Strom TB. Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation. *J Immunol* 1995;154: 5590–5600.
391. Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, et al. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med* 1995; 181:1869–1874.
392. Piccotti JR, Chan SY, Goodman RE, Magram J, Eichwald EJ, Bishop DK. IL-12 antagonism induces T helper 2 responses, yet exacerbates cardiac allograft rejection: evidence against a dominant protective role for T helper 2 cytokines in alloimmunity. *J Immunol* 1996;157:1951–1957.
393. Piccotti JR, Chan SY, VanBuskirk AM, Eichwald EJ, Bishop DK. Are Th2 helper T lymphocytes beneficial, deleterious, or irrelevant in promoting allograft sur-

vival? *Transplantation* 1997;63:619–624.
394. Strom TB, Roy-Chaudhury P, Manfro R, et al. The Th1/Th2 paradigm and the allograft response. *Curr Opin Immunol* 1996;8:688–693.
395. Nickerson P, Steurer W, Steiger J, Zheng X, Steele AW, Strom TB. Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Curr Opin Immunol* 1994;6:757–764.
396. VanBuskirk AM, Wakely ME, Orosz CG. Transfusion of polarized TH2-like cell populations into SCID mouse cardiac allograft recipients results in acute allograft rejection. *Transplantation* 1996;62:229–238.
397. Mueller R, Davies JD, Krahl T, Sarvetnick N. IL-4 expression by grafts from transgenic mice fails to prevent allograft rejection. *J Immunol* 1997;159: 1599–1603.
398. Russell P, Chase C, Colvin R, Plate J. An analysis of the immune status of mice bearing long-term H-2 incompatible transplants. *J Exp Med* 1979;147: 1449–1468.
399. Russell PS, Chase CM, Colvin RB, Plate JMD. Kidney transplants in mice: an analysis of the immune status of mice bearing long-term H-2 incompatible transplants. *J Exp Med* 1978;147:1449–1468.
400. Qian S, Thai NL, Lu L, Fung JJ, Thomson AW. Liver transplant tolerance: mechanistic insights from animal models, with particular reference to the mouse. *Transplant Rev* 1997;11:151–164.
401. Calne RY, Sells RA, Pena JR, et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 1969;223:472–476.
402. Burdick RC, Russell PS. Antigenic requirement for induced rejection of long-surviving murine heart transplants. *J Immunol* 1982;128:1551–1554.
403. Corry RJ, Winn HJ, Russell PS. Primarily vascularized allografts of hearts in mice. The role of H-2D, H-2K, and non–H-2 antigens in rejection. *Transplantation* 1973;16:343–350.
404. Russell PS, Chase CM, Colvin RB, Plate JMD. Induced immune destruction of long-surviving H-2 incompatible kidney transplants in mice. *J Exp Med* 1978;147:1469–1486.
405. Soulillou JP, Peyronnet P, Le Mauff B, et al. Prevention of rejection of kidney transplants by monoclonal antibody directed against interleukin 2. *Lancet* 1987;1:1339–1342.
406. Mitchison NA. An exact comparison between the efficiency of two- and three-cell clusters in mediating helper activity. *Eur J Immunol* 1990;20:699–702.
407. Paul WE. Between two centuries: specificity and regulation in immunology. *J Immunol* 1987;139:1–6.
408. Tucker MJ, Bretscher PA. T cells cooperating in the induction of delayed-type hypersensitivity act via the linked recognition of antigenic determinants. *J Exp Med* 1982;155:1037.
409. Bretscher PA. A cascade of T-T interactions, mediated by the linked recognition of antigen, in the induction of T cells able to help delayed-type hypersensitivity responses. *J Immunol* 1986;137:3726.
410. Mitchison NA, O'Malley C. Three-cell-type clusters of T cells with antigen-presenting cells best explain the epitope linkage and noncognate requirements of the in vivo cytolytic response. *Eur J Immunol* 1987;17:1579–1583.
411. Bennett SRM, Carbone FR, Karamalis F, Miller JFAP, Heath WR. Induction of a CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4⁺ T cell help. *J Exp Med* 1997;186:65–70.
412. Hori S, Kitagawa S, Iwata H, et al. Cell-cell interaction in graft rejection responses: induction of anti–allo-class I H-2 tolerance is prevented by immune responses against allo-class II H-2 antigens coexpressed on tolerogen. *J Exp Med* 1992;175:99–109.
413. Kelly CM, Benham AM, Sawyer GJ, Dalchau R, Fabre JW. A three-cell cluster hypothesis for noncognate T-B collaboration via direct T cell recognition of allogeneic dendritic cells. *Transplantation* 1996;61:1094–1099.
414. Steele DJR, Laufer TM, Smiley ST, et al. Two levels of help for B cell alloantibody production. *J Exp Med* 1996;183:699–703.
415. Benham AM, Sawyer GJ, Fabre JW. T and B cell responsiveness to donor class I MHC molecules and peptides in long survivors with kidney allografts. *Transplantation* 1996;61:1455–1460.
416. Clement JD, Chan SY, Bishop DK. Allogeneic class I MHC requirement for alloantigen-reactive helper T-lymphocyte responses in vivo: Evidence for indirect presentation of alloantigen. *Transplantation* 1996;62:388–396.
417. MacDonald CM, Bolton EM, Jaques BC, Walker KG, Bradley JA. Reduction of alloantibody response to class I major histocompatibility complex by targeting synthetic allopeptides for presentation by B cells. *Transplantation* 1997;63: 926–932.
418. Lee RS, Grusby MJ, Glimcher LH, Winn HJ, Auchincloss H Jr. Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 1994;179:865–872.
419. Lacy PE, Davie JM. Transplantation of pancreatic islets. *Ann Rev Immunol* 1984;2:183.
420. Morrow CE, Sutherland DE, Steffes MW, Najarian JS, Bach FH. Lack of donor-specific tolerance in mice with established anti–Ia-treated islet allografts. *Transplantation* 1983;36:691–694.
421. Gores DF, Sutherland DE, Platt JL, Bach FH. Lack of tolerance to donor-strain skin grafts in mice with established islet allografts. *Transplantation* 1987;43:749–750.
422. Bowen KM, Andrus L, Lafferty KJ. Survival of pancreatic islet allografts. *Lancet* 1979;2:585–586.
423. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67:1033–1036.
424. Hutchinson IV. Cellular mechanism of allograft rejection. *Curr Opin Immunol* 1991;3:722–728.
425. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11–25.
426. Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, Shaw S. Lymphocyte interaction with endothelial cells. *Immunol Today* 1992;13:106–111.
427. Tang MLK, Hale LP, Steeber DA, Tedder TF. L-selectin is involved in lymphocyte migration to sites of inflammation in the skin: delayed rejection of allografts in L-selectin–deficient mice. *J Immunol* 1997;158:5191–5199.
428. Mobley JL, Dailey MO. Regulation of adhesion molecule expression by CD8 T cells in vivo. *J Immunol* 1992;148:2348–2356.
429. Koster F, McGregor D. The mediators of cellular immunity. II. Migration of immunologically committed lymphocytes into inflammatory exudates. *J Exp Med* 1971;133:400–409.
430. Pelletier RP, Ohye RG, Vanbuskirk A, Sedmak DD, Kincade P, Perguson RM, Orosz CG. Importance of endothelial VCAM-1 for inflammatory leukocytic infiltration in vivo. *J Exp Med* 1992;149:2473–2481.
431. Wacholtz MC, Patel SS, Lipsky PE. Patterns of costimulation of T cell clones by cross-linking CD3, CD4/CD8, and class I MHC molecules. *J Immunol* 1989; 142:4201–4212.
432. Harding CV, Unanue ER. Modulation of antigen presentation and peptide-MHC-specific, LFA-1–dependent T cell–macrophage adhesion. *J Immunol* 1991;147:767–773.
433. Cosimi AB, Conti D, Delmonico FL, et al. In vivo effects of monoclonal antibody to ICAM-1 (CD54) in nonhuman primates with renal allografts. *J Immunol* 1990;144:4604–4612.
434. Wee SL, Cosimi AB, Preffer FI, et al. Functional consequences of anti–ICAM-1 (CD54) in cynomolgus monkeys. *Transplant Proc* 1991;23:279–280.
435. Suthanthiran M, Morris RE, Strom TB. Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. *Am J Kidney Dis* 1996;28:159–172.
436. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet* 1995;345:1321–1325.
437. Sollinger HW, for the US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* 1995;60:225–232.
438. Shevach EM. The effects of cyclosporin A on the immune system. *Ann Rev Immunol* 1985;3:397.
439. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med* 1989;321:1725–1738.
440. Kahan BD, Van Buren CT, Flechner SM, et al. Clinical and experimental studies with cyclosporine in renal transplantation. *Surgery* 1985;97:125.
441. Goto T, Kino T, Hatanaka H, et al. Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from Streptomyces Tsukubaenisis. *Transplant Proc* 1987; 19(suppl 6):4.
442. Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. *Ann Rev Immunol* 1996;14:483–510.
443. Todo S, Murase N, Kahn D, et al. Effect of 15-deoxyspergualin on experimental organ transplantation. *Transplant Proc* 1988;209(suppl 1):233–236.
444. Yuh D, Gandy KL, Morris RE, et al. Leflunomide prolongs pulmonary allograft and xenograft survival. *J Heart Lung Transplant* 1995;14:1136–1144.
445. Lin Y, Sobis H, Vandeputte M, Waer M. Mechanism of leflunomide-induced prevention of xenoantibody formation and xenograft rejection in the hamster to rat heart transplantation model. *Transplant Proc* 1995;27:305–306.
446. Cosimi AB, Wortis H, Delmonico F, Russell PS. Randomized clinical trial of antitymocyte globulin in cadaver renal allograft recipients. *Surgery* 1976; 80:155–161.
447. Shield CF, Cosimi AB, Tolkoff-Rubin N, Rubin RH, Herrin J, Russell PS. Use of antithymocyte globulin for reversal of acute allograft rejection. *Transplantation* 1979;28:461.
448. Cosimi AB, Colvin RB, Jaffers GJ, et al. Immunologic monitoring of monoclonal antibody therapy: comparison of five antibodies as immunosuppressants of renal allograft rejection. *Transplant Proc* 1984;16:1459–1461.
449. Cosimi AB, Burton RC, Kung PC, et al. Evaluation in primate renal allograft recipients of monoclonal antibody to human T-cell subclasses. *Transplant Proc* 1981;13:499–503.
450. Onodera K, Lehmann M, Akalin E, Volk H-D, Sayegh MH, Kupiec-Weglinski JW. Induction of "infectious" tolerance to MHC-incompatible cardiac allografts in CD4 monoclonal antibody-treated sensitized rat recipients. *J Immunol* 1996; 157:1944–1950.
451. Alters SE, Shizuru JA, Ackerman J, Grossman D, Seydel KB, Fathman CG. Anti-CD4 mediates clonal anergy during transplantation tolerance induction. *J Exp Med* 1991;173: 491
452. Kirkman RL, Barrett LV, Gaulton GN, et al. The effect of anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody on allograft rejection. *Transplantation* 1985;40: 719.
453. Kelley VE, Gaulton GN, Strom TB. Inhibitory effect of anti-interleukin 2 receptor and anti-L3T4 antibodies on delayed type hypersensitivity: the role of complement and epitope. *J Immunol* 1987;138:2771–2775.
454. Reed MH, Shapiro ME, Strom TB, et al. Prolongation of primate renal allografts with anti-Tac monoclonal antibody. *Curr Surg* 1988;45:28–30.

455. Bacha P, Williams DP, Waters C, Williams JM, Murphy JR, Strom TB. Interleukin 2 receptor-targeted cytotoxicity. Interleukin 2 receptor–mediated action of a diphtheria toxin–related interleukin 2 fusion protein. *J Exp Med* 1988;167:612–622.
456. Kirkman RL, Shapiro ME, Carpenter CB, et al. A randomized prospective trial of anti-TAC monoclonal antibody in human renal transplantation. *Transplantation* 1991;51:107–113.
457. Tinubu SA, Hakimi J, Kondas JA, et al. Humanized antibody directed to the IL-2 receptor β-chain prolongs primate cardiac allograft survival. *J Immunol* 1994;153:4330–4338.
458. Turka LA, Linsley PS, Lin H, et al. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:11102
459. Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996;381: 434–438.
460. Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN, et al. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:8789–8794.
461. Cosimi AB, Colvin RB, Burton RC, et al. Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. *N Engl J Med* 1981;305:308.
462. Russell PS, Colvin RB, Cosimi AB. Monoclonal antibodies for the diagnosis and treatment of transplant rejection. *Ann Rev Med* 1984;35:63.
463. Hirsch R, Gress RE, Pluznik DH, Eckhaus M, Bluestone JA. Effects of in vivo administration of anti-CD3 monoclonal antibody on T cell function in mice II. In vivo activation of T cells. *J Immunol* 1989;142:737–743.
464. Davis LS, Wacholtz MC, Lipsky PE. The induction of T cell unresponsiveness by rapidly modulating CD3. *J Immunol* 1989;142:1084–1094.
465. Alegre ML, Collins AM, Pulito VL, et al. Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a "humanized" OKT3 monoclonal antibody. *J Immunol* 1992;148:3461–3468.
466. Vitetta ES, Uhr JW. The potential use of immunotoxins in transplantation, cancer therapy, and immunoregulation. *Transplantation* 1984;37:535.
467. Knechtle SJ, Vargo D, Fechner J, et al. FN18-CRM9 immunotoxin promotes tolerance in primate renal allografts. *Transplantation* 1997;63:1–6.
468. Auchincloss HA. Why is cell-mediated xenograft rejection so strong? Xeno 1995;3:19–22.
469. Goodnow CC. Transgenic mice and analysis of B-cell tolerance. *Ann Rev Immunol* 1992;10:489–518.
470. Hartley SB, Crosbie J, Brink RA, Kantor AB, Basten A, Goodnow CC. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* 1991;353:765–769.
471. Murakami M, Tsubata T, Okamoto M, et al. Antigen-induced apoptotic death of Ly-1 B cells is responsible for autoimmune disease in transgenic mice. *Nature* 1992;357:77–80.
472. Allen PM. Peptides in positive and negative selection: a delicate balance. *Cell* 1994;76:593–596.
473. Alam SM, Travers PJ, Wung JL, et al. T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 1996;381:616–620.
474. Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibiity complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 1997;185:541–550.
475. Inaba M, Inaba K, Hosono M, et al. Distinct mechanisms of neonatal tolerance induced by dendritic cells and thymic B cells. *J Exp Med* 1991;173:549–559.
476. Schonrich G, Strauss G, Muller K-P, et al. Distinct requirements of positive and negative selection for selecting cell type and CD8 interaction. *J Immunol* 1993; 151:4098–4105.
477. Schulz R, Mellor AL. Self major histocompatibility complex class I antigens expressed solely in lymphoid cells do not induce tolerance in the CD4⁺ T cell compartment. *J Exp Med* 1996;184:1573–1578.
478. Oukka M, Colucci-Guyon E, Tran PL, Cohen-Tannoudji M, Kosmatopoulos K. CD4 T cell tolerance to nuclear proteins induced by medullary thymic epithelium. *Immunity* 1996;4:545–553.
479. Matzinger P. Why positive selection? *Immunol Rev* 1993;135:81–117.
480. Ferber I, Schonrich G, Schenkel J, Mellor AL, Hammerling GJ, Arnold B. Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* 1994;263:674–676.
481. Webb SR, Hutchinson J, Hayden K, Sprent J. Expansion/deletion of mature T cells exposed to endogenous superantigens in vivo. *J Immunol* 1994;152: 586–597.
482. Rocha B, Von Boehmer H. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 1991;251:1225–1228.
483. Ramsdell F, Fowlkes BJ. Clonal deletion versus clonal anergy:the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science* 1990;248:1342–1348.
484. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990;248:1349–1356.
485. Nossal GJV, Pike BL. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:1602–1606.
486. Nossal GJV. Cellular mechanisms of immunologic tolerance. *Ann Rev Immunol* 1983;1:33–62.
487. Zanders ED, Lamb JR, Feldmann M, Green N, Beverley PCL. Tolerance of T-cell clones is associated with membrane antigen changes. *Nature* 1983;303:625–627.
488. Schonrich G, Kalinke U, Momburg F, et al. Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 1991;65:293–304.
489. Arnold B, Schonrich G, Hammerling GJ. Multiple levels of peripheral tolerance. *Immunol Today* 1993;14:12–14.
490. Rocken M, Urban JF, Shevach EM. Infection breaks T cell tolerance. *Nature* 1992;359:79–82.
491. Rocha B, Tanchot C, Von Boehmer H. Clonal anergy blocks in vivo growth of mature T cells and can be reversed in the absence of antigen. *J Exp Med* 1993; 177:1517–1521.
492. Ramsdell F, Fowlkes BJ. Maintenance of in vivo tolerance by persistence of antigen. *Science* 1992;257:1130–1134.
493. Kohler H. The Immune Network Revisted. In: Kohler H, Urbain J, Cazenave P-A, eds. *Idiotypy in biology and medicine.* Orlando, FL: Academic Press, 1984: 3–14.
494. Pennington LR, Flye MW, Kirkman RL, Thisthlethwaite JR Jr, Williams GM, Sachs DH. Transplantation in miniature swine. X. Evidence for non-SLA linked immune response gene(s) controlling rejection of SLA-matched kidney allografts. *Transplantation* 1981;32:315–320.
495. Bluestone JA, Leo O, Epstein SL, Sachs DH. Idiotypic manipulation of the immune response to transplantation antigens. *Immunol Rev* 1986;90:5–27.
496. Carpenter CB, D'Apice AJF, Abbas AK. The role of antibody in the rejection and enhancement of organ allografts. *Adv Immunol* 1976;22:1.
497. Kaliss N. Immunological enhancement of tumor homografts in mice. A review. *Cancer Res* 1958;18:992.
498. Stuart FP, Fitch FW, Rowley DA. Specific suppression of renal allograft rejection by treatment with antigen and antibody. *Transplant Proc.* 1970;2:483–438.
499. Batchelor JR. The riddle of kidney graft enhancement. *Transplantation* 1978; 26:139–141.
500. French ME, Batchelor JR. Enhancement of renal allografts in rats and man. *Transplant Rev* 1972;13:115–141.
501. Verbanac KM, Carver FM, Haisch CE, Thomas JM. A role for transforming growth factor-beta in the veto mechanism in transplant tolerance. *Transplantation* 1994;57:893–900.
502. Raju GP, Belland SE, Eisen HJ. Prolongation of cardiac allograft survival with transforming growth factor-β1 in rats. *Transplantation* 1994;58:392–396.
503. Langrehr JM, Dull KE, Ochoa JB, et al. Evidence that nitric oxide production by in vivo allosensitized cells inhibits the development of allospecific CTL. *Transplantation* 1992;53:632–640.
504. Langrehr JM, Hoffman RA, Lancaster JR Jr, Simmons RL. Nitric oxide—a new endogenous immunomodulator. *Transplantation* 1993;55:1205–1212.
505. Snijdewint FGM, Kalinski P, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol* 1993;150:5321–5329.
506. Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol* 1991;146:108–113.
507. Maes LY, York JL, Soderberg LSF. A soluble factor produced by bone marrow natural suppressor cells blocks interleukin 2 production and activity. *Cell Immuol* 1988;116:35–43.
508. Hertel-Wulff B, Strober S. Immunosuppressive lymphokine derived from natural suppressor cells. *J Immunol* 1988;140:2633–2638.
509. Knaan-Shanzer S, Van Bekkum DW. Soluble factors secreted by naturally occurring suppressor cells that iterfere with in vivo graft-vs.-host disease and with T cell responsiveness in vitro. *Eur J Immunol* 1987;17:827–834.
510. Choi KL, Maier T, Holda JH, Claman HN. Suppression of cytotoxic T-cell generation by natural suppressor cells from mice with GVHD is partially reversed by indomethacin. *Cell Immunol* 1988;112:271–278.
511. Weingust RW, McCain GA, Singhal SK. Regulation of autoimmunity in normal and rheumatoid individuals by bone marrow-derived natural suppressor cells and their suppressor factor: BDSF. *Cell Immunol* 1989;122:154–163.
512. Okada S, Strober S. Spleen cells from adult mice given total lymphoid irradiation or from newborn mice have similar regulatory effects in the mixed leukocyte reaction. I. Generation of antigen-specific cells in the mixed leukocyte reaction after the addition of spleen cells from adult mice given total lymphoid irradiation. *J Exp Med* 1982;156:522–538.
513. Okada S, Strober S. Spleen cells from adult mice given total lymphoid irradiation (TLI) or from newborn mice have similar regulatory effects in the mixed leukocyte reaction. II. Generation of antigen-specific suppressor cells in the MLR after the addtion of spleen cells from newborn mice. *J Immunol* 1982; 129:1892–1897.
514. Oseroff A, Okada S, Strober S. Natural suppressor (NS) cells found in the spleen of neonatal mice and adult mice given total lymphoid irradiation (TLI) express the null surface phenotype. *J Immunol* 1984;132:101–110.
515. Muraoka S, Miller RG. Cells in bone marrow and in T cell colonies grown from bone marrow can suppress generation of cytotoxic T lymphocytes directed against their self antigens. *J Exp Med* 1980;152:54–71.
516. Miller RG. The veto phenomenon and T-cell regulation. *Immunol Today* 1986;7: 112–114.

517. Claesson MH, Miller RG. Functional heterogeneity in allospecific cytotoxic T lymphocyte clones I. CTL clones express strong anti-self suppressive activity. *J Exp Med* 1984;160:1702–1716.
518. Azuma E, Kaplan J. Role of lymphokine-activated killer cells as mediators of veto and natural suppression. *J Immunol* 1988;141:2601–2606.
519. Sambhara SR, Miller RG. Programmed cell death of T cells signaled by the T cell receptor and the alpha-3 domain of class I MHC. *Science* 1991;252: 1424–1427.
520. Kaplan DR, Hambor JE, Tykocinski ML. An immunoregulatory function for the CD8 molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:8512
521. Takahashi H, Nakagawa Y, Leggatt GR, et al. Inactivation of human immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes by free antigenic peptide: a self-veto mechanism? *J Exp Med* 1996;183:879–889.
522. Pearce NW, Spinelli A, Gurley KE, Hall BM. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. V. Dependence of CD4+ suppressor cells on the presence of alloantigen and cytokines, including interleukin-2. *Transplantation* 1993;55:374–379.
523. Roser BJ. Cellular mechanisms in neonatal and adult tolerance. *Immunol Rev* 1989;107:179–202.
524. Tomita Y, Mayumi H, Eto M, Nomoto K. Importance of suppressor T cells in cyclophosphamide-induced tolerance to the non–H-2-encoded alloantigens. Is mixed chimerism really required in maintaining a skin allograft tolerance. *J Immunol* 1990;144:463–473.
525. Tutschka PJ, Ki PF, Beschorner WE, Hess AD, Santos GW. Suppressor cells in transplantation tolerance. II. Maturation of suppressor cells in the bone marrow chimera. *Transplantation* 1981;32:321
526. Lancaster F, Chui YL, Batchelor JR. Anti-idiotypic T cells suppress rejection of renal allografts in rats. *Nature* 1985;315:336–337.
527. Maki T, Gottshalk R, Wood ML, Monaco AP. Specific unresponsiveness to skin allografts in anti-lymphocyte serum-treated, marrow-injected mice: participation of donor marrow-derived suppressor T cells. *J Immunol* 1981;127:1433–1437.
528. Wood ML, Monaco AP. Suppressor cells in specific unresponsiveness to skin allografts in ALS-treated, marrow-injected mice. *Transplantation* 1980;29: 196–200.
529. Wilson DB. Idiotypic regulation of T cells in graft-versus-host disease and autoimmunity. *Immunol Rev* 1989;107:159–176.
530. Koide J, Engleman EG. Differences in surface phenotype and mechanism of action between alloantigen-specific CD8+ cytotoxic and suppressor T cell clones. *J Immunol* 1990;144:32–40.
531. Mossman TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989;7:145
532. Kupiec-Weglinski JW, Wasowska B, Papp I, et al. CD4 mAb therapy modulates alloantibody production and intracardiac graft deposition in association with selective inhibition of Th1 lymphokines. *J Immunol* 1993;151:5053–5061.
533. Gorczynski RM, Wojcik D. A role for nonspecific (cyclosporin A) or specific (monoclonal antibodies to ICAM-1, LFA-1, and IL-10) immunomodulation in the prolongation of skin allografts after antigen-specific pretransplant immunization or transfusion. *J Immunol* 1994;152:2011–2019.
534. Hancock WW, Sayegh MH, Kwok CA, Weiner HL, Carpenter CB. Oral, but not intravenous, alloantigen prevents accelerated allograft rejection by selective intragraft TH2 activation. *Transplantation* 1993;55:1112–1118.
535. Takeuchi T, Lowry RP, Konieczny B. Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. *Transplantation* 1992;53:1281–1294.
536. Mottram PL, Han W-R, Purcell LJ, McKenzie IFC, Hancock WW. Increased expression of IL-4 and IL-10 and decreased expression of IL-2 and interferon-gamma in long-surviving mouse heart allografts after brief CD4-monoclonal antibody therapy. *Transplantation* 1995;59:559–565.
537. Chen N, Field EH. Enhanced type 2 and diminished type 1 cytokines in neonatal tolerance. *Transplantation* 1995;59:933–941.
538. Bucy RP, Li J, Huang GQ, Honjo K, Xu XY. Allograft tolerance induced by combined anti–LFA-1 and anti–ICAM-1 mAb is associated with shift from Th1 to Th2 cytokine expression in allograft [Abstract]. *FASEB J* 1995;9:A497.
539. Onodera K, Hancock WW, Graser E, et al. Type 2 helper T cell-type cytokines and the development of "infectious" tolerance in rat cardiac allograft recipients. *J Immunol* 1997;158:1572–1581.
540. Bishop DK, Chan SY, Eichwald EJ. Th1 and Th2 cytokines promote distinct forms of allograft rejection [Abstract]. *FASEB J* 1995;9:497.
541. Martinez OM, Lang T, Villanueva JC, Esquivel CO, So S, Krams SM. Allograft rejection is associated with a Th2-dominant cytokine profile [Abstract]. *FASEB J* 1995;9:497.
542. Alexander DZ, Pearson TC, Ritchie SC, et al. Analysis of the mechanisms of CTLA4-Ig plus bone marrow induced transplantation tolerance [Abstract]. *FASEB J* 1995;9:783.
543. Zheng XX, Steele AW, Nickerson PW, Steurer W, Steiger J, Strom TB. Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation. *J Immunol* 1995;154: 5590–5600.
544. Wren SM, Wang SC, Thai NL, et al. Evidence for early Th2 T cell predominance in xenoreactivity. *Transplantation* 1993;56:905–911.
545. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737–742.
546. Bohme J, Haskins K, Stecha P, et al. Transgenic mice with I-A on islet cells are normoglycemic but immunologically intolerant. *Science* 1989;244:1179–1183.
547. Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, et al. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 1991;65: 305–317.
548. Hammerling GJ, Schonrich G, Momburg F, et al. Non-deletional mechanisms of peripheral and central tolerance:studies with transgenic mice with tissue-specific expression of a foreign MHC class I antigen. *Immunol Rev* 1991;122:47–67.
549. Picarella DE, Kratz A, Li C, Ruddle NH, Flavell RA. Transgenic tumor necrosis factor (TNF)-α production in pancreatic islets leads to insulinitis, not diabetes: distinct patterns of inflammation in TNF-α and TNF-β transgenic mice. *J Immunol* 1993;150:4136–4150.
550. Heath WR, Allison J, Hoffman MW, et al. Autoimmune diabetes as a consequence of locally produced interleukin-2. *Nature* 1992;359:547–549.
551. von Herrath MG, Guerder S, Lewicki H, Flavell RA, Oldstone MBA. Coexpression of B7-1 and viral ("self") transgenes in pancreatic b cells can break peripheral ignorance and lead to spontaneous autoimmune diabetes. *Immunity* 1995;3: 727–738.
552. Lafferty KJ, Babcock SK, Gill RG. Prevention of rejection by treatment of the graft:an overview. *Prog Clin Biol Res* 1986;224:87.
553. Charlton B, Auchincloss H Jr, Fathman CG. Mechanisms of transplantation tolerance. *Annu Rev Immunol* 1994;12:707–734.
554. Orloff MS, Fallon MA, DeMara E, Coppage ML, Leong N, Cerilli J. Induction of specific tolerance to small-bowel allografts. *Surgery* 1994;116:222–228.
555. Auchincloss H Jr, Sachs DH. Mechanisms of tolerance in murine radiation bone marrow chimeras: I. Nonspecific suppression of alloreactivity by spleen cells from early but not late chimeras. *Transplantation* 1983;36:436.
556. Auchincloss H Jr, Sachs DH. Mechanisms of tolerance in murine radiation bone marrow chimeras II. Absence of nonspecific suppression in mature chimeras. *Transplantation* 1983;36:442.
557. Almaraz R, Ballinger W, Sachs DH, Rosenberg SA. The effect of peripheral lymphoid cells on the incidence of lethal graft versus host disease following allogeneic mouse bone marrow transplantation. *J Surg Res* 1983;34:133–144.
558. Sharp TG, Sachs DH, Fauci AS, Messerschmidt GL, Rosenberg SA. T-cell depletion of human bone marrow using monoclonal antibody and complement mediated lysis. *Transplantation* 1983;35:112–120.
559. Martin P. Overview of marrow transplantation immunology. In: Forman SJ, Blume KG, Thomas ED, eds. *Bone marrow transplantation.* Cambridge, England: Blackwell Scientific, 1994:16
560. Singer A, Hathcock KS, Hodes RJ. Self recognition in allogeneic radiation bone marrow chimeras. A radiation-resistant host element dictates the specificity and immune response gene phenotype of T-helper cells. *J Exp Med* 1981;153:1286.
561. Ruedi E, Sykes M, Ildstad ST, et al. Antiviral T cell competence and restriction specificty of mixed allogeneic (P1 + P2 → P1) irradiation chimeras. *Cell Immunol* 1989;121:185–195.
562. Slavin S, Fuks Z, Strober S, Kaplan H, Howard RJ, Sutherland DER. Transplantation tolerance across major histocompatibility barriers after total lymphoid irradiation. *Transplantation* 1979;28:359.
563. Slavin S, Strober S, Fuks Z, Kaplan HS. Induction of specific tissue transplantation tolerance using fractionated total lymphoid irradiation in adult mice:long-term survival of allogeneic bone marrow and skin grafts. *J Exp Med* 1977;146: 34.
564. Field EH, Rouse TM. Alloantigen priming after total lymphoid irradiation alters alloimmune cytokine responses. *Transplantation* 1995;60:695–702.
565. Zeng D, Ready A, Huie P, et al. Mechanisms of tolerance to rat heart allografts using posttransplant TLI. *Transplantation* 1996;62:510–517.
566. Strober S. Natural suppressor (NS) cells, neonatal tolerance, and total lymphoid irradiation:Exploring obscure relationships. *Ann Rev Immunol* 1984;2:219
567. Najarian JS, Ferguson RM, Sutherland DER, et al. Fractionated total lymphoid irradiation as preparative immunosuppression in high risk renal transplantation: clinical and immunological studies. *Ann Surg* 1982;196:442.
568. Myburgh JA, Meyers AM, Margolius L, et al. Total lymphoid irradiation in clinical renal transplantation—results in 73 patients. *Transplant Proc* 1991;23: 2033–2034.
569. Strober S, Dhillon M, Schubert M, et al. Acquired immune tolerance to cadaveric renal allografts. A study of three patients treated with total lymphoid irradiation. *N Engl J Med* 1989;321:28–33.
570. Thomas J, Alqaisi M, Cunningham P, et al. The development of a posttransplant TLI treatment strategy that promotes organ allograft acceptance without chronic immunosuppression. *Transplantation* 1992;53:247–258.
571. Ildstad ST, Sachs DH. Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature* 1984;307:168–170.
572. Ildstad ST, Wren SM, Bluestone JA, Barbieri SA, Sachs DH. Characterization of mixed allogeneic chimeras: immunocompetence, in vitro reactivity, and genetic specificity of tolerance. *J Exp Med* 1985;162:231–244.
573. Kawai T, Cosimi AB, Colvin RB, et al. Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomologous monkeys. *Transplantation* 1995;59: 256–262.
574. Mayumi H, Good RA. Long-lasting skin allograft tolerance in adult mice

induced across fully allogeneic (multimajor H-2 plus multiminor histocompatibility) antigen barriers by a tolerance-inducing method using cyclophosphamide. *J Exp Med* 1989;169:213.

575. De Vries-van der Zwan A, Besseling AC, De Waal LP, Boog CJP. Specific tolerance induction and transplantation: a single-day protocol. *Blood* 1997;89: 2596–2601.
576. Colson YL, Wren SM, Schuchert MJ, et al. A nonlethal conditioning approach to achieve durable multilineage mixed chimerism and tolerance across major, minor, and hematopoietic histocompatibility barriers. *J Immunol* 1995;155: 4179–4188.
577. Nomoto K, Yung-Yun K, Omoto K, Umesue M, Murakami Y, Matsuzaki G. Tolerance induction in a fully allogeneic combination using anti-T cell receptor-$\alpha\beta$ monoclonal antibody, low dose irradiation, and donor bone marrow transfusion. *Transplantation* 1995;59:395–401.
578. Vallera DA, Taylor PA, Sprent J, Blazar BR. The role of host T cell subsets in bone marrow rejection directed to isolated major histocompatibility complex class I versus class II differences of bm1 and bm12 mutant mice. *Transplantation* 1994;57:249–256.
579. Sharabi Y, Sachs DH, Sykes M. T cell subsets resisting induction of mixed chimerism across various histocompatibility barriers. In: Gergely J, Benczur M, Falus A, et al., eds. *Progress in immunology VIII. Proceedings of the Eighth International Congress of Immunology, Budapest, 1992.* 1992:801
580. Aguila HL, Weissman IL. Hematopoietic stem cells are not direct cytotoxic targets of natural killer cells. *Blood* 1996;87:1225–1231.
581. Sykes M, Sachs DH, Nienhuis AW, Pearson DA, Moulton AD, Bodine DM. Specific prolongation of skin graft survival following retroviral transduction of bone marrow with an allogeneic MHC gene. *Transplantation* 1993;55:197–202.
582. Emery DW, Sablinski T, Shimada H, et al. Expression of an allogeneic MHC DRB transgene, through retroviral transduction of bone marrow, induces specific reduction of alloreactivity. *Transplantation* 1997 (*in press*).
583. Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS. The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9647–9651.
584. Hayashi S-I, Gimble JM, Henley A, Ellingsworth LR, Kincade PW. Differential effects of TGF-β1 on lymphohemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *Blood* 1989;74:1711–1717.
585. Lee LA, Sergio JJ, Sykes M. Evidence for non-immune mechanisms in the loss of hematopoietic chimerism in rat-mouse mixed xenogeneic chimeras. *Xenotransplant* 1995;2:57–66.
586. Pallavicini M, Flake AW, Bethel C, et al. Creation of human-mouse xenogeneic chimeras by the in utero transplantation of hemopoietic cells [Abstract]. *First International Congress on Xenotransplantation.* 1991:50.
587. Lapidot T, Pflumia F, Doedens M, Murdoch B, Williams DE, Dick JE. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* 1992;255:1137–1143.
588. Gritsch HA, Glaser RM, Emery DW, et al. The importance of non-immune factors in reconstitution by discordant xenogeneic hematopoietic cells. *Transplantation* 1994;57:906–917.
589. Yang Y-G, Sergio JJ, Swenson K, Glaser RM, Monroy R, Sykes M. Donor-specific growth factors promote swine hematopoiesis in SCID mice. *Xenotransplant* 1996;3:92–101.
590. Lee LA, Gritsch HA, Sergio JJ, et al. Specific tolerance across a discordant xenogeneic transplantation barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91: 10864–10867.
591. Zhao Y, Fishman JA, Sergio JJ, et al. Immune restoration by fetal pig thymus grafts in T cell-depleted, thymectomized mice. *J Immunol* 1997;158:1641–1649.
592. Zhao Y, Swenson K, Sergio JJ, Arn JS, Sachs DH, Sykes M. Skin graft tolerance across a discordant xenogeneic barrier. *Nature Med* 1996;2:1211–1216.
593. Zhao Y, Sergio JJ, Swenson KA, Arn JS, Sachs DH, Sykes M. Positive and negative selection of functional mouse CD4 cells by porcine MHC in pig thymus grafts. *J Immunol* 1997;159:2100–2107.
594. Markert ML, Kostyu DD, Ward FE, et al. Successful formation of a chimeric human thymus allograft following transplantation of cultured postnatal human thymus. *J Immunol* 1997;158:998–1005.
595. Salaun J, Bandeira A, Khazaal I, et al. Thymic epithelium tolerizes for histocompatibility antigens. *Science* 1990;247:1471–1474.
596. Ohki H, Martin C, Corbel C, Coltey M, Le Douarin NM. Tolerance induced by thymic epithelial grafts in birds. *Science* 1987;237:1032–1035.
597. Modigliani Y, Tomas-Vaslin V, Bandeira A, et al. Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate dominant tolerance toward tissue grafts of the thymic epithelium haplotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7555–7559.
598. Modigliani Y, Pereira P, Thomas-Vaslin V, et al. Regulatory T cells in thymic epithelium-induced tolerance. I. Suppression of mature peripheral non-tolerant T cells. *Eur J Immunol* 1995;25:2563–2571.
599. Touraine JL, Raudrant D, Rebaud A, et al. In utero transplantation of stem cells in humans:immunological aspects and clinical follow-up of patients. *Bone Marrow Transplant* 1992;9(suppl 1):121–126.
600. Flake AW, Roncarolo M-G, Puck JM, et al. Treatment of X-linked severe combined immunodeficiency by in utero transplantation of paternal bone marrow. *N Engl J Med* 1996;335:1806–1810.
601. Carrier E, Lee TH, Busch MP, Cowan MJ. Induction of tolerance in nondefective mice after in utero transplantation of major histocompatibility complex-mismatched fetal hematopoietic stem cells. *Blood* 1995;86:4681–4690.
602. Kawashima I, Zanjani ED, Almaida-Porada G, Flake AW, Zeng H, Ogawa M. CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells. *Blood* 1996;87:4136–4142.
603. Hedrick MH, Rice HE, MacGillivray TE, Bealer JF, Zanjani ED, Flake AW. Hematopoietic chimerism achieved by in utero hematoopietic stem cell injection does not induce donor-specific tolerance for renal allografts in sheep. *Transplantation* 1994;58:110–111.
604. Streilein JW. Neonatal tolerance of H-2 alloantigens. *Transplantation* 1991; 52:1–10.
605. Alard P, Matriano JA, Socarras S, Ortega M-A, Streilein JW. Detection of donor-derived cells by polymerase chain reaction in neonatally tolerant mice. Microchimerism fails to predict tolerance. *Transplantation* 1995;60:1125–1130.
606. Smith JP, Kasten-Jolly J, Field LJ, Thomas JM. Assessment of donor bone marrow cell–derived chimerism in transplantation tolerance using transgenic mice. *Transplantation* 1994;58:324–329.
607. Lubaroff DM, Silvers WK. The importance of chimerism in maintaining tolerance of skin allografts in mice. *J Immunol* 1973;111:65–71.
608. Sykes M, Sheard MA, Sachs DH. Effects of T cell depletion in radiation bone marrow chimeras II. Requirement for allogeneic T cells in the reconstituting bone marrow inoculum for subsequent resistance to breaking of tolerance. *J Exp Med* 1988;168:661–673.
609. Khan A, Tomita Y, Sykes M. Thymic dependence of loss of tolerance in mixed allogeneic bone marrow chimeras after depletion of donor antigen. Peripheral mechanisms do not contribute to maintenance of tolerance. *Transplantation* 1996;62:380–387.
610. Donckier V, Wissing M, Bruyns C, et al. Critical role of interleukin 4 in the induction of neonatal transplantation tolerance. Transplantation 1995;59: 1571–1576.
611. Sarzotti M, Robbins DS, Hoffman PM. Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science* 1996;271:1726–1728.
612. Forsthuber T, Yip HC, Lehmann PV. Induction of Th1 and Th2 immunity in neonatal mice. *Science* 1996;271:1728–1730.
613. Ridge JP, Fuchs EJ, Matzinger P. Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science* 1996;271:1723–1726.
614. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, et al. Chimerism and donor-specific nonreactivity 27 to 29 years after kidney allotransplantation. *Transplantation* 1993;55: 1272–1277.
615. Anonymous. The lost chord: microchimerism and allograft survival. *Immunol Today* 1996;17:577–584.
616. Wood K, Sachs DH. Chimerism and transplantation tolerance: cause and effect. *Immunol Today* 1996;17:584–588.
617. Eynon EE, Parker DC. Parameters of tolerance induction by antigen targeted to B lymphocytes. *J Immunol* 1993;151:2958–2964.
618. Fuchs EJ, Matzinger P. B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science* 1992;258:1156–1159.
619. Lombardi G, Hargreaves R, Sidhu S, et al. Antigen presentation by T cells inhibits IL-2 production and induces IL-4 release due to altered cognate signals. *J Immunol* 1996;156:2769–2775.
620. Burlingham WJ, Grailer AP, Fechner JH Jr, et al. Microchimerism linked to cytotoxic T lymphocyte functional unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient. *Transplantation* 1995;59:1147–1155.
621. Murase N, Starzl TE, Ye Q, et al. Multilineage hematopoietic reconstitution of supralethally irradiated rats by syngeneic whole organ transplantation with particular reference to the liver. *Transplantation* 1996;61:1–4.
622 Taniguchi H, Toyoshima T, Fukao K, Nakauchi H. Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver. *Nature Med* 1996;2:198–203.
623. Lu L, Rudert WA, Qian SG, et al. Growth of donor-derived dendritic cells from the bone marrow of murine liver allograft recipients in response to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1995;182:379–387.
624. Bushell A, Pearson TC, Morris PJ, Wood KJ. Donor-recipient microchimerism is not required for tolerance induction following recipient pretreatment with donor-specific transfusion and anti-CD4 antibody. *Transplantation* 1995;59: 1367–1371.
625. Shirwan H, Wang HK, Barwari L, Makowka L, Cramer DV. Pretransplant injection of allograft recipients with donor blood or lymphocytes permits allograft tolerance without the presence of persistent donor microchimerism. *Transplantation* 1996;61:1382–1386.
626. Fisher RA, Cohen DS, Ben-Ezra JM, Sallade RE, Tawes JW, Tarry WC. Induction of long-term graft tolerance and donor/recipient chimerism. *J Surg Res* 1996;60:181–185.
627. Schlitt HJ. Is microchimerism needed for allograft tolerance? *Transplant Proc* 1997;29:82–84.
628. Hisanaga M, Hundrieser J, Boker K, et al. Development, stability, and clinical correlations of allogeneic microchimerism after solid organ transplantation. *Transplantation* 1996;61:40–45.
629. Schlitt HJ, Hundreiser J, Ringe B, Pichlmayr R. Systemic microchimerism of donor-type associated with irreversible acute liver graft rejection eight years after transplantation. *N Engl J Med* 1994;330:646–647.

630. Shapiro R, Rao AS, Fontes P, et al. Combined simultaneous kidney/bone marrow transplantation. *Transplantation* 1995;60:1421–1425.
631. Rolles K, Burroughs AK, Davidson BR, Karatapanis S, Prentice HG, Hamon MD. Donor-specific bone marrow infusion after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 1994;343:263–265.
632. Ricordi C, Karatzas T, Nery J, et al. High-dose donor bone marrow infusions to enhance allograft survival. The effect of timing. *Transplantation* 1997;63:7–11.
633. Garcia-Morales R, Carreno M, Mathew JM, et al. The effects of chimeric cells following donor bone marrow infusions as detected by PCR-flow assays in kidney transplant recipients. *J Clin Invest* 1997;99:1118–1129.
634. Mathew JM, Carreno M, Fuller L, Ricordi C, Esquenazi V, Miller J. Modulatory effects of human donor bone marrow cells on allogeneic immune responses. *Transplantation* 1997;63:689–692.
635. Thomas JM, Verbanac KM, Smith JP, et al. The facilitating effect of one-DR antigen sharing in renal allograft tolerance induced by donor bone marrow in rhesus monkeys. *Transplantation* 1995;59:245–255.
636. Tomita Y, Sachs DH, Sykes M. Myelosuppressive conditioning is required to achieve engraftment of pluripotent stem cells contained in moderate doses of syngeneic bone marrow. *Blood* 1994;83:939–948.
637. Ramshaw HS, Crittenden RB, Dooner M, Peters SO, Rao SS, Quesenberry PJ. High levels of engraftment with a single infusion of bone marrow cells into normal unprepared mice. *Biol Blood Marrow Transplant* 1995;1:74–80.
638. Sykes M, Szot GL, Swenson K, Pearson DA. Separate regulation of hematopietic and thymic engraftment. *Exp Hematol* 1997 (*in press*).
639. Sykes M, Szot GL, Swenson K, Pearson DA. Induction of high levels of allogeneic hematopoietic reconstitution and donor-specific tolerance without myelosuppressive conditioning. *Nature Med* 1997;3:783–787.
640. Waldmann H, Cobbold S. The use of monoclonal antibodies to achieve immunological tolerance. *Immunol Today* 1993;14:247–251.
641. Kobata T, Ohnishi Y, Urushibara N, Takahashi TA, Sekiguchi S. UV irradiation can induce in vitro clonal anergy in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 1993;82:176–181.
642. Wood KJ. Transplantation tolerance with monoclonal antibodies. *Semin Immunol* 1990;2:389–399.
643. Lombardi G, Sidhu S, Batchelor R, Lechler R. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science* 1994;264:1587–1589.
644. Pearson TC, Alexander DZ, Winn KJ, Linsley PS, Lowry RP, Larsen CP. Transplantation tolerance induced by CTLA4Ig. *Transplantation* 1994;57:1701–1706.
645. Baliga P, Chavin KD, Qin L, et al. CTLA4Ig prolongs allograft survival while suppressing cell-mediated immunity. *Transplantation* 1994;58:1082–1090.
646. Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, et al. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med* 1995; 181:1869–1874.
647. Yin D, Fathman CG. Induction of tolerance to heart allografts in high responder rats by combining anti-CD4 with CTLA4Ig. *J Immunol* 1995;155:1655–1659.
648. Lenshow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islets induced by CTLA4Ig. *Science* 1992;257:789.
649. Lafferty KJ. A contemporary view of transplantation tolerance: an immunologist's perspective. *Clin Transplant* 1994;8:181–187.
650. Calne R, Davies H. Organ graft tolerance: the liver effect. *Lancet* 1994;343:67–68.
651. Sun J, McCaughan GW, Matsumoto Y, Sheil AGR, Gallagher ND, Bishop GA. Tolerance to rat liver allografts. I. Differences between tolerance and rejection are more marked in the B cell compared with the T cell or cytokine response. *Transplantation* 1994;57:1349–1357.
652. Starzl TE, Murase N, Thomson A, Demetris AJ. Liver transplants contribute to their own success. *Nature Med* 1996;2:163–165.
653. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995;80:707–718.
654. Schweitzer AN, Borriello F, Wong RCK, Abbas AK, Sharpe AH. Role of costimulators in T cell differentiation. Studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86. *J Immunol* 1997;158:2713–2722.
655. Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD, Noelle RJ. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol Today* 1994;15: 406–411.
656. Noelle RJ. CD40 and its ligand in host defense. *Immunity* 1996;4:415–419.
657. Isobe M, Yagita H, Okumura K, Ihara A. Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* 1992;255: 1125–1127.
658. Qin S, Cobbold SP, Pope H, et al. "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 1993;259:974–977.
659. Cobbold SP, Adams E, Marshall SE, Davies JD, Waldmann H. Mechanisms of peripheral tolerance and suppression induced by monoclonal antibodies to CD4 and CD8. *Immunol Rev* 1996;149:5–34.
660. Rao SS, Peters SO, Crittenden RB, Stewart FM, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. Stem cell transplantation in the normal nonmyeloablated host: relationship between cell dose, schedule, and engraftment. *Exp Hematol* 1997;25:114–121.
661. Homan WP, Fabre JW, Williams KA, Millard PR, Morris PJ. Studies of the immunosuppressive properties of cyclosporin A in rats receiving renal allografts. *Transplantation* 1980;29:360–369.
662. Hall BM, Pearce NW, Gurley K, Dorsch SE. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. *J Exp Med* 1990;171:141–157.
663. Rosengard BR, Ojikutu CA, Guzetta PC, et al. Induction of specific tolerance to class I–disparate renal allografts in miniature swine with cyclosporine. *Transplantation* 1992;54:490–497.
664. Gianello PR, Blancho G, Fishbein JF, et al. Mechanism of cylosporin-induced tolerance to primarily vascularized allografts in miniature swine. Effect of administratin of exogenous IL-2.*J Immunol* 1994;153:4788–4797.
665. Blancho G, Gianello PR, Germana S, Baetscher M, Sachs DH, LeGuern C. Molecular identification of porcine interleukin-10: regulation of expression in a kidney allograft model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2800–2804.
666. Blancho G, Gianello PR, Lorf T, et al. Molecular and cellular events implicated in local tolerance to kidney allografts in miniature swine. *Transplantation* 1997;63:26–33.
667. Yamada K, Gianello PR, Ierino FL, et al. Role of the thymus in transplantation tolerance in miniature swine. I. Requirement of the thymus for rapid and stable induction of tolerance to class I–mismatched renal allografts. *J Exp Med* 1997;186:497–506.
668. Agus DB, Surh CD, Sprent J. Reentry of T cells to the adult thymus is restricted to activated T cells. *J Exp Med* 1991;173:1039–1046.
669. Oluwole SF, Jin M-X, Chowdhury NC, Ohajewkwe OA. Effectiveness of intrathymic inoculation of soluble antigens in the induction of specific unresponsiveness to rat islet allografts without transient recipient immunosuppression. *Transplantation* 1994;58:1077–1081.
670. Odorico JS, O'Connor T, Campos L, Barker CF, Posselt AM, Naji A. Examination of the mechanisms responsible for tolerance induction after intrathymic inoculation of allogeneic bone marrow. *Ann Surg* 1993;218:525–531.
671. Debruin RWF, Vanrossum TJ, Scheringa M, Bonthuis F, Ijzermans JNM, Marquet RL. Intrathymic injection of alloantigen may lead to hyperacute rejection and prolonged graft survival of heart allografts in the rat. *Transplantation* 1996;60:1061–1063.
672. Alfrey EJ, Wang X, Lee L, et al. Tolerance induced by direct inoculation of donor antigen into the thymus in low and high responder rodents. *Transplantation* 1995;59:1171–1176.
673. Speiser DE, Schneider R, Hengartner H, MacDonald HR, Zinkernagel RM. Clonal deletion of self-reactive T cells in irradiation bone marrow chimeras and neonatally tolerant mice. Evidence for intercellular transfer of Mlsa. *J Exp Med* 1989;170:595–600.
674. Billingham RE, Medawar PB. Technique of free skin grafting in mammals. *J Exp Biol* 1951;28:385.
675. Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH, et al. Evolution of liver transplantation. *Hepatology* 1982;2:614.
676. Calne RY. Liver grafting. *Transplantation* 1983;35:109.
677. Russell PS. Some immunological considerations in liver transplantation. *Hepatology* 1984;4(suppl):76–78.
678. Ramsey G, Nusbacher J, Starzl TE, Lindsay GD. Isohemagglutinins of graft origin after ABO-unmatched liver transplantation. *N Engl J Med* 1984;311: 1167–1170.
679. Burdick JF, Vogelsang GB, Smith WJ, et al. Severe graft-versus-host disease in a liver-transplant recipient. *N Engl J Med* 1988;318:689–691.
680. Jamieson SW, Stinson EB, Shumway NE. Cardiac transplantation in 150 patients at Stanford University. *Br Med J* 1979;1:93.
681. Burke CM, Baldwin JC, Morris AJ, et al. Twenty-eight cases of human heart-lung transplantation. *Lancet* 1986;1:517.
682. Griepp RB, Stinson EB, Bieber CP, et al. Control of graft arteriosclerosis in human heart transplant recipients. *Surgery* 1977;81:262.
683. Toronto Lung Transplant Group. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1986;314:1140.
684. Cosimi AB, Auchincloss H Jr, Delmonico FL, et al. Combined kidney and pancreas transplantation in diabetics. *Arch Surg* 1988;123:621.
685. Pancreas Transplantation in the United States as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and analyzed by the International Pancreas Transplant Registry. In: Cecka and Terasaki, eds. *Clinical transplants 1995*. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1995.
686. Kuhr CS, Davis CL, Barr D, et al. Use of ultrasound and cystoscopically guided pancreatic allograft biopsies and transabdominal renal allograft biopsies: safety and efficacy in kidney-pancreas transplant recipients. *J Urol* 1995;153:316–321.
687. Matas AJ, Sutherland DER, Steffes MW, Najarian JS. Islet transplantation. *Surg Gynecol Obstet* 1977;145:757.
688. Martin PJ, Hansen JA, Torok-Storb B, et al. Graft failure in patients receiving T cell–depleted HLA-identical allogeneic marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1988;3:445–456.
689. Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: increased risk of relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med* 1988;108:806
690. Blazar BR, Taylor PA, Linsley PS, Vallera DA. In vivo blockade of CD28/CTLA4: B7/BB1 interaction with CTLA4-Ig reduces lethal murine graft-versus-host disease across the major histocompatibility complex barrier in mice. *Blood* 1994;83:3815–3825.
691. Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Blockade of CD40 ligand-CD40 interactions impairs $CD4^+$ T cell–mediated alloreactivity by inhibiting

mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation. *J Immunol* 1997;158:29–39.

692. Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Gray GS, Vallera DA. Coblockade of the LFA1:ICAM and CD28/CTLA4:B7 pathways is a highly effective means of preventing acute lethal graft-versus-host disease induced by fully major histocompatibility complex–disparate donor grafts. *Blood* 1995;85: 2607–2618.
693. Townsend RM, Briggs C, Marini JC, Murphy GF, Korngold R. Inhibitory effect of a CD4-CDR3 peptide analog on graft-versus-host disease across a major histocompatibility complex–haploidentical barrier. *Blood* 1996;88:3038–3047.
694. Koch U, Korngold R. A synthetic CD4-CDR3 peptide analog enhances bone marrow engraftment across major histocompatibility barriers. *Blood* 1997;89: 2880–2890.
695. Sykes M, Romick ML, Hoyles KA, Sachs DH. In vivo administration of interleukin 2 plus T cell–depleted syngeneic marrow prevents graft-versus-host disease mortality and permits alloengraftment. *J Exp Med* 1990;171:645–658.
696. Brok HPM, Heidt PJ, Van der Meide PH, Zurcher C, Vossen JM. Interferon-gamma prevents graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Immunol* 1993;151:6451–6459.
697. Sykes M, Szot GL, Nguyen PL, Pearson DA. Interleukin-12 inhibits murine graft-vs-host disease. *Blood* 1995;86:2429–2438.
698. Sykes M, Romick ML, Sachs DH. Interleukin 2 prevents graft-vs-host disease while preserving the graft-vs-leukemia effect of allogeneic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5633–5637.
699. Sykes M, Harty MW, Szot GL, Pearson DA. Interleukin-2 inhibits graft-versus-host disease-promoting activity of CD4+ cells while preserving CD4- and CD8-mediated graft-versus-leukemia effects. *Blood* 1994;83:2560–2569.
700. Yang Y-G, Sergio JJ, Pearson DA, Szot GL, Sykes M. Interleukin-12 preserves the CD8-mediated graft-vs-leukemia effect of allogeneic T cells while inhibiting graft-vs-host disease. *Blood* 1997 (*in press*)
701. Johnson BD, McCabe C, Hanke CA, Truitt RL. Use of anti-CD3 epsilon F(ab')2 fragments in vivo to modulate graft-versus-host disease without loss of graft-versus-leukemia reactivity after MHC-matched bone marrow transplantation. *J Immunol* 1995;154:5542–5554.
702. Cahn JY, Bordigoni P, Tiberghien P, et al. Treatment of acute graft-versus-host disease with methylprednisolone and cyclosporine with or without an anti–interleukin-2 receptor monoclonal antibody. *Transplantation* 1995;60:939–942.
703. Anasetti C, Hansen JA, Waldmann TA, et al. Treatment of acute graft-versus-host disease with humanized anti-Tac: an antibody that binds to the interleukin-2 receptor. *Blood* 1994;84:1320–1327.
704. Herve P, Flesch M, Tiberghien P, et al. Phase I-II trial of a monoclonal anti-tumor necrosis factor α antibody for the treatment of refractory severe acute graft-versus-host disease. *Blood* 1992;79:3362–3368.
705. Antin JH, Weinstein HJ, Guinan EC, et al. Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of steroid-resistant graft-versus-host disease. *Blood* 1994;84:1342–1348.
706. Sykes M, Sheard MA, Sachs DH. Graft-versus-host–related immunosuppression is induced in mixed chimeras by alloresponses against either host or donor lymphohematopoietic cells. *J Exp Med* 1988;168:2391–2396.
707. Sykes M, Chester CH, Sachs DH. Protection from graft-versus-host disease in fully allogeneic chimeras by prior administration of T cell–depleted syngeneic bone marrow. *Transplantation* 1988;46:327–330.
708. Johnson BD, Drobyski WR, Truitt RL. Delayed infusion of normal donor cells after MHC-matched bone marrow transplantation provides and antileukemia reaction without graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1993;11: 329–336.
709. Kolb HJ, Mittrmuller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990;76:2462–2465.
710. Cullis JO, Jiang YZ, Schwarer AP, Hughes TP, Barrett AJ, Goldman JM. Donor leukocyte infusions for chronic myeloid leukemia in relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1992;79:1379–1381.
711. Mackinnon S, Papadopoulos EB, Carabasi MH, et al. Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia resonses from graft-versus-host disease. *Blood* 1995;86:1261–1268.
712. Sykes M, Sheard M, Sachs DH. Effects of T cell depletion in radiation bone marrow chimeras. I. Evidence for a donor cell population which increases allogeneic chimerism but which lacks the potential to produce GVHD. *J Immunol* 1988;141:2282–2288.
713. Lapidot T, Faktorowich Y, Lubin I, Reisner Y. Enhancement of T-cell–depleted bone marrow allografts in the absence of graft-versus-host disease is mediated by CD8+CD4- and not by CD8-CD4+ thymocytes. *Blood* 1992;80:2406–2411.
714. Martin PJ. Prevention of allogeneic marrow graft rejection by donor T cells that do not recognize recipient alloantigens: potential role of a veto mechanism. *Blood* 1996;88:962–969.
715. Champlin R, Jansen J, Ho W, et al. Retention of graft-versus-leukemia using selective depletion of CD8-positive T lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease following bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Transplant Proc* 1991;23:1695–1696.
716. Truitt RL, Shih C-Y, LeFever AV, Tempelis LD, Andreani M, Bortin MM. Characterization of alloimmunization-induced T lympohcytes reactive against AKR leukemia in vitro and correlation with graft-versus-leukemia activity in vivo. *J Immunol* 1983;131:2050–2058.
717. van Lochem E, de Gast B, Goulmy E. In vitro separation of host specific graft-versus-host and graft-versus-leukemia cytotoxic T cell activities. *Bone Marrow Transplant* 1992;10:181–183.
718. van der Harst D, Goulmy E, Falkenburg JHF, et al. Recognition of minor histocompatibility antigens on lymphocytic and myeloid leukemic cells by cytotoxic T-cell clones. *Blood* 1994;84:1060–1066.
719. Oettel KR, Wesly OH, Albertini MR, et al. Allogeneic T cell clones able to selectively destroy Philadelphia chromosome (Ph1) bearing human leukemia lines can also recognize Ph1 negative cells from the same patient. *Blood* 1994;83:3390–3402.
720. Kwak LW, Pennington R, Longo DL. Active immunization of murine allogeneic bone marrow transplant donors with B-cell tumor–derived idiotype: a strategy for enhancing the specific antitumor effect of marrow grafts. *Blood* 1996; 87:3053–3060.
721. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Med* 1996;2:52–58.
722. Hsu FJ, Caspar CB, Czerwinski D, et al. Tumor-specific idiotype vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma—long-term results of a clinical trial. *Blood* 1997;89:3129–3135.
723. Sachs DH. The pig as a potential xenograft donor. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;43:185–191.
724. Oriol R, Ye Y, Koren E, Cooper DKC. Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation. *Transplantation* 1993;56: 1433–1442.
725. Seebach JD, Comrack C, Germana S, LeGuern C, Sachs DH, DerSimonian H. HLA-Cw3 expression on porcine endothelial cells protects against xenogeneic cytotoxicity mediated by a subset of human NK cells. *J Immunol* 1997;159: 3655–3661.
726. Moses RD, Pierson RN III, Winn HJ, Auchincloss H Jr. Xenogeneic proliferation and lymphokine production are dependent on CD4+ helper T cells and self antigen-presenting cells in the mouse. *J Exp Med* 1990;172:567–575.
727. Wecker H, Winn HJ, Auchincloss H Jr. CD4+ T cells, without CD8+ or B lymphocytes, can reject xenogeneic skin grafts. *Xenotransplantation* 1994;1:8–16.
728. Chan DV, Auchincloss H Jr. Human anti-pig cell–mediated cytotoxicity in vitro involves non-T as well as T cell components. *Xenotransplantation* 1996;3:158–165.
729. Yamada K, Seebach JD, DerSimonian H, Sachs DH. Human anti-pig T-cell mediated cytotoxicity. *Xenotransplantation* 1996;3:179–187.
730. Inverardi L, Samaja M, Motterlini R, Mangili F, Bender JR, Pardi R. Early recognition of a discordant xenogeneic organ by human circulating lymphocytes. *J Immunol* 1992;149:1416–1423.
731. Seebach JD, Yamada K, McMorrow IM, Sachs DH, DerSimonian H. Xenogeneic human anti-pig cytotoxicity mediated by activated natural killer cells. *Xenotransplantation* 1996;3:188–197.
732. Dorling A, Binns R, Lechler RI. Cellular xenoresponses: observation of significant primary indirect human T cell anti-pig xenoresponses using co-stimulator–deficient or SLA class II–negative porcine stimulators. *Xenotransplantation* 1996;3:112–119.
733. Dorling A, Binns R, Lechler RI. Significant primary indirect human T-cell anti-pig xenoresponses observed using immature porcine dendritic cells and SLA-class II–negative endothelial cells. *Transplant Proc* 1996;28:654.
734. Tearle RG, Tange MJ, Zannettino ZL, et al. The α-1,3-Galactosyltransferase knockout mouse. *Transplantation* 1996;61:13–19.
735. Platt JL, Logan JS. Use of transgenic animals in xenotransplantation. *Transplant Rev* 1996;10:69–77.
736. Waterworth PD, Cozzi E, Tolan MJ, et al. Pig-to-primate cardiac xenotransplantation and cyclophosphamide therapy. *Transplant Proc* 1997;29:899–900.
737. Storck M, Abendroth D, Prestel R, et al. Morphology of hDAF (CD55) transgenic pig kidneys following ex-vivo hemoperfusion with human blood. *Transplantation* 1997;63:304–310.
738. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Med* 1997;3:282–286.
739. Reemtsma K. Renal heterotransplantation from nonhuman primates to man. *Ann N Y Acad Sci* 1969;162:412–418.
740. Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J, et al. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nature Med* 1997;3:350–353.
741. Terasaki PI, ed. *Clinical transplants, 1987.* Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1987.
742. Terasaki PI, ed. *Clinical transplants, 1988.* Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1988.
743. Ascher NL, Simmons RL, Fryd D, Noreen H, Najarian JS. Effects of HLA-A and B matching on success of cadaver grafts at a single center. *Transplantation* 1979;28:172.
744. Opelz G. Correlation of HLA matching with kidney graft survival in patients with or without cyclosporine treatment. *Transplantation* 1985;40:240–243.
745. Opelz G, Terasaki PI. International study of histocompatibility in renal transplantation. *Transplantation* 1982;33:87.

746. Persign GG, Cohen B, Lansbergen Q, et al. Effect of HLA-A and HLA-B matching on survival of grafts and recipients after renal transplantation. *N Engl J Med* 1982;307:905.
747. Tiwari JL. HLA matching and kidney graft survival: a review. In: Terasaki PI, ed. *Clinical transplants 1986.* Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1986:333–340.
748. Festenstein H, Doyle P, Holmes J. Long-term follow-up in London transplant group recipients of cadaver renal allografts: the influence of HLA matching on transplant outcome. *N Engl J Med 1986;314:7.*
749. Middleton D, Gillespie EL, Doherty CC, Douglas JF, McGeown MG. The influence of HLA-A,B, and DR matching on graft survival in primary cadaveric renal transplantation in Belfast. *Transplantation* 1985;39:608–610.
750. Sanfilippo F, Vaughn WK, Spees EK, Heise ER, LeFor WM. The effect of HLA-A,-B matching on cadaver renal allograft rejection comparing public and private specificities. *Transplantation* 1984;38:483–489.
751. Berg B, Moller E. The influence of HLA-DR match on the outcome of cadaver renal transplantation in Stockholm during 1977–1980. *Tissue Antigens* 1981;18:316–328.
752. Morris PJ, Ting A. Studies of HLA-DR with relevance to renal transplantation. *Immunol Rev* 1982;66:103.
753. Ayoub G, Terasaki P. HLA-DR matching in multicenter, single-typing laboratory data. *Transplantation* 1982;33:515.
754. Brynger H, Rydberg B, Samuelsson B, Sandberg L. Experience with 14 renal transplants with kidneys from blood group A (subgroup A2) to O recipients. *Transplant Proc* 1984;16:1175–1176.
755. Fuller TC, Phelan D, Gebel HM, Rodey GE. Antigen specificity of antibody reactive in the antiglobulin-augmented lymphocytotoxicity test. *Transplantation* 1982;34:24.
756. Thisthlethwaite JR Jr, Buckingham M, Stuart JK, Gaber AO, Mayes JT, Stuart FP. T cell immunofluorescence flow cytometry cross-match results in renal transplants. *Transplant Proc* 1987;19:722.
757. Cook DJ, Terasaki PI, Iwaki Y, et al. The flow cytometry crossmatch in kidney transplantation. In: Terasaki PI, ed. Clinical Transplants, 1987. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1987.
758. Pelletier RP, Orosz CG, Adams PW, et al. Clinical and economic impact of flow cytometry crossmatching in primary cadaveric kidney and simultaneous pancreas-kidney transplant recipients. *Transplantation* 1997;63:1639–1645.
759. Delmonico FL, Fuller A, Cosimi AB, et al. New approaches to donor crossmatching and successful transplantation of highly sensitized patients. *Transplantation* 1983;36:629.
760. Fuller TC, Forbes JB, Delmonico FL. Renal transplantation with a positive historical donor crossmatch. *Transplant Proc 1985;17:113–115.*
761. Smith WJ. Monitoring the components of the immune system. In: Williams GM, Burdick JF, Solez K, eds. *Kidney transplant rejection:* diagnosis and treatment. New York: Marcel Dekker, 1987:264–282.
762. Stiller C, Sinclair N, McGirr D, Jernikar A, Ullan R. Diagnostic and prognostic value of donor specific posttransplant immune responses: clinical correlates and in vitro variables. *Transplant Proc* 1978;10:525–530.
763. Kincaid-Smith P. Histological diagnosis of rejection of renal homografts in man. *Lancet* 1967;2:849–852.
764. Kiaer H, Hansen HE, Olsen S. The predictive value of percutaneous biopsies from human renal allografts with early impaired function. *Clin Nephrol* 1980; 13:58–63.
765. Banfi G, Imbasciati Etarantino A, Ponticelli C. Prognostic value of renal biopsy in acute rejection of kidney transplantation. *Nephron* 1981;28:222–226.
766. Matas AJ, Sibley R, Mauer M, Sutherland DE, Simmons RL, Najarian JS. The value of needle renal allograft biopsy. I. A retrospective study of biopsies performed during putative rejection episodes. *Ann Surg* 1983;197:226–237.
767. Sibley RK, Rynasiewicz JJ, Ferguson RM, et al. Morphology of cyclosporine nephrotoxicity and acute rejection in patients immunosuppressed with cyclosporine and prednisone. *Surgery* 1983;94:245.
768. Bishop GA, Hall BM, Duggin GG, Horvath JS, Sheil AG, Tiller DJ. Diagnosis of renal allograft rejection by analysis of fine needle aspiration biopsy specimens with immunostains and simple cytology. *Lancet* 1986;2:645–650.
769. Colvin RB Immunopathology of renal allografts. In: Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT, eds. *Diagnostic immunopathology.* New York: Raven Press, 1988:151–197.
770. Burdick JF, Beschorner WE, Smith WJ, McGraw DJ, Bender WL, Williams GM, Solez K. Characteristics of early routine renal allograft biopsies. *Transplantation* 1984;38:679–684.
771. Solez K, McGraw DJ, Beschorner WE, Burdick JF Pathology of "acute tubular necrosis" and acute rejection:Observations on early systematic renal tranplant biopsies. In: Williams GM, Burdick JF, Solez K, eds. *Kidney transplant rejection.* New York: Marcel Dekker, 1986:207–224.
772. Rosengard BR, Kortz EO, Guzzetta PC, et al. Transplantation in miniature swine: analysis of graft-infiltrating lymphocytes provides evidence for local suppression. *Hum Immunol* 1990;28:153–8.
773. Schulick RD, Weir MB, Miller MW, Cohen DJ, Bermas BL, Shearer GM. Longitudinal study of in vitro $CD4^+$ T helper cell function in recently transplanted renal allograft patients undergoing tapering of their immunosuppressive drugs. *Transplantation* 1993;56:590–596.
774. Winn HJ. Laws of transplantation. In: *Human immunogenetics.* New York: Marcel Dekker, 1988.

第37章　肿瘤免疫学

Hanks Schreiber[①]

1237　自19世纪末20世纪初以来,将免疫学应用于癌症问题的解决强烈吸引着免疫学家。几十年肿瘤免疫学研究的最强动力是,敏感的免疫学技术有可能检测到可用于癌症的预防、治疗和(或)诊断的肿瘤特异性物质。的确,在近交系小鼠发展以后,20世纪50年代和60年代的肿瘤移植研究显示,小鼠可被免疫以抵抗在同种近交系小鼠体内产生的化学诱导的肿瘤移植物。这些研究提供了"肿瘤特异性"排斥抗原存在的第一个证据,开创了肿瘤免疫学的近代史。然而,由于没有分子信息,小鼠或人肿瘤是否真的表达真正意义上的肿瘤特异性抗原(即只在恶性细胞上表达并被免疫系统识别的分子)仍不清楚。近年来,两个发现已为肿瘤免疫学提供了坚实的基础,深刻地改变了我们的观点。第一个是,T细胞能识别被"加工过的"、以肽的形式被运送到细胞表面且作为靶结构被主要组织相容性复合体(MHC)分子呈递给克隆选择特异性T细胞的细胞内

① H. Schreiber: Department of Pathology, The University of Chicago, Chicago, Illinois 60637.

蛋白抗原。第二个发现是,存在被T细胞识别的、由肿瘤特异性体细胞突变编码的真正的肿瘤特异性抗原。综合这些发现提示:在恶性细胞与正常细胞间,临床上有用的免疫学差异将被发现。

虽然免疫学家在癌症的治疗或诊断方面没有取得主要的突破,但用免疫学技术对癌细胞及其产物的研究已有了重要的发现。例如,肿瘤移植研究为MHC的发现和近交系小鼠的发展铺平了道路。骨髓瘤蛋白(即恶性浆细胞产生的抗体)的免疫学分析导致了抗体分子的化学和物理学定性。在其他例子中,免疫学机制首先在肿瘤系统中被观察到,但后来却发现有着广泛得多的应用。例如,在研究小鼠白血病免疫应答时,发现了表面分子的抗原调变现象。恶性造血细胞上细胞表面抗原的分析导致了允许分离不同功能淋巴细胞的标记的发现。同样,使用肿瘤移植物,移植增强作用首先被证实。最后,探寻利用肿瘤免疫的非特异性方法,导致了细胞类型如自然杀伤(NK)细胞和细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF)的发现。 *1238*

目前,我们缺乏多种癌或所有的癌所共有的肿瘤特异性诊断标记,因而,惟一可靠的恶性肿瘤诊断通常由病理学者利用组织学或细胞学技术来完成[1]。尽管"tumor"仅仅表示"肿大"的意思,但它通常等同于字面上"新生长"的肿瘤。肿瘤是一种促使其出现的刺激物撤消后仍持续存在和增殖的异常组织块。有两种类型的肿瘤:良性的和恶性的。所有恶性肿瘤的共同术语是癌。几乎所有良性肿瘤都被包裹且从不转移。相反,癌几乎都从不被包裹而是通过浸润性、破坏性生长侵袭邻近组织。浸润性生长后,癌细胞通常通过经淋巴和(或)血液传播的细胞移植,被播种于与原发肿瘤不连续的部位。尽管浸润性生长是最可靠的癌诊断标准,但由于浸润性生长通常继发转移,因而转移这一过程明确表明肿瘤是恶性的。

多方面的证据证明癌不是一种单一疾病。但仍有某些重要规律可应用于许多恶性肿瘤,即使不是所有的恶性肿瘤。现在有小鼠和人的癌是多个连续突变结果的真实证据[2,3]。在工业化国家,物理致癌剂和化学致癌剂与大多数的人恶性肿瘤的诱导有关[4],许多致癌剂是诱变剂[5]。尽管大多数突变似乎是后天的(体细胞突变),但数目不断增加的、使个体有形成癌倾向的胚系突变正在被发现[2]。癌可能需要在多个阶段中经10次或更多次的突变来形成其全部的破坏性恶性特征。癌形成过程可被分成三个不同的阶段。第一阶段被称为肿瘤启动,它是由致癌剂暴露或胚系传递引起的突变的获得。如果在被称为肿瘤促进的过程中不暴露给促进剂或促进条件,被启动的细胞不形成肿瘤。此过程代表第二阶段,它随着第一批肿瘤细胞的出现而结束[1]。前两个阶段中的早期异常细胞被称为肿瘤前或癌变前细胞。肿瘤演进[1,6~8]指肿瘤形成多阶段过程的第三阶段,该阶段以癌变前肿瘤结节形成浸润性生长为起点,结束于最终杀死宿主的高度浸润性、广泛转移性癌。引人注目的证据表明,大多数恶性肿瘤起源时都是纯系的,而在肿瘤演进中,由于有生长优势的遗传变异细胞的达尔文选择,已获得其他突变的新细胞亚群不断出现[2,8]。在癌的这种演变过程中,连续的突变导致生长形态学、激素依赖性、酶和细胞因子产生及表面抗原表达的改变。在这些改变中,有些改变可能是巧合,而其他改变则允许异常细胞逃避内环境稳定的控制,或抵抗防御机制或治疗对它的破坏。

肿瘤上的排斥抗原

大约在19世纪末20世纪初发现,在某些情况下,实验动物体内自发形成的肿瘤可被移植给同种的其他动物,且可用这种方法连续繁殖。这一发现为癌症研究提供了重要的实验工具[9]。科学家立刻开始研究抗这种可移植癌的免疫的可能性。接种了小量非致命性肿瘤的啮齿动物对常规杀死未受免疫动物的同种肿瘤的再次大移植物接种产生了免疫力。肿瘤初次生长后的完全去除也赋予动物抗肿瘤免疫力(许多实验肿瘤不容易转移,所以即使肿瘤已经生长相当长一段时间,也能通过血液供应的结扎或外科切除被完全去除)。这些早期结果似乎提示抗癌免疫是可能的。此外,某些自发产生的肿瘤不容易被移植到同种的其他动物体内,这被认为是抗癌天然耐受或天然免疫的证据。多年后已经清楚,从这些早期研究中不能得到这样的结论,因为远系杂交大鼠或远系杂交小鼠已被使用。当认识到用肿瘤免疫也使宿主获得抗供体正常组织的免疫力及供体的正常组织也能使宿主获得抗肿瘤免疫力时[10],这一问题变得显而易见。使肿瘤特异性抗原的想法变得声名狼藉的这些实验也启动了对造成正常移植组织排斥的抗原的探寻。此研究最终导致了*MHC*

的发现和近交系小鼠的发展[10~12]。一旦近交系小鼠可以获得,就显示:移植于近交系小鼠体内的肿瘤一般都生长良好,以致肿瘤特异性抗原的存在似乎是完全不可能的。事实上,肿瘤在同系基因动物体内的移植力曾经是(且现在仍是)一种实验性肿瘤恶性表型的诊断标准。该标准特别有用,因为许多啮齿类动物肿瘤是非上皮来源的癌(肉瘤),也因为在这类癌内,局部侵袭性生长的清晰组织学说明是特别困难的。此外,这些肿瘤很少转移,该特性是许多其他实验诱导的啮齿类动物肿瘤所共有的。

移植癌的肿瘤特异性排斥证据

肿瘤免疫学的近代史始于近交系小鼠能被免疫来抗化学致癌剂甲基胆蒽(MCA)所诱导肉瘤的发现。诱导的免疫力能抗移植的、MCA 所诱导肉瘤的第一次证实是由 Gross 于 1943 年完成的[13];但直到 20 世纪 50 年代,更完全的实验才为移植癌的"肿瘤特异性"排斥提供了明确的证据[14~19]。特别是 Prehn 和 Main[16] 于 1957 年所做的实验使 MCA 诱导肉瘤上的排斥抗原在功能上是肿瘤特异性的成为可能,因为移植分析不能在所用小鼠的正常组织内检测到这些抗原。这些研究者显示,肿瘤细胞免疫不能使小鼠产生抗肿瘤起源小鼠的正常皮肤移植物的免疫力,用该小鼠的正常组织免疫也不能使小鼠产生抗肿瘤的免疫力(图 37.1)。这些结果使得残留杂合性[20]引起移植肿瘤的免疫原性极不可能,如果它在这些近交系小鼠内存在。肿瘤抗原性的观点被进一步的实验所证实,这些实验证明,如果肿瘤首先被完全去除,抗 MCA 所诱导肿瘤的肿瘤特异性抵抗在宿主体内(即在肿瘤起源的小鼠体内)可被诱导[17]。在随后的几年中,肿瘤特异性移植抵抗的诱导并不局限于 MCA 所诱导的肿瘤被证实,因为这种抵抗也能被其他化学或物理(如紫外线)致癌剂诱导的肿瘤或自发肿瘤诱导[21~25]。尽管动物肿瘤能表达导致肿瘤排斥而非正常组织排斥的抗原的证据现在是非常充分的,但仍需要说明的是:至少这些抗原中的一些抗原可被正常基因编码,这些正常基因在正常细胞仅仅以不能检测的水平被表达。目前,我们仅仅开始鉴定在宿主体内诱导导致肿瘤排斥的免疫应答的抗原的遗传起源。

因为抗移植肿瘤的保护性免疫被用作抗原性标准,所以这些抗原一般也被称为移植抗原或排斥抗原。不幸的是,一些关于肿瘤排斥抗原的论文和综述没有提供所述抗原真正导致肿瘤排斥的证据。如,排斥抗原这一术语经常被不恰当地用于任何表达于肿瘤、而在正常组织上不表达的、且体外被溶细胞性 T 细胞识别的抗原。然而,即使肿瘤抗原特异性 T 细胞可从肿瘤或荷瘤宿主(小鼠或人)的外周血被分离,即使这些 T 细胞体外溶破肿瘤细胞能被显示,肿瘤却仍然可以侵蚀性生长;即是说,这些体外发现并不说明对这些抗原的识别导致肿瘤排斥。

抗原是一种癌所特有的或与其他癌共有的

用 MCA 诱导的小鼠肿瘤所做实验的早期目的是探寻独立诱导的、不同肿瘤所共有的肿瘤特异性抗原。这些共有抗原可用于存在于不同个体的癌症的诊断或治疗。但移植实验[15~18,26,27]显示,抗癌细胞攻击的最强免疫保护各具肿瘤特异性。用一种肿瘤免疫仅能有效保护宿主抵抗同种肿瘤的攻击,却不抵抗多种被测试的其他肿瘤的攻击(表 37.1);即是说,即使癌有相同的组织学类型并且是由同种致癌剂在遗传背景相同的个体的同一器官系统内所诱导,每种癌也是独特的。这种独特特异性表明,每种肿瘤都有一种独特的移植抗原和(或)都表达一组独特的共有抗原。事实上,仔细的研究提示,这些肿瘤的抗原谱是非常大的。由于免疫每个患者以抗每种肿瘤的独特抗原不切实际,因此许多年前所进行的研究是鉴定能激发有效的和可重复的肿瘤排斥的共有抗原。那些研究的结果是,没有广泛的交叉保护被观察到[26]。因此,在探寻 10 种 MCA 所诱导肿瘤的共有抗原时,先用一种肿瘤免疫小鼠再用其他的同源肿瘤接种,在所进行的 90 个测试中没有可重现的交叉保护(图 37.2)被发现[26]。除 MCA 外,其他许多化学[19]或物理[21,22]致癌剂,如 3,4-苯并芘或紫外线,也能诱导产生可激发强而独特的(即各具肿瘤特异性的)移植免疫力的肿瘤。独特且共有的肿瘤抗原也已经被发现在体外是人自体 T 细胞的靶抗原。然而,即使当一种共有抗原被溶细胞性 T 细胞识别时,移植免疫力也可以各具肿瘤特异性。例如,正如用 Northern 印迹和对 P1A 特异性溶细胞性 T 细胞系(CTL)溶破的敏感性等方法所确定的,共有抗原 P1A[28]被多种肿瘤表达,而且 P1A 能诱导产生溶破多种肿瘤的交叉反应性 T

细胞[29]。尽管有这种交叉反应性，但因为没有交叉保护，所以免疫保护被发现是由独特抗原介导的。该研究也警示我们，不要把 CTL 对一种抗原的识别看作是称此抗原为排斥抗原的充分证据。

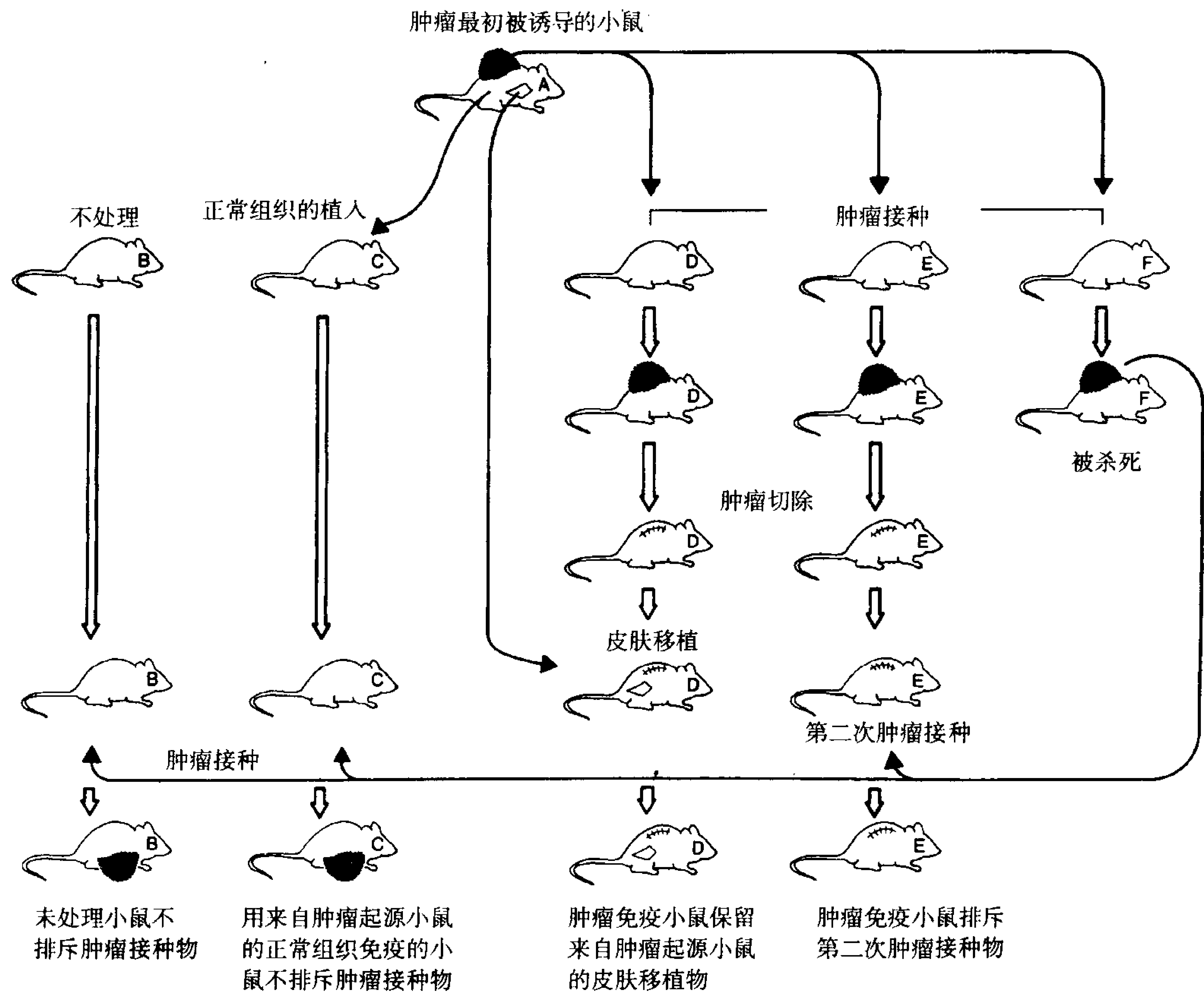


图 37.1　证实 MCA 所诱导小鼠肉瘤上排斥抗原存在的移植实验[16]。当第二次肿瘤接种时，只有那些已经被前一次肿瘤接种免疫过的且肿瘤被去除的小鼠(E)排斥肿瘤。但是，肿瘤免疫后小鼠(D)仍接受肿瘤起源小鼠(A)的正常组织(皮肤移植物)，该小鼠(A)的正常组织不保护其他小鼠(C)。动物 F 仅被用于"贮存"用正常组织和恶性组织免疫其他小鼠(C-E)期间所需的来自小鼠 A 的肿瘤。在相似的实验[17]中，原发肿瘤被完全去除而不杀死动物；肿瘤被贮存在第二只小鼠的间歇期后，被再次植入现在排斥曾起源于该小鼠的肿瘤的肿瘤起源小鼠体内。这提示，肿瘤从小鼠体内完全去除后，小鼠能产生抗原发肿瘤的免疫力。

表 37.1　肿瘤上独特的各不相同的排斥抗原的特性

1. 每种肿瘤特异的且与其他肿瘤不同的，即使当：
   有相同的组织学类型；在相同器官系统中被诱导；由同种致癌剂诱导；在同一品系小鼠中或在同一小鼠中
2. 在正常同系基因细胞上检测不到
3. 由移植分析确定(在人体不可能)
4. 主要在化学和物理诱导肿瘤上被发现，但也在自发的实验性肿瘤上被发现
5. 看上去有无穷尽的种类
6. 不知是否由以下原因造成：
   先前存在的抗原的克隆扩增；以前静止的正常基因的激活；或肿瘤特异性体细胞突变；

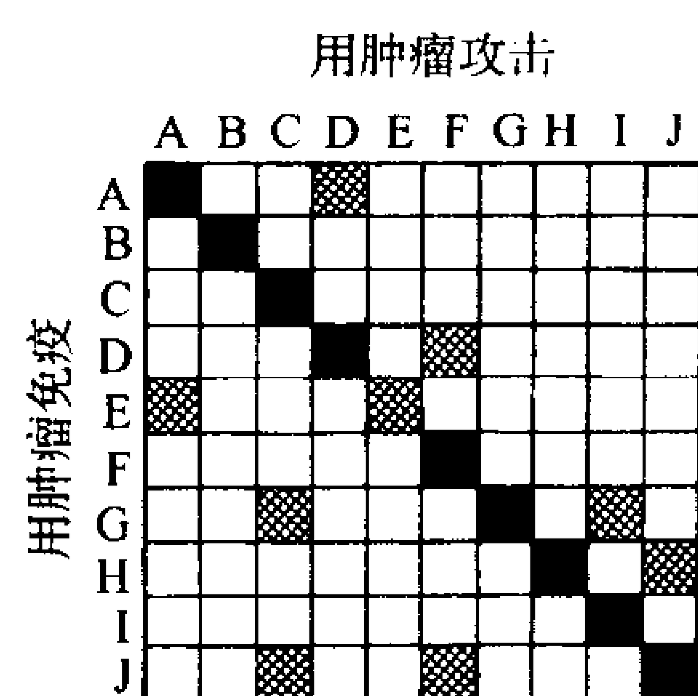


图 37.2 使用移植实验[26]对单独起源的 MCA 所诱导肿瘤上移植抗原个体(独特)特异性的证实。通过注射非致瘤剂量活细胞免疫小鼠。1~3 周后,通过注射致瘤剂量同种肿瘤和 9 种已在同系基因小鼠单独诱导的其他同系基因肿瘤攻击小鼠。由于没有可重复的交叉保护被发现,所以保护是用于免疫的肿瘤特异性的。实心黑方框,肿瘤接种物排斥;交叉影线方框,不可重复排斥;白色方框,显示无排斥的组合。(摘自参考文献[27]。)

1241

共有抗原在独立诱导的肿瘤之间可引起交叉保护。事实上,独立起源肿瘤间的交叉保护经常在紫外线或化学致癌剂诱导的小鼠黑色素瘤中被发现[30]。在所选择的实验条件下,交叉保护也在 MCA 或紫外线诱导的小鼠肿瘤模型中被发现[16,17,31~33]。例如,用一种有高度免疫原性的消退肿瘤进行超免疫,可引起抗其他几种免疫原性较低的进展肿瘤的保护性免疫[31]。交叉保护的发现提示:抗原谱的大小可能是有限的或存在共同的肿瘤特异性的抗原。尽管这是可能的,但注意到用无关肿瘤免疫诱导的抵抗通常是弱的也是重要的[33],这种弱的抵抗持续时间相当短且对 γ 射线敏感,或需超免疫[31];相反,用独特抗原免疫诱导的抵抗通常持续时间长[33],而且与其他特异性免疫应答相似,免疫一旦发生就相对地能抗辐射[34]。此外,抗活肿瘤细胞攻击的弱抵抗有时可用正常组织诱导[17]。所以,用无关肿瘤或正常组织超免疫诱导的弱交叉保护性效应,可能是由于特异性抗原免疫应答的非特异性支持[17]。换句话说,独立起源肿瘤间的交叉保护可能源于可与许多肿瘤共有的癌胎抗原、癌精原细胞抗原、病毒抗原或分化抗原(见下),但这些抗原不可能是肿瘤特异性的,因为它们在某些非恶性成年组织或细胞上也被发现。但肿瘤特异性的、独立诱导的人癌瘤间共有的分子确实存在。在某些类型人类癌瘤中发现的肿瘤特异性突变蛋白就是例子(见下),但人肿瘤上的共有抗原如何被有效地用作免疫治疗的靶分子以获得排斥仍未确定[35]。

移植免疫主要是 T 细胞介导的

用癌细胞免疫激发的移植免疫主要是 T 细胞介导的[18,36]。代表排斥抗原探针的克隆化 CTL 可被产生,这些探针是稳定的、可转移的且是高度特异性的。使用这类探针,要证实化学或物理致癌剂诱导的肿瘤表达独特的、各不相同的抗原表位有时已是可能的(图 37.3)[37]。当在体外使用 CTL 克隆时,确定一种在体外被 CTL 克隆识别的抗原是否在体内起排斥抗原作用也是可能的[38]。这是在紫外线诱导的、通常被正常小鼠排斥却在 T 细胞缺陷小鼠体内进行性生长的消退肿瘤模型中做的[39]。这些肿瘤的抗原丢失变异体在体外被选择以抵抗特异性 CTL(图 37.4)。用体外产生的变异体注射小鼠,结果提示,抗原丢失在体内造成从消退表型到进展表型的改变[39]。因此,通过分离对一种 CTL 克隆有选择性抵抗力的肿瘤变异体,肿瘤细胞上单个或多个组合抗原或表位在肿瘤排斥中的相对重要性可被显示。

表达于单个癌细胞上的独特肿瘤抗原的多样性

CTL 克隆也可用于决定一种给定肿瘤的抗原性是源于单个还是多个独立成分。肿瘤抗原复杂性的这种剖析,可通过选择有抵抗力的肿瘤变异体,及通过确定这些变异体是否已保留任何其他的 CTL 识别抗原或表位来完成[41]。来自这种研究[37]的结果提示,CTL 确定的肿瘤抗原性可能由多个独立的特有表位组成。因此,特有的肿瘤特异性抗原的多样性甚至可能比以前预料的大。现在还不清楚这些 CTL 所确定的、单个肿瘤细胞表达的多个表位,到底是位于一个分子上还是位于不同的分子上;无论如何,这些表位在功能上似乎是独立的,因为 CTL 克隆总是选择产生只丢失被识别表位的突变体。表位的这种功能独立性使得这种多样性对理解免疫逃避及允许组合免疫治疗(见关于抗原丢失或表位丢失变异体的选择部分)变得重要。尽管同系细胞和 MHC Ⅰ类分子还没有被广泛测试肿瘤特异性,但采用类似的、用 CTL 克隆来选择丢失变异体的方法,人类肿瘤或小鼠肥大细胞肿瘤细胞能表达多个独立的靶表位已被显示[42~44]。

1242

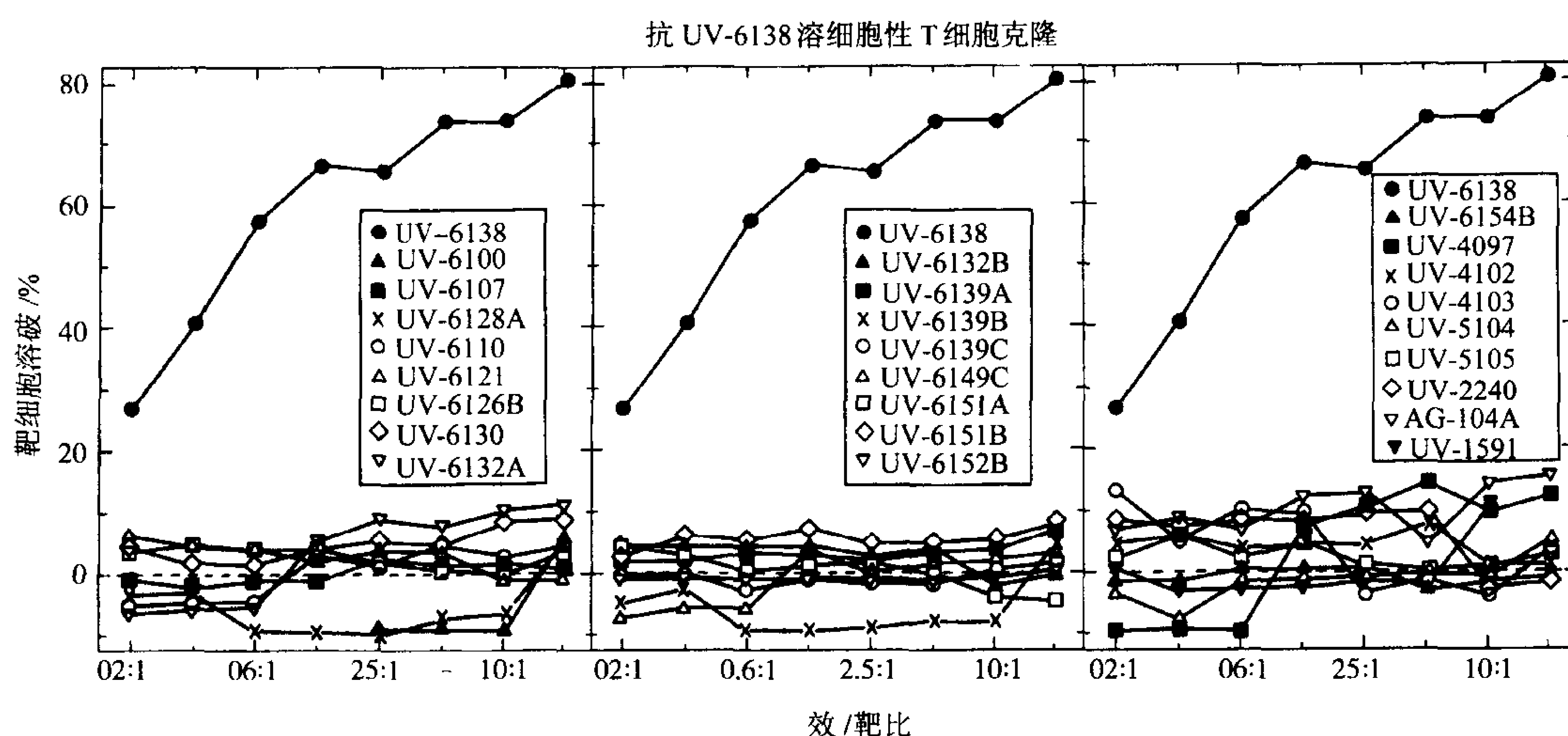


图 37.3 独特特异性的例子。用此独特特异性,溶细胞性 T 细胞克隆能溶破在 UV-6138 中已被用于免疫的一种特定紫外线诱导的肿瘤细胞。3 个组中所示的其他 25 个同系基因 C3H 肿瘤细胞系没有一个被溶破,证实了 CTL 所确定抗原的独特性。效应细胞与^{51}Cr标记的靶细胞孵育 4.5 小时,从受损肿瘤细胞释放入上清的放射性同位素的数量被用于确定被溶破了的靶细胞的百分率。(摘自参考文献[37]。)

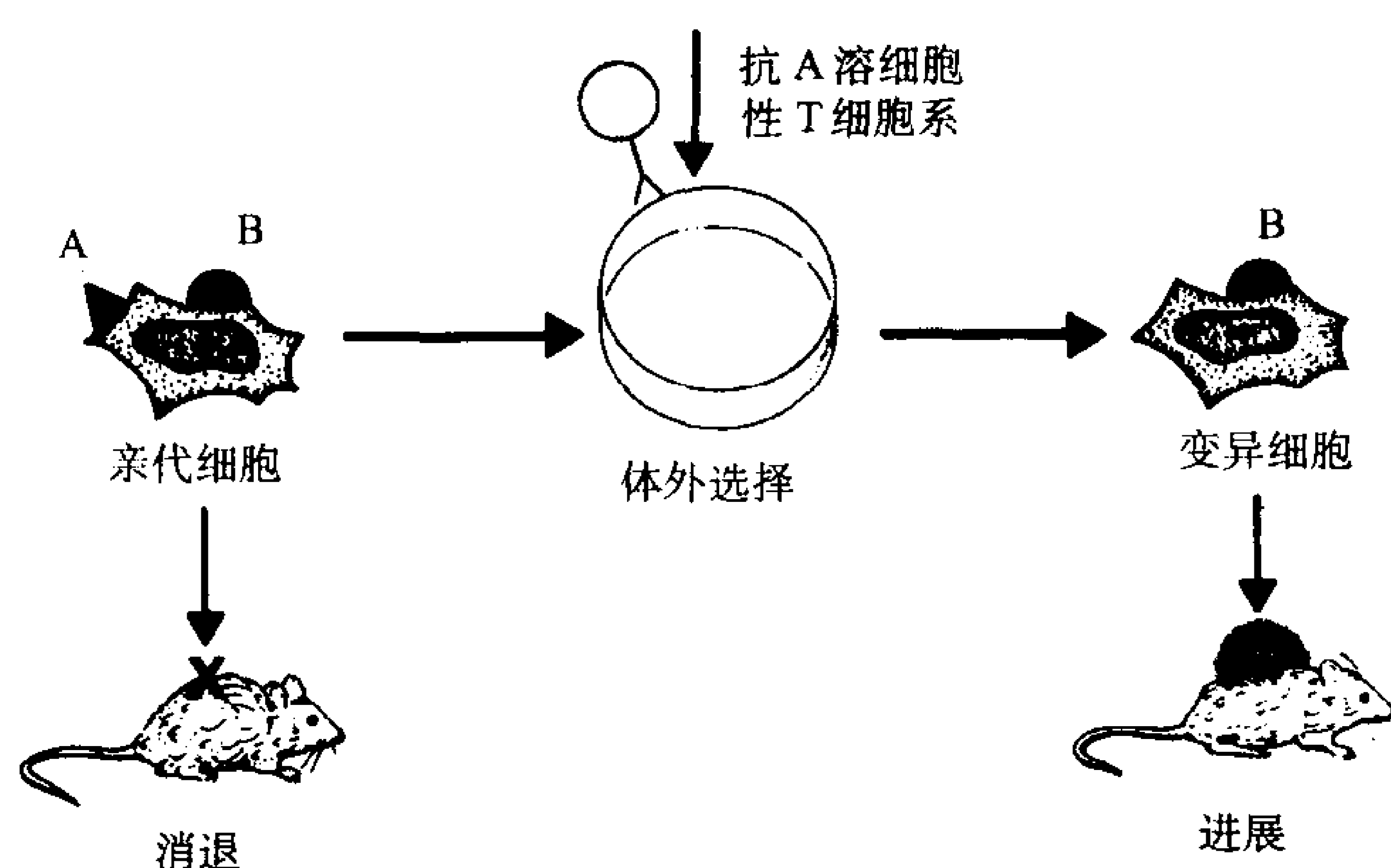


图 37.4 检测 CTL 所确定抗原与体内肿瘤排斥的关系的实验方案。通过体外暴露亲代肿瘤细胞给 CTL,相当少的抗原丢失变异细胞可被选择。在此处所示实验中,A 抗原的丢失产生在正常小鼠体内表现为进行性肿瘤生长的变异细胞,但是,与 UV 诱导的亲代消退肿瘤相似,所选择的 B 抗原丢失的变异细胞(未显示)仍被正常宿主排斥。(经同意摘自参考文献[40]。)

突变细胞基因编码的肿瘤抗原(肿瘤特异性抗原)

免疫分析发现的突变

尽管独特肿瘤抗原(表 37.1)于 20 世纪 60 年代被发现,但仅仅从 1995 年起,我们才开始研究这些抗原的多样性的分子基础。大体而言,可导致这些抗原出现的可能机制有三种:克隆扩增、突变或基因激活。大多数化学或物理致癌剂都是诱变剂[5]。所以,一般认为肿瘤上由这些致癌剂诱导的独特肿瘤抗原是突变基因的产物,这些基因可能是带有突变“热点“的单一基因。但是,Burnet[45]认为,肿瘤上由致癌剂诱导的移植抗原的独特性也可能是源于表达特定正常抗原的单个细胞的克隆扩增。根据这个假说,宿主体内的正常前体细胞含有不同的抗原;但直到这些抗原由癌细胞克隆扩增而增多时,它们才有足够多的数量为免疫系统所识别(当个体发生 B 细胞或 T 细胞起源的恶性肿瘤时,类似情形可与克隆抗原一起发生;存在于相对较少的正常细胞上的独特型在数量上可能不足以在正常宿主体内激发应答,但可充当有相同独特型肿瘤细胞的靶抗原[46]),这种可能性已被实验证实[47,48]。在其中一项研究中[48],一个非恶性纤维母细胞系在体外被克隆,然后被扩增;在植入小鼠体内的扩散盒中,来自同一前体细胞的亚克隆被 MCA 恶性转化。移植实验显示,即

使所有肿瘤都来自同一前体细胞,发展中的肿瘤也都有各自独特的抗原。这些结果似乎显示,暴露给致癌剂后有新的抗原(新抗原)出现,独特抗原并不是在前体细胞上已经表达。但是,在从单个前体细胞开始的克隆扩增过程中,正常细胞能产生种类繁多的表面分子[49],由致癌剂造成的转化事件可能只装配细胞的一种特定的抗原表型,产生恶性克隆。也有可能以前静止的正常基因被致癌剂激活。涉及正常基因的两种机制可能产生相当多抗原各异的肿瘤。所以,以前的实验没有回答各个截然不同的(独特的)抗原的出现是否是由致癌剂诱导的结构 DNA 序列体细胞突变造成的,或是否这些抗原是由正常基因编码的[50]。也不清楚癌细胞在体外暴露给诱变剂所产生的独特排斥抗原可在多大程度上充当各自不同的排斥抗原的范例[51]。此外,残余胚系杂合和抗原漂移一般在近交系小鼠和起源于这些小鼠的肿瘤中被观察到[20],所以被断定是"肿瘤特异性的"[52~55]。由"突变"编码的几个独特肿瘤抗原可能由杂合胚系基因编码,产生独特的、看上去是肿瘤特异性的抗原;无论如何,所述的来自肿瘤起源宿主的自体正常 DNA 突变变化的缺乏未被证实。最后,尽管一般认为独特肿瘤抗原的出现是暴露给致癌剂的直接结果,但是,除抗原是由致瘤病毒转化基因编码外,并没有这方面的直接证据。即使独特肿瘤抗原通常是给定肿瘤中的大部分(或所有)细胞所共有的,也只能提示肿瘤中的细胞来自单个前体细胞。表达独特肿瘤抗原的前体出现于转化前或转化后细胞群中仍是可能的,在这些转化前或转化后细胞群中,其他不表达这种抗原的细胞在癌连续演变过程中被排除或过度生长[8]。

自 1995 年以来,来自小鼠和人类癌症的几个 T 细胞所识别的独特抗原的遗传起源已被鉴定,而且每种抗原都是由体细胞突变造成的(即通过自体正常 DNA 所没有的遗传改变),从而被发现是真正肿瘤特异性的[56~61]。表 37.2 显示,这些抗原似乎不是涉及单个基因家族而是涉及多个不同的无关基因。第二个吸引人的发现是,大部分突变好像不是位于随机位点,而是发生在那些编码被表达蛋白的功能重要部分的基因内。如,半胱氨酸依赖性激酶 4 内的突变降低该分子与其抑制分子及肿瘤抑制蛋白 p16INK4a 的结合[58],同样的突变在家族性黑色素瘤中被发现[62]。同样,β-catenin 内的突变似乎阻止该癌基因的降解[63];螺旋酶蛋白 p68 内的突变,导致这种可能的肿瘤抑制基因的功能上重要的结构域内的一个氨基酸替换[61]。最后,对于核糖体蛋白 L9,伴随野生型等位基因丢失的杂合性丢失(LOH)被发现[64]。目前,要确定受体细胞突变影响的、数量有限的基因是否编码肿瘤特异性抗原,及这些肿瘤特异性改变在恶性肿瘤中发挥功能作用有多普遍还太早。可预期,在某种程度上,相同的突变可被选择用于另一个患者。周期素依赖性蛋白激酶-4 基因内的同种体细胞突变,确实在所分析的 28 个黑色素瘤的另外一个中被发现[58]。也有可能我们只了解了遗传改变的一部分,这些遗传改变是使不同类型的癌处于不同的阶段所需要的。所以,注意到抗独特肿瘤抗原的 T 细胞被用于鉴定肿瘤特异性突变及这些抗原不可能被其他可用的、不依赖免疫探针的技术所鉴定是重要的。此外,正如先前所提到的,独特抗原能激发癌的强肿瘤特异性排斥,所以可能是免疫治疗的重要靶抗原。由于这两个原因,进一步分析独特肿瘤抗原的遗传起源将是重要的。

1243

表 37.2 被同系基因 T 细胞或自体 T 细胞识别的独特肿瘤抗原

突变抗原多肽起源的蛋白质	识别蛋白质的 T 细胞亚类	肿瘤来源	体细胞突变或肿瘤特异性	参考文献
小鼠				
核糖体蛋白 L9	$CD4^+$	紫外线诱导的肉瘤	是	56
螺旋酶蛋白 p68	$CD8^+$	紫外线诱导的肉瘤	是	61
人				
MUM-1	$CD8^+$	黑色素瘤	是	57
cdk4	$CD8^+$	黑色素瘤	是	58
β-catenin	$CD8^+$	黑色素瘤	是	59
HLA-A2	$CD8^+$	肾细胞癌	是	60

由于被分析的基因来自肿瘤,而用于区分胚系多态性或体细胞突变的非恶性对照细胞又不能得到,所以缺乏体细胞突变证据和肿瘤特异性证据的独特抗原被排除在外。这些基因包括连接蛋白 37、c-akt、活化 gag 或有丝分裂原活化蛋白激酶 ERK2[52~55]。

功能或遗传分析发现的突变

在工业化国家，大部分人类癌症可能不是由病毒引起的，而是由物理或化学致癌剂所致突变引起的[3~5]。这些突变中的一些可能是对正常靶细胞的初始突变损伤的直接结果，并随机影响许多基因。但是，大部分突变改变对癌细胞都可能是一个不利因素，以致于当癌症最终出现时所发现的突变都是被高度选择的，可能贯穿致癌作用和肿瘤进展的长期过程。这些被选择的突变优先发生于某些基因内且常常发生于这些基因的被高度选择了的位点内；这些突变中的许多与恶性过程有关并是恶性过程特异的。这些突变最初被发现，是因为突变基因①被过度表达；②在转染分析中引起转化；③涉及癌特异性染色体易位。一些突变影响编码蛋白的 DNA 序列，所以导致肿瘤特异性突变蛋白的出现。这些新蛋白可以是点突变、内缺失或包括基因融合的其他基因重组的结果。发现这些突变的最初原因不是被编码的突变蛋白的抗原性；所以，这些突变基因可能不一定编码肿瘤特异性抗原。计算机化运算法则已被用于（在也被称为“反向免疫学”过程中[65]）预测产生强抗原的特定突变的可能性，几个突变蛋白和多肽已被用于探测诱导肿瘤特异性免疫的可能性。有趣的是，当用肿瘤细胞免疫宿主时（直接免疫学），被宿主识别的抗原到目前为止已被发现是由不同的突变基因编码（见前一部分）。所以，重要的问题是：最初已通过非免疫学方法被鉴定的突变蛋白作为肿瘤特异性抗原被宿主识别的普遍性如何？这种抗原能作为癌细胞免疫排斥的有效靶分子吗？下面给出了一些例子（表 37.3）（综述，也见参考文献[66]）。

突变 RAS 癌基因编码的蛋白质

RAS 原癌基因的致瘤潜能可通过激活突变获得，这些突变发生于被选择的可预测位点并影响氨基酸残基 12 或 61，而对 p21 ras 蛋白的氨基酸残基 13 的影响频率较少。突变型 RAS 能激发特异性抗体[67,68]，但该蛋白位于肿瘤细胞内部质膜，不在细胞表面。然而，蛋白水解裂解产生的突变型 RAS 多肽能结合到某些 MHC 分子上，激发 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T 细胞应答[69~73]。如，人 $CD4^+$ T 细胞已被显示识别在 RAS 的 12 位氨基酸处替代甘氨酸的缬氨酸，这是人类癌瘤中最普遍的突变之一[69]。突变型 RAS 蛋白的 MHC 分子结合多肽所在区域对 RAS 原癌基因家族的所有 3 个成员来说都是相同的。RAS 原癌基因家族的 3 个成员是 H-RAS、K-RAS和 N-RAS，它们在不同的癌中有不同的普遍性。RAS 突变发生在胸腺自身反应性克隆清除后的癌变前或恶性细胞内，所以大部分个体都应该有对突变蛋白应答的克隆。在所有例子中，T 细胞已用纯化后 ras 多肽或蛋白诱导，而不是用肿瘤细胞。潜在的问题是，仅仅在某些肿瘤细胞中，肽-MHC 复合物才有足够的密度被 RAS 特异性 T 细胞识别[74,75]。同样，MHC 分子上 ras 多肽的呈递已被发现是非传统的[76]，用半纯化突变 ras 蛋白免疫后，所发现的抗移植肿瘤细胞的弱免疫力的抗原特异性仍不清楚[77]。因此，现在仍未确定突变型 RAS 是否能充当肿瘤排斥的有效靶抗原。例如，在保护分析中，在化学诱导的、有相同 RAS 突变的纤维肉瘤间没有免疫学交叉反应被观察到[78]。然而，临床试验已被发展[79,80]。

1245

突变 p53 抑制基因编码的蛋白质

p53 抑制基因内的突变属于人和实验癌瘤中发现的最普遍的突变。p53 最初是通过抗小鼠肉瘤[81]或抗猴病毒 40 T 抗原[82,83]的抗体被发现的。该蛋白在多种癌（包括那些不知道病毒病因学的癌）中被发现，但在非恶性胚胎细胞或成熟细胞中却检测不到，因而暗示 p53 在恶性过程中可能起主要作用[81~83]。现在知道，正常 p53 蛋白起细胞生长的抑制分子作用，它在正常细胞内表达很少，因而一般检测不到，而在恶性细胞内普遍检测到的高水平 p53 通常代表突变型 p53 蛋白[84]。p53 内的突变往往集中于该基因的进化保守区域，但 p53 基因内突变的精确定位极为不同[85]。正如不同的突变型 p53 蛋白与某些抗 p53 单克隆抗体的优先反应性所证实的[86]，不同的突变似乎引起共同的构象改变（和可能相似的功能紊乱）。患者似乎对突变型 p53 蛋白产生抗体应答，特别是那些与热休克蛋白联系在一起的突变型 p53 蛋白[87]，这些抗体的存在与差的预后有关[88]。也不知道突变型 p53 在多大程度上可被 T 细胞识别或可作为肿瘤排斥的靶抗原。与抗体不同，

表 37.3　用例子代表的不同种类肿瘤抗原的起源、分布和抗原性

抗原种类/类型	例子	癌瘤中表达机制	参与恶性行为	正常成年组织分布	发生率				被识别		排斥抗原
					癌特异性的	正常前体谱系	癌类型	共有的 / 独特的	T	B	
正常细胞基因产物											
癌精原细胞抗原	MAGE-1	异位表达	?	睾丸	–	–	几个	共有的	+		
癌胎抗原	MAGE-3	异位表达	?	睾丸或滋养母细胞	–	–	几个	共有的	+	–	
	P1A	异位表达	?	睾丸或滋养母细胞	–	–	肥大细胞瘤	共有的	+	–	
	CEA	再生细胞扩增	?	结肠或哺乳期乳房	–	+	几个	共有的	–	+	弱的
分化抗原	17-1A	正常表面糖蛋白	–	广泛的	–	+	几个	共有的	–	+	被动的
	PSA	正常细胞内酶	–	前列腺	–	+	前列腺	共有的	–	–	
	酪氨酸酶	正常细胞内酶	–	黑色素细胞	–	+	黑色素瘤	共有的	+	+	被动的
	Lewis(糖)	异常糖基化	?	广泛的	–	+	几个	共有的	–	+	
	HER-2/neu(癌蛋白)	过度表达	+(?)	乳房或卵巢	–	+	几个	共有的	–	+	
	GD2/GD3 神经节苷脂	过度表达	?	广泛的	–	+	几个	共有的	–	+	被动的
克隆抗原	免疫球蛋白独特型	克隆扩增	–	B 细胞克隆	–	+	B 细胞恶性肿瘤	独特的	(+)	+	弱的
突变细胞基因产物											
初步检测为抗原											
核糖体蛋白	Mut L9	点突变	LOH	–	+	–	纤维肉瘤	独特的	+	+	
细胞周期蛋白	Mut cdk4	点突变	+	–	+	–	黑色素瘤	高度局限的	+	?	
初步检测为癌基因											
癌基因产物	Mut p21s	点突变	+	–	+[a]	–	几个	共有的	+	+	?
抑制基因产物	Mut p53s	点突变	+	–	+[b]	–	几个	独特的	?	+	?
内融合蛋白	Mut EGFR	内缺失	+(?)	–	+	–	神经节瘤	共有的	?	+	?
嵌合融合蛋白	BCR－ABL	易位	+	–	+	–	CML	共有的	+	+	?
病毒基因产物											
核蛋白	HPV16 的 E6 或 E7	转化病毒基因	+	–	a	–	颈的	共有的	+	+	+

[a] 也可发生于致癌剂诱导的良性癌变前损伤(如乳头状瘤)。

[b] 也作为主要被遗传的 Li－Fraumeni 家族性癌症综合征中的胚系突变被发现。

Mut,突变;T,T 细胞;B,B 细胞;MCA,甲基胆蒽;CML,慢性粒性白血病;EGFR,表皮生长因子受体;HER－2,人表皮生长因子受体 2;LOH,杂合性丢失;PSA,前列腺特异性抗原;HPV,人乳头状瘤病毒。

T细胞将识别独特的短的突变多肽,这些多肽没有共同的构象改变。探寻作为潜在的治疗用免疫靶抗原的突变型p53蛋白是有吸引力的,因为有独特特异性的T细胞似乎介导最强的抗瘤免疫,且p53特异性T细胞已被诱导(综述,见参考文献[66])。但与突变ras一样,用肿瘤细胞免疫没能够诱导出突变p53多肽特异性的T细胞,提示在一般情况下其他独特抗原可支配应答。但是如果用突变p53多肽与白细胞介素-12(IL-12)一起免疫[89],抗突变p53多肽的体内肿瘤免疫可被诱导。因为p53在癌细胞中普遍被过度表达,所以抗正常p53的T细胞可能优先破坏肿瘤细胞。被设计来使宿主获得抗正常p53免疫的疫苗也无需修改针对每个有高度不同的p53突变的疫苗。但是,正常p53是一种个体耐受的自身抗原。由于小鼠和人的正常p53序列不完全保守,所以特异性识别人正常p53多肽的小鼠T细胞已被诱导,它们能溶破人肿瘤细胞[90]。此外,p53敲除小鼠产生特异性识别正常小鼠p53的T细胞,将这些T细胞过继转移人野生型小鼠体内,能根除小鼠p53过度表达的肿瘤,而没有对宿主的自身免疫现象[91]。

由内缺失或染色体易位产生的融合蛋白

新的抗原决定簇可以是以前相隔较远的氨基酸序列并置的结果,这种并置产生一个新的多肽序列并可能引起构像结构的改变。这种融合蛋白可由单个基因编码序列内的内缺失产生。例如,在最普通的人原发性脑恶性肿瘤——恶性神经胶质母细胞瘤中,大约40%有表皮生长因子受体(EGFR)基因的内缺失,产生融合蛋白[92]。患这种肿瘤的患者大约50%有相同的缺失,从而在融合位点产生一个新的氨基酸。癌细胞表面的新抗原决定簇可被单克隆抗体特异性识别[93]。该肿瘤特异性抗体在抗这种用传统治疗方法无法治疗的癌的治疗上是有用的。融合蛋白也可由在各种人类癌瘤中被发现的染色体易位产生[94,95]。由于同一蛋白质的不同部分是由两种不同的基因序列编码的,所以所产生的融合蛋白是嵌合的。值得注意的是,相似的易位和重组事件可发生于一种特定的癌中,可引起来自2个有关染色体的完全相同的编码序列的并置[95,96]。所以这些高度保守的染色体断点在来自不同个体的同种癌中可导致同种融合蛋白的产生。最好的例子是在某些人类白血病患者中被发现的嵌合的BCR-ABL融合蛋白[97]。在其他类型的癌中,导致独特融合蛋白产生的断点的变化相当大。在有些情况下,新的密码子可被创造,从而在融合点产生一个不同的或不适当的氨基酸。融合蛋白可被抗体特异性识别[98],跨越融合点的多肽可被人$CD4^+$ T细胞特异性识别[99]。重要的是,许多融合蛋白是维持细胞的恶性状态所必需的,而肿瘤细胞可能不容易通过丢失融合蛋白的表达来逃避治疗。但是,这些融合蛋白是否能充当主动或被动免疫治疗的有效靶抗原还未确定。

正常细胞基因编码的肿瘤抗原(肿瘤相关抗原)

列于这部分的所有抗原都是由非突变的细胞基因编码的,这些基因不仅被某些癌细胞表达,而且至少被一类正常成熟细胞表达。所以这些抗原不是肿瘤特异性的,它们一般被称为肿瘤相关抗原。这些抗原被正常细胞和组织表达的程度各不相同,可从广泛表达到极度局限于小群正常细胞[100]。此外,在发育或分化过程中,这些标记表达于正常细胞上的时间可显著不同。这些抗原中的一些仅在精原细胞、精母细胞和某些癌细胞(癌精原细胞抗原)中被发现,而在肿瘤起源组织的正常细胞内未被发现,即是说这些抗原以非谱系特异性方式被表达。但是,大部分肿瘤相关抗原都至少在一定水平上被表达于肿瘤起源的细胞类型上;即这些抗原是谱系特异性的,代表分化抗原。这些分化抗原中的一些仅在少量恶性肿瘤起源的正常细胞克隆中被发现(克隆抗原),而其他分化抗原也在胚胎或胎儿前体细胞中被发现,所以被称为癌胚抗原或癌胎抗原。

尽管本节所讨论的抗原没有一个是真正肿瘤特异性的,但对于一些肿瘤相关抗原,几种解释有效相对肿瘤特异性的机制已被援引:①恶性细胞可以高得多的水平表达一种特定的抗原(如10倍到100倍)[101]。一些研究提示,这种正常细胞与恶性细胞间表达水平的不同可在治疗学上被利用(综述,见参考文献[102]); *1246* ②由于与正常细胞相比,抗原特异性效应细胞可更好地识别恶性细胞,因此相对肿瘤特异性也可被实现;③对于某些抗原,表位在正常细胞上的表达被正常细胞内靶分子更完全的糖基化所掩饰,因而不能被免疫系

统识别(就上皮黏蛋白来说);④就癌精原细胞抗原来说,正常细胞 MHC 分子表达的缺乏可阻止这些细胞成为 T 细胞的直接靶细胞[103]。但是,对于抗体及 T 细胞识别的抗原,抗原的间接呈递可发生,而且保护性 T 细胞介导的对肿瘤特异性抗原应答的主动免疫诱导比诱导对缺乏肿瘤特异性靶结构的免疫应答有效得多,大量实验证据支持此观点[29,35]。不过,使用小鼠的抗人肿瘤相关分化抗原单克隆抗体的被动免疫已被描述是有效的[104~106](见下文),达到抗癌精原细胞抗原主动免疫治疗效果的可能性现在正在探索之中。

癌精原细胞抗原

在所有非恶性细胞中完全静止的某些正常基因可能只在恶性细胞中被激活,这已被反复假设。但一些先前的类似主张还未被证实,即癌细胞中正常基因的选择性激活导致肿瘤特异性抗原的产生。由至少一种正常细胞类型产生的同一种抗原的最低限短暂表达通常更迟被发现。例如,胸腺白血病(TL)抗原由 MHC 基因座中的一个正常细胞基因编码[107,108]。最初发现,胸腺白血病基因在胸腺白血病阴性小鼠的正常胸腺细胞中不表达,但它可在这些小鼠品系中形成的白血病中被特异性激活。然而,后来的研究证实,TL 抗原被胸腺白血病阴性小鼠品系的正常肠上皮表达[109]。另一个例子是,人黑色素瘤和其他几种癌上的某些 CTL 识别抗原(如 MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3)被报道是由正常基因编码的,这些正常基因被发现仅在恶性细胞中表达[110]。但进一步的研究显示,这些抗原也被睾丸中的正常精原细胞和初级精原细胞表达[111],且有可能被其他正常细胞表达[112]。用癌症患者的自体血清作探针,类似的癌精原细胞抗原也已被鉴定[113]。癌精原细胞抗原也可在小鼠肿瘤模型中被发现,MAGE 的小鼠同源物在减数分裂后精子细胞中被表达[114]。此外,小鼠肥大细胞瘤 P1A 上的一种 CTL 识别抗原已被报道由正常基因表达,而该基因在正常细胞不表达[28];但后来的研究显示,该抗原在正常的精原细胞和滋养细胞表达[115]。因此,我们缺乏正常且完全的基因在癌细胞中被特异性激活及其能编码真正肿瘤特异性抗原的强有力的证据。

这些抗原中的几个在精原细胞和精母细胞中的检测是非常有趣的,因为它可能与基因的广泛脱甲基有关[116]。这种脱甲基颇具选择性地发生在精子发生过程中,并可导致大量基因的表达。这些基因可能在一种未被注意到的细胞类型中,或者可能在其他细胞中是完全静止的,或者更有可能在细胞发育的某个选择性阶段被表达。与这种解释相一致的是一些肿瘤相关抗原,如 P1A、MAGE-3 和 MAGE-4,不仅在精原细胞而且也在滋养层细胞中被发现,所以是癌胚抗原(CEA)[115,117]。无论如何,与分化抗原不同,癌精原细胞抗原在癌细胞以高度选择性的、非谱系特异性方式被敏锐表达。由于其相对肿瘤特异性,癌精原细胞抗原可能是癌诊断及免疫治疗的重要靶抗原。

分化抗原

至少在分化的某个阶段,一些在肿瘤细胞上表达的抗原也在产生肿瘤的细胞系的非恶性细胞上被表达。所以这些谱系特异性抗原可被认为是分化标记。这些抗原代表极为不同的一组蛋白、糖蛋白(包括黏蛋白)和糖脂(糖表位或多肽表位);作为潜在的免疫治疗靶分子,这些抗原中的一些正在被调查[104,105,118~121]。其他一系列证据支持效应细胞和靶分子结构可以不必有绝对特异性的想法。例如,尽管对正常细胞有潜在的严重的副作用,但几个化学治疗因子却被成功地用于抗癌。此外,在肿瘤细胞注射后不久给予抗体时,抗正常表面糖蛋白的抗体已被发现在抑制裸鼠体内结肠直肠癌细胞方面是有效的[106],这种正常表面糖蛋白以相似水平表达于正常结肠上皮细胞和恶性结肠上皮细胞上[122];结肠直肠癌患者在经历治愈性肿瘤切除后即刻被给予同一种抗体,结果该抗体在降低转移发生和增加患者的长期存活方面是有效的[104,105]。同样,当在接种恶性细胞时被给予,抗黑色素细胞特异性分化抗原的被动抗体可有效抗小鼠体内黑色素瘤细胞的转移扩散[123],类似的抗体在人黑色素瘤患者体内可能有类似的有利作用[124]。

由于恶性细胞通常至少表达肿瘤细胞起源的正常细胞类型所特有的一些基因,所以分化标记在癌细胞上被发现。因此,这些正常分化抗原的存在可帮助确定癌起源(谱系)的器官或细胞类型[33,125]。例如,B 细胞肿瘤表达表面免疫球蛋白;使用 T 细胞亚群特异性单克隆抗体,T 细胞白血病可被分为辅助细胞白血病和

抑制细胞白血病[126]。因为不同的肿瘤亚型可有不同的预后且对不同的治疗敏感，所以对不同亚型的癌的仔细的诊断性叙述是重要的。虽然谱系特异性标记对造血细胞癌亚类的划分已是特别有用的[126]，但只有非常少的细胞类型特异性抗原或谱系特异性抗原已在造血细胞系统和黑色素细胞系统外的细胞被发现。相反，通过有更广泛分布的抗原标记的不同表达方式，其他细胞类型中的一些可被定性[100]。肿瘤常常获得区别较少的进展外观。事实上，组织起源完全不同的肿瘤转移病灶在形态上常常是相似的，因而转移细胞表达的细胞类型特异性抗原的保留可提供有关癌起源器官的重要诊断线索[125]。但是，对于组织学或细胞学肿瘤分类，分化标记的使用有其缺陷。首先，癌细胞有时表达肿瘤起源细胞系通常不表达的分化抗原(异常表达)。其次，在肿瘤进展过程中，分化标记可被丢失，失去癌组织起源的线索。一些组织特异性抗原仅在细胞化学或组织化学上被检测到，但其他组织特异性抗原可被用作血清标记；例如，前列腺特异性抗原(PSA)是一种糜蛋白酶样蛋白酶，被前列腺的正常上皮细胞或恶性上皮细胞选择性表达，它在前列腺良性肥大和前列腺癌中表达增加。所以，前列腺被完全切除后，任何 PSA 的检测都提示残余肿瘤和(或)复发(综述，见参考文献[127]、[128])。但是，由于现有血清学标记水平在各种非恶性疾病和病症中也被升高[129]，所以现在没有可用的癌特异性免疫血清标记。

1247

几种分化抗原(如酪氨酸酶、相关黄褐斑蛋白、gp100 和 Melan A/MART-1)似乎只限于黑色素细胞。作为免疫治疗的可能靶分子，所有上述抗原现在都正在被研究。另一个有用的靶分子可能是神经节苷脂 GD2 和 GD3，这两种抗原不仅在黑色素瘤被过度表达而且在起源于神经冠的其他细胞及其他组织中被发现[130,131]。胰腺癌、乳腺癌和结肠癌表达黏蛋白，它们可在癌细胞上被与黏蛋白分子蛋白核心上的重复表位特异性反应的 MHC 非限制性 T 细胞识别，黏蛋白分子蛋白核心上重复表位的暴露是由恶性细胞内的糖基化缺陷所致[132]。最后，人表皮生长因子受体 2(HER-2/neu)的过度表达在一些乳腺癌和卵巢癌及其他腺癌中被观察到，且表皮生长因子受体-2 的高水平表达与更有侵蚀性的临床病程有关。对 HER-2/neu 蛋白的抗体应答及辅助性 T 细胞应答和溶细胞性 T 细胞应答可被诱导，使用该蛋白作为治疗性靶抗原的方法正在被发展[66]。

癌胎抗原和癌胚抗原

50 多年前发现，人类癌细胞表达血清学上与正常胚胎组织交叉反应的抗原[133]。由于癌细胞分化表型的缺乏常常与胚胎细胞、胚胎组织或胎儿细胞、胎儿组织中以更高水平被表达的抗原的出现有关，所以这些抗原的出现是逆分化的结果[134]。因为肿瘤干细胞保留了与它们的正常对应细胞相似的分化能力，所以一些肿瘤有高度分化的表象。但是随着肿瘤的进展，肿瘤有失去其分化表象的倾向[134]。这种肿瘤进展过程中的分化特性的丢失似乎与细胞谱系早期发育阶段特有的细胞标记的顺序性获得无关[135]。所以，“逆分化”一词可能会引起混淆。这种抗原的出现似乎有两种不同的机制。在第一种机制中，胚胎抗原或胎儿抗原的表达似乎是由于恶性转化和(或)肿瘤进展而发生的。这种表达好像是基因的异常激活或“压抑”的结果(如由于甲基化[116])，这些基因在肿瘤细胞起源谱系的成熟的非恶性细胞中被推测是完全静止的，而在某些胎儿细胞和胚胎细胞(如滋养层细胞)中通常是活动的。例子是非谱系特异性肿瘤抗原，如人的 MAGE-3 和小鼠的 P1A[115,117]。在第二种机制中，抗原是谱系特异性的，而且不仅在胎儿细胞或胚胎细胞中表达也已在肿瘤起源的成熟组织的正常干细胞中表达。更成熟的细胞通常不表达这些抗原，至少不以高水平表达，但这些抗原在非恶性成熟细胞中被表达，特别是在各种损伤或疾病后。肿瘤似乎是这种干细胞的扩增和无限增殖。举个例子，CEA 是一种研究得最好的胚胎肿瘤标记。

CEA 是作为人结肠癌中的一种肿瘤特异性抗原[136]，作为妊娠前 6 个月中局限于胎儿肠道、胰腺和肝的一种胎儿抗原[137]被发现的。现在已认识到，CEA 也低水平存在于非恶性的、非胎儿的成熟组织中，如正常结肠黏膜、肺和泌乳乳房组织[138]。所以，用“胚胎抗原”或“胎儿抗原”等术语来称这些也在成熟细胞中被发现的分子会引起混淆。CEA 最初是作为被释放入细胞周围液体中的 200kDa 的膜相关糖蛋白被描述的。编码 CEA 的 cDNA 克隆的序列分析显示了 3 个长的重复单位，这 3 个重复单位与免疫球蛋白超基因家族间有重要的序列同源性[138]。曾经希望 CEA 可被用作胃肠恶性肿瘤的早期诊断标记；但增加的 CEA 血清水平不仅

在胃肠恶性肿瘤中被发现，也在胃肠道外的其他许多恶性疾病中被发现，如肺和乳房的癌。此外，增加的CEA 水平也在无恶性肿瘤的个体（如吸烟者及溃疡性结肠炎等炎性肠病患者）中被发现。尽管 CEA 的血清水平对早期检测癌症是无用的，但血液中的 CEA 水平可被用于监测治疗效果，以显示癌是已经被成功根除还是已经复发[139]。用 CEA 作为一种免疫治疗靶抗原的可能性也正在被研究[140]。

α 甲胎蛋白（AFP）是胎儿蛋白或胚胎蛋白的另一个例子[141]，尽管由胎儿肝和卵黄囊细胞产生，但该蛋白仅少量存在于正常成人血清中。在一些肝或睾丸癌及各种非恶性肝病的患者体内，这种蛋白的数量增加。所以，与 CEA 相似，用 AFP 作为癌早期诊断的一种标记是困难的[142]。不过，在癌症还可治疗时，AFP 分析可检测原发肝癌，AFP 也被用于监测治疗后患者[142]。胎儿抗原和胚胎抗原常在非恶性成熟组织血清被发现的事实为用这些抗原作为主动或被动免疫治疗的靶抗原提出了特别的问题[143]，可解释为什么用这些发育抗原作为免疫治疗的靶抗原至今还没有成功或仅有一定的成功。

克隆抗原

1248 与上述其他分化抗原相反，克隆抗原只在一些正常成熟细胞上表达，即是说，仅在肿瘤起源的细胞克隆上表达[46]，如表面免疫球蛋白阳性的 B 细胞恶性肿瘤的独特型。在这一特殊例子中，有趣的是，抗独特型小鼠免疫诱导产生了独特型特异性的移植免疫力，该免疫力阻止表达此独特型的肿瘤（骨髓瘤、淋巴瘤）的生长[144,145]。表达 T 细胞受体（TCR）γδ 链的、自体 B 细胞肿瘤上免疫球蛋白独特型特异性的人 CTL 已被产生[146]。此外，无论是在体内[147]或在体外[148]，独特型特异性抗体都阻止独特型阳性小鼠骨髓瘤细胞的生长。独特型特异性抗体也已被用于小鼠[149]或豚鼠[150]独特型阳性 B 细胞白血病的治疗。最后，独特型特异性单克隆抗体已使几例患者的 B 细胞淋巴瘤部分缓解，并使一例的完全消退[151]；独特型特异性主动免疫也已进入临床试验[152,153]。虽然治疗每一种癌必须产生不同的单克隆抗体或独特型疫苗，但使用这种克隆抗原优于局限性较少的肿瘤相关抗原的优势是只有少数正常细胞有此相同的抗原。例如，表达独特型的正常 B 细胞克隆可能不会妨碍抗独特型抗体的使用，而且治疗造成的某种正常 B 细胞克隆的丢失可能不会对患者造成不利影响。除 B 细胞恶性肿瘤和 T 细胞恶性肿瘤上的独特型外，现在还没有其他的克隆抗原候选者。

病毒基因编码的肿瘤抗原

DNA 肿瘤病毒

猴病毒 40（SV40）和多瘤病毒是致癌 DNA 病毒，编码恶性转化的诱导和维持所需的、功能相似但抗原性不同的蛋白。正如所预料的，不管组织起源或动物种类如何，这些病毒编码蛋白都是所有的、同种病毒所诱导的肿瘤共有的[154~156]。这些蛋白在细胞内主要作为核抗原出现，但编码这些蛋白的基因，也是肿瘤细胞表面上作为移植抗原的、CTL 所识别的、病毒特异性的、MHC 所呈递多肽的表达所必需的[157,158]。排斥抗原不被正常宿主细胞表达、不被宿主基因编码或不被有病毒衣壳抗原的病毒颗粒自身呈递，在这个意义上，排斥抗原是肿瘤特异性的。20 世纪 80 年代初，大量的研究分析了 SV40 特异性 CTL 如何能识别肿瘤细胞表面上的核 T 抗原[157~160]。通过转染删减了的、编码 T 抗原表位的基因的非转化部分，研究提供了 MHC Ⅰ类抗原限制性 CTL 能识别主要位于细胞内而在细胞表面上被加工的蛋白片段的早期线索[157,159]。

与 SV40 和多瘤病毒的 T 抗原相似，腺病毒和人乳头状瘤病毒（HPV）也有所谓的早期区域基因，它们分别被称为 E1A/E1B 和 E6/E7，这些基因不仅在病毒复制的早期阶段被转录也在转化细胞中被转录，这些抗原的表达是转化表型的维持所必需的。因此，DNA 病毒，如猴病毒 40、多瘤病毒、乳头状瘤病毒和腺病毒，表现出稳定但随机的整合，至少可将其早期区域基因整合进所转化细胞的基因组中。对诱导和维持转化表型重要的似乎是早期区域基因的蛋白产物，而不是整合进基因组的病毒整合位点。所以，早期区域蛋白是病毒编码的、肿瘤特异性抗原，它们显然和转化表型和恶性行为有关。这些抗原中的一些可诱导 MHC Ⅰ类限制性 CTL。几种 DNA 病毒已与人类癌症有关。HPV 的某些亚型与颈部癌和其他的某些癌有关；乙肝病毒（HBV）

与原发性肝癌有关;EB 病毒(EBV)与免疫受损个体内的免疫母细胞淋巴瘤和地方性(非洲的)伯基特淋巴瘤有关;此外,SV40 可能促进间皮瘤、骨肿瘤、室管膜细胞瘤和绒毛膜丛肿瘤形成(综述,见参考文献[161])。参与 EB 病毒所致恶性转化的病毒基因基本上还不知道,但淋巴瘤细胞通常已整合了病毒序列。EB 病毒可编码许多 CTL 识别抗原,它们已被仔细地作了图谱[162]。在潜伏感染细胞中被表达的几个 EB 病毒编码的核抗原(EBNA)和隐性膜蛋白(LMP)特别重要。在免疫抑制患者体内进行的 T 细胞过继免疫治疗可有效根除表达所有靶抗原的、更具进展性的 EB 病毒相关淋巴瘤,对此已有强的、提示性的证据[163]。HPV 相关颈部癌表达转化蛋白 E6 和 E7(综述,见参考文献[164]),在小鼠体内,抗 E6/E7 的主动免疫导致表达这些抗原的移植肿瘤细胞的排斥[165]。

RNA 肿瘤病毒

可有外源型或内源型的 RNA 肿瘤病毒整合进宿主细胞 DNA;但是,在大部分的病毒生命周期中,外源病毒存在并作为能感染其他细胞的感染颗粒复制。相反,内源病毒大部分时间保持着整合进宿主基因组的前病毒形式,只有在被电离辐射、化学致癌剂、诱变剂或蛋白合成抑制物诱导时才产生感染颗粒。近交系小鼠的基因组 DNA 含有大约 50 个拷贝的正常的鼠白血病病毒(MULV)相关前病毒序列[166]。这些前病毒可被分为三个大组,这是由可被前病毒感染颗粒感染的宿主细胞的范围确定的。同向性病毒在小鼠细胞内复制而不在非小鼠细胞内复制;异向性病毒在非小鼠细胞内复制而不在小鼠细胞内复制;多向性(两向或二向)病毒在两种细胞类型中都复制。病毒宿主范围的不同是由其病毒包膜(env)基因的不同决定的,这些基因编码一种分子质量为 70kDa 的糖蛋白(gp70)。所以,三类包膜基因特异性的寡核苷酸探针[167]或病毒包膜蛋白 gp70 的 3 种抗原型特异性的抗体探针[107,108,168]可被用来将这些前病毒归到上述所列的三种类型之一。显然,所有 RNA 肿瘤病毒都共有包膜蛋白的许多抗原决定簇,甚至当它们从不同的种属被分离时。这与 RNA 肿瘤病毒是极端密切相关的观点一致,这些病毒相似的基因组结构支持这一观点。

人嗜 T 淋巴细胞病毒Ⅰ(HTLV-1)是惟一一种目前已知的与人类癌(地方性成人 T 细胞白血病)有关的 RNA 病毒。但是,人内源性反转录病毒基因产物在几种人类癌中的表达已被报道,RNA 病毒与几种动物癌有关[169]。在这些肿瘤中发现的病毒抗原包括 *env* 基因编码的病毒包膜糖蛋白、病毒 *gag* 基因编码的几种病毒核心蛋白和鼠乳腺瘤病毒(MMTV)长末端重复序列(LTR)内的一个开放可读框(ORF)或 MUTV 的 *gag* 基因编码的超抗原。因此,RNA 肿瘤病毒编码蛋白在病毒颗粒及病毒感染的或病毒转化细胞的表面被发现。相反,DNA 肿瘤病毒编码蛋白在病毒颗粒上不表达,仅被转化细胞或感染细胞表达。某些前病毒基因,如编码 MUTV gp70 表面糖蛋白的 *env* 基因,可表达于正常小鼠细胞和化学诱导的或紫外线诱导的肿瘤上,而没有产生感染性颗粒的前病毒活化,对此已有强有力的证据[107,108]。所以,gp70 的表达通常在正常细胞上被观察到,在这些正常细胞,这些糖蛋白的出现受细胞分化阶段调节[170,171]。

将 MUTV 或鼠肉瘤病毒(MSV)注射进新生动物能诱导癌[172]。虽然抗 gp70 抗体能明显抑制病毒感染,但 RNA 肿瘤病毒转化细胞的排斥有赖于病毒抗原特异性的 MHC 限制性 T 细胞。这些 T 细胞识别 MULV 或 MSV 所诱导肿瘤细胞的病毒包膜蛋白(如 gp70)和病毒核心蛋白(如 gag)[173~175]。化学诱导的或自然发生的小鼠癌细胞上的这种蛋白也能为 T 细胞所识别[54,176]。这些实验研究已显示,内源性反转录病毒序列的激活可引起共有[176]或独特肿瘤抗原[53,54]的表达;但是,由于缺乏来自肿瘤起源小鼠的正常对照细胞,转录激活是肿瘤特异性的还是由已存在于胚系基因的重排所造成的还不清楚。一些 RNA 肿瘤病毒,如 MMTV,是垂直传播的(如,在新生儿的哺育过程中),但初生儿暴露给内源性 MMTV LTR 编码抗原能预防外源性 MMTV 感染(由于充当病毒携带者的反应性 T 细胞的清除[177]),导致较低的乳腺肿瘤发生率。DNA 肿瘤病毒的转化基因与正常细胞基因不密切相关;所以,这些基因编码的产物引起强效免疫应答。相反,RNA 肿瘤病毒的转化基因(也被称为病毒癌基因)与细胞癌基因密切相关,有时与细胞癌基因相同[3];所以它们的产物也可能不引起应答或仅仅引起弱的应答。因此,自身耐受可解释为什么诱导 RNA 肿瘤病毒癌基因产物特异性 CTL 比诱导 SV40、HPV 和腺病毒转化蛋白特异性 CTL 更困难。

1249

影响癌症发病率的免疫因素

肿瘤形成的免疫监视

20世纪初，研究提示，如果宿主防御不阻止不断出现的癌细胞的过度生长，癌将以"令人难以置信的频率"发生[9]。直到20世纪50年代[178]和60年代，当这一问题被重申和重新解释时，宿主对原发癌过度生长的免疫抵抗这一假说才引起较大注意。扩展假说[179]提示，在脊椎动物进化过程中，T细胞介导免疫形成的主要原因是由于抗改变了的自身细胞或瘤细胞的特异性防御。此外，"免疫监视"一词是为了描述抗癌形成的天然免疫宿主抵抗这一概念造出的[179]。监视这一概念在20世纪50年代和60年代特别具有吸引力，因为它为T细胞介导的细胞免疫提供了进化意义，而在以前，T细胞介导的细胞免疫除造成实验性同种异体移植物排斥外似乎没有用处。现在我们知道，T细胞介导的免疫对抵抗许多病毒感染是必需的，可能对抵抗其他感染也是必需的。例如，无胸腺及缺乏功能性T细胞免疫的裸鼠对病毒感染高度敏感，但不显示化学诱导癌发生率增加或潜伏期缩短[180,181]，尽管这些小鼠淋巴网状瘤的发生率增加[182]。同样，某些先天性免疫缺陷患者可能有显著增加的癌症发生率(几千倍)[183]，但大部分都是淋巴细胞生成起源的和网状内皮起源的。与一般的免疫活性人群的癌相比，这些个体最普遍的癌不会更早发生或不会有明显更高的发生率。所以极有可能，这些组织中的先天性畸形明显促成这些特殊类型癌的高发生率。最普遍的癌形式在获得性免疫缺陷综合征(AIDS)患者或由于移植或其他情况而被药物处理免疫抑制的个体中也不增加。但是，免疫缺陷患者通常对病毒感染高度敏感，表37.4显示，这些个体有病毒或紫外线引起的增加了的癌发生率[184]。肾移植患者显示出皮肤癌优先在身体的紫外线暴露位点显著增多，这与所用的免疫抑制剂无关[185]。甚至用免疫抑制药物环孢霉素(它已被发现不是诱变剂)处理也造成相似的增加。所以，这些皮肤癌在紫外线暴露部位的局限定位与全身药物治疗的辅致癌作用相违背；相反，此观测支持药物诱导的宿主免疫防御的抑制能增加紫外线造成的原发皮肤癌形成的观点。在这点上，环孢霉素在小鼠中轻微降低紫外线诱导的皮肤癌的潜伏期是有趣的[186]，它抑制小鼠对所移植的紫外线诱导的消退瘤的排斥[187]。

1250

表37.4 在免疫缺陷患者中发生率增加的恶性肿瘤

免疫缺陷类型	癌	致癌剂
原发的(遗传的)	B细胞淋巴瘤	EBV
	肝细胞癌	HBV
	血液恶性肿瘤	胚系
继发性的，药物诱导的(有或没有同种异体移植的患者)	B细胞淋巴瘤	EBV
	鳞状细胞癌(皮肤)	HPV, UV
	肝细胞癌	HBV
	子宫颈癌	HPV
AIDS	B细胞淋巴瘤	EBV
	cloagenic或口腔癌	HPV
	肝细胞癌	HBV

EBV，Epstein-Barr病毒；HBV，乙肝病毒；HPV，人乳头状瘤病毒；UV，紫外线。

由上述可看出，通过提供抵抗致命的病毒性疾病和其他类型感染的保护，T细胞介导的免疫似乎为个体提供了选择性优势。所以，免疫监视在保护人和动物抵抗病毒诱导的或病毒相关恶性肿瘤中确实起着重要的作用[188]。某些DNA病毒或RNA病毒诱导的肿瘤可极具免疫原性[188]。例如，由于SV40和多瘤病毒在转化细胞上诱导排斥抗原，而这些抗原有足够的免疫原性，在没有预先免疫的情况下足以引起排斥，所以这两种病毒在成年动物体内通常不诱发肿瘤。所以，肿瘤诱导需要使用免疫功能不全的动物，如非常年幼的或新生动物或裸鼠，这是在体外研究病毒和病毒转化细胞的肿瘤发生学中导致突破的一个发现。然而，尽管这些病毒诱导的肿瘤可在成年小鼠体内被连续传代，但只有在大量肿瘤细胞被用于转移时才可以。重要的是注

意到天然宿主的这种免疫抵抗是抗病毒转化细胞的而不是抗病毒本身的。致瘤 DNA 病毒恶性转化的细胞不产生病毒(与致瘤 RNA 病毒相反),而且肿瘤形成通常被免疫系统所阻止,但却不能阻止这些病毒的感染。对 DNA 肿瘤病毒所致肿瘤诱导的这种抵抗与多瘤病毒在成年小鼠体内是一种普通的无害的过客病毒且在野生小鼠体内被普遍发现而没有诱导恶性肿瘤这一事实相一致[189]。

正如松鼠猴嗜淋巴细胞性疱疹病毒所例证的,对致瘤病毒所引起的肿瘤诱导的抵抗在遗传上被确定[190]。在其天然宿主松鼠猴体内,该病毒是一种无害的"居民"。在其他一些没有携带该病毒的新大陆猴(如狨或猫头鹰猴)体内,定期接种这种病毒能引起恶性淋巴瘤。已发现,易感猴对病毒编码抗原应答,但这种应答很晚才发生且仅在淋巴瘤已经形成后才发生。在某种程度上,这些结果提示,有致瘤潜能的病毒选择那些可有效破坏被这些病毒转化了的细胞的天然宿主,因为致命肿瘤在杀死宿主时将同时清除病毒。这方面的另一个例子是嗜淋巴细胞性 EB 病毒[188],人是 EB 病毒的天然宿主,EB 病毒在人体造成被称为单核细胞增多症的一种自限性淋巴细胞增殖性疾病。所以 EB 病毒成为潜伏的病毒;大约 90%的成人被潜伏感染,只有免疫抑制个体或疟疾患者似乎才产生 EB 病毒相关的恶性淋巴瘤。由于表达 EB 病毒编码的、CTL 所识别抗原的淋巴瘤在免疫活性个体还没有被发现,所以这些抗原对宿主识别和肿瘤排斥一定是重要的。往往出现于任何明显的免疫功能损害前的伯基特淋巴瘤,仅仅表达 EB 病毒编码的靶抗原 EBNA-1,对 CTL 来说,EBNA-1 是弱的靶抗原,而 EB 病毒相关淋巴瘤则只在免疫缺陷病人体内表达全系列的 CTL 识别的抗原。但是,这两种类型的 EB 病毒相关淋巴瘤都有涉及 *myc* 和免疫球蛋白基因座的相同的易位。

为了描述宿主对起始(即原发)肿瘤(如,某些病毒诱导的恶性肿瘤)的有效抵抗,术语"免疫监视"可能应该被保留。用肿瘤细胞[191]或体外转化细胞[192]进行的移植研究不能充分测试严格意义上的免疫监视概念。不过,对大部分肿瘤而言,在肿瘤形成前,相当数量的肿瘤细胞必须被接种进遗传学相同的动物或裸鼠体内,知道这一点是重要的;即无论使用什么样的免疫抑制方法,肿瘤细胞的阈值数目通常是必需的。所以,对移植的这种屏障有可能具有非免疫特性。的确,许多非免疫自我平衡控制机制可能参与阻止这些被移植的肿瘤细胞的过度生长。

总之,免疫监视可有效抵抗几种病毒所诱导的癌的形成,但它似乎在阻止化学或物理致癌剂所诱导的大部分癌类型的形成中不起作用,可能紫外线所诱导的肿瘤除外。但是,对自发癌或那些由物理或化学致癌剂所诱导的癌的免疫监视的缺失并不意味着这些肿瘤是无抗原性的或对免疫破坏不敏感。事实上,正如下面将要显示的,已有令人信服的证据表明,癌携带着特异性的抗原(即在正常细胞上不存在),且这些抗原中的一些可能与癌的恶性表型有关。此外,这些抗原中的一些可充当癌诊断或治疗的靶抗原。最后,广泛的临床和实验证据提示,癌能在荷瘤宿主体内刺激免疫应答,虽然这种应答通常不能阻止癌的形成。

肿瘤形成的刺激作用

19 世纪,Virchow[193]提出了炎症浸润与恶性生长间的一种可能的功能关系。现在知道,这种浸润能促进癌的缩小或促进癌的形成(和进展)。但是,这些差别不能轻易地从浸润的组织学外观加以预测,因为由肿瘤破坏而产生的炎症细胞反应在组织学上可能不容易与造成肿瘤破坏的炎症浸润区分开来。此外,炎症细胞如巨噬细胞在形态学上看起来可能是完全相同的,即使他们可分泌对肿瘤生长有相反影响的不同的细胞因子。尽管不断有其他的主张[194],但肿瘤炎症浸润的测量似乎仍是未被证实的预后意义的一个组织病理学变量[195,196]。这也适用于进行性原发黑色素瘤病变的组织学"退化"区的发现,即使这种病变与寡克隆 T 细胞浸润或白斑(正常皮肤色素减退)有关[196,197]。部分恶性病变的破坏可能仅仅是癌细胞侵入周围组织的浸润性生长的结果,这种浸润性生长可破坏肿瘤的部分血液供应。因此,肿瘤已被比作"不能治愈的伤口"[198]。依赖于抗原、细胞和细胞因子的参与,结果可能是获得性免疫和(或)先天免疫对癌变前细胞或恶性细胞生长的抑制或刺激(图 37.5)。细胞因子在炎症反应中可能起中心作用。非恶性细胞在生理条件下仅短暂产生细胞因子以供细胞间的短期信号传导,而癌细胞则产生相当多的细胞因子并维持各种细胞因子和趋化因子的数量,如白细胞介素-8、转化生长因子 β(TGF-β)和巨噬细胞趋化蛋白(MCP)。这些细胞因子和趋化因子可吸

1251

引非恶性宿主细胞和(或)诱导这些细胞产生其他细胞因子。例如,肿瘤细胞释放的MCP将吸引巨噬细胞到肿瘤生长部位,这些肿瘤相关巨噬细胞能释放血小板衍生生长因子(PDGF)等其他细胞因子和生长因子,刺激肿瘤生长[199](综述,见参考文献[200]、[201])(图37.5)。相似地,肿瘤细胞持续产生的潜在的TGF-β可被巨噬细胞等浸润炎症细胞活化,活化TGF-β可诱导血管生成及纤维母细胞和内皮细胞产生细胞外基质和其他细胞因子(综述,见参考文献[202])。这些浸润的和固着的非恶性宿主细胞及细胞外基质提供了肿瘤生长的基质("床")。所以,发展中的旨在破坏肿瘤基质的方法可能对已确定的实体瘤的成功治疗具有重要价值[203]。

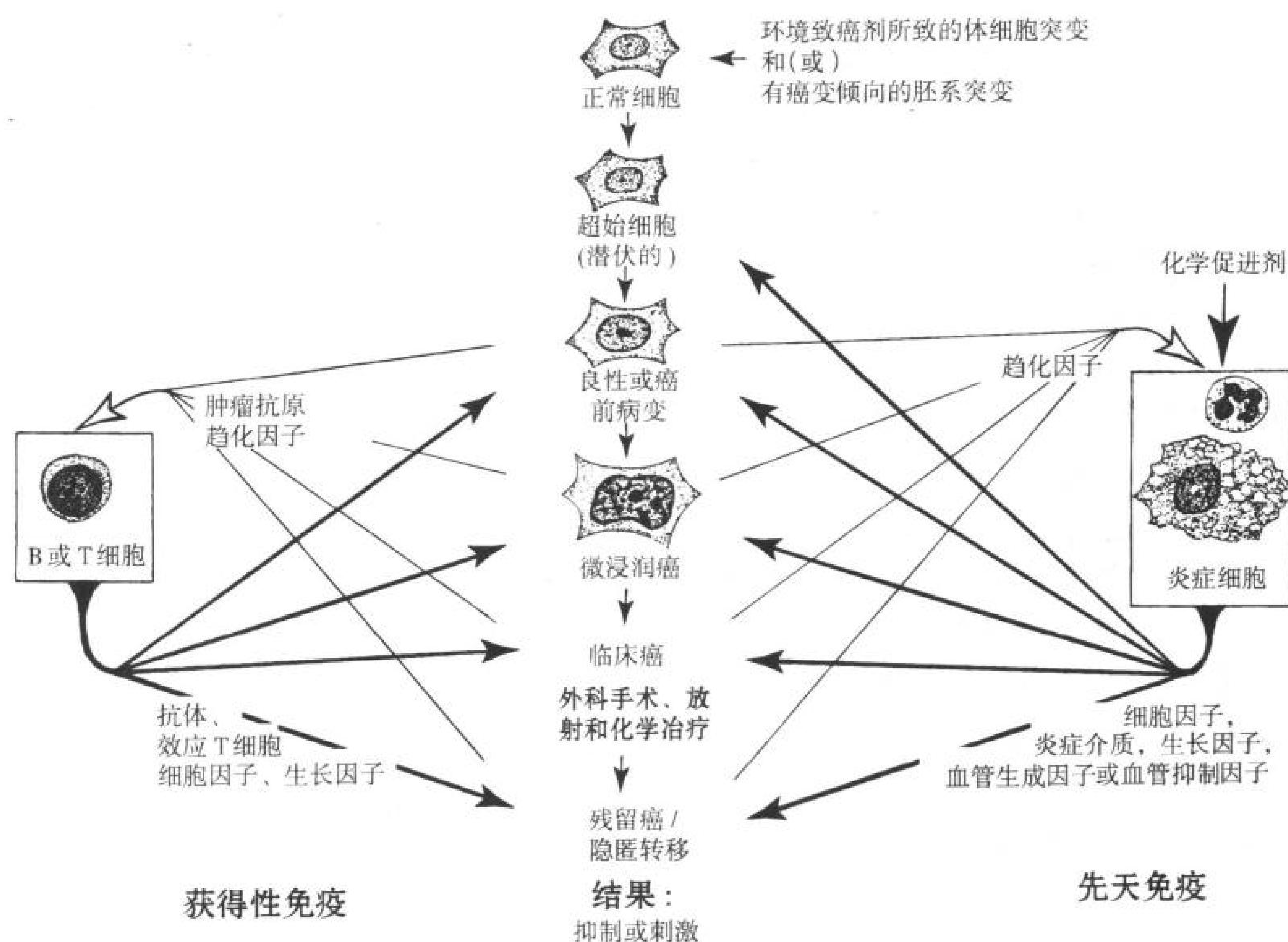


图37.5 获得性免疫和先天免疫对肿瘤形成和生长都可有重要的影响。例如,特异性T细胞免疫阻止EBV所诱导淋巴瘤在人体内的形成,而特定T细胞亚类的存在有助于MMTV相关乳腺肿瘤在小鼠体内的形成。先天免疫也可刺激或抑制癌的形成。如,BCG诱导的炎症阻止人膀胱癌的复发,而前列腺素H合酶2依赖性炎症似乎促进某些皮肤和结肠肿瘤的形成。大体上,免疫系统的这两个领域能在癌形成和生长的多步骤过程的任何阶段抑制或刺激肿瘤细胞。

伴随着用转基因小鼠和基因敲除小鼠所做的实验,基质炎症的肿瘤促进效应机制已经更加清楚。早期研究已显示,化学(佛波酯)或物理(创伤)方法对皮肤肿瘤形成的促进作用的有效性与所诱导的炎症程度直接相关。因此,对创伤或佛波酯有低的或弱的炎症反应的小鼠品系对促进后的肿瘤形成更具抵抗力[204]。Cox-2基因所编码的前列腺素H合酶2的诱导具有重要的价值[205]。某些细胞因子或化学促进剂诱导该基因在巨噬细胞和其他炎症细胞内的转录,导致前列腺素E2(PGE2)和其他物质的局部产生,如活性氧中间体。PGE-2能直接刺激某些肿瘤细胞(包括结肠上皮细胞)的生长;诱导血管生成和阻止白细胞介素-12的产生并从而阻止γ干扰素(IFN-γ)产生(这两种细胞因子都可降低化学致癌剂对原发癌的诱导[206])。此外,活性氧中间体能在起始细胞内造成额外的突变,从而有助于肿瘤形成[205]。前列腺素合酶2的活性不是组成性的但可在细胞内被诱导,如在上皮肿瘤内被发现作为间质细胞的单核细胞和巨噬细胞[207]。特异性化学药品或遗传敲除对*Cox*-2编码酶的抑制显著降低易产生肠道肿瘤的小鼠的肠道肿瘤的形成[207]。相似地,非甾体类抗炎药物(包括阿斯匹林)对前列腺素产生的抑制能抑制皮肤乳头状瘤和肠道肿瘤的形成[207]。

1252

肿瘤进展可能有赖于连续的炎症反应，因为当化学促进剂的应用被太快终止时乳头状瘤的消退被观察到。肿瘤进展的后期阶段也可受炎症细胞的显著影响。例如，通过旁分泌刺激回路的获得，通过产生能吸引炎症细胞的趋化因子，不同的癌细胞能获得多得多的体内侵蚀性生长[208~210]；这些炎症细胞又可产生细胞因子和生长因子，刺激肿瘤血管生成或直接刺激肿瘤细胞的生长。另一个例子是，发现卡波西肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)感染的非恶性基质细胞的病毒白细胞介素-6的产生可在多发性骨髓瘤(发生率位居第二的人血细胞恶性肿瘤)的发生中起着不可或缺的作用。浆细胞的这种恶性肿瘤发生于大约25%的、患有被称为单株丙种球蛋白病的恶变前患者[211]。其他实验已显示，在肿瘤进展过程中，癌细胞能从被某些细胞因子(如转化生长因子β或白细胞介素-6)抑制转换到被它们刺激[212,213]。在肿瘤进展后期，当癌细胞自身开始产生这些因子时，旁分泌刺激可转换为自分泌刺激[214]。变异选择的这一过程可被旨在破坏提供旁分泌生长因子的肿瘤基质的不完全治疗所促进[215]。某些细菌物质，如卡介菌和某些细胞因子，当它们由被转染的癌细胞产生时，有抗肿瘤作用，这些作用与炎症应答有关，但我们现在不知道是什么决定一种炎症应答是抑制而不是刺激肿瘤生长。一旦炎症应答的效应机制和调节回路中的差异被更好地理解，我们就可能发展强有力的新方法来预防及治疗恶性肿瘤。

在一个有趣的例子中，某种T细胞亚类的存在已被显示可使病毒诱导的小鼠乳腺肿瘤有更高的发生率。通过乳传播感染，MMTV可通过喂乳的母亲传播给后代，导致以后的成人乳腺肿瘤[216,217]。MMTV基因组长末端重复序列可读框内编码的一种蛋白质超抗原ORF介导Mls应答，刺激或清除特定的T细胞亚类，如C3H/He小鼠内的$V_{\beta}14$亚类[218~220]。分裂细胞更易被反转录病毒感染[221,222]，被ORF刺激的那些T细胞被优先感染。这些T细胞似乎是将病毒运输到乳腺的主要运输细胞[223]。这种T细胞亚类对乳腺肿瘤发生的重要性，为出身时表达高水平超抗原ORF的转基因小鼠清除$V_{\beta}14$亚类及其不被乳传播病毒感染的发现所证实。所以，小鼠有更低的乳腺肿瘤发生率，而表达较低水平此种抗原的小鼠不清除这种T细胞且保留对病毒的敏感性[177]。这些结果与早期的发现相一致，即小鼠的新生期胸腺切除显著降低乳腺肿瘤发生率[224]。有趣的是，据报道，器官移植后被长期免疫抑制的女性，其乳癌发生率被轻微降低[225]。

已假设，在一般情况下，对肿瘤抗原的免疫应答“弱”时刺激肿瘤生长，而当对肿瘤抗原的免疫应答“强”时则抑制肿瘤生长[226,227]。但是，用于支持这一概念的研究没有一个已鉴定了有关的抗原。因此，还不清楚是抗原特异性免疫起重要作用还是先天免疫起重要作用。不过，抗原特异性免疫反应总是伴有先天免疫的效应细胞，而接种促进肿瘤的形成是可能的。

影响肿瘤免疫原性的因素

自发癌和诱导癌之间免疫原性的不同

有一个被广泛接受的误解认为，人类癌瘤通常比小鼠肿瘤的免疫原性低[228]。但令人信服的证据表明，许多人类癌瘤是有抗原性的，即使当生长是进行性的。同样，甚至免疫原性最强的小鼠“消退”肿瘤都在原发宿主体内进行性生长且总是杀死原发宿主(图37.6)。只有将原发小鼠肿瘤移植到年轻的同系基因免疫活性受体才能显示如此强的免疫原性，以至于在没有预先免疫时被移植的肿瘤碎片在任何可测剂量下都被排斥(即这种肿瘤是消退肿瘤)，或移植物将进行性生长，所以这种肿瘤代表一种“进展肿瘤”。所以，很有可能一些人类原发肿瘤同小鼠消退肿瘤一样有免疫原性，因为只有移植物(在人类不可能)才可能显示这种免疫原性。

正如移植实验所检测到的，肿瘤诱导模型大大地影响着所诱导肿瘤的免疫原性。尽管连续移植的肿瘤被用于大部分研究，而且移植已被选择以寻找低免疫原性突变体，但没有任何已知的致癌剂暴露而发生的自发性小鼠癌，往往比DNA肿瘤病毒或故意暴露给致癌剂所诱导的癌的免疫原性弱[4,15,229~232]。如果自发性小鼠癌与人类癌更相似，那么这将提示人类癌是弱免疫原性的[232]。然而，大部分人类癌是由环境致癌剂诱导的，而且正如前面已提及的，人类癌的免疫原性不能在移植实验中被测量。

有些紫外线诱导的肿瘤是最具免疫原性的癌；对这些所谓的消退肿瘤的移植抵抗似乎是绝对的而不是

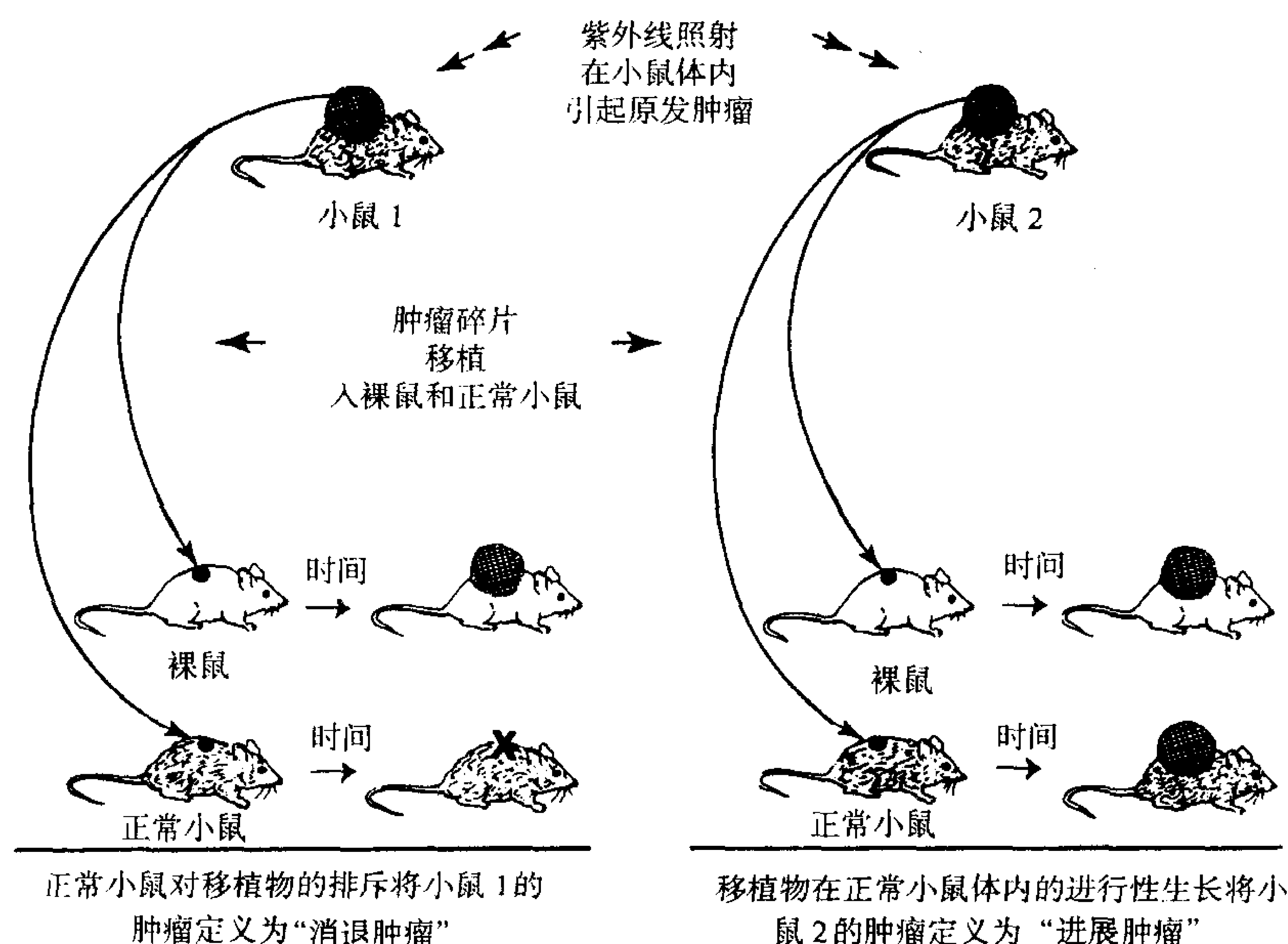


图 37.6 无论肿瘤是否有高度免疫原性,原发的、紫外线所诱导的皮肤癌在原发宿主体内的生长是不能区分的。只有后来移植入年轻的同系基因小鼠才能将肿瘤确定为消退肿瘤或进展肿瘤,裸鼠体内移植碎片的生长充当移植肿瘤碎片生存能力和确定消退表型的 T 细胞依赖性的对照。

相对的。即使当最大可测剂量的肿瘤细胞或碎片被使用时,在没有预先免疫小鼠的情况下,被正常同系基因小鼠排斥仍被观察到[22];尽管小量同种肿瘤细胞将生长并杀死无胸腺裸鼠,但这些肿瘤移植物将生长大约一周,然后消失。大部分的 MCA 所诱导的纤维肉瘤显示出中等程度的免疫原性[16,17,31]。这被事实所显示,即对大部分化学诱导肿瘤的免疫抵抗的诱导需预先免疫,因为肿瘤的最初移植物通常产生进行性致死性生长[16]。免疫可通过接种小的无肿瘤发生能力的肿瘤细胞剂量或在肿瘤已生长几天或几周后通过初始肿瘤移植物的完全外科手术去除(切除或结扎)来完成。这些化学诱导肿瘤所诱导的免疫抵抗通常是相对的而不是绝对的,而且当用于接种的肿瘤细胞的数目多时会消失。

致癌剂剂量、免疫潜能和肿瘤潜伏的影响

大部分致癌剂都是诱变剂[4,5],且导致癌发生的突变也可引起肿瘤特异性抗原的表达。所以,假定肿瘤的免疫原性与用于诱导的致癌剂的剂量成比例似乎是合理的;这也许能解释"自发"肿瘤的通常低的或缺乏的免疫原性,这些"自发"肿瘤估计可能是由无法探测到的低剂量环境致癌剂所诱导的。以此类推,用较大剂量的物理或化学致癌剂诱导的肿瘤,就采用实验方法诱导的肿瘤而言,应该是有免疫原性的。但还不清楚为什么用相同剂量的化学或物理致癌剂所诱导的肿瘤可显示出完全不同的免疫原性[16,233]。一种原因可能是,被输送到特定靶细胞或靶组织的致癌剂的实际局部剂量可能在动物间相差很大。另一种原因可能是,不管由突变产生的突变蛋白可能有的免疫原性强弱如何,有利于恶性行为的突变被选择。这是可能发生的,因为如果肿瘤切除后没被免疫,原发宿主就可能不对自身肿瘤应答[17]。这与原发的、紫外线所诱导肿瘤的免疫原性的显著差异只有在被移植进第二宿主后才变得明显的观测[37,233](图 37.6)相一致。

在癌诱导和形成过程中,宿主的免疫潜能有时可允许宿主选择有抗原丢失的变异体[18]。相反,在癌发生过程中,宿主的免疫抑制或免疫缺陷将允许有高度免疫原性的肿瘤生长(如有高度抗原性的 EB 病毒相关淋巴瘤在免疫被抑制的移植物受体内的出现)。所以,认为一些致癌剂是免疫抑制性的可能是非常适当的[234]。例如在小鼠中,反复暴露给紫外线诱导免疫抑制[235~237],这种免疫抑制似乎允许有高度免疫原性的消退肿瘤生长。与此相反,单次注射在 100% 的小鼠体内诱导肿瘤所需的 MCA 只能诱导一个短期的免疫抑

制状态，因此允许宿主在肿瘤形成过程中选择免疫原性较弱的变异体。通过对比发生在紫外线照射过的和正常小鼠体内的、MCA所诱导肿瘤的免疫原性，宿主的免疫潜能影响正在形成中的肿瘤的免疫原性强弱的概念已在实验上被测试[238]。的确，与用MCA在未被紫外线照射抑制的小鼠体内所诱导的肿瘤相比，在被紫外线免疫抑制的小鼠体内，用MCA诱导的肿瘤是具高度免疫原性的消退肿瘤的频率更高。

1254

在对比不同的肿瘤模型时，潜伏期的长短与免疫原性的强弱之间没有一致的相关性。例如，在MCA所诱导的肿瘤中，潜伏期的长短与免疫原性的强弱呈负相关[18,239]，但在紫外线所诱导的肿瘤中却没有这种相关性[22]。这种不一致的原因可能是：当潜伏期增加时，宿主的年龄也增加；与年龄有关的免疫潜能的降低[240~243]可能使宿主不能进行抗高度免疫原性肿瘤细胞的选择。所以，经过一段长的潜伏期后，在老年个体中形成的癌有时可能是极具免疫原性的。

癌症免疫中的效应机制

由于癌症不是一种单一疾病，因此用一种肿瘤模型所得到的发现可能不能应用于其他肿瘤模型并不奇怪。考虑到在肿瘤中所发现的抗原性差异，在数目众多的肿瘤模型的一种或另一种模型中，体液和细胞介导的免疫的不同成分已被显示在恶性细胞的破坏中起不同的作用也并不奇怪。

研究体内效应机制重要性的试验

大体而言，4种不同的试验已被用于评价体内不同效应机制的重要性。第一种类型的试验包括将效应细胞、细胞因子或抗体转移进亚致死剂量照射后的、环磷酰胺预处理后的或正常动物体内，这些动物都接种了肿瘤细胞。这种试验有某些局限性。效应细胞可能不到达或定位于肿瘤内，除非效应细胞和癌细胞都被静脉内注射且都被截留在肺中。此外，即使被转移的细胞或试剂是有效的，这种试验也不能排除宿主的其他效应机制可能已被该程序激活。在被称为Winn试验[17,18,244]的第二种程序中，肿瘤细胞在体外与效应细胞或血清混合，然后混合物被皮下注射进动物以确定肿瘤的体内生长是否被阻止。虽然“读出”需要长得多的时间，但肿瘤细胞在注射前或注射后不久的几分钟之内可能就被杀死了。所以，尽管宿主被用作肿瘤生长的接受器，但Winn试验在大体上还是一种体外细胞毒性试验。第三种方法是用不同淋巴细胞亚类或细胞因子特异性的抗体处理，以去除体内特异性的淋巴细胞亚类或细胞因子[39,245]。宿主不能抵抗肿瘤攻击表明特定的细胞亚类或细胞因子是宿主抵抗的必需成分。对已逃避宿主肿瘤破坏的肿瘤变异体的分析提供了确定体内免疫效应物重要性的第四种方法[39,44,191]。在这些变异体内观察到的表型变化可能表明哪种效应机制负责选择。所以，表型改变的类型可使我们深入了解可在免疫活性小鼠体内起作用的自然发生的防御机制的重要性(类似于根据在耐药菌内被发现的变化类型推断抗生素的作用)。用紫外线所诱导肿瘤举例说明了这种方法。这些癌有免疫性强的肿瘤特异性抗原，尽管这些消退肿瘤确实在免疫缺陷小鼠体内生长，但在没有预先免疫的情况下，它们通常被同系基因小鼠排斥。在极个别情况下，通常在不到1%的正常受体体内，这些肿瘤通过一些可遗传的改变逃避排斥。这些被再次植入正常小鼠体内时会进行性生长(进展变异体)的逃避变异体在体外被测试了对T细胞、活化巨噬细胞或自然杀伤细胞的敏感性改变[39,191,246]。一些进展变异体由于缺乏某种独特的肿瘤抗原因而在体外表现出对细胞毒性T细胞的抵抗[39,191]、对活化巨噬细胞[246]和肿瘤坏死因子的增加的抵抗提示，在这种肿瘤体系中，溶细胞性T细胞和活化巨噬细胞在体内可能有破瘤活性。无论如何，至少一些观察到的改变是一致的，而不能在对一种效应机制的抵抗中观察到改变并不意味着这种效应机制就不重要。例如，大部分进展变异体都保留有T细胞识别抗原[39]，而其他可遗传的改变，如旁分泌刺激回路的建立，显然使这些变异体能逃避T细胞破坏[208~210]。

抗体和B细胞

B细胞在调节肿瘤免疫中的作用很少被了解：在一个肿瘤排斥需$CD4^+$辅助性T细胞的肿瘤模型中，B

细胞似乎是高效 T 细胞活化启动和肿瘤抵抗所必需的[247]。相反,在另一个肿瘤模型中,$CD4^+$ T 细胞的去除促进了 $CD8^+$ 细胞对肿瘤的排斥,而 B 细胞的缺乏则增强了 CTL 应答和肿瘤排斥[248,249]。

与自体肿瘤反应的人抗血清和单克隆抗体已被分离[108,250]。但是,对肿瘤抗原的强体液应答似乎与宿主对肿瘤的可证明的抵抗无关。例如,用实验方法诱导的针对 MCA 所诱导肉瘤的体液免疫应答不提供抗肿瘤移植物的保护性免疫[251]。在另一个例子中,TL^+ 白血病细胞诱导高滴度的 TL 特异性抗体,有异种补体存在时这些抗体在体外对 TL^+ 白血病细胞有细胞毒性,但无论是在免疫后有高滴度 TL 抗原特异性抗体的小鼠体内还是在未免疫小鼠体内,TL^+ 白血病细胞都同样地生长良好[252,253]。很明显,在预测宿主是否将排斥肿瘤中,针对这些肿瘤的抗体的存在无相关性[251,253]。造血系统的正常或恶性细胞在体外一般会被抗体和异种补体非常有效地溶破;但是,某些来自实体组织的正常或恶性细胞受到的影响却少得多,即使它们表达高水平的抗原。这种显著差异的原因仍不清楚,但可能与补体来源、抗原分布或补体介导的病灶的修复的差异有关。在体外,一些实体瘤细胞被一个包括抗体包被、调理作用和随后的巨噬细胞吞噬的过程杀死;该过程可被补体的存在所加强。当与巨噬细胞、自然杀伤细胞或中性粒细胞一起培养时,抗体包被的肿瘤细胞也可在缺乏吞噬作用的情况下被抗体依赖性细胞介导的细胞毒杀死。这些在体杀死肿瘤细胞的机制的普遍关联性还不清楚。

1255

T 淋巴细胞

T 细胞介导免疫对免疫小鼠排斥病毒[254~256]和化学诱导的肿瘤[17,18,36]或正常小鼠排斥同种异体[257]和紫外线所诱导肿瘤[22,39,236],具有关键重要性已被令人信服地证实。例如,在 MCA 所诱导的小鼠肿瘤模型中,免疫细胞而非免疫血清的静脉内注射能将全身性肿瘤特异性免疫力转移进亚致死性 X 射线照射后小鼠体内已被显示[18]。在另一项研究中,通过用抗 T 细胞抗体和补体预处理免疫细胞,抗浆细胞瘤免疫的转移被废除[36]。这些结果与其他研究[17]相一致。这些研究显示,免疫细胞而非免疫血清与肿瘤细胞体外混合后,皮下注射能阻止肿瘤的过度生长;此方法是一种局部过继转移试验(Winn 试验)[244]。同样,未免疫(正常)小鼠对紫外线诱导的消退肿瘤的排斥也需要 T 细胞[22,39,236,258]。各种 T 细胞亚类在肿瘤排斥中的相对重要性已是反复的而且可能是不必要争论的主题[259]。不同的肿瘤相差很大,以致排斥所需的 T 细胞亚类的不同将被期待。对于某些肿瘤,如紫外线诱导的肿瘤,$CD8^+$ 溶细胞性 T 细胞亚类似乎是排斥通常所必需的[39]。有关 $CD4^+$ T 细胞亚类如何能影响抗肿瘤免疫则知道得相对较少,但肿瘤特异性的、$CD4^+$ T 细胞识别的肿瘤抗原确实存在[56]。$CD4^+$ T 细胞对 $CD8^+$ T 细胞记忆[260]和过继转移的 $CD8^+$ T 细胞的存活[261]似乎是关键的。某些 $CD4^+$ 亚类也可对肿瘤排斥产生负面影响,因为此 $CD4^+$ T 细胞亚类的去除可增加某些肿瘤模型中的肿瘤抵抗[248]。在 4~5 小时的 ^{51}Cr 释放试验中,杀死肿瘤靶细胞的鼠 CTL,可从反复腹膜内注射抗原性肿瘤细胞后的小鼠新鲜分离或者可在 7 天的混合淋巴细胞-肿瘤细胞培养中体外产生。在大多数实验肿瘤模型中,特异性 T 细胞从无肿瘤同基因小鼠产生。由于这种方法在人类不可行,所以来自癌症患者的 T 淋巴细胞已从外周血[262,263]或肿瘤(肿瘤浸润淋巴细胞,TIL)[264]分离获得。这种 T 细胞在体外能与自体癌细胞反应(综述,见参考文献[265])。当新鲜分离时,在肿瘤细胞的显著溶破或生长抑制能被观察到以前,这些淋巴细胞通常需与肿瘤靶细胞孵育 16~48 小时,但已在培养中生长并被反复刺激的淋巴细胞常常将在 4~5 小时的 ^{51}Cr 释放试验中溶破肿瘤细胞。

自然杀伤细胞与淋巴因子激活杀伤细胞

自然杀伤细胞[266~271]是一种独特的淋巴细胞亚群,它们能在无预先致敏和不需要 MHC 限制的情况下杀死一些癌细胞(综述,见参考文献[271]和第 17 章)。此外,不表达宿主的至少一种 MHC Ⅰ类等位基因的癌细胞被涉及自然杀伤细胞的机制[275]更有效地排斥[273,274](综述,见参考文献[272])。与此相反,癌细胞对一种 MHC 等位基因的表达能保护肿瘤细胞免受自然杀伤细胞的溶破[276]。现在知道,自然杀伤细胞上识别 MHC 分子的受体的连接会施加一种抑制信号来阻止自然杀伤细胞溶破活性的活化。使用一些高度敏感的细胞

系，如鼠T细胞白血病细胞系YAC和人红白血病细胞系K562，鼠和人自然杀伤细胞抗恶性细胞的细胞毒性已在体外被最完全地定性。此外，体内研究提示，自然杀伤细胞可能有助于降低静脉内注射的癌细胞的转移性播散[277~279]。与自然杀伤细胞体内作用相一致(但不能证明)的观测包括：①随着小鼠年龄的增加，当内源性自然杀伤细胞活性降低时，自发肿瘤的发生率增加；②有自然杀伤细胞但T细胞免疫缺陷的裸鼠排斥一些肿瘤的能力。

用高剂量白细胞介素-2体外活化外周血细胞能诱导产生淋巴因子激活杀伤细胞(LAK细胞)[280,281]。癌细胞，即使当它们对自然杀伤细胞有抵抗力时，通常对LAK细胞的体外杀伤敏感，而大部分非恶性靶细胞已被报道对LAK细胞的杀伤是有抵抗力的。然而，胎儿细胞和胎盘细胞、有时正常外周血细胞[281]已被报道对LAK细胞的杀伤敏感。静脉内接种癌细胞后，早期静脉内注射LAK细胞进小鼠体内降低肺内转移性肿瘤细胞生长，但使用该方法，LAK细胞和癌细胞都被截留在肺内[282,283]。LAK细胞和肾细胞癌及黑色素瘤一起在病人体内过继转移后，人体内的抗肿瘤应答也已被报道[284]。考虑到癌细胞在体外对LAK细胞的普遍敏感性，该选择性很难解释。尽管介导广泛的恶性细胞体外杀伤的细胞90%以上是激活了的$CD16^+/CD3^-$自然杀伤细胞[285,286]，但哪些细胞有在体抗肿瘤活性还没有被完全确定。即使鼠LAK细胞可从裸鼠脾细胞产生[287]，但还没有证实来自裸鼠和正常小鼠的LAK细胞有相似的在体抗肿瘤细胞治疗性作用。其他细胞类型，如通常存在于每一次制备的LAK细胞内的$CD3^+$淋巴细胞[287]，可显著促进肿瘤细胞的在体杀伤。

巨噬细胞与中性粒细胞

来自正常供体的巨噬细胞和中性粒细胞在体外一般对肿瘤细胞或正常细胞没有细胞毒性；但巨噬细胞和中性粒细胞在体外可被细菌产物激活，造成恶性细胞的选择性细胞溶解或细胞增殖抑制[288~294]。当使用未被细菌或其产物污染的肿瘤细胞时，巨噬细胞和中性粒细胞的这种溶瘤性激活似乎不发生。很明显，癌细胞缺乏直接激活这些先天免疫效应细胞所必需的[296]"危险信号"[295]。完全激活的巨噬细胞需要16~72小时的试验在体外证实其在同位素释放试验中的溶瘤活性，或在生长抑制试验中的细胞增殖抑制活性。尽管巨噬细胞对肿瘤细胞的一些细胞溶解效应或细胞增殖抑制效应涉及细胞接触和(或)各种细胞毒性物质的分泌，但吞噬作用也可能起重要作用[297]。

活化巨噬细胞产生的肿瘤坏死因子[298,299]可解释体外抗一些肿瘤的所有经典溶瘤作用[300]。例如，对肿瘤坏死因子有抵抗力的变异体也完全抵抗活化巨噬细胞；在反向实验中，对活化巨噬细胞有抵抗力的变异体对肿瘤坏死因子完全抵抗[300]。此外，巨噬细胞细胞毒性可被重组肿瘤坏死因子抗体完全抑制[300]。在人外周血单核细胞对某些肿瘤细胞的杀伤中，肿瘤坏死因子似乎也是一种重要的效应分子[301~303]。正如可能被预期的，由于可被巨噬细胞释放的细胞毒性分子的过量[304]，与肿瘤坏死因子无关的机制也与一些肿瘤细胞的杀伤有关。例如，活化巨噬细胞从L精氨酸合成氮氧化物，这些氮中间体似乎也是活化巨噬细胞对肿瘤细胞杀伤的介质[305,306]。 1256

由于巨噬细胞对恶性细胞的颇具选择性的细胞毒性，众多的研究已考虑了这种细胞类型在免疫监视和免疫治疗中的潜在作用。已知正常宿主能选择体外对肿瘤坏死因子和活化巨噬细胞的作用有抵抗力的变异癌细胞[246,300,307~309]。但是，这种选择似乎有赖于在受到抗原刺激时能产生大量肿瘤坏死因子的T细胞[246]。所以，现在没有关键的证据来确定或反驳活化巨噬细胞破坏初生肿瘤及因此在免疫监视中起作用的观点[310]。更重要的问题可能是，活化巨噬细胞在癌症治疗中是否有用。实验证据显示，在一些实验模型中，巨噬细胞的体内活化或体外活化巨噬细胞的过继转移能消除或降低转移(综述，见参考文献[311])。

细胞因子

肿瘤细胞或肿瘤基质中的非恶性宿主细胞产生的细胞因子对肿瘤生长的可能的刺激性作用先前已在本章被讨论(见肿瘤生长刺激部分)。通过使用被转染而产生大量的某些细胞因子的肿瘤细胞，局部维持的高水平的各种细胞因子的作用已被研究。一些细胞因子，如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)[312]、白细胞介素-

2[313]、白细胞介素-4[314]和肿瘤坏死因子[315,316]，当它们由被转染的肿瘤细胞充分地大量分泌时，即使没有T细胞存在也可引起显著的生长抑制。其他一些细胞因子，如白细胞介素-1[317]、白细胞介素-7[318]和γ干扰素[319~321]，已被显示能在体内抑制被转染的肿瘤细胞的生长，但这种抑制有赖于T细胞的存在。然而，我们才仅仅开始理解引起这种生长抑制的机制。即使对被感染的肿瘤细胞的细胞反应的组织学和超微结构外观可能是相似的，但对不同的细胞因子，这些机制可能是极为不同的。

肿瘤坏死因子提供了分析一种特定的细胞因子在体抑制肿瘤生长所涉及机制中的难点的例子。遗传稳定且在体外完全抵抗巨噬细胞[246]和肿瘤坏死因子[300]的变异肿瘤细胞在体内仍形成肿瘤，与其所起源的、对肿瘤坏死因子敏感的肿瘤一样，这些肿瘤仍对肿瘤坏死因子注射后的出血性坏死高度敏感。因此，肿瘤细胞在体外对肿瘤坏死因子直接细胞毒性的敏感性在体内对被动肿瘤坏死因子治疗的效果可能不重要。肿瘤产物可致敏肿瘤的血管床，使其对肿瘤坏死因子引起的出血性坏死敏感。此观点为肿瘤细胞能产生组织因子的发现所支持，这些组织因子增强对肿瘤坏死因子的促凝血应答[322]，但这种信号的精确性质仍难以捉摸。被转染而产生肿瘤坏死因子的肿瘤细胞在体外也对肿瘤坏死因子完全抵抗，但在体内，即使没有T细胞免疫，它们也被所产生的肿瘤坏死因子抑制。有趣的是，这种肿瘤坏死因子介导的生长抑制机制不包括出血性坏死[316]。

一些肿瘤细胞组成性产生某种细胞因子，而其他肿瘤细胞则可被多种因子刺激而产生细胞因子，如其他细胞因子、细菌产物（如脂多糖）、辐射或药物。因此，治疗可定位于激发肿瘤自身的抑制性细胞因子的释放[323]。这种方法在体内可能是有利的，因为用治疗性基因靶向每个细胞似乎是不切实际的，也因为重组细胞因子的全身应用可能引起较大的全身毒性和（或）肿瘤生长部位的局部细胞因子浓度不足。也许位于肿瘤中的、细胞因子基因转染的T细胞能导致某种细胞因子的局部高浓度，但没有支持该提示的实验模型存在。

限制有效肿瘤免疫的因素

正如从肿瘤的多样性可预料到的，肿瘤细胞能通过多种机制逃避肿瘤特异性免疫应答或不激发肿瘤特异性免疫应答（表37.5）。与正常细胞相比，癌细胞在遗传和表型上都较不稳定，并能迅速改变以逃避免疫破坏。下面是肿瘤逃避或宿主抵抗失败方面的一些例子。

表37.5 肿瘤逃避免疫破坏的机制

肿瘤相关的
1. 肿瘤不能提供适当的靶抗原（有缺陷的免疫敏感性）
抗原表位的缺乏
MHC Ⅰ类分子的缺乏
肿瘤细胞有缺陷的抗原加工
抗原调变
肿瘤的抗原屏蔽
肿瘤细胞对破瘤效应途径的抵抗
2. 肿瘤不能诱导有效的免疫应答（有缺陷的免疫原性）
(a)抗原表位的缺乏（见上）
(b)肿瘤降低的MHC或抗原表达（见上）
(c)共刺激信号的缺乏
(d)肿瘤产生抑制性物质（如细胞因子）
(e)抗原脱落和耐受诱导
(f)癌细胞Fas配体表达所引起的T细胞凋亡的诱导
(g)肿瘤负荷所致的T细胞信号传导缺陷的诱导
3. 旁分泌刺激回路的建立
宿主相关的
1. 宿主不能对抗原性肿瘤应答
包括由于致癌剂（物理的，化学的）、感染或年老所造成的T细胞凋亡和信号传导缺陷在内的宿主免疫抑制或免疫缺陷
宿主抗原呈递细胞对肿瘤抗原的不足呈递
宿主效应细胞不能到达肿瘤（如基质屏障）
2. 由于所起源肿瘤细胞上的免疫优势抗原，宿主不能杀死变异肿瘤细胞

主要组织相容性复合物单体型

肿瘤细胞可表达肿瘤特异性突变蛋白,但是,如果它们缺乏可被 MHC 分子呈递的突变多肽或缺乏识别肽 MHC 复合物的 TCR,这些突变蛋白可能不能充当抗原。例如,由于 MHC 遗传背景的关系,只有一些小鼠品系把某种特定的突变 ras 蛋白作为抗原而加以识别,而其他的则不能[70]。MHC 基因也可调节针对癌细胞上抗原的或针对致癌病毒的免疫应答;自发现 MHC 深深影响小鼠对白血病的敏感性以来[324](综述,见参考文献[325]),研究者们已寻找了人和小鼠的 MHC 类型与癌症敏感性间的可能联系。但到目前为止,HLA 单体型和任何主要的人类癌症发生率间还没有稳定的联系被建立。

耐受和忽视

即使癌细胞表达具有潜在抗原性的分子,但由于耐受或克隆忽视,宿主可能对肿瘤不应答。自身耐受可解释为什么与通常在独特肿瘤抗原免疫的动物体内所发现的保护相比,表达于一些正常成熟细胞上的癌胎抗原和癌胚抗原或癌精抗原诱导较弱的保护[29,34,35,143]。可能只有那些与这些抗原低亲和力反应的 T 细胞能逃避清除和耐受[326]。可能荷瘤宿主体内的 T 细胞不是简单地"忽视"肿瘤抗原,因为即使没有另外的免疫,肿瘤的完全切除也常常导致对肿瘤再次接种的特异性免疫。因此,这些 T 细胞虽已被暴露给抗原,但却是全身或仅仅局部无反应性的,而用 T 细胞上的调节分子 CTLA-4 或活化分子 4-1BB 的单克隆抗体对荷瘤小鼠进行的被动治疗可克服这一难题[327,328]。是否在一些情况下宿主也可完全忽视肿瘤上抗原的存在还不清楚。尽管突变多肽可被用来激发有更高亲和力的 T 细胞,但在肿瘤生长部位,与来自原发肿瘤的多肽的低亲和力反应的关键问题可能继续存在。

1257

肿瘤基质与其他局部因素

实验已显示,基质对阻止或允许肿瘤细胞的免疫破坏是关键的[203],也可能肿瘤基质在快速形成的实体瘤对全身免疫的抵抗中是一种重要的因素,即使在肿瘤生长的相对早期阶段[330]。局部因素可解释为什么荷瘤小鼠不能排斥它们的原发性肿瘤,即使动物可抵抗转移来的小量肿瘤细胞的植入(一种被称为伴随免疫的现象)[331]。肿瘤周围特有的局部因素也可解释为什么有恶性移植物的小鼠不能排斥肿瘤,但却能排斥通过基因转移表达同种排斥抗原的非恶性移植物[332]。这种现象似乎还发生于肿瘤和非恶性移植物都被单一类型 TCR 识别的 TCR 转基因小鼠[333]。因此,这些不能排斥肿瘤的荷瘤小鼠体内的 T 细胞既不是克隆衰竭的也不是全身性无反应性的[333]。正常和恶性移植物应答中的差异也不能为肿瘤上较弱的排斥抗原的表达所解释,因为肿瘤移植物和正常移植物表达同种抗原。这种差异可能是由于肿瘤基质是非抗原性的,并作为物理屏障妨碍癌细胞的排斥[203];由于基质存在于非恶性同种异体移植物中,抗原性基质的存在可辅助 T 细胞,也对肿瘤细胞造成破坏[203]。例如,T 细胞介导的同种异体基质的破坏不仅可破坏肿瘤的血管支撑物,并通过破坏物理屏障允许 T 细胞到达癌细胞所在地,而且可对肿瘤排斥所需的 T 细胞和其他白细胞产生局部辅助。肿瘤生长部位"辅助"的缺乏可能是实体瘤不能被排斥的一个重要原因。这种情况可能与转基因小鼠有些相似,这些转基因小鼠的胰岛细胞表达作为自身抗原的异种 MHC Ⅰ类分子并且也有浸润胰岛的自身反应性 T 细胞[334]:甚至在激发后,这些自身反应性细胞都不能破坏胰岛细胞,除非局部辅助以白细胞介素-2 的形式被提供[334]。抗原特异性 T 细胞甚至能浸润生长于免疫特定部位中的肿瘤,但浸润 T 细胞的适当分化被阻止。事实上,似乎正在生长的肿瘤自身能形成一个免疫特定部位[335~337]。恶性细胞上共刺激分子的缺乏或 Fas 配体的表达可导致外周无反应性[338~340]。宿主抗原呈递细胞(APC)对肿瘤细胞脱落抗原的间接呈递可起重要作用[341,342]。但在某些情况下,直接呈递可能比间接呈递能更有效地诱导应答[343]。此外,表达几种细胞因子或共刺激分子(如 B7)中的一种的转染肿瘤细胞可使肿瘤细胞成为免疫应答的更有效诱导者(综述,见参考文献[118])。但任何被诱导的应答的有效性都被野生型(即未被转染的)肿瘤细胞限制,由于上述原因,肿瘤细胞周围的环境可能依然阻碍肿瘤破坏[333]。所以,为了达到有效的肿瘤破坏,关键的未解决的问

题可能是在肿瘤生长部位提供局部辅助和共刺激[328,333]。最后，正如先前所提到的，基质可提供某些肿瘤形成的基本因素[211]，基质是旁路刺激同路引起快速恶性生长从而阻碍免疫排斥的部位[209]。

主要组织相容性复合物Ⅰ类抗原表达的改变

在一些癌中，MHCⅠ类表达的改变是由于MHCⅠ类分子的完全或选择性丢失或下调。在其他癌中，这种改变可能是由于β2微球蛋白编码基因的突变[344]。这些逃避宿主免疫的机制可特别发生于那些肿瘤特异性抗原不能被丢失的癌细胞（如，表达人乳头状瘤病毒的E6和E7的癌细胞），因为这些癌细胞的肿瘤特异性抗原表达是维持恶性表型所必需的。MHCⅠ类抗原表达的改变在转移的癌细胞中特别常见[345,346]。所以，用转移的人黑色素瘤[347]和转移的人乳腺癌[346,348]或结肠癌[349~352]的组织块对MHCⅠ类表达的研究已普遍检测到了HLA表达的改变；在这些研究中发现，单个HLAⅠ类等位基因的丢失比所有Ⅰ类等位基因的丢失更普遍（综述，见参考文献[353]）。癌基因，如*myc*，可造成MHCⅠ类抗原表达的基因座特异性抑制[354]，迄今为止，临床研究结果还不支持MHCⅠ类表达下调是逃避T细胞攻击的结果并导致更差的临床预后的观点[349]。虽然如此，肿瘤细胞有缺陷的抗原呈递将阻止效应T细胞的有效的直接免疫攻击[355]。更糟的是，由于在肿瘤细胞表面上缺乏呈递抗原的MHC等位基因，不再充当细胞破坏的靶抗原的抗原可阻止对癌细胞的有效免疫应答。这是由于这种抗原仍可被宿主抗原呈递细胞间接呈递，并诱导免疫优势应答，此优势应答排斥对癌细胞上可能靶抗原的应答（见下文）[341]。

抗原丢失或表位丢失变异体的选择

在癌症从原发靶细胞开始的缓慢、逐步发展过程中，宿主选择应该明显有利于无免疫原性的、不可排斥的肿瘤细胞变异体的出现。虽然通过临床研究证实这种机制不是不可能的，但却是困难的，因为原发的单个癌细胞的抗原性无法被知道，而且没有公认抗原的探针。尽管如此，与恶性肿瘤后期患者体内的免疫选择相一致的连续改变的可能例子已被报道[356]。

肿瘤免疫原性的丢失可以是系列移植的结果[357,358]，可遗传的肿瘤变异体显示出增强的恶性生长，它们可从移植了免疫原性肿瘤的小鼠分离。这些变异体中的一些通过丢失CTL识别的靶抗原逃避免疫破坏[39,44,191]。这种变异体的发现与抗原丢失变异体的选择也可在肿瘤进展过程中自然发生的观点相一致。然而，靶分子抗原性的丢失而非其表达的丢失有时可能是逃避机制。溶细胞性T细胞通常只识别一些不连续的表位，甚至是某种大蛋白抗原上的不连续表位。导致这些表位多肽序列中氨基酸替换的点突变可导致抗原性的丢失。这种机制的一个例子被猴病毒40 T基因转化的、在体外已逃避了CTL介导破坏的癌细胞所证实[359]。对这种变异体的分析显示了代表T抗原CTL识别表位的氨基酸序列中的点突变。该机制不仅允许癌细胞逃避T细胞破坏也允许癌细胞继续表达维持恶性转化所必需的基因。目前，这种逃避机制是否正被其他病毒相关癌使用还不确定。例如，人乳头状瘤病毒转化基因E6和E7内的突变改变在颈部癌细胞中还未被观察到，而HLAⅠ类表达的整个基因丢失或等位基因丢失在这种癌中被普遍观察到[353]。

正如前文所提到的，实验肿瘤和人类肿瘤有多个肿瘤特异性CTL识别表位，通过体外用T细胞所做的选择，这些表位被独立丢失[37,41,44]。然而，宿主不能同时识别一种肿瘤细胞上的所有抗原[360,361]；第二抗原的识别只发生在第一抗原被大多数肿瘤细胞丢失后[360,361]。这提示，肿瘤细胞的免疫优势抗原可阻止对其他肿瘤抗原的致敏并以这种方式阻止对变异体的免疫攻击，从而导致抗原从肿瘤细胞上连续丢失。在对表达于单个细胞上的多个次要组织相容性抗原的免疫应答的研究中，对多个独立抗原的免疫应答的层次性已被描述[362]。这种层次性机制在任何一个系统中都不清楚，对如何打破这种层次性的理解可帮助我们阻止免疫选择和肿瘤逃避。例如，使用CTL克隆的体外研究提示，导致单个抗原从肿瘤细胞丢失的突变率小于10^{-6}。即使突变率高达10^{-4}，在10^{16}个肿瘤细胞中（即在一个比人体大的肿瘤中）也只有一个肿瘤细胞丢失4种独立的抗原。所以，如果宿主免疫应答可被操纵以至于所有4种抗原都被同时攻击，那么肿瘤逃避将不会发生。实验证据提示，体外用被选择的、表达选择性抗原成分的肿瘤细胞变异体免疫能克服免疫优势，防止肿

1258

瘤逃避[363]。

部分免疫抑制可导致抗原丢失变异体的快速选择和过度生长[364]。已发现,免疫活性完全的小鼠经常排斥有高度免疫原性的消退肿瘤,其中只有极少数例外,而缺乏 T 细胞免疫的小鼠(如,裸鼠或 X 射线照射后的胸腺切除小鼠)不选择抗原丢失变异体。相反,肿瘤在紫外线照射后小鼠体内以非常高的频率生长,但所有肿瘤都被发现是由已丢失了 CTL 识别的排斥抗原的、遗传稳定的变异体组成。这显然是由于紫外线照射后小鼠表现部分免疫活性,以至于溶细胞性 T 细胞的产生被延迟[360,365],直到肿瘤已发展到含有足够数目的抗原丢失变异体,因而能逃避免疫应答。(用抗生素药物对细菌感染的不完全治疗也有利于对这些药物表现出可遗传的抵抗力的变异细菌株的过度生长,因此,依此类推,对荷瘤个体的部分或不完全免疫治疗可导致抗原丢失变异体的选择。)

抗原调变

抗原调变现象代表抗原从细胞表面的一种可逆的、抗体诱导的补体非依赖性丢失。该现象是用表达 TL 抗原的白血病细胞首先被证实的[252,253,366]。用 TL⁺ 白血病细胞免疫后,表达极低水平 TL 抗原的小鼠[81](TL 小鼠)产生高滴度的、体外溶破 TL⁺ 白血病细胞的抗 TL 抗体;但白血病细胞在免疫后小鼠和未免疫小鼠体体内都同样生长良好。由于抗体造成 TL 抗原桥接、加帽及从细胞表面消失,对 TL 抗体和补体的敏感性的丢失便发生了。表面免疫球蛋白是另一种暴露给特异性抗体时可调变的细胞表面蛋白[367];但其他一些细胞表面抗原则不调变,与其他表面分子相比,为什么某些表面分子对免疫调变更敏感尚不得而知。

1259

免疫学增强作用和封闭因子

在移植免疫学早期发现,预先用某些同种异体肿瘤的裂解细胞免疫后的小鼠不能排斥有活力的肿瘤的接种,而正常小鼠在最初的短暂生长后却排斥同种肿瘤[368,369]。注射免疫血清到未被免疫的宿主体内有时也增强肿瘤同种异体移植,在接种时注射免疫血清或直到肿瘤移植前或移植后一周注射免疫血清,这种增强作用是有效的。此外,同种免疫抗血清被发现可保护靶细胞免受同种致敏后淋巴细胞的体外溶破[370],这提示了体内增强的可能机制。尽管这种增强现象已在同种异体肿瘤系统中被明确证实,但对于抗同系基因肿瘤的免疫应答,其相关性仍不确定[371,372]。抗体、肿瘤抗原与抗体的复合物[372]及脱落抗原[373]都参与该阻断现象。肿瘤抗原与抗体的复合物能诱导抑制性 T 细胞[374],抑制性 T 细胞可在封闭因子得以发挥功能的机制中起一定的作用。

免疫抑制或免疫缺陷

在前面有关肿瘤形成的免疫监视部分,免疫抑制和免疫缺陷,包括原发的(遗传的)或继发的(药物诱导的)或获得性免疫缺陷综合征,增加病毒相关癌的发生率已被讨论过。

致癌剂

许多用于实验动物的化学和物理致癌剂是都免疫抑制性的[234~238];例如,紫外线照射引起的免疫抑制可在某种程度上造成有高度免疫原性的肿瘤的过度生长[236,375]。紫外线照射损伤 DNA,导致抗原呈递细胞功能损伤[376]。可能是由于这种功能紊乱,抑制细胞在小鼠体内被诱导,其作用可通过过继转移试验被证实[375,377]。因而发现,致死性 X 射线照射后小鼠,经正常小鼠脾和淋巴结细胞静脉内注射重建免疫系统后,能排斥紫外线诱导的消退肿瘤;但来自紫外线照射后小鼠和正常小鼠的淋巴样细胞混合物的转移却阻止受体对消退肿瘤的排斥。此外,紫外线照射后小鼠脾细胞的过继转移也似乎缩短原发的、紫外线诱导的肿瘤在受体体内形成的潜伏期[378]。紫外线诱导的抑制细胞不是某个肿瘤特异性的,却反而抑制对所有紫外线所诱导的同系基因肿瘤的免疫应答;但是,这种抑制细胞却不影响重建小鼠排斥同种异体肿瘤的能力。

γ辐射或某些化学治疗药物在小鼠和人体是致癌的和免疫抑制的。但却不清楚化学或物理致癌剂诱导的免疫抑制对人体内的肿瘤逃避是否重要。在大多数情况下，人类可能被暴露给比通常施与实验小鼠的剂量低得多的这些致癌剂，可引起更少的免疫抑制。但致癌剂的免疫抑制作用在物种间可能不同。这使解释变得困难，因为暴露给这些致癌剂后，癌可能由于致癌剂作用[379]、抗转化细胞的免疫应答的抑制或这两种类型的作用而形成。

致瘤病毒代表致癌剂免疫抑制成分如何能通过阻止有效的宿主免疫而辅助肿瘤诱导的另一个有趣的例子。例如，腺病毒(Ad)Ad12 株的 *E1A* 基因抑制 MHC Ⅰ类表达，可允许其逃避 CTL 介导的破坏，导致肿瘤的形成[380]。但降低了的 MHC Ⅰ类抗原水平可能不足以解释 Ad12 株 *E1A* 基因较高的致瘤性。例如，在检测用这些病毒转化的小鼠和仓鼠细胞时，MHC Ⅰ类表达水平与 Ad2 和 Ad5 在免疫活性同系基因成年动物体内的致瘤性不同间无相关性被发现[381]。另一种在小鼠 RNA 肿瘤病毒内被编码的病毒蛋白 P15E 已被广泛研究，以探询其免疫抑制特性，并在人恶性细胞中发现一种与 P15E 有关的免疫抑制抗原[382]。

肿瘤负荷

在大量的、不同的实验肿瘤模型和人体中，荷瘤宿主往往已经抑制了免疫功能已被很好地证明。有时肿瘤细胞本身似乎释放免疫抑制物质，如前列腺素、β转化生长因子、P15E；并可能释放其他一些未被鉴定的物质，这些物质可直接或间接抑制免疫系统。在其他情况下，肿瘤可侵入淋巴样组织，从而干扰免疫应答。对于不同的癌及在癌症的不同阶段，肿瘤所诱导抑制的机制、大小和特异性可能大大不同[383]。肿瘤负荷造成的免疫抑制程度可以是意义深远的：例如，那些有紫外线或 MCA 所诱导的进展肿瘤的小鼠将不能排斥通常被正常小鼠排斥的大部分免疫原性清退肿瘤[384]。这些小鼠产生抗传统抗原的免疫应答的能力或排斥同种异体肿瘤或正常皮肤移植物的能力保持完整。所以，与紫外线所诱导的免疫抑制相似，对许多独立起源的肿瘤的免疫应答被影响，但这些动物体内的其他应答不被影响。

荷瘤小鼠和癌症患者在全身和(或)肿瘤相关 T 细胞的信号转导装置中可以有所改变，通过 TCRζ 链和 p56 lck 的丢失[385~390]，连续的肿瘤生长后，这种改变始于 p65 跟随的 NF-κB 的降低，而活化巨噬细胞可分泌

1260

诱导这些结构异常的物质[391]。尽管抑制的维持需要癌症的持续存在，但肿瘤不完全切除后留下的残余肿瘤组织就足以维持抑制。然而，肿瘤完全切除后，抑制却是短暂的且常常在没有进一步免疫的情况下给特异性免疫让路[392]。在一些动物模型中，抑制的诱导和维持需要 T 细胞，这已被过继转移实验有说服力地显示[384,393,394]。在其他肿瘤模型中[395]，抑制细胞有 B 细胞或巨噬细胞的表型[396]。正如从肿瘤的异质性中可能被预期的，在这种抑制的特异性中似乎也有很大程度的变异性。在一些肿瘤模型中，免疫抑制对于诱导抑制的肿瘤似乎是选择性的[394]，但在其他例子中，对其他各种各样的肿瘤的应答被抑制[395]。甚至对常规抗原的应答也可被抑制，特别是在肿瘤起源于免疫系统或侵入免疫系统的情况下；例如，在霍奇金病患者中，免疫抑制常常导致降低了的对各种抗原的迟发性超敏反应和增加了的对各类感染的易感性。在某些肿瘤模型中，肿瘤负荷造成的免疫抑制也可阻止有效的免疫 T 细胞过继免疫治疗[397]。所以，电离辐射、环磷酰胺或其他制剂已在过继免疫治疗前被用于预处理动物[397]。

辐射或化学治疗制剂

用抗癌制剂对患者进行治疗，如化疗效射模拟药物或电离辐射，可以是极具免疫抑制性的。淋巴细胞对许多化疗药物和电离辐射造成的破坏高度敏感，所以这些相同的制剂(如环磷酰胺)也被用于抑制免疫应答以进行器官移植。正如所预期的，由这些制剂造成的免疫抑制常常导致增加了的感染敏感性。此外，许多抗癌制剂，如环磷酰胺，是引起突变的和致癌的[379]。所以，作为成功的化疗或放疗的晚期并发症，继发性恶性肿瘤的诱导可发生于原发癌症成功治疗后[379]。大部分继发性恶性肿瘤起源于造血系统、淋巴细胞增殖系统和网状内皮系统，这些系统是免疫抑制性抗癌制剂最敏感的直接靶组织；相似类型的恶性肿瘤一般在用免疫抑制药物治疗的器官移植患者体内被发现。这些继发性恶性肿瘤的形成与允许病毒相关癌形成的、抗癌制

剂对淋巴网状系统的直接致癌作用或免疫抑制有关。

年龄

随着年龄的增长，一些免疫应答逐渐降低[398]，然而随着年龄的增长，恶性肿瘤的发生率却显著增加。因此，老年个体中癌症发病率增加可能起因于无效的免疫监视。但是，癌发生需要多个步骤，且肿瘤潜伏期的长短通常与致癌剂的剂量呈反比。许多癌可发生在晚年，仅仅因为它们是由与长潜伏期有关的、极低剂量的致癌剂所诱导的，或者因为对致癌剂的暴露是多年积累的。在实验上，随着年龄的增长，对移植癌的免疫应答降低。例如，被年轻同系基因小鼠排斥的、紫外线诱导的鼠消退肿瘤可在未处理的老年鼠体内进行性生长[241,242]。老年个体体内有缺陷的免疫应答可阻止免疫选择，并允许在老年个体体内形成的肿瘤保留那些可充当治疗的靶抗原的肿瘤抗原。但老年个体内有效癌症免疫治疗的形成可能也需要拯救年龄依赖性免疫缺陷[243]。

总之，癌的诱导、生长和治疗通常与免疫抑制和免疫缺陷有关。但是，免疫抑制不引起常见类型癌的增加。相反，较少见的淋巴网状恶性肿瘤和病毒相关恶性肿瘤及皮肤癌却显著增加。此外，在设计癌症主动或被动免疫治疗方案时，癌症患者免疫抑制和免疫缺陷的一般发生率值得大量考虑。

免疫预防

与免疫监视可阻止或降低与某些病毒有关的癌症的发生有令人信服的证据一样，抗病毒衣壳蛋白的主动免疫可阻止感染。例如，含外壳蛋白的、无 DNA 的病毒样颗粒可被使用[399]。为了降低子宫颈肿瘤和肝细胞肿瘤的发生率，这种方法正被用于人乳头状瘤病毒相关疾病和乙型肝炎病毒。其他癌症提供了另外的机会，如与 KSHV 有关的卡波西肉瘤和与 HTLV-1 有关的人 T 细胞白血病。如果病毒转化蛋白被恶变前和恶性细胞表达，那么曾经被感染的个体仍能通过抗病毒转化蛋白的免疫阻止恶变前和恶性细胞的形成。例如，在出生时接受单次多瘤病毒或猴病毒 40 接种的仓鼠几个月后形成了高发生率的原发性肿瘤[400]；但是，如果猴病毒 40 或由该病毒转化的照射后肿瘤细胞在潜伏期期间被第二次给予，那么肿瘤发生率被降低。出生就被接种的仓鼠显然不是耐受的，因为后来暴露给同种抗原时它们产生了保护性应答。用病毒单次接种，肿瘤克隆显然被免疫系统忽视而逃避。在病毒接种和肿瘤形成之间的潜伏期期间，用足够剂量的抗原再次免疫可防止这一问题，降低肿瘤发生率。在人乳头状瘤病毒感染的人体内，在原位癌或浸润性癌发生前的疾病（发育不良）早期阶段，通过诱导抗病毒所诱导癌变前结节表达的、人乳头状瘤病毒转化蛋白 E6 和 E7 上的、T 细胞识别表位的免疫，子宫颈癌可被阻止（综述，见参考文献 164）。重要的是，确定癌症是否也可通过有倾向性突变的、有癌形成倾向的个体的主动免疫而被预防。在这些个体的细胞内，编码肿瘤特异性抗原的、数目不断增加的这种突变正在被鉴定。但由于这些抗原是自身的，所以诱导抗这些抗原的免疫应答可能是有问题的。例如，致瘤蛋白在癌变前的宿主组织内被表达后开始免疫时，在有癌形成倾向的小鼠体内，抗转基因所编码致瘤病毒蛋白的主动免疫在防止癌症的形成中变得无效，这提示了外周耐受的诱导[401]。

1261

免疫治疗

为了控制癌症，涉及先天免疫或获得性免疫的多种免疫治疗策略已被发展。这些策略包括：活细菌疫菌，如卡介苗的局部应用、细胞因子的使用、主动免疫、使用抗体的被动治疗和效应细胞的过继转移。非常少的免疫治疗方法是明显有效的或是最佳治疗方法[102]。例子之一是卡介苗的局部使用，以治疗患有手术后典型复发的、残余表浅性膀胱癌患者[402]。手术后经导尿管反复滴注活分枝杆菌入膀胱已成为治疗表浅性膀胱癌的首选治疗方法。局部卡介菌感染在膀胱壁内引起延长的炎症应答，显著降低癌复发的危险[402]。有趣的是，采用肿瘤内注射细菌的第一次非特异性免疫治疗尝试是在 100 多年前[403~405]。非特异性免疫治疗的另一种方法使用了细胞因子的局部或全身应用。例如，白细胞介素-12 在动物实验中已显示出有前途的抗肿瘤

效应[406];该细胞因子的一些效应似乎有赖于T细胞的同时存在。细胞因子在细胞间的近距离产生生理效果,这可解释采用全身细胞因子应用所普遍观察到的毒性。

利用获得性免疫的免疫治疗(即肿瘤抗原或特异性识别这些抗原的效应细胞和分子)大体上可被分为主动治疗性免疫、T细胞过继转移和使用抗体的被动治疗。通过尝试主动治疗性接种,肿瘤免疫学家已采用了一种在传染性疾病(除具有特别长潜伏期的狂犬病外)的临床处理中已被完全抛弃了的方法,知道这一点是重要的。与大部分有传染性的微生物相比,癌细胞有较慢的细胞增代时间,且大部分的大块肿瘤负荷常常可通过其他治疗方法被去除(如外科手术)。在抗原负荷最小时,抑制性环境可被去除,且主动免疫可引起有效的治疗性免疫应答。所以,关键的问题是残留的或静止的癌是否可通过主动免疫被有效治疗。

在考虑癌症的免疫治疗时,癌细胞的免疫原性和免疫敏感性之间的差别是重要的。某些癌细胞可能对肿瘤特异性T细胞或抗体完全敏感,但由于种种原因不能诱导免疫应答。实验研究提示,如果特异性效应T细胞或抗体可被诱导,那么这些癌仍有可能被排斥。这需要抗肿瘤细胞上相应靶抗原的有效免疫。肿瘤细胞上靶抗原弱免疫原性的原因可能多种多样;所以,对于不同的癌,必须使用不同的方法,以有效产生抗癌免疫力[407]。而且,T细胞或抗体可能是治疗上最有效的;所以,不同的免疫方法可能必须被使用,以择优诱导其中的一种或另一种。用活肿瘤细胞免疫有可能产生癌并杀死宿主,但死的和破坏的肿瘤细胞、膜片段或细胞提取物通常是弱免疫原,可能促进癌的生长。巧妙解决这一问题的一种方法是破坏肿瘤细胞的增生潜能而同时保留细胞活性和代谢活性,至少是暂时保留细胞活性和代谢活性。例如,这一点可通过暴露细胞给γ射线或某些抑制细胞增殖的化学药品被完成,如丝裂霉素C。单独用这些方法常常不足以引起抗癌细胞的溶细胞性T细胞应答。许多策略已被设计来提高肿瘤细胞接种物的免疫原性(图37.7)。一种方法是通过:①用某些病毒感染的肿瘤细胞异质化[408~410]、体细胞与各种非肿瘤发生细胞融合[411~413]、自身或异源MHC Ⅰ

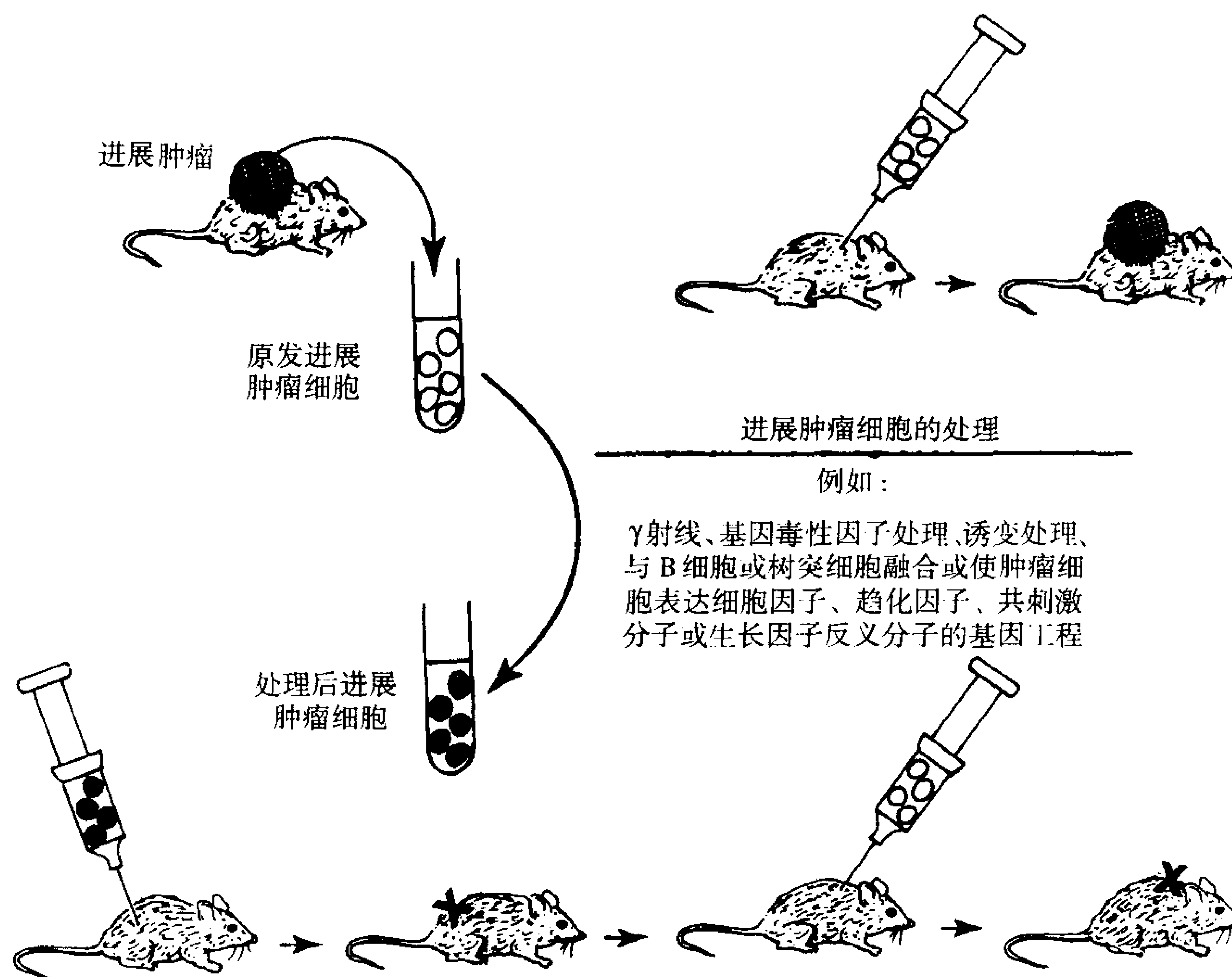


图37.7 多种不同的方法可被用来提高自发的或实验所诱导的肿瘤细胞的免疫原性。弱免疫原性肿瘤细胞被移植时将杀死正常同系基因宿主(进展肿瘤)。列于正文和图例中的各种处理都产生有代谢活性的肿瘤细胞。当被注射进正常同系基因小鼠时,它们不能形成肿瘤[即移植物被排斥(X)]。此外,这些小鼠常常被保护而抵抗随后的未被修饰过的肿瘤细胞的接种。因此,处理后肿瘤细胞可作为预防性疫苗。但是,这些处理后细胞用于治疗性接种(此处未显示)好像几乎总是被局限于肿瘤生长的极早期阶段,通常是肿瘤生长的几天至2周内,对于建立较长的肿瘤(当它们在患者体内被临床检测到时,与人类肿瘤更有可比性),使用这些方法的主动治疗性接种的有效性通常被显著降低。

类或Ⅱ类分子的转染[118,414,415]、半抗原偶联[416,417]或暴露给诱变剂[418]；②肿瘤细胞转染以表达可提供共刺激信号给T细胞的B7配体[415,419,420]；③肿瘤细胞与被杀死的细菌一起注射，如小棒状杆菌[421,422]；④肿瘤细胞转染以产生某些细胞因子[423,424]，如白细胞介素-2、γ干扰素、白细胞介素-4、白细胞介素-6、白细胞介素-7、粒细胞集落刺激因子、粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)或肿瘤坏死因子，来提高肿瘤细胞的抗原性。目前，粒-巨噬细胞集落刺激因子似乎是特别吸引人的，因为这种细胞因子导致强效树突细胞的募集和活化。最后，肿瘤细胞已被转染来表达一种必需的生长因子的反义RNA[425]。这种转染导致癌细胞的终末分化和未知原因的、增加了的免疫原性。事实上，不管肿瘤细胞的哪种特定的基因工程被用来降低其体内生长潜能，修饰后肿瘤细胞的排斥通常被抗未修饰肿瘤细胞的T细胞介导的免疫跟随。可能是改变后但有代谢活性的癌细胞的生长停止和最终排斥导致允许T细胞免疫形成的抗原的延长暴露。

纯抗原常常不能有效诱导获得性免疫(即抗原特异性免疫应答)，除非某些"佐剂"被用来刺激有助于抗原特异性应答产生的先天免疫。所以，许多方法被设计来通过化学和(或)细菌制剂的使用在接种部位刺激先天免疫。疫苗中使用的合成肽必须被设计以适合特定的MHC单体型，而且它们可能是无效的或者甚至使宿主"耐受"[426]；加载到热激蛋白(或作为重组病毒样颗粒)后，传递的抗原肽能提高免疫效能。免疫应答的有效诱导需要抗原呈递，而且要在能提供适当辅助信号或第二信号的环境中。因此，一些实验设计使用了用病毒特异性或肿瘤相关肽处理的树突细胞来诱导肿瘤反应性T细胞和移植肿瘤细胞的排斥。树突细胞可用合成的抗原肽或重组蛋白加载。树突细胞也能用从肿瘤细胞表面脱下的天然肽；肿瘤细胞起源的、加载了肽的热休克蛋白和来自肿瘤的mRNA；或通过肿瘤细胞的融合(综述，见参考文献[427])加载。后3种策略的一个优点是抗(独特的)各不相同的肿瘤抗原及肿瘤相关抗原的强效免疫可被诱导，而不必鉴定抗原。这些使用分子未被鉴定的抗原的专用化方法的局限是抗原剂量不能被标化。

1262

对于分子已被鉴定的肿瘤抗原，使用牛痘、李斯特氏杆菌或病毒样颗粒，重组疫苗已被发展。主动免疫的其他策略包括基因接种[428]，例如，注射在肌肉内编码肿瘤抗原(由此粒-巨噬细胞集落刺激因子基因也可被用来提高注射位点树突细胞对抗原的呈递[429])的裸DNA质粒接种，或用带有肿瘤抗原内影像的抗独特型抗体接种[430]。希望这些主动免疫新方法中的一些将有效抗肿瘤，特别是在有临床上不能检测到的(残留的或静止的)癌或癌前病变的患者体内。是否这些方法中的任何一种都将有效治疗建立较久的癌或癌的进展阶段是颇具争议的，因为实验肿瘤移植模型中的主动免疫治疗作用通常限于恶性生长的早期阶段。

除主动免疫外，另一种主要方法是被动抗体治疗或肿瘤特异性T细胞的过继转移。在某些实验肿瘤模型中，用抗体被动免疫能保护个体抵抗肿瘤细胞的接种，且在癌细胞接种后被很快给予时可以是治疗性的[106]。因此，抗体通常被同时给予或仅仅在肿瘤细胞接种后几小时或几天被给予。用抗人结肠癌上肿瘤相关抗原的鼠单克隆抗体被动免疫患者已被发现可降低转移扩散的发生率；而当治疗在外科手术后即刻开始时，没有临床上可检测的转移扩散或残留疾病的患者的长期存活率可增加[104,105]。实验性B细胞白血病的抗独特型抗体治疗似乎在诱导癌细胞进入长期静止状态中是有效的[431]，且抗独特型抗体正被用于B细胞淋巴瘤患者的治疗[151](也见"克隆抗原"部分)。一些治疗性效果也已在用其他的鼠单克隆抗体治疗的患者体内被观察到[151,432,433]。但是，单克隆抗体在治疗已充分建立的人类进展性癌症中的治疗效果不确定。所以，确定抗体治疗能成功的条件及确定大量的可能的机制中哪些机制负责肿瘤逃避抗体的治疗作用将是重要的。由于抗体诱导的肿瘤缩小可发生在治疗后几周[432,433]，所以抗体所介导肿瘤细胞的直接溶破有时可能不是抗肿瘤作用的机制。其他方法使用了抗癌细胞上生长因子受体的抗体来抑制癌生长。例如，癌基因*neu-1/HER2*编码一种在某些癌上被过度表达的生长因子受体，而此抗原的单克隆抗体已被发现可抑制肿瘤生长[434,435]，对肿瘤生长的抑制可能是通过诱导分化[436]。同样，白细胞介素-2受体抗体能在皮肤T细胞淋巴瘤患者体内使肿瘤缩小[437]。通过用抗体作为细胞因子或细胞毒制剂的载体，如放射性化学物质或天然毒素，相当多的技术性努力正在进行，以增强抗体杀伤肿瘤细胞的能力[438,439]。尽管重组抗体-细胞因子或抗体-毒素融合蛋白对集中这些因子于肿瘤细胞周围的基质中可能有用，但是，如果结合物到肿瘤的选择性传递不被完成，那么这些融合抗体中的一些则可能有严重的毒性。另一种可能有好效果的方法是既结合效应细

1623

胞也结合癌细胞上肿瘤抗原的双特异性单克隆抗体的基因工程。鼠单克隆抗体也已被“人源化”,以降低患者产生的中和性抗鼠抗体的刺激。在必要的临床试验已在患者体内被完成前,这些不同的基因工程抗体分子的临床效用将仍然不为人知。正在被发展的另一种免疫治疗方法利用表达于T细胞上的调节性分子和活化分子的特异性单克隆抗体[327,328]来提高它们的抗瘤活性。

使用目前可用的、在动物实验中被测试过的大多数免疫治疗程序,治疗效能发生于肿瘤移植后的相对早期阶段,而测试小鼠体内治疗效能的实验研究不充足,这些小鼠有长期建立的癌的小量肿瘤负荷,而这些癌在外科手术或化学治疗后则是静止的和(或)残留的。对更长期建立的肿瘤负荷,T细胞的过继转移可能更有效。但未确定哪些抗原是人类癌上最有效的靶分子、特异性T细胞应该用哪种方法在体外产生以便过继转移时它们在体内是有效的。已从患者体内分离的T细胞可用白细胞介素-2体外扩增,然后被灌输入也接受了白细胞介素-2的患者体内。在一组被选择的黑色素瘤患者中,有利的应答在几个患者体内被观察到,且在一个患者中明显的治愈被看见[440]。T细胞不足的特异性或这些细胞特异性局部定位的失败是否是很难达到持久治疗作用的原因还不清楚。尽管早期的证据提示,T细胞的过继转移可有效抵抗在免疫减弱的病人体内形成的EB病毒相关淋巴瘤[163],但在此方法可应用于其他肿瘤前,仍有多得多的工作要做。

结论

癌症免疫学介于两个格外复杂的研究领域之间。癌通常有(且产生于)多种癌特异性突变,尽管许多突变还未被确定,但却可被T细胞检测到。功能上重要的癌特异性突变是各个不同的(独特的)肿瘤抗原的基础,现已明确,真正肿瘤特异性的抗原确实存在。也有肿瘤非特异性的、非突变的抗原,宿主也能对它们应答。这些正常自身抗原中的一些在肿瘤起源谱系的正常细胞上没被发现;相反,这些抗原在正常细胞上的表达似乎被高度局限于精原细胞和滋养层细胞。所以,这些抗原可能有特殊的诊断和治疗潜能。但不明确的是,对正常自身抗原的免疫是否能非常有效地抵抗那些没有引起有害自身免疫的癌。

获得性免疫介导的监视保护我们免受许多感染性因子感染,阻止或至少降低某些由EB病毒或人乳头状瘤病毒等病毒所致的癌的发生。所以,研究者们现在正试图通过主动免疫阻止感染或病毒转化细胞的生长。然而,被广泛用于抗感染性疾病的预防性接种可能不能用于大部分癌。使抗原性癌不能被宿主免疫系统破坏的机制的主要差异已被鉴定。对基本调节机制和分子的这种理解为发现抵制肿瘤逃避的新方法提供了希望。许多证据提示,肿瘤细胞周围的局部环境可阻止能抵抗已建立的实体瘤的有效免疫,造成转移细胞的潜伏或促进复发,但关键机制仍需要被确定。特别地,我们需要更好地理解炎症或调节性T细胞可导致肿瘤增进或肿瘤抑制所凭借的机制。基因工程肿瘤细胞和小鼠品系的可用性为调查自己-非己区别及炎症的基本问题提供了许多重要的新模型,阐明了肿瘤逃避、增进和进展的机制,但仍缺乏研究肿瘤潜伏和复发的模型。

随着生物技术学及我们对癌和免疫系统的理解的快速进展,数目众多的癌免疫治疗新策略正在被发展,且必须在临床前模型中调查它们的潜在有效性。虽然治疗性主动接种在感染性疾病的临床治疗中几乎已被废弃,但大量的、可能在癌症中被证明是有效的主动免疫新方法正在被发展。此外,被动抗体治疗和T细胞过继治疗提供了重要的可选择的方法。总之,尽管警告仍是极具正当理由的,但大有希望的是,肿瘤免疫不仅可被开发以增加我们对癌症生物学和免疫学的进一步理解,而且可被开发来显著改进癌症的诊断和治疗。

(贾正才 译)

参 考 文 献

1. Cotran R, Kumar V, Robbins S. *Neoplasia: pathologic basis of disease.* Philadelphia: WB Saunders, 1994:241–303.
2. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87:159–170.
3. Weinberg RA. How cancer arises. *Sci Am* 1996;275:62–70.
4. Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr. *Cancer epidemiology and prevention.* 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1996:1–1521.
5. Williams GM, Iatropoulos MJ, Weisburger JH. Chemical carcinogen mechanisms of action and implications for testing methodology. *Exp Toxicol Pathol* 1996;48:101–111.

6. Rous P, Beard J. The progression to carcinoma of virus induced rabbit papillomas (Shope). *J Exp Med* 1935;62:523–528.
7. Foulds L. The experimental study of tumor progression. A review. *Cancer Res* 1954;14:327–339.
8. Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 1986;46:2203–2207.
9. Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskd* 1909;5:273–290.
10. Woglom WH. Immunity to transplantable tumors. *Cancer Rev* 1929;4:129–214.
11. Gorer PA. Some recent work on tumor immunity. *Adv Cancer Res* 1956;4: 149–186.
12. Andervont HB. The use of pure strain animals in studies on natural resistance to transplantable tumors. *Public Health Rep* 1937;52:1885–1895.
13. Gross L. Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Res* 1943;3:326–333.
14. Foley EJ. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res* 1953;13:835–837.
15. Baldwin RW. Immunity to methylcholanthrene-induced tumors-inbred rats following atrophy and regression of implanted tumors. *Br J Cancer* 1955;9: 652–665.
16. Prehn RT, Main JM. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 1957;18:769–778.
17. Klein G, Sögren HO, Klein E, Hellström KE. Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 1960;20:1561–1572.
18. Old LJ, Boyse EA, Clarke DA, Carswell EA. Antigenic properties of chemically-induced tumors. *Ann NY Acad Sci* 1962;101:80–106.
19. Globerson A, Feldman M. Antigenic specificity of benzo(a) pyrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 1964;32:1229–1243.
20. Bailey DW. How pure are inbred strains of mice? *Immunol Today* 1982;3:210–214.
21. Pasternak G, Graffi A, Horn K-H. Der Nachweis individual specifischer Antigenität bei UV-induzierten Sarkomen der Maus. *Acta Biol Med Ger* 1964;13: 276–279.
22. Kripke ML. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J Natl Cancer Inst* 1974;53:1333–1336.
23. Vaage J. Nonvirus-associated antigens in virus-induced mouse mammary tumors. *Cancer Res* 1968;28:2477–2483.
24. Morton DL, Miller GF, Wood DA. Demonstration of tumor-specific immunity against antigens unrelated to the mammary tumor virus in spontaneous mammary adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1969;42:289–301.
25. Carswell EA, Wanebo HJ, Old U, Boyse EA. Immunogenic properties of reticulum cell sarcomas of SJL/J mice. *J Natl Cancer Inst* 1970;44:1281–1288.
26. Basombrio MA. Search for common antigenicities among twenty-five sarcomas induced by methylcholanthrene. *Cancer Res* 1970;30:2458–2462.
27. Basombrio MA, Prehn RT. Studies on the basis for diversity and time of appearance of antigens in chemically induced tumors. *Natl Cancer Inst Monogr* 1972; 35:117–124.
28. Van den Eynde B, Lethe B, Van Pel A, De Plaen E, Boon T. The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice. *J Exp Med* 1991;173:1373–1384.
29. Ramarathinam L, Sarma S, Maric M, et al. Multiple lineages of tumors express a common tumor antigen, P1A, but they are not cross-protected. *J Immunol* 1995;155:5323–5329.
30. Donawho C, Kripke ML. Immunogenicity and cross-reactivity of syngeneic murine melanomas. *Cancer Commun* 1980;2:101–107.
31. Spellman CW, Daynes RA. Ultraviolet light induced murine suppressor lymphocytes dictate specificity of anti-ultraviolet tumor immune responses. *Cell Immunol* 1978;38:25–34.
32. Leffell MS, Coggin JH Jr. Common transplantation antigens on methylcholanthrene-induced murine sarcomas detected by three assays of tumor rejection. *Cancer Res* 1977;37:4112–4119.
33. Van Waes C, Urban JL, Rothstein JL, Ward PL, Schreiber H. Highly malignant tumor variants retain tumor-specific antigens recognized by T helper cells. *J Exp Med* 1986;164:1547–1565.
34. Brent L, Medawar P. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. The effects of irradiation. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1966;165:413–423.
35. Srivastava PK. Do human cancers express shared protective antigens? or the necessity of remembrance of things past. *Semin Immunol* 1996;8:295–302.
36. Rouse BT, Röllinghoff M, Warner NL. Anti-theta serum-induced suppression of the cellular transfer of tumour-specific immunity to a syngeneic plasma cell tumour. *Nat New Biol* 1972;238:116–117.
37. Ward PL, Koeppen H, Hurteau T, Schreiber H. Tumor antigens defined by cloned immunological probes are highly polymorphic and are not detected on autologous normal cells. *J Exp Med* 1989;170:217–232.
38. Wortzel RD, Urban JL, Schreiber H. Malignant growth in the normal host after variant selection in vitro with cytolytic T-cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2186–2190.
39. Ward PL, Koeppen HK, Hurteau T, Rowley DA, Schreiber H. Major histocompatibility complex class I and unique antigen expression by murine tumors that escaped from CD8+ T-cell-dependent surveillance. *Cancer Res* 1990;50: 3851–2858.
40. Koeppen H, Rowley DA, Schreiber H. Tumor-specific antigens and immunological resistance to cancer. In: Steinman RM, North RJ, eds. *Mechanisms of host resistance for infectious agents, tumors and allografts.* New York: Rockefeller University Press, 1986:359–386.
41. Wortzel RD, Philipps C, Schreiber H. Multiple tumour-specific antigens expressed on a single tumour cell. *Nature* 1983;304:165–167.
42. Knuth A, Wölfel T, Klehmann E, Boon T, Meyer zum Buschenfelde KH. Cytolytic T-cell clones against an autologous human melanoma: specificity study and definition of three antigens by immunoselection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2804–2808.
43. Van den Eynde B, Hainaut P, Herin M, et al. Presence on a human melanoma of multiple antigens recognized by autologous CTL. *Int J Cancer* 1989;44: 634–640.
44. Uyttenhove C, Maryanski J, Boon T. Escape of mouse mastocytoma P815 after nearly complete rejection is due to antigen-loss variants rather than immunosuppression. *J Exp Med* 1983;157:1040–1052.
45. Burnet FM. A certain symmetry: histocompatibility antigens compared with immunocyte receptors. *Nature* 1970;226:123–126.
46. Lampson LA, Levy R. A role for clonal antigens in cancer diagnosis and therapy. *J Natl Cancer Inst* 1979;62:217–220.
47. Embleton MJ, Heidelberger C. Antigenicity of mouse prostate transformed in vitro. *Int J Cancer* 1972;9:8–18.
48. Basombrio MA, Prehn RT. Antigenic diversity of tumors chemically induced within the progeny of a single cell. *Int J Cancer* 1972;10:1–8.
49. Hood L, Huang HV, Dreyer WJ. The area-code hypothesis: the immune system provides clues to understanding the genetic and molecular basis of cell recognition during development. *J Suprastruct* 1977;7:531–559.
50. Srivastava PK, Old LJ. Individually distinct transplantation antigens of chemically induced mouse tumors. *Immunol Today* 1988;9:78–83.
51. Lurquin C, Van Pel A, Mariame B, et al. Structure of the gene of tum-transplantation antigen P91A: the mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells. *Cell* 1989;58:293–303.
52. Mandelboim O, Berke G, Fridkin M, Feldman M, Eisenstein M, Eisenbach L. CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. *Nature* 1994;369:67–71.
53. Uenaka A, Ono T, Akisawa T, Wada H, Yasuda T, Nakayama E. Identification of a unique antigen peptide pRL1 on BALB/c RL male 1 leukemia recognized by cytotoxic T lymphocytes and its relation to the Akt oncogene. *J Exp Med* 1994;180:1599–1607.
54. de Bergeyck V, De Plaen E, Chomez P, Boon T, Van Pel A. An intracisternal A-particle sequence codes for an antigen recognized by syngeneic cytolytic T lymphocytes on a mouse spontaneous leukemia. *Eur J Immunol* 1994;24: 2203–2212.
55. Ikeda H, Ohta N, Furukawa K, et al. Mutated mitogen-activated protein kinase: a tumor rejection antigen of mouse sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6375–6379.
56. Monach PA, Meredith SC, Siegel CT, Schreiber H. A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. *Immunity* 1995;2:45–59.
57. Coulie PG, Lehmann F, Lethe B, et al. A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7976–7980.
58. Wölfel T, Hauer M, Schneider J, et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995;269:1281–1284.
59. Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, et al. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183:1185–1192.
60. Brändle D, Brasseur F, Weynants P, Boon T, Van den Eynde B. A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J Exp Med* 1996;183:2501–2508.
61. Dubey P, Hendrickson RC, Meredith SC, et al. The immunodominant antigen of an ultraviolet-induced regressor tumor is generated by a somatic point mutation in the DEAD box helicase p68. *J Exp Med* 1997;185:695–705.
62. Zuo L, Weger J, Yang Q, et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 1996;12:97–99.
63. Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 1997;275:1790–1792.
64. Mumberg D, Wick M, Schreiber H. Unique tumor antigens redefined as mutant tumor-specific antigens. *Semin Immunol* 1996;8:289–293.
65. Boon T, van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183:725–729.
66. Disis ML, Cheever MA. Oncogenic proteins as tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1996;8:637–642.
67. Pullano TG, Sinn E, Carney WP. Characterization of monoclonal antibody R256, specific for activated ras p21 with arginine at 12, and analysis of breast carcinoma of v-Harvey-ras transgenic mouse. *Oncogene* 1989;4:1003–1008.
68. Feramisco JR, Clark R, Wong G, Arnheim N, Milley R, McCormick F. Transient reversion of ras oncogene-induced cell transformation by antibodies specific for amino acid 12 of ras protein. *Nature* 1985;314:639–642.
69. Jung S, Schluesener HJ. Human T lymphocytes recognize a peptide of single

point-mutated, oncogenic ras proteins. *J Exp Med* 1991;173:273–276.
70. Peace DJ, Chen W, Nelson H, Cheever MA. T cell recognition of transforming proteins encoded by mutated ras proto-oncogenes. *J Immunol* 1991;146: 2059-2065.
71. Skipper J, Stauss HJ. Identification of two cytotoxic T lymphocyte-recognized epitopes in the Ras protein. *J Exp Med* 1993;177:1493–1498.
72. Peace DJ, Smith JW, Chen W, et al. Lysis of ras oncogene-transformed cells by specific cytotoxic T lymphocytes elicited by primary in vitro immunization with mutated ras peptide. *J Exp Med* 1994;179:473–479.
73. Abrams SI, Stanziale SF, Lunin SD, Zaremba S, Schlom J. Identification of overlapping epitopes in mutant ras oncogene peptides that activate CD4+ and CD8+ T cell responses. *Eur J Immunol* 1996;26:435–443.
74. Van Elsas A, Nijman HW, Van der Minne CE, et al. Induction and characterization of cytotoxic T-lymphocytes recognizing a mutated p21ras peptide presented by HLA-A*0201. *Int J Cancer* 1995;61:389–396.
75. Fossum B, Olsen AC, Thorsby E, Gaudernack G. CD8+ T cells from a patient with colon carcinoma, specific for a mutant p21-Ras-derived peptide (Gly13→Asp), are cytotoxic towards a carcinoma cell line harbouring the same mutation. *Cancer Immunol Immunother* 1995;40:165–172.
76. Yin L, Thomas C, Hsuan JJ, Stauss HJ. Unconventional cytotoxic T lymphocyte recognition of synthetic peptides corresponding to residues 1-23 of Ras protein. *Eur J Immunol* 1994;24:1988–1992.
77. Fenton RG, Keller CJ, Hanna N, Taub DD. Induction of T-cell immunity against Ras oncoproteins by soluble protein or Ras-expressing Escherichia coli. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1853–1861.
78. Carbone G, Borrello MG, Molla A, et al. Activation of ras oncogenes and expression of tumor-specific transplantation antigens in methylcholanthrene-induced murine fibrosarcomas. *Int J Cancer* 1991;47:619–625.
79. Abrams SI, Hand PH, Tsang KY, Schlom J. Mutant ras epitopes as targets for cancer vaccines. *Semin Oncol* 1996;23:118–134.
80. Gjertsen MK, Bakka A, Breivik J, et al. Vaccination with mutant ras peptides and induction of T-cell responsiveness in pancreatic carcinoma patients carrying the corresponding RAS mutation. *Lancet* 1995;346:1399–1400.
81. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:2420–2424.
82. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979;278:261–263.
83. Linzer DI, Maltzman W, Levine AJ. The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen. *Virology* 1979;98:308–318.
84. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992;70:523–526.
85. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49–53.
86. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990;9:1595–1602.
87. Davidoff AM, Iglehart JD, Marks JR. Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3439–3442.
88. Houbiers JG, van der Burg SH, van de Watering LM, et al. Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1995;72:637–641.
89. Noguchi Y, Richards EC, Chen YT, Old LJ. Influence of interleukin 12 on p53 peptide vaccination against established Meth A sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2219-2223.
90. Theobald M, Biggs J, Dittmer D, Levine AJ, Sherman LA. Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11993–11997.
91. Melief CJ, Offringa R, Toes RE, Kast WM. Peptide-based cancer vaccines. *Curr Opin Immunol* 1996;8:651–657.
92. Humphrey PA, Gangarosa LM, Wong AJ, et al. Deletion-mutant epidermal growth factor receptor in human gliomas: effects of type II mutation on receptor function. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;178:1413–1420.
93. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, et al. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4207–4211.
94. Solomon E, Borrow J, Goddard AD. Chromosome aberrations and cancer. *Science* 1991;254:1153–1160.
95. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243:290–293.
96. Sato Y, Rowley JD. Chromosome abnormalities in hematologic malignant diseases. In: Nathan DG, Orkin SH, Lantiqua CJ, eds. *Hemotology of infancy and childhood*. Philadelphia: WB Saunders, 1998:1147–1182.
97. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1985;315:550–554.
98. van Denderen J, Hermans A, Meeuwsen T, et al. Antibody recognition of the tumor-specific bcr-abl joining region in chronic myeloid leukemia. *J Exp Med* 1989;169:87–98.
99. Bosch GJ, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJ, Leeksma OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood* 1996;88:3522–3527.
100. Rettig WJ, Old LJ. Immunogenetics of human cell surface differentiation. *Annu Rev Immunol* 1989;7:481–511.
101. Brown JP, Woodbury RG, Hart CE, Hellstrøm I, Hellström KE. Quantitative analysis of melanoma-associated antigen p97 in normal and neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:539–543.
102. Oettgen HF, Old LJ. The history of cancer immunotherapy. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Biologic therapy of cancer*. Philadelphia: Lippincott, 1991:87–119.
103. Uyttenhove C, Godfraind C, Lethe B, et al. The expression of mouse gene P1A in testis does not prevent safe induction of cytolytic T cells against a P1A-encoded tumor antigen. *Int J Cancer* 1997;70:349–356.
104. Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, et al. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 1998;16:1788–1794.
105. Riethmüller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, et al. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet* 1994;343:1177–1183.
106. Herlyn DM, Steplewski Z, Herlyn MF, Koprowski H. Inhibition of growth of colorectal carcinoma in nude mice by monoclonal antibody. *Cancer Res* 1980;40: 717–721.
107. Chen YT, Obata Y, Stockert E, Takahashi T, Old LJ. Tla-region genes and their products. *Immunol Res* 1987;6:30–45.
108. Old LJ. Cancer immunology: the search for specificity—G. H. A. Clowes Memorial lecture. *Cancer Res* 1981;41:361–375.
109. Wu M, van Kaer L, Itohara S, Tonegawa S. Highly restricted expression of the thymus leukemia antigens on intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 1991;174: 213–218.
110. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254:1643–1647.
111. Takahashi K, Shichijo S, Noguchi M, Hirohata M, Itoh K. Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res* 1995;55:3478–3482.
112. Becker JC, Gillitzer R, Brocker EB. A member of the melanoma antigen-encoding gene (MAGE) family is expressed in human skin during wound healing. *Int J Cancer* 1994;58:346–348.
113. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1914–1918.
114. Chomez P, Williams R, De Backer O, Boon T, Vennstrom B. The SMAGE gene family is expressed in post-meiotic spermatids during mouse germ cell differentiation. *Immunogenetics* 1996;43:97–100.
115. Amar-Costesec A, Godelaine D, Van den Eynde B, Beaufay H. Identification and characterization of the tumor-specific P1A gene product. *Biol Cell* 1994;81: 195–203.
116. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7149–7153.
117. De Plaen E, Arden K, Traversari C, et al. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 1994;40:360–369.
118. Baskar S. Gene-modified tumor cells as cellular vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43:165–173.
119. Barratt-Boyes SM. Making the most of mucin: a novel target for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43:142–151.
120. Hakomori S, Wang SM, Young WW Jr. Isoantigenic expression of Forssman glycolipid in human gastric and colonic mucosa: its possible identity with "A-like antigen" in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:3023–3027.
121. Lloyd KO. Philip Levine award lecture. Blood group antigens as markers for normal differentiation and malignant change in human tissues. *Am J Clin Pathol* 1987;87:129–139.
122. Göttlinger HG, Funke I, Johnson JP, Gokel JM, Riethmüller G. The epithelial cell surface antigen 17-1A, a target for antibody-mediated tumor therapy: its biochemical nature, tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 1986;38:47–53.
123. Hara I, Takechi Y, Houghton AN. Implicating a role for immune recognition of self in tumor rejection: passive immunization against the brown locus protein. *J Exp Med* 1995;182:1609–1614.
124. Livingston PO. Approaches to augmenting the immunogenicity of melanoma gangliosides: from whole melanoma cells to ganglioside-KLH conjugate vaccines. *Immunol Rev* 1995;145:147–166.
125. DeLellis RA, Dayal Y. The role of immunohistochemistry in the diagnosis of poorly differentiated malignant neoplasms. *Semin Oncol* 1987;14:173–92.
126. Freedman AS, Nadler LM. Cell surface markers in hematologic malignancies. *Semin Oncol* 1987;14:193–212.
127. Garnick MB, Fair WR. Prostate cancer: emerging concepts. *Ann Intern Med* 1996;125:118–125.
128. Kelly WK, Slovin S, Scher HI. Clinical use of posttherapy prostate-specific antigen changes in advanced prostate cancer. *Semin Oncol* 1996;23:8–14.
129. Pandha HS, Waxman J. Tumour markers. *Q J Med* 1995;88:233–241.
130. Garin-Chesa P, Beresford HR, Carrato-Mena A, et al. Cell surface molecules of human melanoma. Immunohistochemical analysis of the gp57, GD3, and mel-

CSPG antigenic systems. *Am J Pathol* 1989;134:295–303.

131. Mueller BM, Reisfeld RA. Melanoma antigens and antibodies. *Encycl Hum Biol* 1991;4:957–967.
132. Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, et al. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol Rev* 1995;145:61–89.
133. Hirszfeld L, Halber W, Rosenblat J. Untersuchungen über Verwandtschaftsreaktionen zwischen Embryonal- und Krebsgewebe. II. Menschenembryo und Menschenkrebs. *Z Immunitätsforsch* 1932;75:209–216.
134. Uriel J. Retrodifferentiation and the fetal patterns of gene expression in cancer. *Adv Cancer Res* 1979;29:127–174.
135. Leibson PJ, Loken MR, Panem S, Schreiber H. Clonal evolution of myeloma cells leads to quantitative changes in immunoglobulin secretion and surface antigen expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:2937–2941.
136. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965;122:467–481.
137. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965;122:467–481.
138. Thompson JA. Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen gene family members. *Tumour Biol* 1995;16:10–16.
139. Northover J. The use of prognostic markers in surgery for colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A:1207–1209.
140. Hodge JW. Carcinoembryonic antigen as a target for cancer vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43:127–134.
141. Abelev GI, Perova SD, Khramkov NI, Postnikova ZA, Irlin IS. Production of embryonal a-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* 1963;1:174–180.
142. Haydon GH, Hayes PC. Screening for hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:856–860.
143. Medawar PB, Hunt R. Can fetal antigens be used for prophylactic immunization? *Ciba Found Symp* 1983;96:160–181.
144. Lynch RG, Graff RJ, Sirisinha S, Simms ES, Eisen HN. Myeloma proteins as tumor-specific transplantation antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69: 1540–1544.
145. Syrengelas AD, Chen TT, Levy R. DNA immunization induces protective immunity against B-cell lymphoma. *Nat Med* 1996;2:1038–1041.
146. Krensky AM. Cytotoxic T lymphocyte recognition of non-Hodgkin's B cell lymphomas. *Immunol Res* 1996;15:91–97.
147. Beatty PG, Kim BS, Rowley DA, Coppleson LW. Antibody against the antigen receptor of a plasmacytoma prolongs survival of mice bearing the tumor. *J Immunol* 1976;116:1391–1396.
148. Schreiber H, Leibson P. Suppression of myeloma growth in vitro by anti-idiotypic antibodies: inhibition of DNA synthesis and colony formation. *J Natl Cancer Inst* 1978;60:225–233.
149. Krolick KA, Uhr JW, Slavin S, Vitetta ES. In vivo therapy of a murine B cell tumor (BCL1) using antibody-ricin A chain immunotoxins. *J Exp Med* 1982; 155:1797–1809.
150. Stevenson FK, Elliott EV, Stevenson GT. Some effects on leukaemic B lymphocytes of antibodies to defined regions of their surface immunoglobulin. *Immunology* 1977;32:549–557.
151. Miller RA, Maloney DG, Warnke R, Levy R. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody. *N Engl J Med* 1982;306:517–522.
152. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:52–58.
153. Stevenson FK, Zhu D, King CA, Ashworth LJ, Kumar S, Hawkins RE. Idiotypic DNA vaccines against B-cell lymphoma. *Immunol Rev* 1995;145:211–228.
154. Habel K. Resistance of polyoma virus immune animals to transplanted polyoma tumors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961;106:722–725.
155. Sjögren HO, Hellström I, Klein G. Resistance of polyoma virus-immunized mice to transplantation of established mice to transplantation of established polyoma tumors. *Exp Cell Res* 1961;23:204–208.
156. Defendi V. Effects of SV40 virus immunization on growth of transplantable SV40 and polyoma virus tumors in hamsters. *Proc Soc Exp Biol Med* 1963;113: 12–16.
157. Tevethia SS, Tevethia MJ, Lewis AJ, Reddy VB, Weissman SM. Biology of simian virus 40 (SV40) transplantation antigen (TrAg). IX. Analysis of TrAg in mouse cells synthesizing truncated SV40 large T antigen. *Virology* 1983;128: 319–330.
158. Tevethia SS, Greenfield RS, Flyer DC, Tevethia MJ. SV40 transplantation antigen: relationship to SV40-specific proteins. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1980;44:235–242.
159. O'Connell KA, Gooding LR. Cloned cytotoxic T lymphocytes recognize cells expressing discrete fragments of the SV40 tumor antigen. *J Immunol* 1984;132: 953–958.
160. Sharma S, Rodgers L, Brandsma J, Gething MJ, Sambrook J. SV40 T antigen and the exocytotic pathway. *EMBO J* 1985;4:1479–1489.
161. Carbone M, Rizzo P, Grimley PM, et al. Simian virus-40 large- T antigen binds p53 in human mesotheliomas. *Nat Med* 1997;3:908–912.
162. Rickinson AB, Murray RJ, Brooks J, Griffin H, Moss DJ, Masucci MG. T cell recognition of Epstein-Barr virus associated lymphomas. *Cancer Surv* 1992;13: 53–80.
163. Smith CA, Ng CY, Loftin SK, et al. Adoptive immunotherapy for Epstein-Barr virus-related lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1996;23:213–220.
164. Tindle RW. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr Opin Immunol* 1996;8:643–650.
165. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med* 1995;1:1297–1302.
166. Coffin JM. Endogenous retrovirus. In: Weiss R, Teich N, Varmas H, Coffin J, eds. *Molecular biology of tumor viruses, part III. RNA tumor viruses,* 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1984:1109–1203.
167. Stoye JP, Coffin JM. Polymorphism of murine endogenous proviruses revealed by using virus class-specific oligonucleotide probes. *J Virol* 1988;62:168–175.
168. Nowinski RC, Stone MR, Tam MR, Lostrom ME, Burnette WN, O'Donnell PV. Mapping of viral proteins with monoclonal antibodies. In: Kennett RH, McKearn TJ, Bechton KB, eds. *Monoclonal antibodies. Hybridomas: a new dimension in biological analyses.* New York: Plenum Press, 1980:295–316.
169. Löwer R, Löwer J, Kurth R. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5177–5184.
170. Müller R, Slamon DJ, Tremblay JM, Cline MJ, Verma IM. Differential expression of cellular oncogenes during pre- and postnatal development of the mouse. *Nature* 1982;299:640–644.
171. Britt WJ, Chesebro B, Portis JL. Identification of a unique erythroleukemia-associated retroviral gp70 expressed during early stages of normal erythroid differentiation. *J Exp Med* 1984;159:1591–1603.
172. Fefer A, McCoy JL, Glynn JP. Induction and regression of primary moloney sarcoma virus-induced tumors in mice. *Cancer Res* 1967;27:1626–1631.
173. Plata F, Lilly F. Viral specificity of H-2-restricted T killer cells directed against syngeneic tumors induced by Gross, Friend, or Rauscher leukemia virus. *J Exp Med* 1979;150:1174–1186.
174. Plata F, Langlade-Demoyen P, Abastado JP, Berbar T, Kourilsky P. Retrovirus antigens recognized by cytolytic T lymphocytes activate tumor rejection in vivo. *Cell* 1987;48:231–240.
175. Klarnet JP, Kern DE, Okuno K, Holt C, Lilly F, Greenberg PD. FBL-reactive CD8+cytotoxic and CD4+ helper T lymphocytes recognize distinct Friend murine leukemia virus-encoded antigens. *J Exp Med* 1989;169:457–467.
176. Huang AY, Gulden PH, Woods AS, et al. The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 9730–9735.
177. Golovkina TV, Chervonsky A, Dudley JP, Ross SR. Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* 1992;69: 637–645.
178. Thomas L. Discussion of cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. In: Lawrence HS, ed. New York: Hoeber-Harper, 1959:529–532.
179. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970;13:1–27.
180. Outzen HC, Custer RP, Eaton GJ, Prehn RT. Spontaneous and induced tumor incidence in germfree "nude" mice. *J Reticuloendothel Soc* 1975;17:1–9.
181. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic nude mice. *Science* 1979;183:534–536.
182. Holland JM, Mitchell TJ, Gipson LC, Whitaker MS. Survival and cause of death in aging germfree athymic nude and normal inbred C3Hf/He mice. *J Natl Cancer Inst* 1978;61:1357–1361.
183. Good R. Relations between immunity and malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69:1026–1030.
184. Kinlein LJ. Immunologic factors including AIDS. In: Schottenfield D, Fraumeni JF Jr, eds. *Cancer epidemiology and prevention.* New York: Oxford University Press, 1996:532–545.
185. Bouwes Bavinck JN, Hardie DR, Green A, et al. The risk of skin cancer in renal transplant recipients in Queensland, Australia. A follow-up study. *Transplantation* 1996;61:715–721.
186. Kelly GE, Meikle W, Sheil AG. Effects of immunosuppressive therapy on the induction of skin tumors by ultraviolet irradiation in hairless mice. *Transplantation* 1987;44:429–434.
187. Servilla KS, Burnham DK, Daynes RA. Ability of cyclosporine to promote the growth of transplanted ultraviolet radiation-induced tumors in mice. *Transplantation* 1987;44:291–295.
188. Klein G. Immunological surveillance against neoplasia. *Harvey Lect* 1975;69: 71–102.
189. Tooze J. Origins of contemporary tumor virus research. In: *The molecular biology of tumor viruses.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1973:1–73.
190. Deinhardt FW, Falk LA, Wolfe LG. Simian herpesviruses and neoplasia. *Adv Cancer Res* 1974;19:167–205.
191. Urban JL, Burton RC, Holland JM, Kripke ML, Schreiber H. Mechanisms of syngeneic tumor rejection. Susceptibility of host-selected progressor variants to various immunological effector cells. *J Exp Med* 1982;155:557–573.
192. Collins JL, Patek PQ, Cohn M. In vivo surveillance of tumorigenic cells transformed in vitro. *Nature* 1982;299:169–171.
193. Virchow R. *Aetiologie der neoplastischen Geschwülste/Pathogenie der neoplastischen Geschwülste. Die Krankhaften Geschwülste.* Berlin: Verlag von August

Hirschwald, 1863:57–101.
194. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996;77:1303–1310.
195. Barnhill RL, Mihm MC. Histopathology of malignant melanoma and its precursor lesions. In: Balch CM, Houghton AN, Milton GW, Sober AJ, Soong S, eds. *Cutaneous melanoma.* Philadelphia: Lippincott, 1992:234–263.
196. Berd D, Mastrangelo MJ, Lattime E, Sato T, Maguire HC Jr. Melanoma and vitiligo: immunology's Grecian urn. *Cancer Immunol Immunother* 1996;42: 263–267.
197. Mackensen A, Carcelain G, Viel S, et al. Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma. *J Clin Invest* 1994;93: 1397–1402.
198. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986;315:1650–1659.
199. Van Damme J, Proost P, Lenaerts JP, Opdenakker G. Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med* 1992;176: 59–65.
200. Mantovani A. Tumor-associated macrophages. *Curr Opin Immunol* 1990;2: 689–692.
201. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 1992;13:265–270.
202. Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991;64:867–869.
203. Singh S, Ross SR, Acena M, Rowley DA, Schreiber H. Stroma is critical for preventing or permitting immunological destruction of antigenic cancer cells. *J Exp Med* 1992;175:139–146.
204. DiGiovanni J. Bhatt TS, Walker SE. C57BL/6 mice are resistant to tumor promotion by full thickness skin wounding. *Carcinogenesis* 1993;14:319–321.
205. Prescott SM, White RL. Self-promotion? Intimate connections between APC and prostaglandin H synthase-2. *Cell* 1996;87:783–786.
206. Noguchi Y, Jungbluth A, Richards EC, Old LJ. Effect of interleukin 12 on tumor induction by 3-methylcholanthrene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 11798–801.
207. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996;87:803–809.
208. Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY, Schreiber H. Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J Exp Med* 1995;181:435–440.
209. Seung LP, Rowley DA, Dubey P, Schreiber H. Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6254–6258.
210. Seung LP, Seung SK, Schreiber H. Antigenic cancer cells that escape immune destruction are stimulated by host cells. *Cancer Res* 1995;55:5094–5100.
211. Rettig MB, Ma HJ, Vescio RA, et al. Kaposi's sarcoma-assoicated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients. *Science* 1997;276:1851.
212. Huang F, Hsu S, Yan Z, Winawer S, Friedman E. The capacity for growth stimulation by TGF beta 1 seen only in advanced colon cancers cannot be ascribed to mutations in APC, DCC, p53 or ras. *Oncogene* 1994;9:3701–3706.
213. Okamoto M, Lee C, Oyasu R. Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* 1997;57:141–146.
214. Lu C, Kerbel RS. Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J Cell Biol* 1993;120:1281–1288.
215. Mintz B, Silvers WK. Accelerated growth of melanomas after specific immune destruction of tumor stroma in a mouse model. *Cancer Res* 1996;56:463–466.
216. Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Am J Cancer* 1936;25:162.
217. DeOme KB. The incidence of mammary tumors among low tumor strain C57BLK mice when foster-nursed by high-tumor strain A females. *Am J Cancer* 1940;40:231–234.
218. Choi Y, Kappler JW, Marrack P. A superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumour virus. *Nature* 1991;350:203–207.
219. Marrack P, Kushnir E, Kappler J. A maternally inherited superantigen encoded by a mammary tumour virus. *Nature* 1991;349:524–526.
220. Acha-Orbea H, Shakhov AN, Scarpellino L, et al. Clonal deletion of V beta 14-bearing T cells in mice transgenic for mammary tumour virus. *Nature* 1991;350: 207–211.
221. Fritsch EF, Temin HM. Inhibition of viral DNA synthesis in stationary chicken embryo fibroblasts infected with avian retroviruses. *J Virol* 1977;24:461–469.
222. Varmus HE, Padgett T, Heasley S, Simon G, Bishop JM. Cellular functions are required for the synthesis and integration of avian sarcoma virus-specific DNA. *Cell* 1977;11:307–319.
223. Tsubura A, Inaba M, Imai S, et al. Intervention of T-cells in transportation of mouse mammary tumor virus (milk factor) to mammary gland cells in vivo. *Cancer Res* 1988;48:6555–6559.
224. Squartini F, Olivi M, Bolis GB. Mouse strain and breeding stimulation as factors influencing the effect of thymectomy on mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 1970;30:2069–2072.
225. Stewart T, Tsai SC, Grayson H, Henderson R, Opelz G. Incidence of de-novo breast cancer in women chronically immunosuppressed after organ transplantation. *Lancet* 1995;346:796–798.
226. Prehn RT. The immune reaction as a stimulator of tumor growth. *Science* 1972; 176:170–171.
227. Prehn RT. Stimulatory effects of immune reactions upon the growths of untransplanted tumors. *Cancer Res* 1994;54:908–914.
228. Rapp HJ. Appropriateness of animal models for the immunology of human cancer. *Cancer Res* 1979;39:4285–4287.
229. Baldwin RW. Tumour-specific immunity against spontaneous rat tumours. *Int J Cancer* 1966;1:257–264.
230. Klein G, Klein E. Immune surveillance against virus-induced tumors and nonrejectability of spontaneous tumors: contrasting consequences of host versus tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:2121–2125.
231. Hewitt HB, Blake ER, Walder AS. A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *Br J Cancer* 1976;33:241–259.
232. Hewitt HB. The choice of animal tumors for experimental studies of cancer therapy. *Adv Cancer Res* 1978;27:149–200.
233. Kripke ML. Latency, histology, and antigenicity of tumors induced by ultraviolet light in three inbred mouse strains. *Cancer Res* 1977;37:1395–1400.
234. Malmgren RA, Bennison BE, McKinely TW Jr. Reduced antibody titers in mice treated with carcinogenic and cancer chemotherapeutic agents. *Proc Soc Exp Biol Med* 1952;79:484–488.
235. Kripke ML, Fisher MS. Immunologic parameters of ultraviolet carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1976;57:211–215.
236. Spellman CW, Daynes RA. Ultraviolet light, tumors, and suppressor T cells. *Hum Pathol* 1981;12:299–301.
237. Kripke ML. Immunological unresponsiveness induced by ultraviolet radiation. *Immunol Rev* 1984;80:87–102.
238. Roberts LK, Daynes RA. Modification of the immunogenic properties of chemically induced tumors arising in hosts treated concomitantly with ultraviolet light. *J Immunol* 1980;125:438–447.
239. Bartlett GL. Effect of host immunity on the antigenic strength of primary tumors. *J Natl Cancer Inst* 1972;49:493–504.
240. Makinodan T, Kay MM. Age influence on the immune system. *Adv Immunol* 1980;29:287–330.
241. Spellman CW, Daynes RA. Immunoregulation by ultraviolet light-III. Enhancement of suppressor cell activity in older animals. *Exp Gerontol* 1978;13: 141–146.
242. Flood PM, Urban JL, Kripke ML, Schreiber H. Loss of tumor-specific and idiotype-specific immunity with age. *J Exp Med* 1981;154:275–290.
243. Urban JL, Schreiber H. Rescue of the tumor-specific immune response of aged mice in vitro. *J Immunol* 1984;133:527–534.
244. Winn HJ. Immune mechanisms in homotransplantation. II. Quantitative assay of the immunologic activity of lymphoid cells stimulated by tumor homografts. *J Immunol* 1961;86:228–239.
245. North RJ, Havell EA. The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF) II. Analysis of the role of endogenous TNF in endotoxin-induced hemorrhagic necrosis and regression of an established sarcoma. *J Exp Med* 1988;167: 1086–1099.
246. Urban JL, Schreiber H. Selection of macrophage-resistant progressor tumor variants by the normal host. Requirement for concomitant T cell-mediated immunity. *J Exp Med* 1983;157:642–656.
247. Schultz KR, Klarnet JP, Gieni RS, HayGlass KT, Greenberg PD. The role of B cells for in vivo T cell responses to a Friend virus-induced leukemia. *Science* 1990;249:921–923.
248. Koeppen HK, Singh S, Stauss HJ, Park BH, Rowley DA, Schreiber H. CD4-positive and B lymphocytes in transplantation immunity. I. Promotion of tumor allograft rejection through elimination of CD4-positive lymphocytes. *Transplantation* 1993;55:1349–1355.
249. Monach PA, Schreiber H, Rowley DA. CD4+ and B lymphocytes in transplantation immunity. II. Augmented rejection of tumor allografts by mice lacking B cells. *Transplantation* 1993;55:1356–1361.
250. Real FX, Mattes MJ, Houghton AN, Oettgen HF, Lloyd KO, Old LJ. Class 1 (unique) tumor antigens of human melanoma. Identification of a 90,000 dalton cell surface glycoprotein by autologous antibody. *J Exp Med* 1984;160: 1219–1233.
251. Brown JP, Klitzman JM, Hellstrom I, Nowinski RC, Hellstrom KE. Antibody response of mice to chemically induced tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:955–958.
252. Old LJ, Boyse EA, Stockert E. Antigenic properties of experimental leukemias. I. Serological studies in vitro with spontaneous and radiation-induced leukemias. *J Natl Cancer Inst* 1963;31:977–986.
253. Boyse EA, Old LJ, Luell S. Antigenic properties of experimental leukemias. II. Immunological studies in vivo with C57Bl/6 radiation-induced leukemias. *J Natl Cancer Inst* 1963;31:987–995.
254. Leclerc JC, Gomard E, Levy JP. Cell-mediated reaction against tumors induced by oncornaviruses. I. Kinetics and specificity of the immune response in murine sarcoma virus (MSV)-induced tumors and transplanted lymphomas. *Int J Can-*

cer 1972;10:589–601.
255. Tevethia SS, Blasecki JW, Vaneck G, Goldstein AL. Requirement of thymus-derived theta-positive lymphocytes for rejection of DNA virus (SV 40) tumors in mice. *J Immunol* 1974;113:1417–1423.
256. Cheever MA, Thompson DB, Klarnet JP, Greenberg PD. Antigen-driven long term-cultured T cells proliferate in vivo, distribute widely, mediate specific tumor therapy, and persist long-term as functional memory T cells. *J Exp Med* 1986;163:1100–1112.
257. Algire GH, Weaver JM, Prehn RT. Growth of cells in vivo in diffusion chambers. I. Survival of homografts in immunized mice. *J Natl Cancer Inst* 1954;15:493–507.
258. Kripke ML. Immunologic mechanisms in UV radiation carcinogenesis. *Adv Cancer Res* 1981;34:69–106.
259. Robins RA. T-cell responses at the host-tumour interface. *Biochim Biophys Acta* 1986;865:289–305.
260. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 1994;68:8056–8063.
261. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995;333:1038–1044.
262. Mukherji B, MacAlister TJ. Clonal analysis of cytotoxic T cell response against human melanoma. *J Exp Med* 1983;158:240–245.
263. Knuth A, Danowski B, Oettgen HF, Old LJ. T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3511–3515.
264. Klein E, Vanky F, Galili U, Vose BM, Fopp M. Separation and characteristics of
326. Gervois N, Guilloux Y, Diez E, Jotereau F. Suboptimal activation of melanoma infiltrating lymphocytes (TIL) due to low avidity of TCR/MHC-tumor peptide interactions. *J Exp Med* 1996;183:2403–2407.
327. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996;271:1734–1736.
328. Melero I, Shuford WW, Newby SA, et al. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 1997;3:682–685.
329. Topalian SL, Gonzales MI, Parkhurst M, et al. Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J Exp Med* 1996;183:1965–1971.
330. Golumbek PT, Lazenby AJ, Levitsky HI, et al. Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4. *Science* 1991;254:713–716.
331. Gorelik E. Concomitant tumor immunity and the resistance to a second tumor challenge. *Adv Cancer Res* 1983;93:71–120.
332. Perdrizet GA, Ross SR, Stauss HJ, Singh S, Koeppen H, Schreiber H. Animals bearing malignant grafts reject normal grafts that express through gene transfer the same antigen. *J Exp Med* 1990;171:1205–1220.
333. Wick M, Dubey P, Koeppen H, et al. Antigenic cancer cells can grow progressively in immune hosts without evidence for T cell exhaustion or systemic anergy. *J Exp Med* 1997;186:229–237.
334. Heath WR, Allison J, Hoffmann MW, et al. Autoimmune diabetes as a consequence of locally produced interleukin-2. *Nature* 1992;359:547–549.
335. Ksander BR, Streilein JW. Failure of infiltrating precursor cytotoxic T cells to acquire direct cytotoxic function in immunologically privileged sites. *J Immunol* 1990;145:2057–2063.
336. Ksander BR, Acevedo J, Streilein JW. Local T helper cell signals by lymphocytes infiltrating intraocular tumors. *J Immunol* 1992;148:1955–1963.
337. Streilein JW, Ksander BR, Taylor AW. Immune deviation in relation to ocular immune privilege. *J Immunol* 1997;158:3557–3560.
338. O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 1996;184:1075–1082.
339. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, et al. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells—a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996;2:1361–1366.
340. Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, et al. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996;274:1363–1366.
341. Seung S, Urban JL, Schreiber H. A tumor escape variant that has lost one major histocompatibility complex class I restriction element induces specific CD8+ T cells to an antigen that no longer serves as a target. *J Exp Med* 1993;178:933–940.
342. Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 1994;264:961–965.
343. Kündig TM, Bachmann MF, DiPaolo C, et al. Fibroblasts as efficient antigen-presenting cells in lymphoid organs. *Science* 1995;268:1343–1347.
344. Wang Z, Cao Y, Albino AP, Zeff RA, Houghton A, Ferrone S. Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in beta 2-microglobulin messenger RNA. *J Clin Invest* 1993;91:684–692.
345. Trowsdale J, Travers P, Bodmer WF, Patillo RA. Expression of HLA-A, -B, and -C and beta 2-microglobulin antigens in human choriocarcinoma cell lines. *J Exp Med* 1980;152:11s–17s.
346. Travers PJ, Arklie JL, Trowsdale J, Patillo RA, Bodmer WF. Lack of expression of HLA-ABC antigens in choriocarcinoma and other human tumor cell lines. *Natl Cancer Inst Monogr* 1982;60:175–180.
347. Ruiter DJ, Bergman W, Welvaart K, et al. Immunohistochemical analysis of malignant melanomas and nevocellular nevi with monoclonal antibodies to distinct monomorphic determinants of HLA antigens. *Cancer Res* 1984;44:3930–3935.
348. Natali PG, Giacomini P, Bigotti A, et al. Heterogeneity in the expression of HLA and tumor-associated antigens by surgically removed and cultured breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1983;43:660–668.
349. Stein B, Momburg F, Schwarz V, Schlag P, Moldenhauer G, Moller P. Reduction or loss of HLA-A,B,C antigens in colorectal carcinoma appears not to influence survival. *Br J Cancer* 1988;57:364–368.
350. Smith ME, Bodmer WF, Bodmer JG. Selective loss of HLA-A,B,C locus products in colorectal adenocarcinoma. *Lancet* 1988;1:823–824.
351. Möller P, Hämmerling GJ. The role of surface HLA-A,B,C molecules in tumour immunity. *Cancer Surv* 1992;13:101–127.
352. Kaklamanis L, Gatter KC, Hill AB, et al. Loss of HLA class-I alleles, heavy chains and beta 2-microglobulin in colorectal cancer. *Int J Cancer* 1992;51:379–385.
353. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997;18:89–95.
354. Versteeg R, Kruse-Wolters KM, Plomp AC, et al. Suppression of class I human histocompatibility leukocyte antigen by c-myc is locus specific. *J Exp Med* 1989;170:621–635.
355. Ferrone S, Marincola FM. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 1995;16:487–494.
356. Lehmann F, Marchand M, Hainaut P, et al. Differences in the antigens recognized by cytolytic T cells on two successive metastases of a melanoma patient are consistent with immune selection. *Eur J Immunol* 1995;25:340–347.
357. Graffi A, Pasternak G, Horn K-H. Die Erzeugung von Resistenz gegen isologe Transplantate UV-induzierter Sarkome der Maus. *Acta Biol Med Ger* 1964;12:726–728.
358. Pasternak G. Immunologische Eigenschaften chemisch und physikalisch induzierter Tumoren. *Arch Geschwulstforsch* 1967;29:113–141.
359. Lill NL, Tevethia MJ, Hendrickson WG, Tevethia SS. Cytotoxic T lymphocytes (CTL) against a transforming gene product select for transformed cells with point mutations within sequences encoding CTL recognition epitopes. *J Exp Med* 1992;176:449–457.
360. Urban JL, Kripke ML, Schreiber H. Stepwise immunologic selection of antigenic variants during tumor growth. *J Immunol* 1986;137:3036–3041.
361. Urban JL, Van Waes C, Schreiber H. Pecking order among tumor-specific antigens. *Eur J Immunol* 1984;14:181–187.
362. Wettstein PJ, Bailey DW. Immunodominance in the immune response to "multiple" histocompatibility antigens. *Immunogenetics* 1982;16:47–58.
363. Van Waes C, Monach PA, Urban JL, Wortzel RD, Schreiber H. Immunodominance deters the response to other tumor antigens thereby favoring escape: prevention by vaccination with tumor variants selected with cloned cytolytic T cells in vitro. *Tissue Antigens* 1996;47:399–407.
364. Urban JL, Holland JM, Kripke ML, Schreiber H. Immunoselection of tumor cell variants by mice suppressed with ultraviolet radiation. *J Exp Med* 1982;156:1025–1041.
365. Daynes RA, Fernandez PA, Woodward JG. Cell-mediated immune response to syngeneic ultraviolet-induced tumors. II. The properties and antigenic specificities of cytotoxic T lymphocytes generated in vitro following removal from syngeneic tumor-immunized mice. *Cell* Immunol 1979;45:398–414.
366. Boyse EA, Old LJ. Some aspects of nomral and abnormal cell surface genetics. *Annu Rev Genet* 1969;3:269–290.
367. Takashi T, Old L, McIntire R, Boyse E. Immunoglobulin and other surface antigens of cells of the immune system. *J Exp Med* 1971;134:815–832.
368. Kaliss N. Immunological enhancement of tumor homografts in mice. A review. *Cancer Res* 1957;18:992–1003.
369. Kaliss N. The survival of homografts in mice pretreated with antisera to mouse tissue. *Ann NY Acad Sci* 1957;64:977–993.
370. Möller G. Antagonistic effect of humoral isoantibodies on the in vitro cytotoxicity of immune lymphoid cells. *J Exp Med* 1965;122:11–24.
371. Möller G. Effect on tumour growth in syngeneic recipients of antibodies against tumour-specific antigens in methylcholanthrene-induced mouse sarcomas. *Nature* 1964;204:846–847.
372. Hellström KE, Hellström I. Lymphocyte-mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. *Adv Immunol* 1974;18:209–277.
373. Currie G. Immunological aspects of host resistance to the development and growth of cancer. *Biochim Biophys Acta* 1976;458:135–165.
374. Gershon RK, Mokyr MB, Mitchell MS. Activation of suppressor T cells by tumour cells and specific antibody. *Nature* 1974;250:594–596.
375. Fisher MS, Kripke ML. Systemic alteration induced in mice by ultraviolet light irradiation and its relationship to ultraviolet carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci*

USA 1977;74:1688–1692.
376. Vink AA, Strickland FM, Bucana C, et al. Localization of DNA damage and its role in altered antigen-presenting cell function in ultraviolet-irradiated mice. *J Exp Med* 1996;183:1491–1500.
377. Daynes RA, Spellman CW. Evidence for the generation of suppressor cells by ultraviolet radiation. *Cell Immunol* 1977;31:182–187.
378. Fisher MS, Kripke ML. Suppressor T lymphocytes control the development of primary skin cancers in ultraviolet-irradiated mice. *Science* 1982;216:1133–1134.
379. Harris CC. A delayed complication of cancer therapy—cancer. *J Natl Cancer Inst* 1979;63:275–277.
380. Schrier PI, Bernards R, Vaessen RT, Houweling A, van der Eb AJ. Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. *Nature* 1983;305:771–775.
381. Haddada H, Lewis AM Jr, Sogn JA, et al. Tumorigenicity of hamster and mouse cells transformed by adenovirus types 2 and 5 is not influenced by the level of class I major histocompatibility antigens expressed on the cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9684–9688.
382. Snyderman R, Cianciolo GJ. Immunosuppressive activity of the retroviral envelope protein P15E and its possible relationship to neoplasia. *Immunol Today* 1984;5:240–244.
383. Levey DL, Srivastava PK. Alterations in T cells of cancer-bearers: whence specificity? *Immunol Today* 1996;17:365–368.
384. Mullen CA, Urban JL, Van Waes C, Rowley DA, Schreiber H. Multiple cancers. Tumor burden permits the outgrowth of other cancers. *J Exp Med* 1985;162: 1665–1682.
385. Mizoguchi H, O'Shea JJ, Longo DL, Loeffler CM, McVicar DW, Ochoa AC. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science* 1992;258:1795–1798.
386. Nakagomi H, Petersson M, Magnusson I, et al. Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:5610–5612.
387. Rabinowich H, Suminami Y, Reichert TE, et al. Expression of cytokine genes or proteins and signaling molecules in lymphocytes associated with human ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 1996;68:276–284.
388. Franco JL, Ghosh P, Wiltrout RH, et al. Partial degradation of T-cell signal transduction molecules by contaminating granulocytes during protein extraction of splenic T cells from tumor-bearing mice. *Cancer Res* 1995;55: 3840–3846.
389. Li X, Liu J, Park JK, et al. T cells from renal cell carcinoma patients exhibit an abnormal pattern of kappa B-specific DNA-binding activity: a preliminary report. *Cancer Res* 1994;54:5424–5429.
390. Ghosh P, Sica A, Young HA, et al. Alterations in NF kappa B/Rel family proteins in splenic T-cells from tumor-bearing mice and reversal following therapy. *Cancer Res* 1994;54:2969–2972.
391. Aoe T, Okamoto Y, Saito T. Activated macrophages induce structural abnormalities of the T cell receptor-CD3 complex. *J Exp Med* 1995;181:1881–1886.
392. Mullen CA, Rowley DA, Schreiber H. Highly immunogenic regressor tumor cells can prevent development of postsurgical tumor immunity. *Cell Immunol* 1989;119:101–113.
393. Fujimoto S, Greene MI, Sehon AH. Regulation of the immune response to tumor antigens. I. Immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts. *J Immunol* 1976; 116:791–799.
394. Berendt MJ, North RJ. T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J Exp Med* 1980; 151:69–80.
395. Naor D. Suppressor cells: permitters and promoters of malignancy? *Adv Cancer Res* 1979;29:45–125.
396. Ting CC, Rodrigues D. Switching on the macrophage-mediated suppressor mechanism by tumor cells to evade host immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:4265–4269.
397. North RJ. Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *J Exp Med* 1982;155:1063–1074.
398. Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. *Science* 1996;273: 70–74.
399. Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, et al. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11553–11557.
400. Deichman GI. Immunological aspects of carcinogenesis by deoxyribonucleic acid tumor viruses. *Adv Cancer Res* 1969;12:101–136.
401. Ye X, McCarrick J, Jewett L, Knowles BB. Timely immunization subverts the development of peripheral nonresponsiveness and suppresses tumor development in simian virus 40 tumor antigen-transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3916–3920.
402. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 1976;116:180–183.
403. Fehleisen F. Über die Züchtung der Erysipel-Kokken auf Künstlichen Nährböden und die Übertragbarkeit auf den Menschen. *Deutsche Med Wochenschr* 1882;8: 553–554.
404. Bruns P. Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwülste. *Beitr Klin Chir* 1887–1888;3:443–466.
405. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 1893;105:487–511.
406. Trinchieri G. Function and clinical use of interleukin-12. *Curr Opin Hematol* 1997;4:59–66.
407. Bartlett GL. In vivo methods for the assessment of cell-mediated tumor immunity. *Natl Cancer Inst Monogr* 1972;35:27–32.
408. Lindenmann J, Klein PA. Viral oncolysis: increased immunogenicity of host cell antigen associated with influenza virus. *J Exp Med* 1967;126:93–108.
409. Austin FC, Boone CW. Virus augmentation of the antigenicity of tumor cell extracts. *Adv Cancer Res* 1979;30:301–345.
410. Haas C, Schirrmacher V. Immunogenicity increase of autologous tumor cell vaccines by virus infection and attachment of bispecific antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43:190–194.
411. Liang W, Cohen EP. Resistance to murine leukemia in mice rejecting syngeneic somatic hybrid cells. *J Immunol* 1976;116:623–626.
412. Guo Y, Wu M, Chen H, et al. Effective tumor vaccine generated by fusion of hepatoma cells with activated B cells. *Science* 1994;263:518–520.
413. Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 1997;3: 558–561.
414. DeBruyne L. Treatment of malignancy by direct gene transfer of a foreign MHC class I molecule. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43:180–189.
415. Baskar S, Glimcher L, Nabavi N, Jones RT, Ostrand-Rosenberg S. Major histocompatibility complex class II+ B7-1+ tumor cells are potent vaccines for stimulating tumor rejection in tumor-bearing mice. *J Exp Med* 31995;181:619–629.
416. Mitchison NA. Immunologic approach to cancer. *Transplant Proc* 1970;2: 92–103.
417. Sato T. Active specific immunotherapy with hapten-modified autologous melanoma cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43:174–179.
418. Van Pel A, Boon T. Protection against a nonimmunogenic mouse leukemia by an immunogenic variant obtained by mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:4718–4722.
419. Chen L, Ashe S, Brady WA, et al. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counter-receptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 1992;71:1093–1102.
420. Townsend SE, Allison JP. Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T eells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 1993;259:368–370.
421. Woodruff MF, Boak JL. Inhibitory effect of injection of Corynebacterium parvum on the growth of tumour transplants in isogenic hosts. *Br J Cancer* 1966; 20:345–355.
422. Dye ES, North RJ, Mills CD. Mechanisms of anti-tumor action of Corynebacterium parvum. I. Potentiated tumor-specific immunity and its therapeutic limitations. *J Exp Med* 1981;154:609–620.
423. Blankenstein T, Cayeux S, Qin Z. Genetic approaches to cancer immunotherapy. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1996;129:1–49.
424. Colombo MP, Rodolfo M. Tumor cells engineered to produce cytokines or cofactors as cellular vaccines: do animal studies really support clinical trials? *Cancer Immunol Immunothery* 1995;41:265–270.
425. Trojan J, Johnson TR, Rudin SD, Ilan J, Tykocinski ML, Ilan J. Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor I RNA. *Science* 1993;259:94–97.
426. Toes RE, Offringa R, Blom RJ, Melief CJ, Kast WM. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7855–7860.
427. Shurin MR. Dendritic cells presenting tumor antigen. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43:158–164.
428. Donnelly JJ, Ulmer JB, Liu MA. DNA vaccines. *Life Sci* 1997;60:163–172.
429. Syrengelas AD, Chen TT, Levy R. DNA immunization induces protective immunity against B-cell lymphoma. *Nat Med* 1996;2:1038–1041.
430. Mittelman A, Wang X, Matsumoto K, Ferrone S. Antiantiidiotypic response and clinical course of the disease in patients with malignant melanoma immunized with mouse antiidiotypic monoclonal antibody MK2-23. *Hybridoma* 1995;14:175–181.
431. Uhr JW, Picker LJ, Scheuermann RH, Tucker TF, Vitetta ES, Yefenof E. Cancer dormancy: isolation and characterization of dormant lymphoma cells. 45th Annual Symposium on Fundamental Cancer Research, The University of Texas, MD Anderson Cancer Center. 1992:29–30.
432. Houghton AN, Mintzer D, Cordon-Cardo C, et al. Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: a phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:1242–1246.
433. Goodman GE, Hellström I, Brodzinsky L, et al. Phase I trial of murine monoclonal antibody L6 in breast, colon, ovarian, and lung cancer. *J Clin Oncol* 1990; 8:1083–1092.
434. Drebin JA, Link VC, Weinberg RA, Greene MI. Inhibition of tumor growth by a monoclonal antibody reactive with an oncogene-encoded tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9129–9133.
435. Stancovski I, Hurwitz E, Leitner O, Ullrich A, Yarden Y, Sela M. Mechanistic aspects of the opposing effects of monoclonal antibodies to the ERBB2 receptor on tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8691–8695.
436. Bacus SS, Stancovski I, Huberman E, et al. Tumor-inhibitory monoclonal antibodies to the HER-2/Neu receptor induce differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res* 1992;52:2580–2589.

437. Waldmann TA. Multichain interleukin-2 receptor: a target for immunotherapy in lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:914–923.
438. Ghetie V, Vitetta E. Immunotoxins in the therapy of cancer: from bench to clinic. *Pharmacol Ther* 1994;63:209–234.
439. Reisfeld RA, Gillies SD. Recombinant antibody fusion proteins for cancer immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;213:27–53.
440. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 1988;319:1676–1680.

第38章 寄生虫感染及其疾病的免疫调节

Edward J. Pearce, Phillip A. Scott, and Alan Sher[①]

寄生虫与免疫系统

寄生虫病原体的本质及对全球健康的重要性

1271 寄生虫一词,严格来说指所有的感染因子,通常仅指原生动物及后生动物。尽管此类生物的特性多样,但通常(并不全是)表现为长期存在于宿主体内;通过多样的及通常是生活周期不同阶段的抗原性不同表现出变形能力及高度演变的免疫逃避机制。大多数寄生虫感染都好发于热带地区的发展中国家,成为这些国家健康和经济的沉重负担。但是在北美发生的由原生动物隐孢子虫属环孢子属和弓形体属引起的寄生虫疾病的大流行,也很好地说明了即使在一些较为发达的地区,寄生虫感染也是对人类健康的一种威胁。目前流行的获得性免疫缺陷综合征(AIDS)也增加了寄生虫对发达国家的影响,这是因为免疫力减弱个体对于一些在正常情况下可以耐受的寄生虫如鼠弓形虫也非常敏感。

总的说来,作为一个群体,寄生虫显然仍是一个威胁全球人类健康的主要问题。尽管人们已经采取了一些措施,但是它对于全世界的家畜也仍然是一个重要威胁。表38.1列出了威胁人类的最重要的一些寄生虫及其发病率、流行性、目前控制方法。表38.1虽然强调经过几十年的努力探索,但是目前为止仍然没有任何人类寄生虫感染的疫苗,这一点就可以说明我们对于寄生虫的免疫特性及其免疫逃避机制的复杂性缺乏了

① E.J.Pearce: Department of Microbiology and Immunology, Cornell University, College of Veterinary Medicine, Ithaca, New York 14853-4601. P. A. Scott: Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, *Philadelphia, Pennsylvania 19104: A. Sher: Immunobiology SSection,* Laboratory of PAarasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892.

解。然而不可否认,近年来我们在对寄生虫的免疫应答研究也取得了巨大的进步,其中大部分来自基础免疫学方法和概念的应用。关于寄生虫感染模型的研究,以及通常所说的涉及到在体内发生的效应器和调节反应的"事实检验",也为基础免疫学提供了主要的证据。这种高度复杂的现代寄生虫学和免疫学相互关系的研究正是本章所要讨论的重点。

1272

表 38.1 人类原发的寄生虫感染

寄生虫病	新近(感染人数)	所有(流行)	目前控制方法
原生动物			
疟疾	3~5亿	—	携带者控制;化疗;卧床
恰加斯病(克鲁氏锥虫)	80万	1800万	携带者控制
利什曼病	1800万	1200万	携带者控制;化疗
昏睡病	—	30万	携带者控制
(*T. brucei rhodesiense* 和 *T. gambiense*)			
蠕虫	—		
蛔虫病		2.5亿	化疗,卫生学
血吸虫		2亿	化疗,卫生学
十二指肠病		1.51亿	化疗,卫生学
丝虫病(淋巴腺的)		1.20亿	携带者控制;化疗
鞭虫病		4600万	化疗,卫生学
盘尾丝虫病		1800万	化疗

根据1996年世界健康报道汇编而成。

T细胞亚群在抗寄生虫应答中的作用

在准备前一版基础免疫学的时候,T细胞亚群二分法就已经为研究寄生虫诱导免疫应答设立了主体框架,这个概念在很大程度上是建立在Mosmann和Coffman[4]工作的基础之上的,它主要根据CD4T细胞表达的细胞因子(第26章)将免疫学效应器功能分为两个大类。研究发现由分类Th1-Th2(Th1/Th2)淋巴细胞亚群产生的细胞因子交互抑制各自的发育和功能,这为理解在许多感染性疾病发生的免疫应答的极化现象提供了一个广泛应用的分子基础理论。事实上,第一个直接证实Th1/Th2对体内疾病调节相关性的范例,是在研究硕大利什曼原虫小鼠模型时发现的。不同寄生虫诱导反应的高度变异显示主要与Th1或Th2细胞因子的生成有关,这些细胞因子与感染的恶化或保护性反应有关。然而我们现在也意识到,是这些细胞(如CD8、γδ、自然杀伤细胞)而不是CD4淋巴细胞在对所观察到的体内细胞因子生成方式起作用[5]。因此,更准确地说,免疫应答是指Ⅰ型或Ⅱ型(与Th1/Th2相反)免疫应答,它通常仅指与细胞因子的生成有关而不是直接指明细胞类型[6]。在某种意义上讲,这种Th1/Th2命名法导致一方面与以结构为基础的细胞因子的Ⅰ型和Ⅱ型分类(第21章)存在巨大混乱,另一方面也导致与最早由Coombs和Gel[7]提出的Ⅰ型至Ⅳ型高敏反应相混淆。尽管需要纠正,但是我们还是倾向于应用现在已经得到广泛接受的寄生虫诱导的建立于主要细胞因子基础之上的Ⅰ型和Ⅱ型反应。

当用一个概念上非常强大的框架去分析效应器的功能及其调节时,T细胞细胞因子二分法非常直观地表现出了对寄生虫诱导的免疫反应及其对宿主耐受或疾病的影响。正如下面将要强调的,这些反应的特征很少仅仅是单纯的Ⅰ型或Ⅱ型,许多都伴随着相反的反应,而这些都受到优势亚群细胞产生的抑制性细胞因子下调的影响。正如将要讨论的,这些交叉调节可能会发展成针对由于抑制反应和(或)未调节的优势反应所引起的对宿主潜在免疫致病作用。同样,人们也越来越清楚地认识到,许多宿主耐受和疾病过程也不是由Ⅰ型或Ⅱ型T细胞或其产生的细胞因子单独介导的,而是相互协同作用的结果。最后,近来发现许多新的机制,如由CTLA-4介导的免疫下调作用[8],它可以解释那些由寄生虫激发的但是不诱导T细胞亚群和其细胞因子的免疫现象。

自然感染所诱导的Ⅰ型和Ⅱ型免疫应答

在描述寄生虫引起的免疫应答时,我们首先要讨论的是由于自然感染引起的保护作用及免疫致病作用。

本章后面将用单独的一节来描述疫苗引起的免疫反应。根据自然刺激宿主反应的观点,最明显的保护性免疫应答是受感染的动物可完全清除所感染的寄生虫,但是事实上,大多数的寄生虫通过精巧的侵入机制,其产生的感染大多是慢性的或长期性的,很少能仅通过宿主的免疫系统将其完全清除。最常见及最好的是免疫系统可以部分地保护宿主,因而可以防止致命性感染,但是在病程中,也刺激免疫病理反应。这些由寄生虫介导的免疫学特征及其在诱导宿主抵抗和疾病方面的作用也将在下面进行描述。图 38.1 和 38.2 对寄生虫激发的Ⅰ型和Ⅱ型反应的诱导和效应阶段进行了概括的描述。

1273

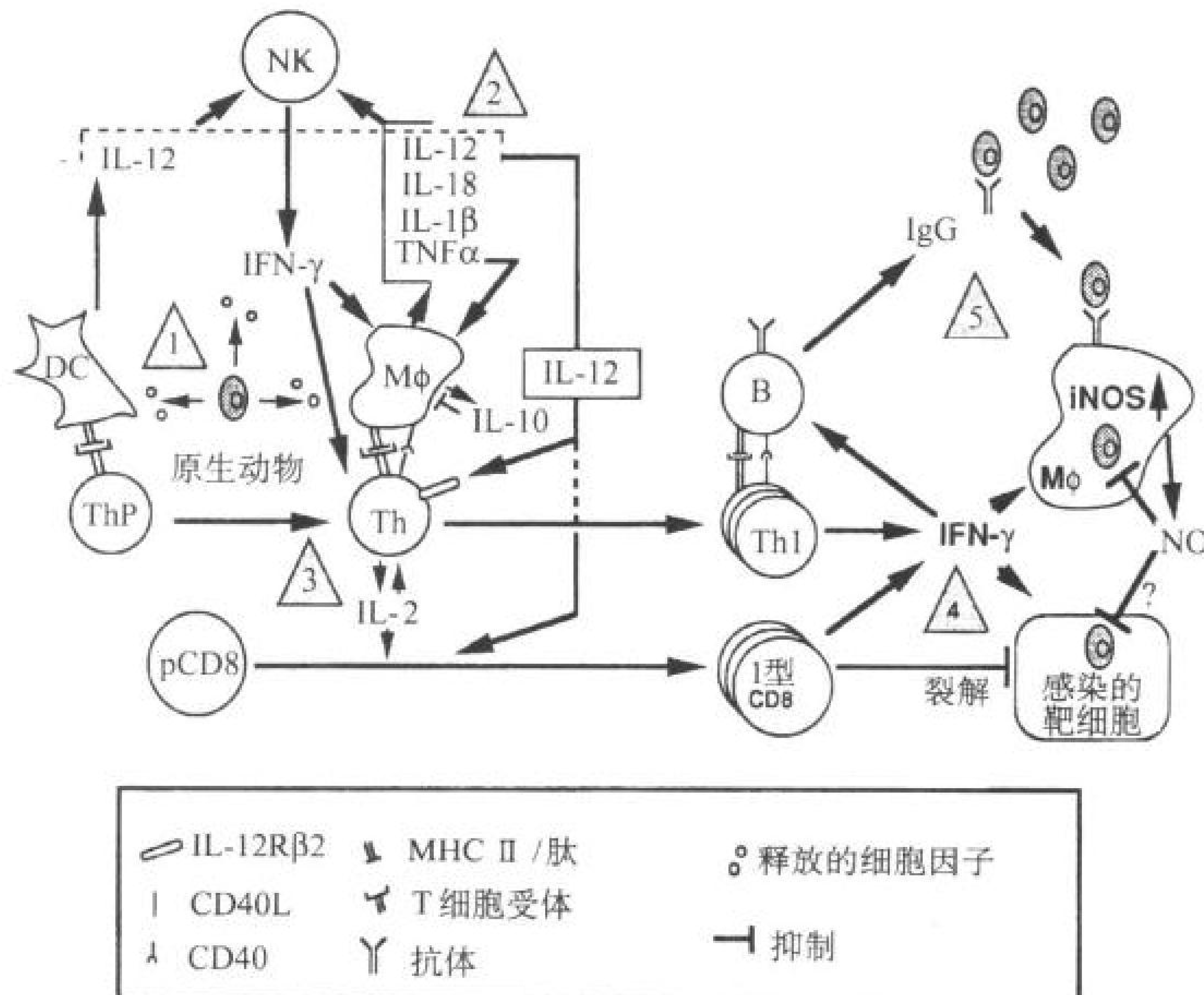


图 38.1 在原虫感染过程中Ⅰ型应答的诱导和效应功能。第一步:感染早期,寄生虫和(或)其所释放的分子可以激活树突细胞和(或)巨噬细胞或中性粒细胞来产生 IL-12 和其他一些前炎症因子。第二步:这些细胞因子激活 NK 细胞生成 IFN-γ,而后者可以进一步促进更多的 IL-12 生成,并与 TNF-α 一起共同上调巨噬细胞中的 INOS(一氧化氮合成酶,NOS),可能还有其他细胞参与了这个过程。NO 和其他活性氮中间产物共同作用控制寄生虫的生长。也合成其他如 IL-10 和其他可能引起下调的细胞因子来防止前炎症因子的过度合成,第三步:在富含 IL-12 的环境中,抗原呈递给 Thp 细胞启动了向 Th1 表型的一个 STAT4 依赖性分化步骤(第 26 章)。IFN-γ 在分化的 T 细胞维持 IL-12Rβ2 的表达。使得它可以接受到来自 IL-12 的信号。由效应 T 细胞产生的 IL-2 作为自分泌生长因子,这种生长因子不但可以促进 pCD8 细胞也可以促进 NK 细胞的激活。激活的 Th 细胞表达 CD40L 并通过 CD40L-CD40 之间的相互作用,可以直接激活巨噬细胞生成 IL-12,这样就可以加强Ⅰ型应答,IL-12 也促进 CD8 前体细胞分化成Ⅰ型 CD8 细胞。第四步:在适应反应形成后就到了感染的后期阶段,Th1 细胞和Ⅰ型 CD8 细胞通过制造更多的 IFN-γ,利用生成的如 NO 等媒介可以激活巨噬细胞和其他细胞来控制寄生虫的生长,Ⅰ型 CD8 细胞也可以对感染细胞具有细胞毒作用。第五步:B 细胞对寄生虫抗原起反应并能从 Th1 细胞得到帮助(或Ⅰ型 CD8 细胞),产生抗体,这些抗体就可以具有补充固定和调理作用,将寄生虫定为巨噬细胞的目标以进行内吞和消灭。

保护性Ⅰ型应答

原生动物

1273

保护性Ⅰ型应答的原型是在小鼠模型中抵抗硕大利什曼原虫。在它们的哺乳类宿主中,所有的利什曼属原虫作为分裂的无鞭毛体,生活在巨噬细胞的溶酶体内。这种疾病通过沙蝇的叮咬而进行传播,而寄生虫正是在沙蝇体内从无鞭毛体发育为前鞭行体,进而进行分裂、分化,从而对哺乳类动物具有感染性。

在实验中,前鞭毛体可以生长在培养组织中,通过注射启动感染。在所有株系的小鼠中,硕大利什曼原虫可以引起一种不同程度的早期损伤。在耐受性小鼠中,损伤就可以消除,目前的研究证据表明这种效应是γ干扰素(IFN-γ)引发的巨噬细胞的激活引起的。而 IFN-γ 最先是由 NK 细胞然后是由 Th1 细胞[9~12]产生的。

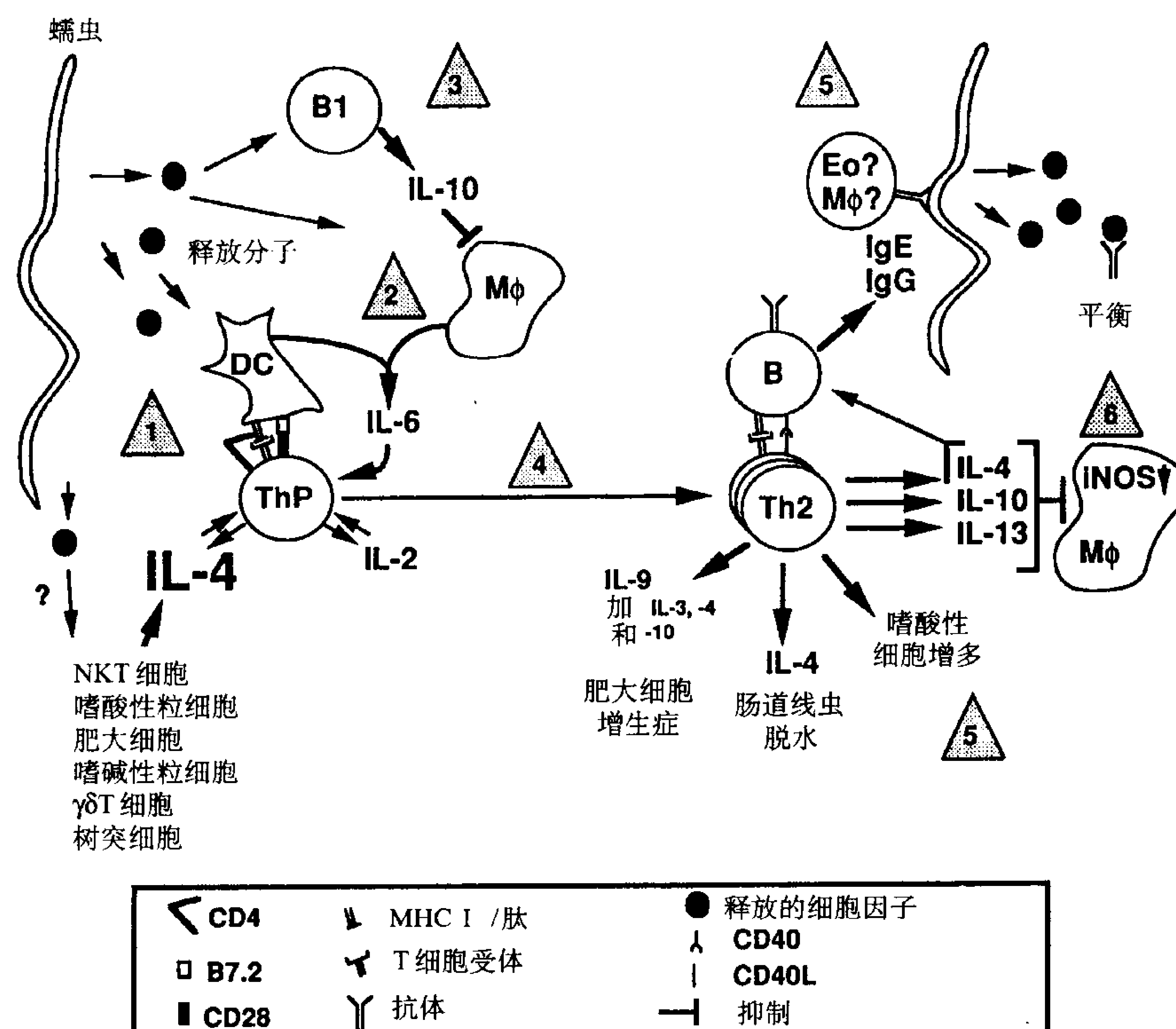


图 38.2 Ⅱ型免疫应答在寄生虫感染时的诱导和效应功能。第一步：寄生虫抗原被呈递给特异性的 pTh 细胞，它可以使 IL-4 本身或由来自其他细胞的 IL-4 所激活。本图列出了产生早期 IL-4 的各种细胞类型。第二步：由 ThP 细胞产生的 IL-4 可以被巨噬细胞和(或)树突细胞源性 IL-6 所激活。第三步：寄生虫抗原刺激通过树突细胞或巨噬细胞不能产生 IL-12，这可能是因为寄生虫在某些情况下通过 B1 或其他细胞诱导快速 IL-10 生成。另外，寄生虫可以促使 B7-2 上调快速，这可以加强Ⅱ型反应的形成。第四步：IL-4 以 STAT6(第 26 章)和 CD4 依赖性方式促进 ThP 细胞向 Th2g4 表型分化，随后引起 IL-12Rβ2 下调，因而可减弱对 IL-12 的反应并巩固 Th2 反应的结果。第五步：Th2 细胞群所形成的一系列反应在某些特殊情况下可以起到保护作用。第六步：除了促进抗寄生虫效应功能外，Ⅱ型反应也在限制由巨噬细胞介导的Ⅰ型炎症反应方面具有重要的作用。

当 CD4 或 CD8 细胞缺乏的小鼠受到感染后，CD4T 细胞的中心作用是很明显的。这样，主要组织相容性抗原(MHC)Ⅱ类敲除小鼠不能控制硕大利什曼原虫引起的感染[13]，而 β_2 微球蛋白$^{-/-}$小鼠对于感染的愈合能力与其野生型小鼠相似。人们对 MHCⅡ类敲除的小鼠的研究还不够多，但是有点矛盾的是在 MHCⅡ类敲除的小鼠感染利什曼原虫后，损伤发生被大大的延迟了[15]。后来的研究发现，T 细胞不仅在作为效应器(Th1)或抑制剂(Th2)方面有重要作用，而且在一些利什曼原虫种属感染中，T 细胞可以起到促进炎症巨细胞向寄生虫侵入部位聚集的作用。

最终控制利什曼原虫生长的分子是活性氮中间产物，后者通过 IFN-γ 的激活感染的巨噬细胞内 iNOS 而生成[16]。IFN-γ 在损伤的消除中具有重要作用，例如，无论是 IFN-γ[17] 还是 IFN-γ 受体[18] 敲除后的小鼠都可以控制寄生虫复制。与之相似，将正常情况下具有抵抗力的小鼠 iNOS$^{-/-}$ 基因破坏后就可以引起对寄生虫易感的表型[19]。而且，用 iNOS 抑制剂 L-N6 亚氨乙基赖氨酸(L-NIL)对小鼠延长治疗时间后就可以导致易感性[20]。有趣的是，当抑制剂应用于清除自身感染的耐受性动物后，损伤就可以重新出现并且寄生虫重新生长[20]。这就有力地支持对利什曼原虫感染的免疫并不是无菌的，它还依赖于由 iNOS 依赖性机制对寄生虫进行持续的控制。但是寄生虫在具有抵抗力的动物体内是怎样持续存在还不清楚，可能是由于利什曼原虫

1274

存在类似弓浆虫包囊较长的静息期。

由激活的巨噬细胞对 iNOS 的上调和随后的 NO 的生成在许多系统中被认为是 TNF-α 依赖性的[21,22]。然而，现在已经很清楚在硕大利什曼原虫感染的细胞中，NO 可以以非 TNF 依赖性的方式生成，这是因为源自 TNFRI 小鼠激活的巨噬细胞，可以生成 NO 并杀死利什曼原虫[23]。这种发现的一种解释是，在这些动物中巨噬细胞的激活存在着不同的第二信号传导。TNF 信号传导替代物可能是 CD40，这可以通过连接 CD40 配体和（或）类似于脂多糖（LPS）的寄生虫免疫调节分子而发挥作用（下面将会单独讨论）。有趣的是在对 TNFR 基因敲除的动物的研究时发现，损伤恢复中 TNFRI 有不依赖于寄生虫杀伤的重要作用[23]。正常情况下，C57BL/6 小鼠在接种的部位出现损伤随后就会消除。一旦愈合后就很难再从损伤部位对寄生虫进行培养（即使预先给予动物 iNOS 抑制剂也不行）[20]。在 C57BL/6TNFRI$^{-/-}$ 小鼠中，寄生虫的清除与在 WT 小鼠应用了相同的动力学，但是损伤恢复还没有发生。对损伤部位的细胞组成分析发现主要是白细胞。这种现象的一种解释是在正常损伤的恢复过程中，TNF 诱导的凋亡在促使寄生虫抗原特异性 T 细胞死亡过程中具有非常关键的作用，但是基因敲除动物中就不存在这种功能。

1275

克氏锥虫如同利什曼原虫一样，也是由嗜血昆虫叮咬传播引起的一种细胞内寄生虫。在哺乳动物宿主中，克氏锥虫可以侵入许多不同类型的有核细胞中。而且一旦进入到细胞内它就能留下 *parasitophorous* 空泡并进入细胞质中。这可以使它处于合适的亚细胞环境中，使其通过Ⅰ类途径[24]对抗原进行处理，这意味着感染将会导致 CD8 细胞反应产生。研究发现，CD8 细胞很可能具有保护作用，Ⅰ型缺陷小鼠（$\beta_2m^{-/-}$ 和Ⅰ类$^{-/-}$）对感染非常敏感就可以说明这种情况[25,26]。而且，尽管抗原特异性溶细胞 CD8 细胞是在感染过程中产生的，也可能是这些细胞产生的 IFN-γ 而不是经典的穿孔素和颗粒酶介导的细胞毒性在保护性作用中起主要作用，这是由于进入到感染小鼠的 IFN-γ 或中性 mAb 抗 IFN-γ 分别导致感染减轻或加重[27]。NO 是 IFN-γ 诱导的效应分子[28]。Th1 细胞和抗体也可以参与控制克氏锥虫感染，前者通过产生 IFN-γ，也可能为 CD8 细胞提供 IL-2，而后者是通过抑制寄生虫在细胞之间扩散发挥效应的[26]。在急性克氏锥虫感染时，NK 细胞也可产生 IFN-γ[29]。抵抗克氏锥虫的Ⅰ型应答的重要性的认识是基于发现对感染高度敏感的小鼠品系可以通过 IL-10 单抗处理而赋予更高的抗性。

顶虫寄生虫是具有独特细胞器的胞内寄生虫，在入侵细胞过程中发挥重要作用，并对Ⅰ型免疫应答敏感。疟疾是由疟原虫引起的，毫无疑问是人类最重要的寄生虫病。它在人和蚊子之间传播。当蚊子叮人后，疟原虫处于孢子阶段，它可以随着血液回到肝中，在肝中快速侵入肝细胞中进行一系列的分裂后产生裂殖性芽孢，后者再次进入血液并侵入红细胞，在红细胞中产生更多的裂殖性芽孢，这样可以通过感染的细胞继续感染其他细胞；或者到配子阶段，这时如果再次被蚊子吸入、融合并启动生命周期的性阶段，最终产生芽孢。这种复杂的生命周期涉及在两种不同的宿主细胞内的停留，其中之一是表达Ⅰ型（肝细胞），另一个（红细胞）中不表达；及其生活周期中几个很明确的细胞外阶段。这意味着可以有不止一种类型的免疫反应对控制疟疾感染很重要。例如利用抗体就可以有效地针对孢子和红细胞阶段（下面将进行讨论）。Ⅰ型细胞因子介导的反应可针对肝细胞内阶段，最明显的证据是，在用 *P. cynomolgi* 或 *P. yoelli* 处理前，IL-12 注射猴子或小鼠体内后两天，就可以完全防止感染的发生[31,32]。在小鼠模型中，这种现象被认为是由于 NK 细胞产生 IFN-γ 及肝细胞中 iNOS 上调引起的。NO 被认为寄生虫细胞内阶段的假想效应器[32]。肝细胞可以表达 iNOS[33]，因此推测 IFN-γ 直接作用于这些细胞诱导对寄生虫的效应反应。

Th2 细胞对血相的疟疾抵抗非常重要（见下），Ⅰ型反应在某些情况下也有作用[34]。例如，在正常敏感性 A/J 小鼠中，先注射 IL-2 然后暴露于 *P. chabaudi* 感染的红细胞中就可以导致寄生虫血症减弱，在某些情况下，提高了存活率，这种机制也涉及 Th1 细胞、IFN-γ、TNF 和 NO[35]。对 *P. chabaudi chabaudi* 从急性期到慢性血相感染 Th 反应的详细研究显示，由 NO 介导的Ⅰ型应答在早期的时相点很重要，但是在感染的后期，Ⅱ型反应、B 细胞和 IgG1 抗体对寄生虫的完全清除非常重要[36]。

对于生活在 *P. falciparum* 流行地区的人们来说，在证据表明他们在缓慢形成免疫力。这种以抗体为基础的特性在实验中证实血清是从成人传向儿童的。这导致了一个暂时但是却非常明显的寄生虫血症的减

弱[37]。一般认为,这种抗体作用被称为抗体依赖性细胞抑制(ADCI)效应,IFN-γ 依赖性 cytophilic IgG1 和 IgG3d 在供体血清中通过 FcR 与单核细胞或巨噬细胞结合,因此将信号传入从而产生 TNF-α,这就抑制了寄生虫的发育,但是这种效应的详细机制还不是很清楚。利用小鼠 *P. yoelii* 或 *berghei* 系统进行了相似的实验,在这种实验中来自感染动物的Ⅰ型反应相关的 cytophilic IgG2a,能够控制一种已存在的感染或防止新的感染[38,39]。

鼠弓形体是一种定期收缩的顶虫,在大多数个体中是一种易控制的长期的感染。但是对于那些患有 AIDS 的感染个体,必须进行长期的化学治疗以防止致命性复发[40]。由于它们可以生活在很多的脊椎动物体内(并不严格限制于哺乳动物),而且可以生活在任何有核的细胞中,因而是一种很不平常的寄生虫。与 *T. cruzi* 不同的是 *T. gondii* 生活在宿主有膜包裹的细胞器内(elbeit much modified[41]),从免疫学角度来说,那些比较强壮的宿主(猫是这种寄生虫惟一限定的宿主,这里将不进行讨论),寄生虫感染是慢性的或者将寄生虫包裹在肌肉和中枢神经系统(CNS)组织里。IFN-γ 和 TNF-α 依赖性免疫压力,很可能通过生成 NO 来体现(见下),维持机体处于相对良性状态。单克隆抗体(mAb)介导的对这些细胞因子的中和效应导致寄生虫出现、侵入周围组织和播散[42,43]。就像未控制鼠弓形虫感染的 AIDS 的患者一样,经过这种处理的动物死于鼠弓形虫脑炎。仔细检测针对寄生虫感染的免疫反应表明,CD4 和 CD8 细胞是抵抗感染所必需,这是因为缺陷这些细胞的小鼠死于感染的慢性阶段[44]。资料表明 CD8 细胞是效应细胞,而 CD4 细胞起一种辅助的作用(很可能为 CD8 细胞提供了 IL-2)。而 CD8 细胞具有对鼠弓形体感染细胞的溶细胞作用已经得到了证实[45,46],体内的这种细胞的保护性作用表现并不是因为直接的细胞毒性,如穿孔素$^{-/-}$小鼠与 WT 小鼠一样对于感染具有耐受性[47]。另外,CD8 细胞通过分泌 IFN-γ 发挥保护性作用[48];这是 CD8 细胞对疟疾和 *T. cruzi* 抵抗最小的回忆作用。

体外研究表明 NO 是一种针对 *T. cruzi* 的主要的效应分子。因为通过 IFN-γ 激活对寄生虫的杀伤效应能被 iNOS 抑制剂所阻抑,从 iNOS$^{-/-}$ 小鼠来的巨噬细胞不能控制寄生虫的感染[50]。然而经过急性感染期、存活至感染晚期的小鼠,正是在这个时期寄生虫到达了大脑并被包裹起来[50]。这个发现可以推出两个结论:首先,一种 IFN-γ 依赖性、iNOS 非依赖性机制负责在感染起始阶段控制寄生虫。对感染部位浸润的细胞类型检查表明有大量的粒细胞成分。利用针对中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的抗体对其进行破坏后发现,小鼠对感染的敏感性大为增强,这就有力表明这些细胞具有早期保护性反应[50,51]。利用 IL-5 耗竭的具有可以控制早期感染的动物的进一步研究表明,抗粒细胞抗体是通过耗竭中性粒细胞而不是嗜酸性粒细胞来减少免疫力的[50]。从这个实验中得到的第二个结论是,脑内的一些细胞类型(很可能是类似巨噬细胞的微神经胶质细胞)利用 iNOS 来控制寄生虫。正如在利什曼原虫系统中一样,这种 iNOS 产物并不要求 TNFR 传导信号[52]。有趣的是,在人类中,IFN-γ 还可以通过耗竭细胞内自由色氨酸(一种鼠弓形虫生长所需的必需氨基酸)杀伤寄生虫感染的非巨噬细胞(如纤维细胞)[53]。

通过预先暴露于无毒性的 RH 株(LD50,一种寄生虫)可诱导对高毒性的 RH 株产生完全的保护效应,这种接种模型可解释Ⅰ型免疫反应对鼠弓形虫的抵抗性[54]。再一次,抵抗力表现为 CD8 细胞通过产生 IFN-γ 来介导[55]。在这个系统中,CD4 细胞对于由疫苗诱导的成功的免疫反应是必不可少的,但是对于控制感染,它们的作用可能是辅助而不是效应器[55]。有趣的是在这种模型中,NK1.1^{+} CD4^{+} T 细胞(NK T 细胞)可以做为Ⅱ$^{-/-}$级小鼠[56] Th 细胞的替代对 CD8 细胞进行辅助[57],在MHCⅠ缺陷的 $\beta_2m^{-/-}$ 小鼠中,NK 细胞可替代 CD8 细胞产生 IFN-γ。

其他通过口-肛途径传播的但又与鼠弓形虫不同的顶虫,如隐孢子虫属和艾美球虫属,仍然存在于小肠黏膜中而且在正常情况下并不扩散。在这些属的寄生虫中,在兽医学上具有重要意义,*C. parvum* 也是一种人类的病原体。至于鼠弓形虫,Ⅰ型反应在这些寄生虫的感染的控制中具有重要的作用,IL-12 的作用是促进了针对隐孢子虫属[58]的保护性免疫反应的诱导,CD4 细胞和 IFN-γ 对这两种病原体的保护性反应都是发挥关键作用的效应分子[59~61]。

1276

寄生虫

针对寄生虫感染的Ⅰ型宿主保护性反应文献中描述最多的例子是血吸虫病曼蚊属减活疫苗,下面将会详细地进行讨论。进一步的针对寄生虫的Ⅰ型反应的证据来自于对生活于旋盘尾丝虫流行区域的研究。丝虫是由嗜血的蚊子传播的,而蚊子不受感染。与开放性感染患者的 PBMC 相比,来自这些个体的外周血单核细胞(PBMC)通过生成较少的 IL-5、IL-10 和更多的 IFN-γ,对旋盘尾丝虫抗原产生应答。

过度或病理性Ⅰ型应答

随着我们对寄生虫和免疫系统之间的关系的研究越多,我们越来越清楚地认识到,在有效的保护性免疫反应和引起的损伤之间存在着一个很好的平衡。事实上,在这些寄生虫感染的原因中,还不清楚是发病率与寄生虫直接相关还是未控制免疫系统反应的结果。现在人们发现寄生虫感染后,在某些不适当的条件下似乎Ⅰ型和Ⅱ型反应可以启动对组织损伤。

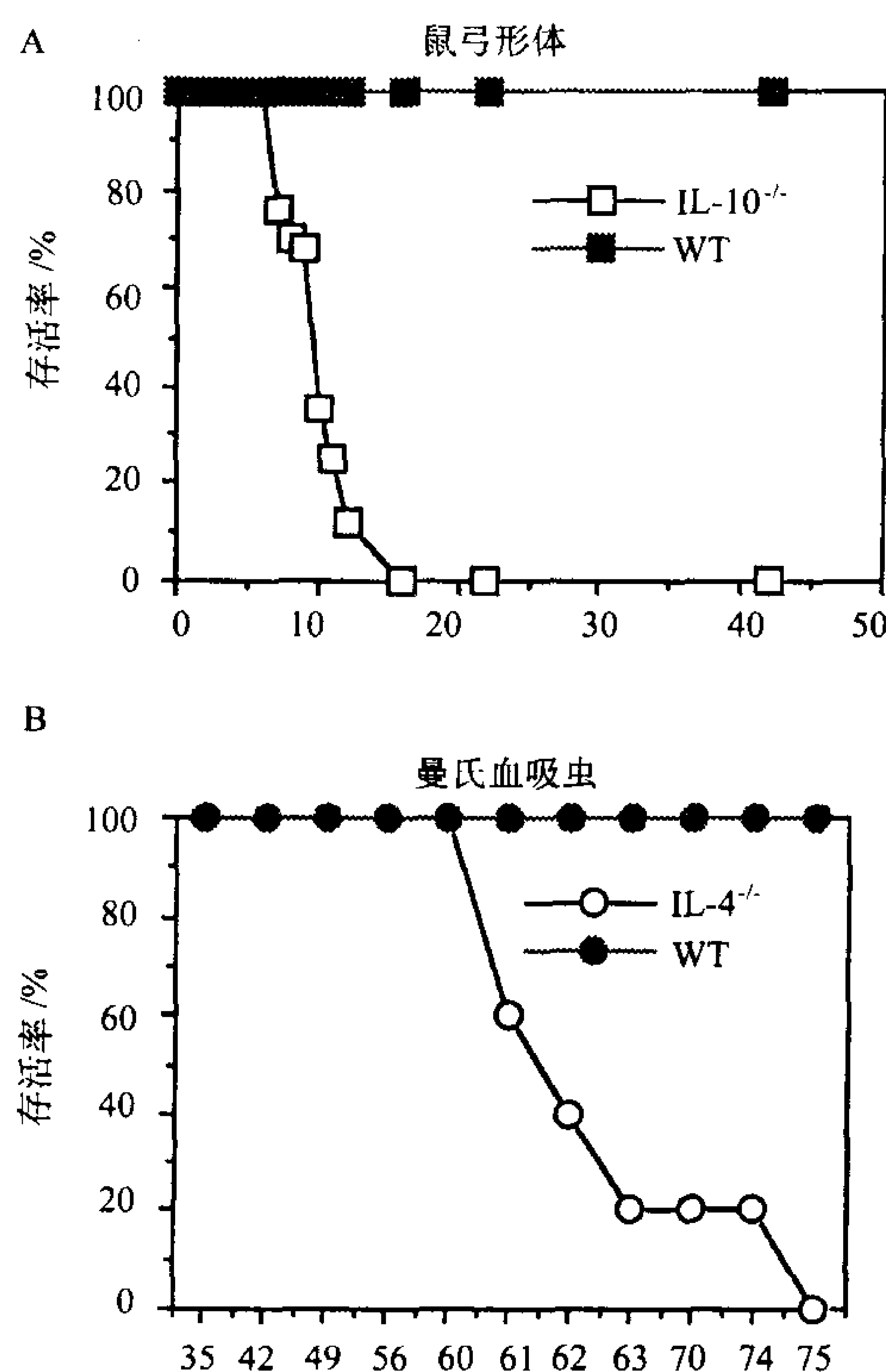


图 38.3 原生动物和寄生虫感染疾病时Ⅱ型细胞因子的抗炎作用。A:C57BL/10WT 或 $IL\text{-}10^{-/-}$ 小鼠分别用 10~20 个 *T. gondii* ME-49 株感染。WT 小鼠感染后未死亡,$IL\text{-}10^{-/-}$ 小鼠死于感染的急性期。死亡的动物并无大量的寄生虫繁殖的证据,但是它们却出现了强烈的组织病理变化。B: C57BL/IOWT 或 $IL\text{-}4^{-/-}$ 小鼠分别用大约 30 个血吸虫尾虫蚴感染,在感染程度上,尽管用了相同的剂量,WT 小鼠全部存活,而 $IL\text{-}4^{-/-}$ 小鼠出现恶病质并最后死亡。在两种感染中,存活率的降低与前炎症介质表达水平的升高相关。(摘自参考文献[68]、[127]。)

原生动物

现在已经没有人怀疑Ⅰ型反应对鼠弓形虫具有保护性作用,研究显示 IL-12[63~65]、IFN-γ、CD4、CD8、NK 细胞及iNOS,都在介导几种不同模型系统中宿主抵抗力具有决定作用(见上)。但是在自然感染途径中,即口服包囊引发感染的小鼠,人们发现未调节的Ⅰ型反应易在肠中引起致死性炎症反应。这种情况尤其是在比较鼠弓形虫的 ME49 株感染 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠的结果中得到了很好的证明[66]。当大剂量的经口给予包囊后,C57BL/6 小鼠产生了一种强烈的Ⅰ型反应和回肠严重的炎症反应,这种反应可以被 mAb 防止,主要是因为它中和了 IFN-γ。相反,感染的 BALB/c 小鼠的Ⅰ型反应明显减弱,因而避免了肠损伤。IL-4 和(或)其他抗炎细胞因子很可能在控制Ⅰ型反应的范围方面存在一定的作用,这是因为在抵抗经口感染的小鼠株中,缺乏功能性IL-4基因导致死亡率增加[67]。有趣的是,在后一种情况下,这些小鼠经历急性肠道疾病而未死亡的 $IL\text{-}4^{-/-}$ 小鼠随后就会出现脑病理变化减少和寄生虫负担减轻[67]。因为 iNOS 对于鼠弓形虫在中枢神经系统中的感染的控制具有决定作用[50],很可能在 WT 小鼠中 IL-4 的功能是抑制 NO 的生成,因而增加了寄生虫在脑内的负担。在病原体引起的感染时内源性抗炎因子(具有很强的促进Ⅰ型反应的作用)的生成的重要性在 $IL\text{-}10^{-/-}$ 小鼠的实验中得到了进一步证实,在这些动物中,与 WT 小鼠相比,鼠弓形虫[68](图 38.3A)和克氏锥虫[69]增强了Ⅰ型细胞因子的生成并增加了死亡率。在经口接种鼠弓形体后,组织损伤系统地发生并伴随着严重的肠炎反应,即使给予小剂量的接种也出现了同样的结果。在另一个原生动物感染中,由 *E. vermiformis* 引起的感染中,肠炎反应在 $\delta^{-/-}$ 小鼠明显加重,由于这种小鼠缺乏 γδT 细胞,很可能由于Ⅰ型 αβT 细胞反应(它控制寄生虫的数目)在缺乏适当的调节时变成了病理

性免疫作用,这可能意味着 $\gamma\delta$ T 细胞在产生控制小肠炎症的细胞因子方面具有一定的作用[70]。

1277

在缺乏调节性Ⅱ型反应时的Ⅰ型细胞因子对控制脑内弓形虫属感染是理想的和非病理性的。与之相比,TNF-α 的生成和大脑疟疾(CM)的病情严重性有更强的相关性。这也是非洲撒哈拉儿童感染疟疾死亡的主要原因,受到寄生虫感染的红细胞黏附于脑内血管的后毛细血管内皮细胞上,这种过程可以导致酸中毒和局部循环血流减少[71,72]。在 CM 患者中,血清高 TNF 水平是死亡的预兆[73],TNF-α 启动子的多态性与 CM 的易感性有关。人们推测升高的 TNF 水平导致脑内 NO 水平增加,这可能是严重患者特征性昏迷的原因[74]。在某些株感染了 ANKA 株 *P. berghei* 的小鼠中,可能出现 CM 一样的条件,即脑内毛细血管和小静脉被白细胞阻塞,中和了抗 TNF 的 mAb 后就可以防止死亡的发生[75]。这些资料都强烈支持 CM 时 TNF 的作用[76]。

在与鼠弓形虫和克氏锥虫感染类似的条件下,IL-$10^{-/-}$ 小鼠也显示对 *P. chabaudi chabaudi*[77] 的敏感性增加。而Ⅰ型反应在控制这种寄生虫感染的早期有一定的作用。它们通常下调而 Th2 起作用,这样就控制了后来的血相感染。然而在 IL-$10^{-/-}$ 小鼠中Ⅰ型反应持续存在并导致内毒素休克样表现,则是一种致命的表现[77]。

肠虫

研究表明,Ⅰ型反应在寄生虫感染可能引起严重疾病。丝虫感染(班克罗夫特氏吴策线虫,马来布鲁格丝虫和 *B. timort*)可以导致一系列条件的改变,如丝虫(微丝蚴)出现在血液中,但未出现与生活在淋巴细胞中的成虫相关的严重的病理学反应,最严重的一种慢性淋巴细胞性病理反应是象皮病。对来自这两种感染患者的 PBMC 分泌的细胞因子的研究表明,IFN-γ 和严重的病理学改变之间及Ⅱ型细胞因子与微丝蚴生存条件之间呈明显相关[78]。

Ⅰ型反应介导的严重疾病也在血吸虫感染的患者中出现。血吸虫病是感染人类的血吸虫属中研究得最为广泛的一种,它生活在肠系膜静脉中并可迁移到邻近的组织并产卵。通过一个免疫依赖性过程,卵通过小肠壁进入肠腔,从肠腔分泌后就可以进入另一个生活周期[79]。然而更多的卵被血液带走并被输送到肝。在那里根据它们的大小而分布在肝窦中。卵可以释放具有高度抗原性的分子,极大地促进了 Th1 反应的产生,后者再引起卵周围各种中性粒细胞聚集[80,81]。大部分($>90\%$)的感染个体生活在血吸虫病流行的地区并不感染血吸虫病。然而小部分感染个体有危及生命的肝脾肿大[82],资料表明,这种现象与在体外抗原刺激后 PBMC 促使 TNF 和 IFN-γ 产生的能力相关,而来自低发病率患者 PBMC 产生了少量Ⅰ型细胞因子和高水平的 IL-5[83]。在这种感染中,如同淋巴细胞微丝蚴一样,它们均表明Ⅱ型反应的根本作用在于调节前炎症Ⅰ型反应。对来自血吸虫或微丝蚴感染的 PBMC 及血吸虫感染的脾细胞产生的细胞因子的分析表明细胞可对抗原的出现产生应答,生成 IFN-γ,但是其产生细胞因子的能力受其他细胞因子如 IL-10 的调节[84~86]。

保护性Ⅱ型应答

原生动物

体液抗体在对原生动物的免疫清除中具有主要的作用,在大多数的原生动物感染中很难明确 Th1 和 Th2 在保护性作用中分别具有的作用。一种情况是 Th2 反应很明确地在小鼠感染 *P. chabaudi chabaudi* 对宿主抵抗发生具有作用。在这种模型中,Th2 和 B 细胞通过与 IgG1 型抗体合作针对寄生虫感染后期的红细胞进行保护[36]。对于为什么这种同种型抗体倾向于介导抵抗还不明确,但是正如上面所提到的,在 *P. yoelii* 感染的不同小鼠模型中,发现 Th1 依赖性 IgG2a 抗体具有保护性作用。

1278

蠕虫

寄生虫的不同在于在大多数的情况下它们均可以诱导强烈的Ⅱ型反应。这当然与人们长期以来认识到的嗜酸性粒细胞、升高的 IgE 及寄生虫之间关系相一致。尤其对于肠道寄生虫Ⅱ型反应的成分对于感染的抵抗具有非常重要的作用。在这个方面已经对一些寄生虫进行了相当仔细的研究：鼠鞭虫是小鼠的自然寄生虫并与人类密切相关的鞭虫；*Heligomosoides polygyrus*，旋毛线虫及钩虫，*Strongyloides stercoalis* 都是小鼠的十二指肠寄生虫。读者可以通过由 Finkelman 及其同事们写的综述进一步了解[87]。

无论是 *T. mnris* 还是 *H. polygyrus* 都是通过口-肛途径进行传播而不需要中间宿主，并可以引起小鼠的慢性感染。在前一种寄生虫中不同的小鼠株对于感染的敏感性是不同的，其中一些株的小鼠仅在暴露后不久对寄生虫短暂的抵抗力，而其他(AKR)可以形成一种更长期的感染[88,89]。这种感染的遗传控制表明，人类对于十二指肠寄生虫的敏感性有很大的不同。在本质上，不同的近亲杂交的小鼠株被认为代表不同的个体[90]。在这个系统中，抵抗性小鼠表达Ⅱ型反应，而敏感性小鼠表达的是 Th1 反应[91]，而且 IL-12 引起了Ⅱ型保护性反应向诱导感染的Ⅰ型反应的转化[92]。大多数的小鼠株对原发性 *H. polygyrus* 感染都很敏感，但是对于随后的药物清除动物却表现了强大的Ⅱ型反应并对二次感染具有高度的抵抗力。无论对于 *H. polygyrus* 和 *T. muris* 来说，CD4 细胞是免疫的诱导和表达所必需的[93,94]。IL-4 可以治疗原发的 *H. polygyrus* 和鼠鞭虫感染[91,95]，抗 IL-4R 可以阻断对两者的抵抗力[91,96]。IL-$4R^{-/-}$ 小鼠不能抵抗 *H. polygyrus*[87] 或原发性鼠鞭虫感染[97]。研究发现，将正常抵抗株小鼠 IL-13 基因的破坏可以引起对 *T. muris* 敏感，否则就可以引起一个正常的Ⅱ型反应。这表明早期发现抗 IL-4R 的 mAb 阻断寄生虫清除很可能是 IL-13 而不是 IL-4 与受体结合的抑制结果[97]。尽管 IL-4 可以引起来自重度联合免疫缺陷联病(SCID)或 CD4 细胞耗竭小鼠(它在正常情况下不能清除通常短生命周期的 *N. brasiliensis* 寄生虫)中 *N. brasiliensis* 寄生虫的清除[95]，很清楚它控制了过多的保护性机制，如同抗 IL-4 mAb 处理的小鼠对感染的抵抗力与 WT 动物一样[98]。抗 IL-4R 处理使得小鼠感染 *T. spiralis* 成为可能[87]，这表明 IL-13 也可能在宿主抵抗感染方面有一定的作用。

现在人们期望可以将这些从各种实验系统中得到的研究结果向外推论，表明对于肠线虫的抵抗力有赖于 Th2 介导的反应，但还不清楚 Th2 反应事实上是怎样起到保护作用的。最简单的解释(也是许多年前的一种推测)是在暴露于 IL-4[99](和在适当的条件下其他非依赖性信号，很可能是 CD40L)后 B 细胞产生的同种型抗体 IgE，是针对小肠寄生虫的保护性因素，在利用多种小鼠模型经过大量的研究后认为，可能被 infute 或至少得到了一点直接证实。但是在这方面也存在着宿主种属的差异，因为在小鼠中快速清除(对 *T. spiralis* 第二次感染的快速排斥)可以通过 IgG 转移给幼年动物[101]。IL-4 是怎样介导针对胃肠线虫的保护性反应到目前为止尚不得知。在未感染小鼠中 IL-4 对小肠有很强的生理作用，可以引起蠕动减少[102]，增加小肠通透性并减少液体及葡萄糖吸收，这些效应很大程度上是 T 细胞和巨细胞依赖性的[87]。其净效应是增加小肠液体的容量，这种现象对寄生虫排斥的作用还需进一步研究。

嗜酸性粒细胞的数目升高通常与寄生虫感染相关，其生成和激活是由Ⅱ型细胞因子 IL-5 刺激的，并受抗 IL-5mAb 抑制[103,104]，并未发现它对于 *T. muros*，*H. polygyrus*[96]，*N. brasiliensis*[103] 及 *T. spiralis*[105] 感染具有任何保护性作用。但是在利用嗜酸性粒细胞缺陷抗 IL-5mAb 处理小鼠和(或)IL-5Rα 链敲除动物和来自 IL-5 转基因小鼠(其循环血液中的嗜酸性粒细胞水平很高)的证据表明：嗜酸性粒细胞对于针对 *Strogyloides* 种属[106,107]和 *Angiostrongylus cantonensis*[108,109] 组织侵入性幼虫具有保护性免疫反应。而且有来自小鼠和人类的许多资料表明，嗜酸性粒细胞在血吸虫病[110~112]保护性反应(大肠不肿胀)有一定的作用。尽管 mAb 抗 IL-5 处理和/或 IL-$5^{-/-}$ 小鼠可以对这种寄生虫形成免疫力[113,114]，这也进一步表明宿主种属差异。总的说来，尽管目前有一定说法，但研究结果并不强烈支持嗜酸性粒细胞对寄生虫免疫有独立作用。

由肠寄生虫诱导的Ⅱ型反应的效应，是增加了 IgG 生成和肠肥大细胞增生[87]。IgG 可能在对 *T. spiralis*[115] 和 *H. polygyrus*[116] 免疫中具有一定的作用，但是它在其他肠寄生虫感染中并无明显的作用。参与 IL-4 对肠的生理效应[87]的肥大细胞，在对 *H. polygyrus* 的免疫中具有重要的作用，这是由于以小鼠的干细胞因子

(SCF)(一种非 T 细胞获得性细胞因子)mAb 对或 c-kit 进行处理后,其受体(两者均在肥大细胞发育中具有重要的作用)就不能清除寄生虫[117]。在近来的实验中,这种处理对于 CD4 反应没有作用,而且一旦 mAb 处理停止以后,寄生虫就可能被清除。将这些资料与其他一些发现一起考虑就会发现,CD4 细胞依赖性反应与 SCF 相互协作来促进肥大细胞反应,而后者介导了寄生虫的清除。CD4 细胞产生的几种细胞因子包括 IL-3、IL-4[118]和 IL-9[119]都与肥大细胞增生有关。与此一致,当利用转基因方法对 IL-9 进行高水平表达时,就可以使小鼠对 *T. spiralis* 的清除比正常小鼠快许多[120]。而且,这些小鼠表现出较强的 Th2 反应,这就提醒人们,可能是来自肥大细胞的 IL-4 可以反馈增强 ThP/Th2 的分化[120](如同来自血吸虫感染的小鼠嗜碱性粒细胞的 IL-4[121])。

1279

除了对肠道寄生虫的免疫之外,越来越多的流行病学证据表明,Ⅱ型反应尤其是以抗原特异性 IgE 形式介导了对血吸虫感染的抵抗力,在血吸虫流行区域随着年龄而血吸虫的感染也会增加[122~124]。尽管对于 IgE Ab 介导的精确保护性机制还不清楚,但是它们可能是与嗜酸性粒细胞或巨噬细胞协作以 ADCC 机制起作用的[125]。来自比利时的资料与这种设想大概一致,它表明抵抗感染的能力受到一个主要基因的影响,这种基因位于编码Ⅱ型细胞因子 5 号染色体的某个区域[126]。

研究也指出,Ⅱ型反应在控制血吸虫反应中具有重要作用,它与虫卵通过肠道壁有关[127]。这种过程涉及穿过黏膜上皮,这样就可能出现细菌转移并增加了接触细菌毒素的机会。在 C57BL/6IL-4$^{-/-}$小鼠,这种小鼠缺乏 Th2 反应。感染导致严重的发病率,其特征是恶病质,它可以导致死亡[127]。(图 38.3B)。这些动物表现的小肠病理学改变比通常所提到的 WT 小鼠更严重。如果用中和抗体对 TNF 进行中和,发病率也可以在这些动物中得到部分的缓解,疾病的严重性与体外 LPS 激活脾细胞产生的 NO 水平有关。这些资料表明,IL-4可能还有其他Ⅱ型抗炎因子如 IL-10、IL-13 通过抑制内毒素诱导的 TNF 和 NO 生成而控制肠道感染。这样在这两种小鼠和人类感染血吸虫病者,Ⅱ型反应的恶化和Ⅰ型反应的加强与发病率增加有关[83,127]。

过度或病理性Ⅱ型应答

原生动物

在巨噬细胞或树突细胞受到利什曼原虫感染后,宿主细胞被杀死后寄生虫可以感染同一系统的其他细胞。一些利什曼原虫种属的寄生虫有一定的倾向性,这可能与其需要适当的生长温度、所转移的内脏器官有关,当转移到内脏器官后就可能引起比其他部位如皮肤更为严重的疾病[128]。正如上面所讨论的,利什曼原虫属在人类和大部分的 WT 小鼠株中引起消退型皮肤利什曼病。但是在 BALB/c 小鼠中感染并不转移到皮肤,而是扩散到内脏并且具有致死性的[129]。在 20 世纪 80 年代末期进行的研究表明,对利什曼原虫的抵抗力与一种明确的 Th1 类似反应的形成有关[10,11],而 IFN-γ 作为主要的效应细胞因子在于,它具有激活巨噬细胞杀伤细胞内利什曼原虫的能力[9]。但是,BALB/c 小鼠可以在感染后形成强烈 Th2 反应,而且在很大程度上是由于缺乏巨噬细胞激活Ⅰ型细胞因子(IFN-γ),与巨噬细胞去活Ⅱ型细胞因子(如 IL-4,[130]),导致严重疾病。BALB/c 小鼠(而不是其他株的小鼠)在暴露于利什曼原虫后形成Ⅱ型反应的原因是,当用抗原刺激时来自 BALB/c 小鼠的初始 Th 细胞易产生 IL-4,而来自其他株的动物在其分化的这个阶段生成相对较少或者不生成 IL-4;而且与来自抵抗性 B10.D2 的小鼠初始 Th 细胞相比,它在激活的早期不能识别 IL-12[132]。

尽管抗 IL-4 治疗可以将 BALB/c 小鼠转化成愈合表现型的Ⅰ型应答[133],而且 IL-4$^{-/-}$ BALB/c 小鼠也得到了相似的结果[134],但是有一篇文章令人意外地发现,IL-4$^{-/-}$ BALB/c 小鼠对感染敏感[135]。这表明很可能有多种细胞因子与这种易感性有关。例如,*L. amazonensis* 感染在小鼠中并不消退,但是随后感染利什曼原虫后可以自行愈合,这并不是由于 IL-4 出现的缘故[136]。人们所认为的 IL-4 基因敲除小鼠的研究结果差异较大的原因在于利什曼原虫品系以及在研究中采用的剂量不同。在低剂量时,即使 BALB/cWT 小鼠也可控制利什曼原虫感染[137]。

很可能研究最广泛的与寄生虫相关的T细胞介导的损伤，是肝捕获血吸虫卵周围形成的肉芽肿。大量的研究资料表明，由卵诱导的主要的Th细胞反应是类Th2细胞反应，而且这也在肉芽肿的组成上得以反映，除了巨噬细胞、纤维母细胞和淋巴细胞外，这种肉芽肿含有大量嗜酸性粒细胞[138]。Th细胞对这种肉芽肿的形成起主要作用[139,140]，其他类型的淋巴细胞，包括B细胞[141]、CD8细胞[140,142]、NK T细胞[142]和γδT细胞[143]起次要作用。肉芽肿是病理性的，主要并不是因为在短期内引起肝功能衰竭，而是因为它们参加了纤维化，增加了门静脉压力，导致了门静脉系统分流的形成[144]。先用卵抗原接种以及IL-12来诱导卵特异性Th1反应，证实Th2细胞在这种病理性反应的作用，结果发现，与未接种的对照组相比，接种动物形成的肉芽肿较小，纤维化较轻微[145]。纤维化的减轻与Th2反应的减少和Ⅰ型细胞因子的生成有关。另外，抗IL-4 mAb处理的感染小鼠可使肉芽肿减小和纤维化程度减轻[146]。但对不同品系的IL-4$^{-/-}$小鼠实验并未观察到同样的结果[127,147]。值得注意的是，Th1细胞因子（IL-2、IFN-γ）也对于肉芽肿的形成有一定的作用，但是它们的作用似乎在反应的早期更为重要[80,148~150]。

尽管很清楚血吸虫卵肉芽肿是T细胞依赖性的，而且它们的扩散受到Ⅱ型细胞因子的强烈影响，免疫反应的其他方式也在肉芽肿的形成和调节具有一定的作用。特别应该指出的是肉芽肿病理性损伤有TNF-α的参与[151~154]。另外，其他化学因子MCP1[155]和通过CCR1受体家族传导的信号似乎在控制肉芽肿的形成方面具有一定的作用，但是一部分可能是通过间接对Th1/Th2的平衡进行影响完成的[156,157]。最后，B细胞缺陷的小鼠加剧了肉芽肿反应，在感染的后期也不能下调病理学反应[158]。缺乏FcγRI的小鼠有相似的表型表明，Ab介导的信号事件强烈影响肉芽肿反应[158]。

1280

尽管血吸虫卵肉芽肿可能很清楚地导致病理改变[81]，它们也具有一种重要的宿主保护性功能[159]。这种情况的最好解释是，观察到大部分感染的SCID小鼠（它们不能加剧肉芽肿反应）死于与肝俘获寄生虫卵相关的肝细胞坏死[151]。有人推测，与肉芽肿相关的慢性有害效应无论对于宿主还是寄生虫来说都是一种比寄生虫卵生殖开始后宿主即死亡的结果要好的选择，而宿主带病生存则是一种折衷方案。

河盲（river blindness）是由*O.volvulus*微丝蚴迁移到眼内引起的。由于小鼠对于这种寄生虫不敏感，因而是研究这种眼病免疫病理学的最好宿主，而且资料表明，Ⅱ型反应参与疾病的形成[160,161]。在所用的这个模型中，用从*O.volvulus*寄生虫的抽提物对小鼠进行皮下免疫，这种损伤可以引起很强的Ⅱ型反应，然后用相同的抗原对对眼基质进行刺激，结果发现，免疫小鼠形成了严重的CD4细胞依赖性角膜造影和新血管形成，这种情况可以通过抗IL-4mAb进行治疗，但是这种情况并不会出现在小鼠和IL-4$^{-/-}$动物中。

对寄生虫免疫应答的启动

效应选择

由于极化的细胞因子的诱导，利用寄生虫感染模型来研究Th1和Th2反应怎样在体内选择性被激活是很有意思的一件事。在Th1反应启动时，大部分的信息都来自于细胞内感染了利什曼原虫或鼠弓形体的实验。在这两个模型中，IL-12的早期诱导对于Th1依赖性宿主抵抗反应非常重要[162,164]。正如第26章所讨论的，这种关键性的细胞因子将内源性和适应性Ⅰ型反应联系起来，激活NK细胞来合成宿主保护性IFN-γ，同时直接促进内源性ThP细胞向Th1细胞分化[165]。由IL-12反应刺激的IFN-γ本身就是免疫调节剂，在对巨噬细胞和（或）树突细胞[167]进行正反馈以生成更多的IL-12从而抑制了Th2的增殖[166]。

这个研究领域的主要问题是，这些原生动物启动Ⅰ型反应诱导IL-12生成。激活的巨噬细胞通常被认为是细胞因子的主要来源，鼠弓形体是这些细胞体外[63]合成IL-12的刺激剂。然而，有趣的是，当利什曼原虫前鞭毛体入侵时，相同的巨噬细胞群并没有被激活以产生IL-12[168,169]。相反，细胞因子的合成却受到寄生虫的抑制[169]。另一方面，分析利什曼原虫感染部位的LN引流液的分析表明IL-12在感染后早期就生成了

(在不同品系的小鼠中动力学有所差异[163]),有可能 IL-12 不是来自于巨噬细胞而是其他一些细胞,其中很可能是树突细胞[170],或者在体外培养过程中巨噬细胞丢失了激活的信号。支持后一种可能性的证据是,研究发现抵抗性小鼠由于 CD40 或 CD40L 基因受到了破坏,因而对利什曼原虫感染敏感从而不能产生 Th1 反应[171,172]。$CD40L^{-/-}$ 小鼠也可以对 *L. amazonensis* 的感染很敏感[173],*L. amazonensis* 几乎对所有品系的小鼠均具有感染性。在 CD40 或 $CD40L^{-/-}$ 小鼠对利什曼原虫的抵抗力降低表现为,至少部分可能由于巨噬细胞生成的 T 细胞依赖性 IL-12 生成缺陷。在 WT 小鼠中,激活的 Th1 细胞通过与一种有效的巨噬细胞激活因子 IFN-γ 结合,来促进巨噬细胞介导的 IL-12 生成,并表达 CD40L。而且通过与巨噬细胞表面的 CD40 的相互作用产生重要的辅助效应[171,172]。这种方案提出一个问题是,在 WT 小鼠中是 Th1 细胞还是生成 IL-12 的巨噬细胞先出现?可能的原因是在与抗原呈递细胞如巨噬细胞和(或)树突细胞相互作用时,内源性 Th 细胞上调了 CD40L 的表达。通过与其他来源的 IFN-γ(很可能是 NK 细胞[12])相结合,提供了通过抗原呈递细胞促进 IL-12 生成所必需的信号,这样就启动 Th1 反应。但是在感染 *T. gondii* 的小鼠中,CD40/CD40L 相互作用并不是启动体内 IL-12 所必需的[174]。在这种细胞内原虫中,IL-12 产生的 T 细胞依赖性信号启动了 I 型因子的产生,而 T 细胞依赖性信号源自未致敏的、静止的树突细胞[174]。

寄生虫感染模型尤其是在研究决定 Th2 反应选择和效应器选择方面非常有用。人们已经在很久前就认识到,IL-4 是促进 ThP 细胞分化为 Th2 细胞的中心因子[133,175~179]。通过与 Th1 相似的分化途径,巨噬细胞或树突细胞可以生成 IL-12,人们假设内源性免疫系统受到抗原刺激早期可产生 IL-4,后者对于 Th2 反应的诱导阶段起到了中心的作用。目前,IL-4 不可能诱导所有的 Th2 反应[180]。而且,目前的观点是在缺乏 IL-12 的情况下,ThP 细胞本身可以生成足够的 IL-4 诱导 Th2 反应[181~183]。在 BALB/c 小鼠中尤其突出[131]。然而也在某些特殊的小鼠品系中,其他细胞通过生成 IL-4 可能在促进 Th2 反应方面有一定的作用。在体外,IL-6 很可能是由抗原呈递细胞产生的,后者促进 ThP 生成 IL-4,诱导 Th2 反应,这就表明这种细胞因子提供了内源性和获得性 II 型反应的关联[184]。

人们发现在抗 CD3Ab 注射到幼鼠体内 30 分钟后就可以看到 NKT 细胞生成 IL-4[185],而且它对于由抗 IgD[186]诱导的 Th2 反应至关重要,这两种情况表明,这种细胞可能对于病原体诱导的 Th2 反应也很重要。但是,由于 $\beta_2m^{-/-}$ 小鼠不能表达 CD1,缺乏 NK T 细胞,实验发现它可以对血吸虫、*N. brasiliensis*、利什曼原虫产生正常的 Th2 反应,这就从根本上排除了 NK T 细胞在寄生虫感染 Th2 诱导中的中心作用的说法[187]。另一类 CD4 细胞表达高度严格的 T 细胞受体[TCR]($V_\beta4V_\alpha8$),确实在感染利什曼原虫的 BALBc 小鼠反应中产生早期 IL-4 中具有重要的作用[188]。在这个模型中,皮下感染后 LN16 小时的引流液中,IL-4 的生成有一个爆发过程[189]。这种 IL-4 来自于大量的 $V_\beta4V_\alpha8$ CD4 细胞,它对利什曼原虫 LACK 抗原起反应[189]。这类细胞更为重要的原因还在于感染的 $V_\beta4$ 缺陷 BALB/c 小鼠产生 Th1 反应并引起消退型损伤[189]。目前对这种 LACK 特异性细胞的概念是,它们代表了内源性 CD4 细胞的保守群体(可能以显著的高频率表达)并且 BALB/c 内源性 CD4 细胞通常也是这样的。它们可以产生生理学上有意义的 IL-4。这样来自于重组 LACK 未感染 BALB/c 小鼠淋巴细胞的刺激可以导致这类细胞的激活,从而产生一个 IL-4 的早期爆发。感染了利什曼原虫的 BALB/c 小鼠 LACK 在 Th2 诱导过程中的重要作用,主要体现在当动物通过转基因在其胸腺中表达这种蛋白质使其对 LACK 耐受时,就可以抵抗寄生虫的感染(图 38.4A)并且其 II 型反应减弱(图 38.4B)[190]。

目前在开始研究在对寄生虫感染时对 Th2 反应的形成具有中心作用的早期 IL-4 来源。在一个模型系统中,血吸虫卵被注射到幼龄小鼠的腹膜内,在 12~24 小时内就会有 IL-4 的爆发形成[191]。这些 IL-4 是由嗜酸性粒细胞产生的,这些资料表明,这种细胞类型被来自肥大细胞的 IL-5 所恢复[192]。这个系列反应的启动因子是 T 依赖性[192],但是除此之外,对其了解得非常少。而且嗜酸性粒细胞产生的 IL-4 似乎对于随后的 Th2 细胞的发育并不是必需的。如同 $IL\text{-}5^{-/-}$ 小鼠不能产生正常的早期嗜酸性粒细胞反应,因而不是 Th2 反应缺陷的。在另一个不同的模型中,*N. brasiliensis* 幼虫注射到幼年的小鼠腹膜内后可以引起快速的 γδ T 细胞汇集,细胞染色发现其细胞内 IL-4 阳性[193]。因为肥大细胞和嗜碱性粒细胞也生成 IL-4,它们曾被认为可以生成 IL-4 来刺激 Th2 细胞的发育[194],但是就我们所知,还没有直接的证据支持它们的作用。小鼠缺陷 *FcεRI*(针

1281

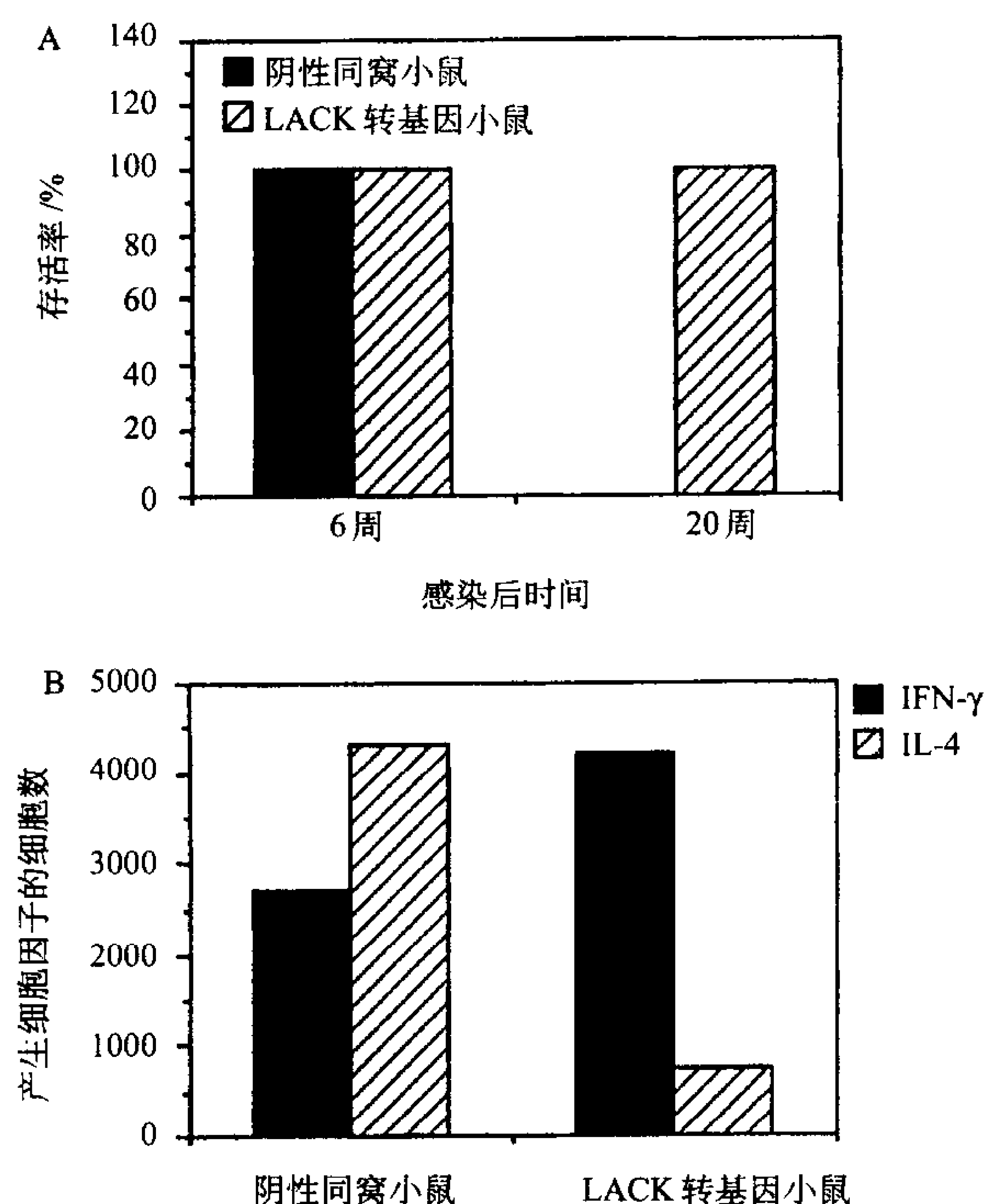


图 38.4　对利什曼原虫 LACK 抗原耐受的 BALB/c 小鼠形成Ⅰ型反应并对感染形成抵抗力。正常情况下感染的 BALB/c 小鼠产生正常的Ⅱ型反应并因为这个原因而死亡。Th2 反应在感染的早期是由于 $V_\beta4V_\alpha8$CD4 亚群细胞对 LACK 反应所形成的 IL-4 爆发产生促进的。这种早期的 IL-4 对Ⅱ型反应形成的重要性是通过一个实验证实的,在这个实验中 BALB/c 小鼠通过转基因在其胸腺内表达这种蛋白质造成对 LACK 耐受后,可以抵抗感染。(A)在感染后 8 周,这种 LACK 转基因小鼠脾内分泌 IL-4 的 T 细胞概率与 LACK 阴性同窝小鼠(B)相比大为减少,同样地,在转基因小鼠(B)中,分泌 IFN-γ 的 Th 细胞有明显的增加。Y 轴代表每 10^6 个脾细胞中分泌细胞因子的细胞数目,细胞测定采用 ELISPOT 法。(摘自参考文献[190]。)

对这些细胞的主要的信号接收器时),反应在血吸虫感染后就可以形成 Th2 反应[195]。

有几篇文章强调了合适的共刺激在启动 Th1 和 Th2 反应时的重要性[196]。T 细胞上最重要的共刺激受体是 CD28,它既可与 B7.1(CD80)也可与 B7.2(CD86)结合,并表达于专门的抗原呈递细胞上[197,198]。直到最近,人们还认为 T 细胞上的 CTLA4 可以接受共刺激信号。尽管这可能在某种情况下是正确的,现在人们已经清楚,CTLA4 最重要的作用是关闭 T 细胞,因而在免疫反应消退中具有一定的作用。其中 T 细胞表面的 CTLA4 与 CD28 连接后就可以上调,但是它与 B7 分子的亲和力比 CD28 要强[8,199]。在减弱免疫反应形成中 CTLA4 的作用的解释是:当小鼠以 mAb 处理后阻断了 CTLA4 与 B7 间的相互作用时,可以观察到在原发 *N. brasiliensis* 感染后比对照组有更强的抵抗力。增加的抵抗力与更快的发作和强大的 Th2 反应有关[200]。尽管最初人们认为 Th2 反应形成的过程中要求很少的共刺激因素,发现 CTLA4-Ig(阻断了 B7 分子与 CD28 和 T 细胞 CTLA4 之间的相互作用)能够抑制 *H. polygyrus*[201]、利什曼原虫[202]诱导的 Th2 反应(在这两种情况下对感染的预后都有很强的影响),在 Th2 反应诱导中相当于一个或两个 B7 分子的作用。与之相似,$CD28^{-/-}$ 小鼠不能对注射的血吸虫卵形成 Th2 反应[203],尽管生成 IL-4 的 CD4 细胞在利什曼原虫感染的 $CD28^{-/-}$ BALB/c 小鼠确实形成了[204]。但是在缺乏 CD28 时 CTLA4 可能具有共刺激作用[204]。B7.1 和 B7.2 可能分别在 Th1 和 Th2 启动中有优先作用[205]。这在某些亚类的细胞中可能是确实存在的。例如阻断 B7.2 可以抑制利什曼原虫感染 BALB/c 小鼠时[206]及血吸虫卵和 *B. malayi* 微丝蚴感染 C57BL/6 小鼠的 Th2 反应[207]。这也许只是简单地反映了 B7.2 在经过这些抗原刺激后的优先表达。总的来说,B7 分子在指导免疫反应中的中心作用不能认为是独一无二的,由于在暴露于 *H. polygyrus*[208]或免疫生成抗 IgG 抗体[196]后,B7.1 和 B7.2 可以相互替代。而且两者都是很强的 Th2 反应刺激剂。

除了通过 CD28 共刺激外,ThP 和 Th2 分化也需要一个共同受体 CD4。在 $CD4^{-/-}$ 小鼠形成了一群Ⅱ级限制性 Th 细胞,即 CD4 细胞。它们不具有产生 Th2 细胞的能力[209,210]。这在体内是事实。而在对感染的利什曼原虫[209,210]抵抗和对 *N. brasiliensis* 易感时[210],BALA/c $CD4^{-/-}$ 小鼠表达与 WT 小鼠相反的表型。而且在体外,对 TCR 来说,来自转基因小鼠的 CD4/CD82 双阴性的 T 细胞不能分化成产生 IL-4 的细胞,即使在 IL-4 存在并被激活的情况下也不能[209,210]。其中 TCR 可以 d I-A 存在的情况下识别利什曼原虫抗原 LACK156-173

1282

肽。有趣的是，CD4 分子的胞质内(通过 CD4 连接启动信号)区域对于 Th2 细胞的分化并不是必需的[209]。这些发现以及重复观察到的高剂量抗原很可能诱导 Th2 反应[137,211,212]，引起人们对信号传导假说的疑虑[213]。因而提出 Th2 分化途径多样化及数量不同的 TCRⅡ级肽的相互作用。

寄生虫毒素的作用

人们越来越清楚地认识到，许多寄生虫产生的分子其功能类似于内毒素和超级抗原。它可以激活一些细胞如巨噬细胞和 T 细胞，这种过程并不要求抗体或 TCR[214]的抗原结合位点对其进行识别。因为在本质上这些分子的功能是佐剂，这也许能解释为什么寄生虫通常都可以诱导如此强烈的免疫反应。而且，如果这些毒素如同所说的那样倾向于激活影响 T 细胞亚群选择的一类细胞(例如，这种细胞可以分泌 IL-12 或 IL-4)时，它们可能在促进免疫反应失衡方面具有重要作用。从结构上来看，这些分子是不同的。其中一些如疟原虫[215]和 *T. cruzi*[216]，*T. brucit* 和利什曼原虫[217]毒素是糖脂，它可以通过与涉及 LPS 激活类似的受体刺激如巨噬细胞、树突细胞及中性粒细胞[214]。对这些因子的分析由于支原体属的污染而变得较为复杂，这是由于支原体含有的脂质类似物具有相似的细胞因子诱导活性[218]。疟疾毒素在诱导炎症反应方面很复杂，这是因为它与 CM 的形成相关并可将其作为抗病理性疟疾疫苗的靶标[219]。

除了一种未定义的可以激活 IL-12 生成的分子外[214]，*T. gondii* 抽提物还包含一种具有超级抗原的细胞因子，它可以通过将 MHC Ⅱ级保守区与 $V_\beta 5$ 保守区交叉连接，对 T 细胞进行刺激[220]。有趣的是，由于目前尚不清楚的原因，这种超级抗原倾向于激活 CD8 细胞。在这种情况下，它对于大量 IFN-γ 的诱导具有一定的作用，并可能在 *T. gondii* 诱导的反应中具有促进Ⅰ型反应的作用。另一个寄生虫获得性免疫刺激蛋白是 *Lefi*，这是一种来自利什曼原虫的延长启动因子，它可以强烈刺激人单核细胞 IL-12 的生成[221]。现在正在对这种分子进行研究以将其作为一种佐剂。

从对利什曼原虫[12,222,223]和 *T. gondii* 研究，人们越来越清楚地认识到，NK 细胞生成 IFN-γ 在控制早期寄生虫血症和促进Ⅰ型反应方面具有非常重要的作用。这些细胞也参与在宿主对其他原虫类寄生虫包括 *Babesia*，*Cryptosporidium*，*Eimeria*，*Plasmodium* 及 *Trypanosoma* 的反应，而且似乎在对原虫感染和以适当的方式影响获得性免疫系统的应答能力方面具有中心作用[226]。NK 细胞可被寄生虫获得性分子直接激活并对感染宿主或受影响细胞改变了的 MHC 表达产生反应，这种 NK 细胞激活的主要机制很可能是间接地通过巨噬细胞和(或)树突细胞(见上)产生的 IL-12 介导的，TNF-α[227]、IL-β 和(或)IL-18 可进一步激活 NK 细胞[229]这样，寄生虫毒素与巨噬细胞和(或)树突细胞之间的相互作用就成为目前研究的热点。

文献中描述最多的有关寄生虫毒素是从原虫中获得的，但是很可能寄生虫也可以生成诱导 Th2 反应的免疫调节分子。例如，在没有佐剂时，注射血吸虫卵和 *Brugia* 微丝蚴，可以诱导明显极化的Ⅱ型反应[230,231]。这两种寄生虫的结构特征是具有较坚固的外部结构(分别是外壳和表皮)，这就可能会出现抗原从内部缓慢释放。如果利用微泵模拟这种过程，由于未知的原因，出现可以诱导 Th2 反应的正常抗原[232]。然而寄生虫的可溶性抽提物也是一种很强的Ⅱ型反应的诱导剂[160]。目前尚在怀疑为什么从这种寄生虫中获得的抗原只能促进这类反应。在这种情况下，人们发现一些血吸卵蛋白被糖修饰了。LNFP-II 本身可以通过 B1 细胞促进 IL-10 生成并能刺激 B1 细胞增殖[233]。有人提出，在感染时这种途径生成的 IL-10 可以促进对感染血吸虫卵后产生的Ⅱ型反应的免疫偏差[233]。

遗传因素的影响

宿主遗传背景对寄生虫感染时 Th1/Th2 反应的选择发挥着主要的作用。除利什曼原虫感染后遗传控制抵抗力和易感性之外，其他寄生虫感染后的控制如 *T. muris*，也是遗传起决定性作用并与 Th 选择相关(见上)。

要理解 BALB/c 小鼠感染利什曼原虫后的易感性有两条途径。其一，专一的遗传学方法，这涉及来自大约 5 代 BALB/c 小鼠一系列的疾病抵抗基因的反交。这就先得明确与抵抗力相关的基因定位于 6、7、10、11、

15 及 16 号染色体上[234]。第二,主要强调对 BALB/c 小鼠和 B10.D2 Th 细胞进行功能性比较。这些研究揭示了两个基本不同,它们可以解释观察到的抵抗-易感性方式。首先,如在上文中提到的,在体外中性条件(如没有外源性细胞因子或其他免疫介质)和激活的条件下,BALB/c Th 细胞倾向于生成比 B10.D2 小鼠更多的 IL-4[131]。即使在通过转基因 TCR 的表达控制了对 TCR 的利用时也是这样。第二,在相同的中性条件下,在原发的激活信号后,来自 B10.D2 小鼠的 ThP 细胞与来自 BALB/c 小鼠[235]的 ThP 细胞相比,前者表达 IL-12Rβ2链的时间延长。这样,在 B10.D2 小鼠中受影响的反应性 Th 细胞持续向 Th1 方向分化,而来自 BALB/c 小鼠的反应性 Th 细胞就变得对 IL-12[132,235]无反应并且接触到了更多的 IL-4[131]。而且因为 IL-4 抑制了IL-12Rβ2链的表达及 IFN-γ 维持对 IL-12 的反应性[236],通过早期 IL-4 或 IFN-γ 的生成使得 Th 反应转变为高度倾斜的倾向性已经很明确了。一个位于 11 号染色体上的位点控制了从 B10.D2 细胞来的 Th 细胞,维持了在延长的时间内对 IL-12 的反应[237],而且很可能存在一种假设,即与上面讨论过的在系列反交研究中定义的位点相同[234]。11 号染色体上的位点与位于人类染色体 5q31.1 联接(与Ⅱ型反应相关联,并且与规律性血吸虫抵抗力相牵连)(见上文)。

由于 BALB/c 小鼠不能控制利什曼原虫感染机制的细节正变得清晰,人们也许可以指出,这株小鼠在感染如鼠弓形虫等原虫时具有抵抗力而且 Th1 是可以胜任的[55]。与利什曼原虫及其出现抗原反应性 Th 细胞群时随后维持 IL-12 的信号传导能力相比,也许这正反映了由弓形虫属寄生虫激活的内源性 IL-12/IFN-γ 轴的相对快速性。另外一个还需指出的是,在接触利什曼原虫后出现 Th1 反应的 C3H、C57BL/6 及其他小鼠,如果感染血吸虫病时可以出现强烈的 Th2 反应[46,238]。这种情况的一种可能的解释是从非 Th 细胞来源的 IL-4足以抑制 IL-12Rβ2 链的表达,这样也抑制了 Th1 反应的形成。

寄生虫感染对免疫反应及自身反应的影响

免疫抑制

免疫抑制通常的定义为当接触特异性或多克隆刺激因子时,来自被感染动物的 T 细胞不能增殖,现在已经被广泛地描述为许多寄生虫感染尤其是那些由原虫引起的感染时的特征。这些通常意义上的人类锥形虫,利什曼原虫及疟疾感染时的免疫抑制,也可以导致对未调节的抗原的低免疫反应。在这种研究比较多的领域有大量的详细资料[239],因此这里只能略加叙述。上面所说的免疫抑制的临床意义是通过大量的并发性感染性疾病例如锥虫病或疟疾患者得到。由于这种现象通常是免疫偏差的标志(见下文),因此至少在一些患者中通常不能简单地用例子来解释的机制是可行的。许多描述免疫抑制病例的共同特征是观察到 APC 水平上的缺陷。在感染疾病模型中,前列腺素、IL-10 和(或)IL-6 都可能是 T 细胞增殖的抑制剂[240,241]。尽管也可能还有其他一些因子也在起作用[242]。由于其有极强的抑制免疫力的作用,能相应抑制 TGF-β 将被发现,至少在一些普通的免疫抑制状态下有着重要作用(第 22 章)。

伴随应答的免疫偏差

对早期研究结果的扩展发现,在促进其自身扩展和巩固的同时,Th1 和 Th2 相互调节,寄生虫也诱导明显异常的免疫反应,这两者结合起来就是,对于某一不相关的微生物因子来说,感染导致的强大的Ⅱ型反应,可以阻止随后诱导强烈的Ⅰ型免疫反应和(或)促进Ⅱ型反应的形成。其结果是效应器选择的偏差,进一步导致强化的抵抗力或共感染病原体的增强。

早期的研究表明,寄生虫感染的动物产生的抗原的 IgE 反应(在正常情况下并不诱导这种同种型)表明,在针对未相关抗原的效应器选择的基础上存在感染的影响。最初的研究主要在于从 Th1/Th2 角度实验性地提出这种现象,表明在对弗罗因德佐剂中[243]的抹香鲸(sperm whale)肌球素(myoglobin)模型抗原、牛痘[224]或对 BCG[245]产生的免疫反应,在正常小鼠中类似于Ⅰ型反应,而在对寄生虫抗原产生强大的Ⅱ型反应的小鼠中Ⅱ型反应的方向就会受到抑制或增强。前不久,通过感染血吸虫或注射血吸虫卵刺激 AKR 小鼠Ⅱ型反应

时发现，这些动物可以排除 *T. muris* 感染[246]；正常的 AKP 小鼠对这种肠道蠕虫可以产生反应引发慢性感染（见上文）。

如果预先存在的感染可以影响针对未相关抗原的效应器选择，那么应用有效的疫苗对尤其是发展中国家来说具有非常重要的意义。这种问题的相关性的通过两个研究得到了证实，其中一个是在血吸虫病流行的区域[247]，另一个是在盘尾丝虫病流行的区域[248]。在那里人们发现在破伤风疫苗接种后寄生虫感染可以抑制针对 破伤风毒素的Ⅰ型反应。

因为Ⅰ型细胞因子 IL-2 和 IFN-γ 可以引起流产[249]，上述观点如果加以扩展就是，由寄生虫感染诱导的偏差免疫反应可以影响妊娠的结局。研究发现，C57BL/6 小鼠先前接触了利什曼原虫并产生正常的 Th1 后，或感染产生了正常的 Th2 反应的 BALB/c 小鼠与未感染的相同株的小鼠相比，其支持妊娠的能力下降，这其实就正是解释了上述的情况[250]。妊娠失败与增加的胎盘 IFN-γ、TNF 及下降的 IL-4 和 IL-10 有关[250]。与之相反，妊娠的 C57BL/6 小鼠使得其对利什曼原虫感染更敏感，已经有人报道了这种现象[251]。

在某些自身免疫性疾病中，尤其是那些实验性模型都描述了Ⅰ型反应和Ⅱ型反应的疾病。特别是器官特异性自身免疫性疾病，如多发性硬化症、胰岛素依赖性糖尿病（IDDM）、uveoretinitis 及桥本甲状腺炎（Hashimoto's thyroiditis），似乎都是由Ⅰ型反应介导的，而多系统性自身免疫反应（如狼疮和系统性硬化症）与Ⅱ型反应相关（见第 34 章）。另外，寄生虫感染也存在着一些其他情况，这可能只引起 Th 反应的偏差，从而减轻或增强自身免疫性疾病，这种情况尤其在 IDDM 疾病的实验中了证实，自发形成 IDDM 的雌性 NOD 小鼠感染曼氏血吸虫后防止了疾病的发作[252]（图 38.5），人们推测是由于针对胰岛细胞的Ⅰ型反应抑制的原因。

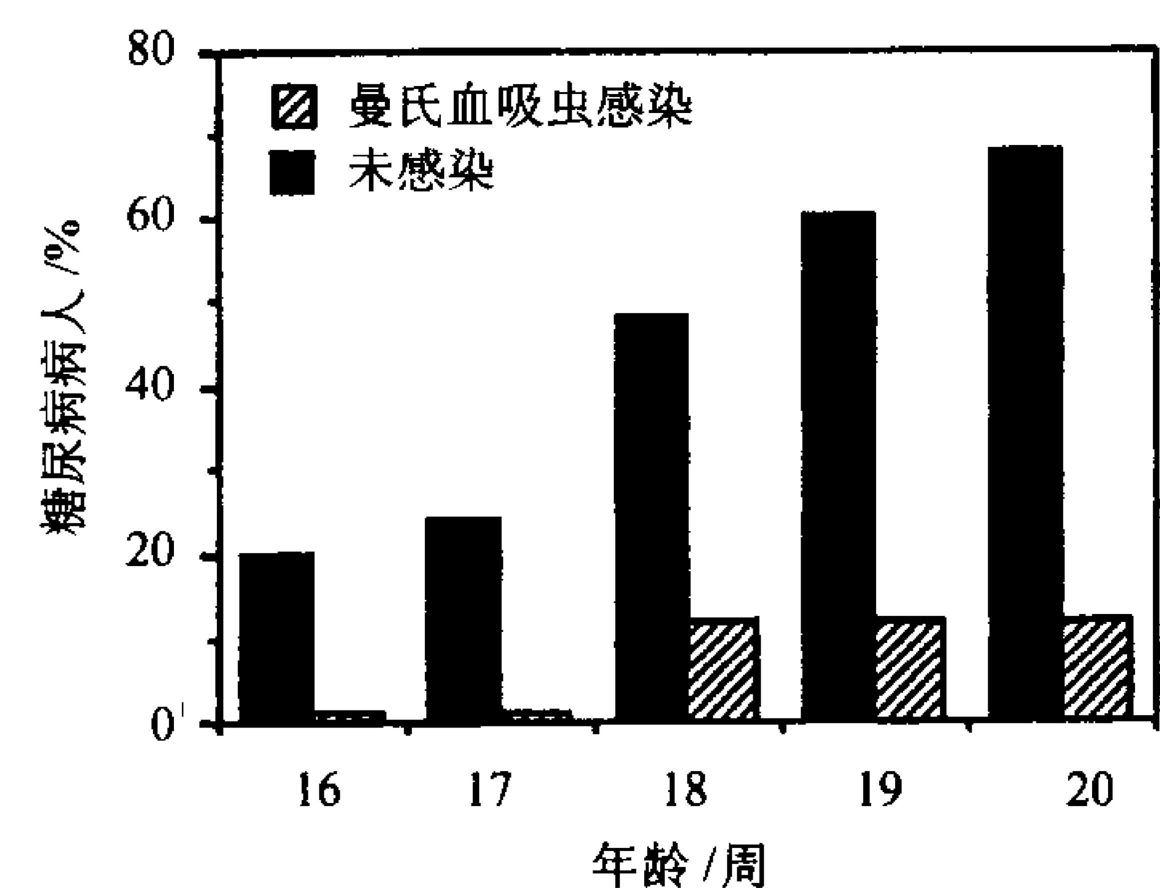


图38.5　如果用寄生虫曼氏血吸虫感染雄性 NOD 小鼠后，其胰岛素依赖性糖尿病（IDDM）的自发率显著下降。6～7 周龄的雄 NOD 小鼠接触曼氏血吸虫尾蚴与对照组相比，检测其血和尿中的葡萄糖来观察是否会出现糖尿病，寄生虫感染可明显抑制糖尿的形成，因此推测血吸虫感染通过诱导强大的Ⅱ型反应，改变免疫反应的环境，从而阻止或抑制了器官特异性Ⅰ型应答，而后者与自身免疫性疾病相关。（摘自参考文献[252]）。

1284

由于现在有好几种关于寄生虫感染引起的免疫失调可以影响随后产生的对免疫刺激完全不同反应的例子，应该指出的是，尽管有诱导的报告（如在几种疟疾[253]和血吸虫[254]中应用活性肝炎病毒），但是几乎没有什么很确实的证据支持人类寄生虫感染在敏感性或对其他疾病的抵抗力方面，寄生虫感染促进的免疫反应偏差有作用。然而除了我们所知道的关于免疫反应的诱导和调节外，还期望针对某一致病原的免疫反应将不会影响随后的免疫反应。热带地区的发展中国家自身免疫和变态反应似乎很少见，这表明在大多数情况下是流行的寄生虫感染，可能在改变这种失调的发生率方面具有某种作用，但是在发达国家这种情况就比较少见了。AIDS 在地球同一地域的快速发展提供了一个很切题的例子，那就是寄生虫感染可能是形成未相关疾病时的一个重要的辅助因子[255]。

自身免疫

长久以来人们一直推测，一些与寄生虫感染相关的慢性病理学有自自免疫的病因学。因为，对于不同的真核生物有许多分子具有基本的持家功能（house-keeping function），因此，并不意外的是寄生虫感染能导致针对和宿主分子同源性的抗原产生免疫反应，其诱导结果可能靶向宿主细胞和寄生虫。例如一研究发现抗体指导马来布鲁格丝虫（B. malayi）的 γ-谷氨酰胺转肽酶（最早被认为是 Bm2325 过敏原）与出现在人类的气管上皮中酶起交叉反应[256]。因为马来布鲁格丝虫感染的一系列并发症是热带肺嗜酸细胞症（TPE），在这种条件下肺就变得对嗜酸细胞具有病理性滤过作用，这种发现的意义表明 TPE 是一种对寄生虫 γ-谷氨酰胺转肽酶免疫反应的自身免疫的表现[256,257]。

心脏和神经组织及克氏锥虫[258,259]具有相同的抗原表位，在心肌病和慢性锥虫病器官综合征它被认为是

自身免疫成分的一种标志[260]。传统的组织病理学在检查病变组织中未发现寄生虫正好是这种观点的一个证明[261]。然而用寄生虫株-小鼠株相结合(Sylvio/C3H)的研究表明,其研究结果与人类感染克氏锥虫后相似;将健康小鼠的心脏移植到耳部皮下组织技术的研究结果表明,它与自身免疫的概念在很大程度上是不同的[262]。在这个系统中,慢性感染克鲁氏锥虫的小鼠形成了与强大的炎症反应相关的心脏疾病。重要的是对寄生虫的特异性序列进行原位聚合酶链反应(PCR)时发现,损伤的心脏组织受到了严重的感染。除寄生虫在慢性感染宿主中持续存在外,移植的心脏却不受感染,人们假设这是由于控制寄生虫扩散的免疫反应的存在之故。但是如果注射锥虫(trypanosome)就会出现排斥反应。也可以利用 PCR 检测慢性消化性锥虫病[263]患者的食管组织中的克氏锥虫 DNA。这些发现的重要意义在于,从反面证实了对南美洲锥虫病的免疫抑制治疗,并提示我们先前的有关克氏锥虫疫苗诱导恶化的自身免疫反应可能是不保险的。自身免疫可能的诱导与所有的疫苗都有关,用于免疫的寄生虫分子和主分子之间存在明显的同源性。要确定一个候选疫苗是一件很重要的事(见上文)。

寄生虫对效应反应的逃逸

抗原性变异

通过定义我们可以看到,适当的寄生虫可以表达有效的免疫损伤机制。很清楚寄生虫碰到的第一个保护性系统是补体爆发。已有大量的资料表明,不同的寄生虫是怎样逃避补体激活后产生的有害损伤的;它包括从模仿衰变加速因子(decay-accelerating factor,DAF)(克氏锥虫[264])的活动、获得 DAF 自身[曼氏血吸虫(*S. memsoni*[265])]到通过其他机制对补体激活的抑制[266],或者表达表面分子,这些都全面地防止了膜攻击复合体的插入(利什曼原虫[267]及布氏锥虫[268])。

复杂的生命周期使得大多数寄生虫要在哺乳动物宿主之间进行转移,这可能是寄生虫延长其在宿主中存在所必需的,这使得对于成功存活的寄生虫来说,必须表达其合适的逃避免疫反应的机制。最惊人的(striking)的免疫逃避机制的例子也许是非洲锥病虫(trypanosome)(牛的寄生虫布氏布氏锥虫及人类的病原体罗德西亚布氏锥虫、冈比亚锥虫)。这些生活在细胞外血流中的寄生虫,在其人或小牛宿主之间通过孑孓蝇(tsetse fly)进行传播。寄生虫的形式寄生是在哺乳动物宿主在其表面以高拷贝表达,这样就可以形成一种黏性衣壳,又称之为变化的表面糖蛋白(VSG)。在感染时,宿主可以成功地产生 VSG 特异性保护性抗体反应,后者可以清除寄生虫表达那种抗原。然而在任何一种群体内,少部分的寄生虫可以从大约 100 种突变体中筛选出来,另一种可以进行表达的编码基因在表达时可以逃避先前建立的免疫反应并进行克隆性的扩张[269,270]。这种免疫反应和睡盘虫之间的斗争可以通过 VSG 突变体进行好几年(如在人类感染睡盘虫时),但是最终未治疗宿主会死亡。有趣的是,除了表达 VSG 外,睡盘虫在其鞭毛插入区表面膜形成了一种特殊的区域,被称为鞭毛口袋,在某些必要的情况下,突变的受体就可以退缩到里面。由于血清组成包括抗体能够进入到这个位置,口袋的形态学就决定了其进入粒细胞或巨噬细胞,否则就可能会加入 ADCC 来抵抗寄生虫。

1285

尽管对其的讨论不在本章的范围之内,但是睡盘虫表面抗原突变的分子偏差已经得到了详尽的研究[270,271]。人们在 1965 年[272,273]就已经发现了疟疾中抗原突变的机制,但是后来一直未有其他发现。直到当编码 *P. falciparum* 红细胞膜蛋白 1(pfEMP1)VRG 基因家族(50~150 个突变体)的不同成员发现之后[274~276],对这种机制才有了进一步的解释。pfEMP1 表达于疟疾感染的红细胞表面,并在这些细胞通过 CD36 及 ICAM-1[277,278]分子黏附于内皮细胞表面有一定的作用。在进行这种作用,感染的细胞是不能通过脾的,这是由于它们的形态学改变后就被认为是衰老的细胞而被吞噬,这样在通过脾时就被清除了。在感染过程中,宿主对 pfEMP1 产生正常的抗体反应,人们推测这种作用可能对感染的红细胞有害(通过阻断黏附或促进ADCC 或 ADCI 反应)。为了防止这种杀伤作用,pfEMP1 就形成了突变体,其每代发生的克隆性变异率约为 2%。

偷窃

寄生虫与疟疾不同,据我们所知,它生活在细胞内但是并不通过插入寄生虫编码分子对宿主细胞膜进行改变,这样就可以逃避抗体反应。但是变得容易被T细胞识别和杀伤,这种T细胞在Ⅰ级和Ⅱ级分子存在的条件下可以识别寄生虫源性肽。对于利什曼虫来说,一个比较特殊的问题是怎样感染巨噬细胞并在不激活它的情况下逃避其杀伤。在这篇文章中,人们发现利什曼原虫 *metacyclicue* 前鞭毛体不诱导 IL-12 的生成[168]但是事实上主动地抑制了 IL-12 基因转录[169]。的确,寄生虫可以通过细胞接触微生物产物,一般认为是IL-12的强烈诱导剂来抑制这种细胞因子的生成[169]。由于它可以在 IL-$10^{-/-}$ 小鼠来源的巨噬细胞中产生,这种抑制不是由 IL-10 介导的[169]。而且 IL-12 抑制是选择性的。在那些巨噬细胞中,接触了微生物刺激剂及前鞭毛体就可以产生 IL-1α 及 β,TNF-α、IL-10、MCP1[169]及更多;前鞭毛体可以刺激暂时性的化学因子自身的表达[279]。因为 IL-12 中一种主要的 IFN-γ 生成的生理性促进剂,而且利什曼原虫对由 IFN-γ 激活的巨噬细胞杀伤作用高度敏感,这种抑制 IL-12 生成的能力为寄生虫的生存提供了出路。

掩饰

曾经一度形成了对寄生虫免疫逃避机制研究热[280],但近年来这方面取得的成绩却非常有限。例如,20年前血吸虫获得了一些宿主的分子并将它们排列在其表面,人们推测是寄生虫形成了某种形式的分子欺骗机制,这也可以解释人们熟悉的来自感染小鼠的血清的抗体不能结合到血相的血吸虫的表面。不幸的是,在大部分情况下,这种情况也只是处于描述阶段。然而血吸虫避免被抗体识别的重要性在实验中得到了证实,在这个实验中,人们常用来治疗血吸虫病的药物吡喹酮(praziquantel)的作用机制是改变寄生虫表面,其方式是抗体特异性蛋白(推测可能是针对释放抗原产生的)可以进入到其先前隐含的表位中,这样靶向了寄生虫从而供单核细胞或巨噬细胞杀伤[281,282]。

免疫反应的偏离

一段时间以来人们一直假定寄生虫可以产生也可以对细胞因子起反应,这样影响免疫反应。由于这个领域目前仍然研究得比较少,因而说明这种过程的例子只能求助于鼠鞭虫系统了。正如上面所讨论的,如果宿主产生正常的Ⅰ型反应,这种寄生虫可以存活很久,但是如果感染后形成了Ⅱ型反应,寄生虫就可以很快被清除。因此寄生虫就尽可能地促进Ⅰ型反应,而且人们在鼠鞭虫中发现 IFN-γ 类似分子,表明它可能会有利于影响到免疫反应的结局[283]。

抗寄生虫感染的疫苗接种

寄生虫感染免疫学方面的扩展研究在20世纪70年代和80年代早期得到了巨大的发展,由于人们希望能得到有效的寄生虫疫苗,这方面的研究也取得了长足的进步[284]。人工或自然灭活的寄生虫可以用做有效的免疫制剂,作为疫苗,它们的应用十分有限,出于安全考虑,多在兽医学方面应用。然而灭活的疫苗得到了继续研究,人们期望对于由它们诱导的保护性免疫反应可以增加成功的、*defined* 疫苗的合理的建立的可能性。

在所有的具有医学重要性寄生虫疾病中,疟疾疫苗是最成功的一个[285]。在前10年中,药物抵抗性疟疾的发病率有了非常明显的增加,由于新的化合物正在不断地出现,很可能既有效又可以很好应用的大量化学治疗已经为期不远了[285]。这样,为这种寄生虫感染建立一种疫苗就迫在眉睫。也许由于这种紧迫性,疟疾领域已经最先并很快形成了新的疫苗技术,如多抗原多肽[286]及 DNA 疫苗[287]。*P. falciparum* 基因组测序计划的实施[288]将会增加快速发现新候选疫苗的机会。但是要建立新的抗疟疾疫苗仍然存在着一些严重问题,包括寄生虫通过 Ag 变异(上文已有讨论)来逃避免疫反应的能力及缺少好的体外相关性措施等。另外也有

1286

文章指出，属于疟疾的疫苗发展计划仍然可以推广到寄生虫，包括与大量疫苗抗原生成相关的问题、选择合适的转移系统和佐剂、人类试验的难度和费用问题等。因为高度流行性和高发病率，在人类的寄生虫感染性疾病中，血吸虫病是仅次于疟疾的将要建立抗原的目标。由于在遗传学方面它比疟疾稳定，血吸虫有一套非常成功的逃避免疫反应的方法，这使得很难对它们进行免疫学攻击[280]。对于疟疾和血吸虫及其他许多寄生虫来说，有4种基本的可以建立疫苗的策略，它是建立在其生活周期之上的(图38.6)：①通过杀死侵入的幼虫防止感染；②清除或防止感染阶段的延长；③防止疾病的连续感染(接种以防止病理改变)；④阻断寄生虫的传播。这是针对疟疾建立的多成分疫苗，考虑到了以上4种方案，详细内容可参看文献[289]、[290]。

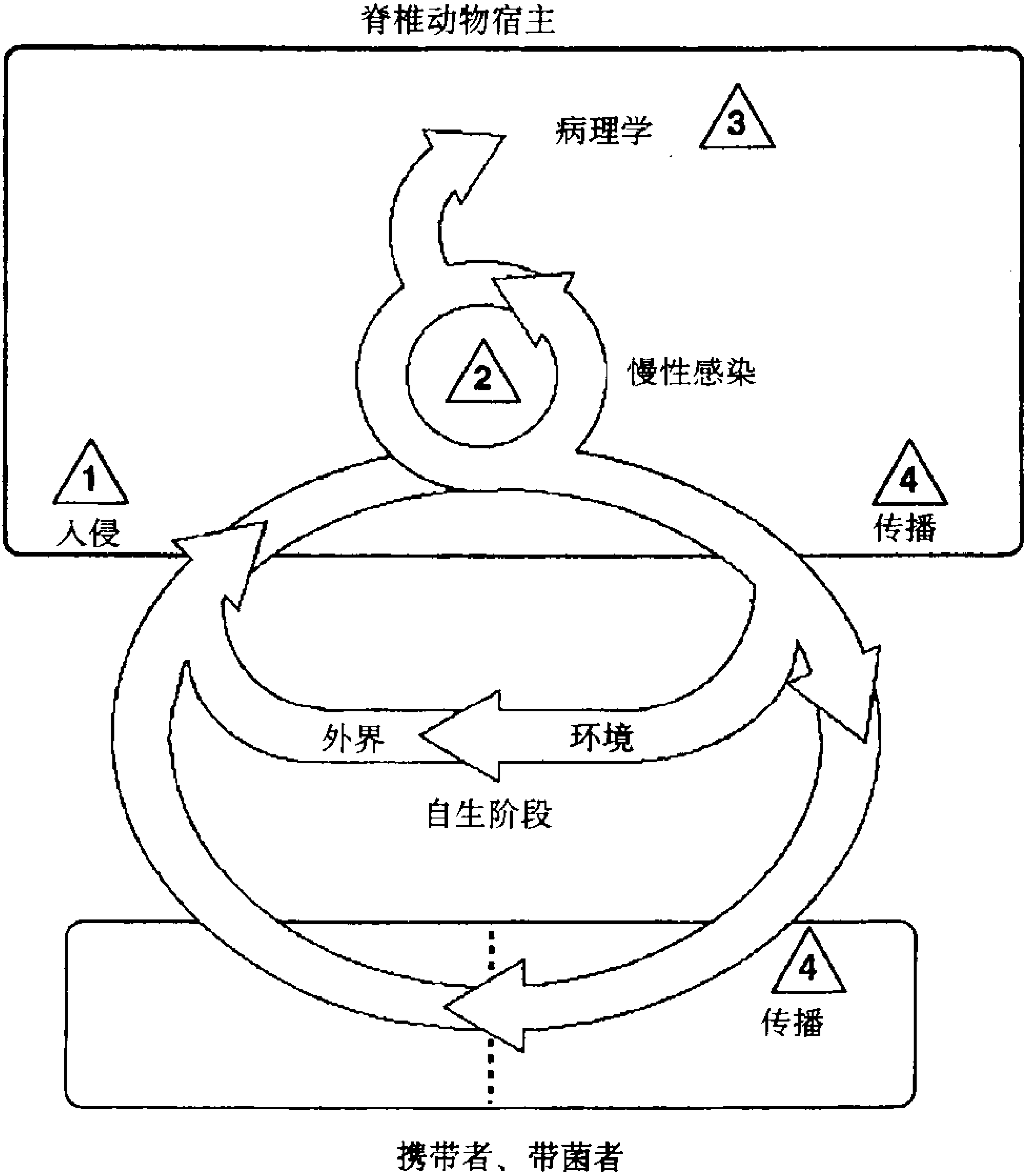


图38.6 针对寄生虫的阶段特异性疫苗诱导的免疫反应。保护性反应主要是针对①进入宿主后的入侵阶段；②慢性感染维持阶段；③病理学诱导阶段；④生命周期形成以保持传播。通过血粉吸附的抗体可以显示宿主本身或载体的免疫学效应。

接种预防感染

当芽孢阶段的疟原虫被注入人体内时它就开始启动了。进入血流后在30~60分钟内就侵入肝细胞。用经过辐射的芽孢疫苗显示这个阶段的免疫诱导可以针对感染产生保护[291]。一部分，这种保护是一种抗体反应，它主要是针对这个阶段的主要表面蛋白-芽孢蛋白(circumsporozite protein, CSP)，它可以在寄生虫入侵肝细胞之前中和寄生虫[291]。另外，这种疫苗反应原本是针对特异性CD8反应的，后者在对感染肝细胞的保护性免疫反应中具有重要的作用[292]。正如在鼠弓形体及克氏锥虫中那样，CD8细胞更多的是通过分泌IFN-γ而不是直接的毒性作用来起作用[293]。事实上，人们已经知道IFN-γ可以直接激活肝细胞产生NO[33]，后者可能是抵抗力的中介[294]。除CSP外，其他几种芽孢蛋白包括SSP2/TRAP、STARP、SALSA、LSA-1、Exp-1及MSP-1，已经用来作为芽孢免疫诱导保护性反应中的靶向抗原，这些蛋白都可能成为一种疫苗[290]。令人欣慰的是，有人报道将重组CSP融合到B表面抗原进行人类的抗芽孢疫苗试验已经取得了成功[295,296]。

尽管还是一个有争议的话题，原则上说来，不能根除所有芽孢的抗芽孢疫苗允许疟疾暴发逃避了的。这种想法在针对血吸虫的疫苗中并不是一个问题，这是由于它在哺乳动物体内并不进行复制。相反，每个寄生

虫都是宿主接触了至少一个感染的寄生虫幼虫的结果。这样以来,一个疫苗如果仅能防止血吸虫感染也仍然有用,也许事实上正是降低发病率的惟一有效的方法[297]。

尽管还没有进行明确的抗血吸虫疫苗的人类试验,但是由世界卫生组织、UTSAID 合作,巴斯德实验室独立进行的课题对几个很有前景的、在啮齿类动物疫苗研究中证实参与免疫的抗原进行研究[284]。通过直接或间接的方式研究实验性放射灭活的疫苗发现,其中针对血吸虫病(一种在地理分布上最广的人类寄生虫)的 2 个抗原 IrV5[298] 及副肌球蛋白[299]。在这个系统中经皮接触放射处理的幼虫(感染阶段的寄生虫)后,导致了 CD4 细胞依赖性、部分保护性免疫反应,它们对于通过肺的寄生虫有靶向作用,这样幼虫迁移到肺内就在那里死亡[300,302]。来自接种小鼠的 Th 细胞通过生成 IFN-γ、相对较少的 IL-4 或 IL-5[238] 对寄生虫起作用,而在接种小鼠中 mAb 介导的 IFN-γ 中和反应使得它们对寄生虫更为敏感[303,304]。而且,IFN-$\gamma R^{-/-}$ 小鼠在用放射处理的幼虫接种后所受到的保护要比 WT 小鼠小[305]。这样与从流行病学方面获得的资料(它预示的是Ⅱ型反应[123])相比,疫苗抵抗这种寄生虫要涉及 Th1 而不是 Th2 反应。与后一种假设相符的情况是,研究显示 IFN-γ 激活巨噬细胞和内皮细胞可以在体外通过非依赖性方式[306] 杀死血吸虫幼虫,而 iNOS 抑制剂可以部分地废除体内免疫[301]。然而,这种复合物不能完全取消抵抗力及所发现的接种 iNOS$^{-/-}$ 小鼠形成明显但是减弱的免疫力表明,可能还有其他因子对于这种反应也很重要[302]。其中一种候选因子是 TNF-α,这是由于它可以直接在体外杀死血吸虫幼虫[307]。当被用做一种佐剂,IL-12 增强了由放射疫苗所诱导的抵抗力水平,人们推测这可能是由于它增加了 Th1 反应的范围和极化[308]。

由于在用放射处理的血吸虫幼虫进行接种后所形成的免疫力自然情况下是Ⅰ型反应,多重免疫,即使在用 IL-12 作为佐剂时就可以出现一个即有Ⅰ型又有Ⅱ型(高水平的 IFN-γ 及 IgG)反应的情况,这就比用单一的接种所形成的反应具有更大的能力[309,310]。一部分,其他的抵抗力是由于抗体的,后者在被动免疫研究中对防止非接种小鼠的感染单独应用也有作用[311]。这些接种研究证实在适当的条件下 IL-12 可以充当体液及细胞介导的针对寄生虫的保护性反应方面具有重要的意义[310,312,313]。

使用 IL-12 做为佐剂最初是从利什曼原虫系统开始的,在用粗糙的可溶性的前鞭毛体抽提物加细胞因子进行接种时发现,可以使正常敏感的 BALB/c 小鼠对寄生虫具有高度的抵抗力,这很可能是由于偏离了从 Th2 到 Th1 的伴随反应引起的[314]。在利用 IL-12 与重组 LACK 分子[315](见上文)时观察到了相同的结果,而且这些在灵长类动物中具有 IL-12 潜在性利什曼原虫的疫苗也正在开发中。在相关的研究中,人们也发现 IL-12 也可以应用于免疫治疗。因为对已经具有损伤及 Th2 反应的 BALB/c 小鼠的可以通过注射 IL-12 与杀伤利什曼原虫的药物予以治疗,但是单独应用任何一种均不起作用[316]。还有利用质粒编码 LACK 进行 DNA 免疫的方法,研究发现这种方法与 LACK(蛋白)加 IL-12 一样的有效[317]。

接种控制寄生虫感染

正如前所提到的,完全的保护可能要求芽孢疫苗来阻止的感染。因此有效的免疫将可能是通过对建立的红细胞形式的直接引起疾病的寄生虫的免疫来完成[318]。一些在这个阶段表达的抗原具有强大的变异能力(见上文)因而人们认为它很难被接种防止。但是疟疾时自然获得的免疫大部分是针对血液中的寄生虫,并且它主要是由抗体介导的[319]。尽管知道它们可能是通过在红细胞表面表达寄生虫编码的蛋白来易化感染红细胞的破坏,这些保护性抗体的作用机制还没有得到很好的研究。对于针对血流形式的疟疾的抵抗性疫苗的大部分进展是来自研究用抗体的抗原靶向作用,这种抗体来自有完全弗罗因德佐剂裂殖子接种进行保护性免疫的猴子,也来自于产生了保护性 mAb 的相似的小鼠实验[318]。在这些研究的基础之上,相继发现了 2 个裂殖子蛋白、裂殖子表面蛋白 1(MSP1)及顶端膜抗原 1(AMA1),它们可以在其相应的宿主中诱导部分针对血相疟疾[318]。一个重要的目的就是要阐明疫苗抵抗的机制,并知道怎样通过改变抗原呈递策略和(或)应用适当的可以应用于人类的佐剂来增强其活性。

阻滞传播疫苗

通过免疫阻断传播的想法是来自于疟疾盛行的地区,在那里这种方法被认为是一种安全地带,可以阻止

接种芽孢或血相靶的个体中出现逃避突变的抗原变异体的转移。而且在地理上相对比较隔离的地区,那里没有贮存宿主,一种阻滞传播疫苗自身就可以排除寄生虫。被这个方法作为靶标的寄生虫处于蚊子体内性和芽胞阶段。人们推测起作用的抗体作用于肠道载体上的寄生虫来阻止其进一步发展[320]。人们已经确定了其他几种如 Pfs25,Pfs28、Pfs230 及 Pfs48/45 可以做为转移阻断靶的寄生虫抗原,其中 Pfs25 是接合子的表面主要蛋白,现在已经进行临床试验[320]。这些抗原的一个有趣而且重要的特点是它们的变异相对较少,人们推测这可能是由于先前缺乏免疫压力的结果。也有人提议对微丝蚴和利什曼氏原虫建立转移阻滞疫苗,但是它们可能在流行地区没有多大用处。

病理学的预防疫苗

因为寄生虫可以如此精确地适应宿主免疫反应,这样设计免疫干涉策略来阻止寄生虫诱导的免疫病理而不是感染本身就更容易并且更有实际价值。例如,疟疾时大部分的严重病理改变可能与寄生虫毒素刺激 TNF 的生成有关,而且疫苗诱导的这些用于中和的分子可以做免疫预防[321]的一种方案。尽管还处于理论研究阶段,由于在很大程度上对于这些相关毒素的分子结构尚不清楚,因此这方面的研究仍然复杂。

因为血吸虫在很大程度上是由于中性粒细胞在其俘获的寄生虫卵周围的宿主组织中形成病理性改变,因此一种有效的对血吸虫进行免疫预防的方法是减少肉芽肿的形成或减少雌性血吸虫产卵。在 WT 小鼠中,肉芽肿的大小和密度与Ⅱ型反应的强度有关,免疫学干涉如给予 mAb 抗 IL-4,减少了肉芽肿的大小、胶原的沉积(上文已有讨论)。小鼠先用寄生虫卵加 IL-12 免疫后就可以诱导卵-抗原特异性Ⅰ型反应,在随后的感染中与未进行免疫控制的小鼠相比,就会出现较轻的与卵相关的肝病[145]。在另一个不同的实验中,对谷胱甘肽-S-转移酶(P28)产生的体液反应是防止血吸虫感染[322]的一个主要候选疫苗抗原,研究发现在感染动物中它可产生更少的卵和变异性,这样就同时减少了疾病的发生和转移[322,323]。

1288

与实验性抗血吸虫病理反应疫苗的一种有趣但相反的观点是,减少在旋弗尾丝虫感染时与Ⅱ型反应相关的眼病(见上文)。在这个研究中,在眼内注射抗原前,小鼠先注射寄生虫抗原加 IL-12(诱导Ⅰ型反应而不是Ⅱ型反应)[324]。比较两实验模型中的结果,接种的小鼠不能产生有效的作用,尽管细胞因子确实促进了诱导的免疫反应向 Th1 方向前进了。一种可能的解释是尽管在这些动物中Ⅰ型反应很强,抗原注射到眼内的接种小鼠诱导产生了强的嗜酸性粒细胞和单核细胞浸润,这与单独用抗原接种时产生的结果相似。由注射抗原诱导的一系列促炎症因子包括 MIP-1a、MIP-1B、MCP-1、eotaxin 及 RANTES,很可能就解释了所观察到的细胞浸润及相关的视觉病理改变,这样抑制了后一种反应而不是简单地改变Ⅱ型细胞因子生成背景的疫苗方法,在疾病的预防尤其是在这种疾病的预防中非常必要[324]。

结论

在寄生虫免疫学上,传统的做法是对那些效应器机制介导的宿主抵抗和免疫病理方面进行明确的分界。本章研究的主要内容,大部分来自于利用细胞因子基因敲除小鼠的方法,而且它都说明免疫和病理之间的界限非常细微,如果要求某一保护性反应不是病理性的,则需要对其进行细微的调节。这种情况的最好解释是缺乏 IL-10 的小鼠感染鼠弓形体。由于强化的Ⅰ型反应,入侵的寄生虫可能比在 WT 小鼠中更有效地清除。但是,动物也可能因为没有限制的并且扩大的与保护性反应相关的炎症反应而更快地死亡[68]。因此,在这种及其他情况下[69,70],在表达Ⅰ型反应的时候就需要调节性Ⅱ型反应细胞因子的存在。在某些情况下,引起感染组织肿胀的寄生虫如微丝蚴和血吸虫,其改变的生活周期可以持续很长时间,避免由于Ⅰ型细胞因子引起炎症的重要性在于主要的Ⅱ型反应非常关键[83,127,325],尽管它本身就可以引起明显的病理反应[138,326]。利用战场打个比喻,组织可以被看成是怎样击退敌人同时又不会损伤自己的一方。也许在许多慢性寄生虫感染时免疫抑制正好反映了由于炎症引起的免疫系统防止患病的最后尝试。还有比较重要的是理解寄生虫和宿主遗传因素,它们可以引起调节信号的诱导;后者表明了免疫表达和疾病之间的平衡,如可以模拟或提高

免疫调节组织以更好地调节平衡,也可以形成自然获得的保护性反应。

另一个目前研究的主要课题是关于宿主-寄生虫相互关系免疫学涉及丰富的效应器反应。这个概念的重要性是通过利用经过遗传工程处理的免疫缺陷型小鼠的大量研究中得出的,在这里人们也观察到补充的机制替代缺陷的免疫功能。由于阻止了对所需的抵抗力及病理学反应的定义,这种冗余引起人们去发现新的可能对定义这些功能完整的宿主较困难。例如,人们先前认为 IgE 生成仅是在 IL-4 的控制下,也可以在感染了 *P. chabaudi*[327]的 $IL-4^{-/-}$ 小鼠及鼠弓形体接种后 $Ⅱ^{-/-}$ 级小鼠中发现。NK 细胞替代传统的 Th 细胞对 CD8 细胞提供帮助[56]。

最后,研究对寄生虫免疫的最终实际目的是应用新信息来发展免疫治疗或预防寄生虫并将这些发现扩展到其他病原体。在本章的第一版结论中,我曾提议对阶段的区分应该利用细胞因子和/或在疫苗的形成或免疫治疗中具有免疫中介因子来进行。更确切一点说,应该用 IL-12,尤其是其作为一种佐剂,并识别其佐剂特性,无论对体液还是细胞免疫反应同样有用。只在意识到在免疫反应的开始,合适的共刺激因子及细胞因子信号的补充对Ⅰ型或Ⅱ型反应的选择有重要的影响,就应该抛弃那种认为疫苗识别仅是建立在抗原识别的基础之上的想法(这种方法取得了有限的成功,如 SPf66 疟疾疫苗[328]),而应该接受一种更全面的方法,在这种方法中抗原呈递的环节至少处于同样优先的地位。

致谢

我们希望对在稿件准备过程中提出意义和建议的无数同事表达我们的谢意,感谢 Drs. Ame Cook, David Dunne, Richard Grencis 和 Thoms Nutman 允许我们参考他们未发表的研究结果。

(管孝鞠 译)

参 考 文 献

1. MacKenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, et al. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med* 1994;331:161–167.
2. Herwaldt BL, Ackers ML. An outbreak in 1996 of cyclosporiasis associated with imported raspberries. The Cyclospora Working Group. *N Engl J Med* 1997; 336:1548 1556.
3. Bowie WR, King AS, Werker DH, et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC toxoplasma investigation team. *Lancet* 1997;350:173–177.
4. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145 173.
5. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138–146.
6. Clerici M, Shearer G. The Th1-Th2 hypothesis. Immunol Today 1994;15: 575–581.
7. Coombs R, Gell P. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: Gell P, Coombs R, Lachmann P, eds. *Clinical aspects of immunology.* Oxford: Blackwell Scientific, 1975:761–781.
8. Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 1997;6:411–417.
9. Belosevic M, Finbloom DS, Van Der Meide PH, Slayter MV, Nacy CA. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major. J Immunol* 1989;143:266–274.
10. Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon-γ or interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. *J Exp Med* 1989;169:59–72.
11. Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1988;168:1675–1684.
12. Scharton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med* 1993;178:567–577.
13. Erb K, Blank C, Ritter U, Bluethmann H, Moll H. *Leishmania major* infection in major histocompatibility complex class II-deficient mice: CD8+ T cells do not mediate a protective immune response. *Immunobiology* 1996;195:243–260.
14. Wang ZE, Reiner SL, Hatam F, et al. Targeted activation of CD8 cells and infection of beta 2-microglobulin-deficient mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1993;151: 2077–2086.
15. Soong L, Chang CH, Sun J, et al. Role of CD4+ cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 1997;158:5374–5383.
16. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amstigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 1990;144:278–283.
17. Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma deficient mice infected with *Leishmania major. J Exp Med* 1994;179:1367–1371.
18. Swihart K, Fruth U, Meeemer N, et al. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type T cell response. *J Exp Med* 1995;181:961–971.
19. Wei XQ, Charles IG, Smith A, et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Nature 1995;375:408–411.
20. Stenger S, Donhauser N, Thuring H, Rollinghof M, Bogdan C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1996;183:1501–1514.
21. Liew FY, Li Y, Millot S. Tumor necrosis factor (TNF-alpha) in leushmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology* 1990;71:556–559.
22. Nacy CA, Meierovics AI, Belosevic M, Green SJ. Tumor necrosis factor-alpha: central regulatory cytokine in the induction of macrophage antimicrobial activities. *Pathobiology* 1991;59:182–184.
23. Vieira LQ, Goldschmidt M, Nashleanas M, Pfeffer K, Mak T, Scott P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesion caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J Immunol* 1996;157:827–835.
24. Garg N, Nunes MP, Tarleton RL. Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I processing and presentation pathway. *J Immunol* 1997;158:3293–3302.
25. Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection [see comments]. Nature

1992;356:338–340.
26. Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I and class II restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol* 1996;8:13–22.
27. Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 1992;175:169–174.
28. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrogphages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-*B*. *Eur J Immunol* 1992;22: 2501–2506.
29. Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10: role of NK cells. Infect Immun 1996:64:128–135.
30. Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 1994;153: 3135–3140.
31. Hoffman SL, Crutcher JM, Puri SK, et al. Sterile protection of monkeys against malaria after administration of interleukin-12. *Nat Med* 1997;3:80–83.
32. Sedegah M, Finkelman F, Hoffman S. Interleukin 12 induction of interferon γ-dependent protection against malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 10700–10702.
33. Nussler AK, Beger H-G, Liu ZZ, Billiar TR. Nitric oxide, hepatocytes and inflammation. *Res Immunol* 1996;146:671–677.
34. von der Weid T, Langhorne J. The roles of cytokines produced in immune response to erythrocytic stages of mouse malarias. *Immunobiology* 1993;189: 397–418.
35. Stevenson MM, Tam MF, Wolf FS, Sher A. IL-12 induced protection against blood stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma, TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 1995;155:2545–2556.
36. Taylor-Robinson AW, Phillips RS, Severn A, Moncada S, Liew FY. The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. *Science* 1993;260:1931–1934.
37. Druihle P, Sabchareon A, Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Perignon J-L. In vivo-veritas: lessons from immunoglobulin-transfer experiments in malaria patients. *Ann Trop Med Parasitol* 1997;91[Suppl 1]:S37–S53.
38. White WI, Evans CB, Taylor DW. Antimalarial antibodies of the immunoglobulin G2a isotype modulate parasitemias in mice infected with *Plasmodium yoelii*. *Infect Immun* 1991;59:5347–5354.
39. Waki S, Uehara S, Kanbe K, Nariuch H, Suzuki M. Interferon-gamma and the induction of protective IgG2a antibodies in non-lethal *Plasmodium berghei* infections of mice. *Parasite Immunol* 1995;17:503–508.
40. Leport C, Remington J. Toxoplasmosis in AIDS. *Presse Med* 1992;21: 1165–1171.
41. Joiner KA, Bermudes D, Sinai A, Qi H, Polotsky V, Beckers C. Structure and function of the *Toxoplasma gondii* vacuole. *Ann NY Acad Sci* 1996;797:1–7.
42. Suzuki Y, Coneley FS, Remington JS. Importance of endogenous IFN-γ for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J Immunol* 1989;143:2045–2052.
43. Gazzinelli RT, Eltoum I, Wynn TA, Sher A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J Immunol* 1993;151:3672–3681.
44. Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1992;149:175–180.
45. Hakim FT, Gazzinelli RT, Denkers EY, Hieny S, Shearer FM, Sher A. CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite infected or antigen-pulsed host cells. *J Immunol* 1991;147:2310–2317.
46. Subauste CS, Koniaris AH, Remington JS. Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii* infected cells. *J Immunol* 1991;147:3955–3962.
47. Denkers EY, Yap G, Scharton-Kerston T, et al. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1997;159: 1903–1908.
48. Suzuki Y, Remington JS. The effect of anti-IFN-γ on the protective effect of lyt-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice. *J Immunol* 1990;144: 1954–1961.
49. Adams LB, Hibbs JB, Taintor RR, Krahenbuhl JS. Microbistatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplàsma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol* 1990;144:2725–2729.
50. Scharton-Kersten TM, Yap G, Magram J, Sher A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 1997;185:1261–1273.
51. Sayles PC, Johnson LL. Exacerbation of toxoplasmosis in neutrophil-depleted mice. *Nat Immun* 1997 1998;160:134 1345.
52. Yap GS, Scharton-Kersten T, Charest H, Sher A. Decreased resistance of TNF receptor p55 and p75 deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of iNOS in vivo. *J Immunol* 1998;160:1340–1345.
53. Pfefferkorn R, Eckel M, Rebhun S. Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by through starvation for tryptophan. Mol Biochem Parasitol 1986;20:215–224.
54. Waldeland H, Pfefferkorn ER, Frenkel JK. Temperature-sensitive mutants of *Toxoplasma gondii: pathogenicity and persistence in mice.* J Parasitol 1983;69: 171–175.
55. Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* 1991;146: 286–292.
56. Denkers EY, Scharton-Kersten T, Barbieri S, Casper P, Sher A. A role for CD4+ NK1.1+ T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of CD8+ effector function against intracellular infection. *J Exp Med* 1996;184:131–139.
57. Denkers EY, Gazzinelli RT, Martin D, Sher A. Emergence of NK1.1⁺ cells as effectors of IFN-γ dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class-I deficient mice. *J Exp Med* 1993;178:1465–1472.
58. Urban JF, Fayer R, Chen S-J, Gause WC, Gately MK, Finkelman FD. IL-12 protects immunocompetent and immunodeficient neonatal mice agains infection with *Crytosporidium parvum*. *J Immunol* 1996;156:263–268.
59. Ungar BLP, Kao TC, Burris JA, Finkelman FD. *Cryptosporidium* infection in the mouse model: independent roles for IFN-gamma and CD4 T lymphocytes in protective immunity. *J Immunol* 1991;147:1014–1021.
60. Ovington KS, Alleva LM, Kerr EA. Cytokines and immunological control of *Eimeria* spp. *Int J Parasitol* 1995;25:1331–1351.
61. McDonald V, Robinson HA, Kelly A, Bancroft GJ. Immunity to *Cryptosporidium muris* infection in mice is expressed through gut CD4+ intraepithelial lymphocytes. *Infect Immun* 1996;64:2556–2562.
62. Elson LH, Calvopina M, Paredes W, et al. Immunity to onchocerciasis: putative immune persons produce a Th1-like response to *Onchocerca volculus*. *J Infect Dis* 1995;171:652–658.
63. Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6115–6119.
64. Hunter C, Candolfi E, Subauste C, Van Cleeve V, Remington JS. The role of IL-12 in acute murine toxoplasmosis. *Immunology* 1995;84:16–20.
65. Khan IA, Matsuura T, Kaspar LH. Interleukin12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. *Infect Immun* 1994;62:1639–1642.
66. Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y. Association of CD4+ T cell dependent interferon-gamma mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 1996;184:597–607.
67. Roberts CW, Ferguson DJ, Jebbari H, Satoskar A, Bluethman H, Alexander J. Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 1996;64:897–904.
68. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 1996;157:798–805.
69. Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, et al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 1997;158: 3311–3316.
70. Roberts SJ, Smith AL, West AB, et al. T cell alpha-beta+ and gamma delta+ deficient mice display abnormal but distinct phenotypes towards a natural, widespread infection of the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 11774–11779.
71. Kwiatkowski D. Tumour necrosis factor, fever and fatality in falciparum malaria. *Immunol Lett* 1990;25:213–216.
72. Grau GE, Bieler G, Pointaire P, et al. Significance of cytokine production and adhesion molecules in malarial immunopathology. *Immunol Lett* 1990;25:189–194.
73. Kwiatkowski D, Hill AVS, Sambou I, et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 1990;336:1201–1204.
74. Clark IA, Rockett KA, Cowden WB. Proposed central role of nitric oxide in conditions clinically similar to cerebral malaria. *Lancet* 1992;340:894–895.
75. Grau GE, Kindler V, Piguet PF, Lambert PH, Vassalli P. Prevention of experimental cerebral malaria by anticytokine antibodies. Interleukin 3 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor are intermediates in increased tumor necrosis factor production and macrophage accumulation. *J Exp Med* 1988;168: 1499–1504.
76. Schlichtherle IM, Treutiger CJ, Fernandez V, Carlson J, Wahlgren M. Molecular aspects of severe malaria. *Parasitol Today* 1996;12:329–332.
77. Linke A, Kuhn R, Muller W, Hornavar N, Li C, Langhorne J. *Plasmodium chabaudi chabaudi:* differential susceptibility of gene-targeted mice deficent in IL-10 to an erythrocytic stage infection. Exp Parasitol 1996;84:253–263.
78. King CL, Mahanty S, Kumaraswami V, et al. Cytokine control of parasite-specific anergy in human lymphatic filariasis. Preferential induction of a regulatory T helper type 2 lymphocyte subset. *J Clin Invest* 1993;92:1667–1673.
79. Doenhoff MJ, Musallam R, Bain J, McGregor A. Studies on the host-parasite relationship in *Schistosoma mansoni*-infected mice: the immunological dependence of parasite egg excretion. *Immunology* 1979;35:771.
80. Boros D. The role of cytokines in formation of the schistosome egg granuloma. *Immunobiology* 1994;191:441–450.
81. Cheever AW. Schistosomiasis: infection versus disease and hypersensitivity ver-

sus immunity. *Am J Pathol* 1993;142:699–702.

82. Jordan P, Webbe G, Sturrock RF. *Human schistosomiasis.* Oxon UK: CAB International, 1993.
83. Mwatha JK, Kimani G, Kamau T, et al. High levels of tumor necrosis factor (TNF), soluble TNF receptors, soluble intracellular adhesion molecule-1 and interferon gamma, but low levels of interleukin-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 1998;160:1992–1999.
84. Sher A, Fiorentino D, Casper P, Pearce EJ, Mosmann TR. Production of IL-10 by CD4⁻ T lymphocytes correlates with down regulation of Th1 cytokine synthesis. *J Immunol* 1991;147:2713–2718.
85. King CL, Medhat A, Malhotra I, et al. Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. *J Immunol* 1996;156:4715–4721.
86. Mahanty S, Ravichandran M, Raman U, Jayaraman K, Kumaraswami V, Nutman TB. Regulation of parasite antigen-driven immune responses by interleukin-10 (IL-10) and IL-12 in lymphatic filariasis. *Infect Immun* 1997;65:1742–1747.
87. Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, et al. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol* 1997;15:505–533.
88. Wakelin D. Genetic control of immune responses to parasites: immunity to *Trichuris muris* in inbred and random bred strains of mice. *Parasitology* 1975; 71:51–60.
89. Else KJ, Hultner L, Grencis RK. Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris.* II. Differential induction of T cell subsets in resistant versus susceptible mice. *Immunology* 1992;75:232–237.
90. Kightlinger LK, Seed JR, Kightlinger MB. The epidemiology of *Ascaris lumbricoides, Trichuris trichura,* and hookworm in children in the Ranomafana rainforest, Madagascar. *J Parasitol* 1995;81:159–169.
91. Else KJ, Finkelman FD, Maliszewski CR, Grencis RK. Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. *J Exp Med* 1994;179:347–351.
92. Bancroft AJ, Else KJ, Sypek JP, Grencis RK. Interleukin-12 promotes a chronic intestinal heliminth infection. *Eur J Immunol* 1997;27:866–877.
93. Urban JF, Katona IM, Finkelman FD. *Heligmosomoides polygyrus: CD4+ but not CD8+ T cells regulate the IgE response and protective immunity in mice.* Exp Parasitol 1991;73:500–511.
94. Koyama K, Tamauchi H, Ito Y. The role of CD4+ and CD8+ T cells in protective immunity to the murine nematode parasite *Trichuris muris. Parasite Immunol* 1995;17:161–165.
95. Urban JF Jr, Maliszewski CR, Madden KB, Katona IM, Finkelman FD. IL-4 treatment can cure established gastrointestinal nematode infections in immunocompetent and immunodeficient mice. *J Immunol* 1995;154:4675–4684.
96. Urban JF Jr, Katona IM, Paul WE, Finkelman FD. Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5513–5517.
97. Bancroft AJ, McKenzie ANJ, Grencis RK. A critical role for IL-13 in resistance to helminth infection. *J Immunol* 1998;160:3453–3461.
98. Finkelman FD, Pearce EJ, Urban JFJ, Sher A. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. *Immunol Today* 1991;12:A62–A65.
99. Finkelman FD, Katona IM, Urban JF, Snapper CM, Ohara J, Paul WE. Suppression of in vivo polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B-cell stimulatory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9675–9678.
100. Morawetz RA, Gabriele L, Rizzo LV, et al. Interleukin (IL)-4 independent immunoglobulin class switch to immunoglobulin (Ig)E in the mouse. *J Exp Med* 1996;184:1651–1661.
101. Ahmad A, Wang CH, Bell RG. A role for IgE in intestinal immunity: expression of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* from rats transfused with IgE and thoracic duct lymphocytes. *J Immunol* 1984;70:3563–3570.
102. Goldhill J, Morris SC, Maliszewski C, et al. Interleukin-4 modulates cholinergic neural control of mouse small intestinal longitudinal muscle. *Am J Physiol* 1997;272:G1135–G1140.
103. Coffman RL, Seymour BWP, Haduk S, Jackson J, Rennick D. Antibody to interleukin 5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 1989;245: 308–310.
104. Weller PF. Eosinophils: structure and function. *Curr Opin Immunol* 1994;6: 85–90.
105. Herndon FJ, Kayes SG. Depletion of eosinophils by anti-IL-5 eosinophil antibody treatment of mice infected with *Trichinella spiralis* does not alter parasite burden or immunologic resistance to reinfection. *J Immunol* 1992;149: 3642–3647.
106. Rotman HL, Yutanawiboonchai W, Brigandi RA, et al. *Strongyloides stercoralis:* eosinophil-dependent immune-mediated killing of third-stage larvae in BALB/cByJ mice. Exp Parasitol 1996:82:267–278.
107. Korenaga M, Hitoshi Y, Takatsu K, Tada I. Regulatory effect of anti-interleukin 5 monoclonal antibody on intestinal worm burden in a primary infection with *Strongyloides venezuelensis. Int J Parasitol* 1994;24:951–957.
108. Sasaki O, Sugaya H, Ishida K, Yoshimura K. Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. *Parasite Immunol* 1993;15:349–354.
109. Sugaya H, Aoki M, Yoshida T, Takatsu K, Yoshimura K. Eosinophilia and intracranial worm reccovery in interleukin-5 transgenic and interleukin-5 receptor alpha-chain knockout mice infected with *Angiostrongylus cantonensis. Parasitol Res* 1997;83:583–590.
110. Capron M, Capron A. Effector functions of eosinophils in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992;87[Suppl 4]:167–170.
111. Gounni AS, Lamkhioued B, Ochiai K, et al. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 1994;367:183–186.
112. Hagan P. Immunity and morbidity in infection due to *Schistosoma haematobium. Am J Trop Med Hyg* 1996;55[5 suppl]:116–120.
113. Sher A, Coffman RL, Hieny S, Scott P, Cheever AW. Interleukin 5 (IL-5) is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni. Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:61–66.
114. Rosa Brunet L, Kopf M, Pearce EJ. IL-4, but not IL-5 is necessary for resistance to *Schistosoma mansoni* superinfection in mice (*submitted*).
115. Ortega-Pierres G, Mackenzie CD, Parkhouse RM. Protection against *Trichinella spiralis* induced by a monoclonal antibody that promotes killing of newborn larvae by granulocytes. *Parasite Immunol* 1984;6:275–284.
116. Pritchard DI, Williams DJ, Behnke JM, Lee TDG. The role of IgG1 hypergammaglobulinaemia in immunity to the gastrointestinal nematode *Nematospiroides dubius.* The immunochemical purification, antigen specificity and in vivo antiparasite effect of IgG1 from immune serum. *Immunology* 1983;49:353–365.
117. Donaldson LE, Schmitt E, Huntley JF, Newlands GF, Grencis RK. A critical role for stem cell factor and c-kit in host protective immunity to an intestinal helminth. *Int Immunol* 1996;8:559–567.
118. Madden KB, Urban JFJ, Ziltener HJ, Schrader JW, Finkelman FD, Katona IM. Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth induced mastocytosis. *J Immunol* 1991;147:1387–1391.
119. Hultner L, Druez C, Moeller J, et al. Mast cell growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P40/TCGFIII (interleukin 9). *Eur J Immunol* 1990:20:1413–1416.
120. Faulkner HC, Humphreys N, Renauld JC, Van Snick J, Grencis RK. Interleukin-9 is involved in host-protective immunity to intestinal nematode infection. *Eur J Immunol* 1997;27:2536–2540.
121. Kullberg MC, Berzofsky JA, Jankovic DL, et al. T cell-derived IL-3 induces the production of IL-4 by non-B, non-T cells to amplify the Th2-cytokine response to a non-parasite antigen in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J Immunol* 1996;156:1482–1490.
122. Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJC, et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur J Immunol* 1992;22:1483–1494.
123. Hagan P, Blumenthal UJ, Dunn D, Simpson AJG, Wilkins HA. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium. Nature* 1991;349: 243–245.
124. Rihet P, Demeure DE, Bourgois A, Prata A, Dessein AJ. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur J Immunol* 1991;21:2679–2686.
125. Capron M, Capron A, Joseph M, Verwaerde C. IgE receptors on phagocytic cells and immune response to schistosome infection. *Monogr Allergy* 1983;18:33–44.
126. Marquet S, Abel L, Hillaire D, et al. Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. *Nat Genet* 1996;14:181–184.
127. Rosa Brunet LR, Finkelman FD, Cheever AW, Kopf MA, Pearce EJ. IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *J Immunol* 1997;159:777–785.
128. Leiby DA, Kanesa-thasan N, Scott P, Nacy CA. Leishmaniasis. In: Kierszenbaum F, ed. *Parasitic infections and the immune system.* San Diego: Academic Press, 1994.
129. Howard JG, Hale C, Liew FW. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis III. Nature and significance of specific suppression of cell mediated immunity in mice highly susceptible to *Leishmania tropica. J Exp Med* 1980;152:594–607.
130. Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, Xie Q, Nathan C. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J Leukoc Biol* 1994;55:227–233.
131. Hsieh C-S, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J Exp Med* 1995;181:713–721.
132. Guler ML, Gorham JD, Hsieh CS, et al. Genetic susceptibility to *Leishmania: IL-12 responsiveness in TH1 cell development.* Science 1996;271:984–987.
133. Sadick MD, Heinzel FP, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS, Locksley RM. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. *J Exp Med* 1990;171:115–127.
134. Kopf M, Brombacher F, Kohler G, et al. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major. J Exp Med* 1996;184:1127–1136.
135. Noben-Trauth N, Kropf P, Muller I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science* 1996;271:987–990.
136. Afonso LC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis. Infect Immun* 1993;61:2952–2959.
137. Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major. Science* 1992;257:539–542.
138. Wynn TA, Cheever AW. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Curr Opin Immunol* 1995;7:505–511.

139. Mathew RC, Boros DL. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced IL-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun* 1986;54:820–824.
140. Hernandez HJ, Wang Y, Tzellas N, Stadecker MJ. Expression of class II, but not class I, major histocompatibility complex molecules is required for granuloma formation in infection with *Schistosoma mansoni*. *Eur J Immunol* 1997;27: 1170–1176.
141. Hernandez HJ, Wang Y, Stadecker MJ. In infection with *Schistosoma mansoni*, B cells are required for T helper type 2 cell responses but not for granuloma formation. *J Immunol* 1997;158:4832–4837.
142. Yap G, Cheever A, Caspar P, Jankovic D, Sher A. Unimpaired down-modulation of the hepatic granulomatous response in CD8 T-cell- and gamma interferon-deficient mice chronically infected with *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun* 1997;65:2583–2586.
143. Iacomini J, Ricklan DE, Stadecker MJ. T cells expressing the gamma delta T cell receptor are not required for egg granuloma formation in schistosomiasis. *Eur J Immunol* 1995;25:884–888.
144. Cheever AW, Yap GS. The immunologic basis of disease and disease regulation in schistosomiasis. *Chem Immunol* 1996;66:159–176.
145. Wynn TA, Cheever AW, Jankovic D, et al. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature* 1995;376: 594–596.
146. Cheever AW, Williams ME, Wynn TA, et al. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J Immunol* 1994;153:753–759.
147. Pearce EJ, Cheever A, Leonard S, et al. *Schistosoma mansoni* in IL-4 deficient mice. *Int Immunol* 1996;8:435–444.
148. Cheever AW, Finkelman FD, Caspar P, Heiny S, Macedonia JG, Sher A. Treatment with anti-IL-2 antibodies reduces hepatic pathology and eosinophilia in *Schistosoma mansoni*-infected mice while selectively inhibiting T cell IL-5 production. *J Immunol* 1992;148:3244–3248.
149. Wynn TA, Eltoum I, Oswald IP, Cheever AW, Sher A. Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. *J Exp Med* 1994;179:1551–1561.
150. Flores Villanueva PO, Harris TS, Ricklan DE, Stadecker MJ. Macrophages from schistosomal egg granulomas induce unresponsiveness in specific cloned Th-1 lymphocytes in vitro and down-regulate schistosomal granulomatous disease in vivo. *J Immunol* 1994;152:1847–1855.
151. Amiri P, Locksley RM, Parslow TG, et al. Tumour necrosis factor α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* 1992;356:604–606.
152. Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM, Warmington K, Kunkel SL. Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-α inducible intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 1994;152:5883–5889.
153. Adewusi OI, Freeman GL, Colley DG, Secor WE. Production of TNF-α by spleen cells of mice with chronic *Schistosoma mansoni* infections. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55:A507.
154. Adewusi O, Nix N, Lu X, Colley D, Secor W. *Schistosoma mansoni: relationship of tumor necrosis factor-alpha to morbidity and collagen deposition in chronic experimental infection.* Exp Parasitol 1996;84:115–123.
155. Chensue SW, Warmington KS, Lukacs NW, et al. Monocyte chemotactic protein expression during schistosome egg granuloma formation. Sequence of production, localization, contribution, and regulation. *Am J Pathol* 1995;146:130–138.
156. Gao JL, Wynn TA, Chang Y, et al. Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *J Exp Med* 1997;185:1959–1968.
157. Lukacs NW, Chensue SW, Karpus WJ, et al. C-C chemokines differentially alter interleukin-4 production from lymphocytes. *Am J Pathol* 1997;150:1861–1868.
158. Jankovic D, Cheever AW, Kullberg M, et al. CD4+ T cell mediated granulmatous pathology in schistosomiasis is down-regulated by a B lymphocyte-dependent mechanism requiring Fc receptor signalling (*submitted*).
159. Dunne DW, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni* egg antigens and hepatocyte damage in infected T cell-deprived mice. *Contrib Microbiol Immunol* 1983;7: 22–29.
160. Pearlman E, Lass JH, Bardenstein DS, Hazlett FE, Diaconu E, Kazura JW. IL-4 and Th2 cells are required for the development of experimental onchocercal keratitis (river blindness). *J Exp Med* 1995;182:931–940.
161. Pearlman E. Immunopathology of onchocerciasis: a role for eosinophils in onchocercal dermatitis and keratitis. *Chem Immunol* 1997;66:26–40.
162. Heinzel FP, Rerko RM, Ahmed F, Pearlman E. Endogenous IL-12 is required for control of Th2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. *J Immunol* 1995;155:730–739.
163. Scharton-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1995;154:5320–5330.
164. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1994;153:2533–2543.
165. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:251–276.
166. Gajewski TF, Joyce J, Fitch FW. Antiproliferative effect of murine IFN-γ in immune regulation. III. Differential selection of TH1 and TH2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN-γ. *J Immunol* 1989;143:15–22.
167. Ma X, Chow JM, Gri G, et al. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med* 1996;183:147–157.
168. Reiner SL, Zheng S, Wang Z-E, Stowring L, Locksley RM. Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J Exp Med* 1994;179:447–456.
169. Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, et al. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med* 1996;183:515–526.
170. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995;154:5071–5079.
171. Campbell KA, Ovendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG, Maliszewski CR. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity* 1996;4:283–289.
172. Kamanaka M, Yu P, Yasui T, et al. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. *Immunity* 1996;4: 275–281.
173. Soong L, Xu JC, Grewal IS, et al. Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity* 1996;4:263–273.
174. Reis e Souza C, Hieny S, Scharton-Kersten T, et al. In vivo microbial stimulation induced rapid CD40L-independent production of IL-12 by dendritic cells and their re-distribution to T cell areas. *J Exp Med* 1997;186:1819–1829.
175. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 1990;172: 921–929.
176. Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an αβ T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6065–6069.
177. Seder RA, Paul WE, Davis MM, de St Groth BF. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992;176:1091–1098.
178. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of different subsets of helper T cells. *J Immunol* 1990;145:3796.
179. Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993; 362:245–248.
180. Coffman RL, von der Weid T. Multiple pathways for the initiation of T helper 2 (Th2) responses. *J Exp Med* 1997;185:373–375.
181. Schmitz J, Thiel A, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Assenmacher M. Induction of interleukin 4 (IL-4) expression in T helper (Th) cells is not dependent on IL-4 from non-Th cells. *J Exp Med* 1994;179:1349–1353.
182. Launois P, Ohteki T, Swihart K, MacDonald HR, Louis JA. In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4+ T cells which are NK1.1-. *Eur J Immunol* 1995;25:3298–3307.
183. von der Weid T, Beebe AM, Roopenian DC, Coffman RL. Early production of IL-4 and induction of Th responses in the lymph node originate from an MHC class I-independent CD4-NK1.1- T cell population. *J Immunol* 1996;157: 4421–4427.
184. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell R. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4 producing CD4+ cells. *J Exp Med* 1997;185:461–469.
185. Yoshimoto TO, Paul WE. CD4+, NK1.1+ T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med* 1994;179:1285–1295.
186. Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE. Role of NK1.1+ T cells in a Th2 response and in immunoglobulin E production. *Science* 1995;270: 1845–1847.
187. Brown DR, Fowell DJ, Corry DB, et al. Beta 2-microglobulin-dependent NK1.1+ T cells are not essential for T helper cell 2 immune responses. *J Exp Med* 1996;184:1295–1304.
188. Launois P, Maillard I, Pingel S, et al. IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* 1997;6:541–549.
189. Launois P, Swihart KG, Milon G, Louis JA. Early production of IL-4 in susceptible mice infected with *Leishmania major* rapidly induces IL-12 unresponsiveness. *J Immunol* 1997;158:3317–3324.
190. Julia V, Rassoulzadegan M, Glaichenhaus N. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science* 1996;274:421–423.
191. Sabin EA, Pearce EJ. Early IL-4 production by non-CD4+ cells at the site of antigen deposition predicts the development of a T helper 2 cell response to *Schistosoma mansoni* eggs. *J Immunol* 1995;155:4844–4853.
192. Sabin EA, Kopf MA, Pearce. EJ. *Schistosoma mansoni* egg induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *J Exp Med 1996;184:* 1871–1878.

193. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-γ and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by γδ T cells in vivo. *Nature* 1995;373:255–257.
194. Paul WE, Seder RA, Plaut M. Lymphokine and cytokine production by FcεRI+ cells. *Adv Immunol* 1993;53:1–29.
195. Jankovic D, Kullberg MC, Dombrowicz D, et al. Fc epsilonRI-deficient mice infected with *Schistosoma mansoni* mount normal Th2-type responses while displaying enhanced liver pathology. *J Immunol* 1997;159:1868–1875.
196. Gause WC, Halvorson MJ, Lu P, et al. The function of costimulatory molecules and the development of IL-4-producing T cells. *Immunol Today* 1997;18: 115–120.
197. Lenschow DL, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233–258.
198. Chambers CA, Allison JP. Co-stimulation in T cell responses. *Curr Opin Immunol* 1997;9:396–404.
199. Waterhouse P, Marengere LEM, Mittrucker H-W, Mak TW. CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunol Rev* 1996;153:183–207.
200. McCoy K, Camberis M, Le Gros G. Protective immunity to nematode infection is induced by CTLA-4 blockade. *J Exp Med* 1997;186:183–188.
201. Lu P, Zhou XD, Chen SJ, et al. Requirement of CTLA-4 counter receptors for IL-4 but not IL-10 elevations during a primary systemic in vivo immune response. *J Immunol* 1995;154:1078–1087.
202. Corry DB, Reiner SL, Linsley PS, Locksley RM. Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1994;153:4142–4148.
203. King CL, Xianli J, June CH, Abe R, Lee KP. CD28-deficient mice generate an impaired Th2 response to *Schistosoma mansoni* infection. *Eur J Immunol* 1996; 26:2448–2455.
204. Brown DR, Green JM, Moskowitz NH, Davis M, Thompson CB, Reiner SL. Limited role of CD28-mediated signals in T helper subset differentiation. *J Exp Med* 1996;184:803–810.
205. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995;80:707–718.
206. Brown JA, Titus RG, Nabavi N, Glimcher LH. Blockade of CD86 ameliorates *Leishmania major* infection by down-regulating the Th2 response. *J Infect Dis* 1996;174:1303–1308.
207. Subramanian G, Kazura JW, Pearlman E, Jia X, Malhorta I, King CL. B7-2 requirement for helminth-induced granuloma formation and CD4 type 2 T helper cell cytokine expression. *J Immunol* 1997;158:5914–5920.
208. Greenwald RJ, Lu P, Halvorson MJ, et al. Effects of blocking B7-1 and B7-2 interactions during a type 2 in vivo immune response. *J Immunol* 1997;158: 4088–4096.
209. Brown DR, Moskowitz NH, Killeen N, Reiner SL. A role for CD4 in peripheral T cell differentiation. *J Exp Med* 1997;186:101–107.
210. Fowell DJ, Magram J, Turck CW, Killeen N, Locksley RM. Impaired Th2 subset development in the absence of CD4. *Immunity* 1997;6:559–569.
211. Parrish CR. The relationship between humoral and cell-mediated immunity. *Transplant Rev* 1972;13:35–66.
212. Hosken NA, Shibuya K, W. HA, Murphy KM, O'Garra A. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development on a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J Exp Med* 1995;182:1579–1584.
213. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787–793.
214. Gazzinelli RT, Camargo MM, Almeida IC, et al. Identification and characterization of protozoan products that trigger the synthesis of IL-12 by inflammatory macrophages. *Chem Immunol* 1997;68:136–152
215. Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* 1993;177:145–153.
216. Camargo MM, Almeida IC, Pereira ME, Ferguson MA, Travassos LR, Gazzinelli RT. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J Immunol* 1997;158:5890–5901.
217. Tachado SD, Gerold P, Schwarz R, Novakovic S, McConville M, Scofield L. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma* and *Leishmania:* activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4022–4027.
218. Turrini F, Giribaldi G, Valente E, Arese P. Mycoplasma contamination of Plasmodium cultures: A case of parasitism. *Parasitology Today*
219. Jakobsen PH, Bate CA, Taverne J, Playfair JH. Malaria: toxins, cytokines and disease. *Parasite Immunol* 1995;17:223–231.
220. Denkers EY, Caspar P, Sher A. *Toxoplasma gondii* possesses a superantigen activity that selectively expands murine T cell receptor Vbeta 5-bearing CD8+ lymphocytes. *J Exp Med* 1994;180:985–994.
221. Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, et al. A recombinant Leishmania antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med* 1995;181:1527–1537.
222. Scharton-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1995;154:5320–5330.
223. Laskay T, Diefenbach A, Rollinghoff M, Solbach W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major. Eur J Immunol* 1995;25: 2220–2227.
224. Sher A, Denkers EY, Gazzinelli RT. Induction and regulation of host cell-mediated immunity by *Toxoplasma gondii.* In: Mitchison NA, ed. *CIBA Foundation Symposium.* West Sussex: John Wiley and Sons, 1995.
225. Scharton-Kersten T, Denkers EY, Gazzinelli R, Sher A. Role of IL-12 in induction of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii. Res Immunol* 1996;146: 539–545.
226. Scharton-Kersten TM, Sher A. Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. *Curr Opin Immunol* 1997;9:44–51.
227. Hunter CA, Subauste CS, Van Cleave VH, Remington JS. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 1994;62:2818–2824.
228. Hunter CA, Chizzonite R, Remington JS. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. *J Immunol* 1995;155:4347–4354.
229. Zhang T, Kawakami K, Qureshi MH, Okamura H, Kurimoto M, Saito A. Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells. *Infect Immun* 1997;65: 3594–3599.
230. Vella AT, Pearce EJ. CD4- Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. *J Immunol* 1992;148:2283–2290.
231. Pearlman E, Hazlett FE Jr, Boom WH, Kazura JW. Induction of murine T-helper-cell responses to the filarial nematode *Brugia malayi. Infect Immun* 1993;61: 1105–1112.
232. Guery JC, Galbiati F, Smiroldo S, Adorini L. Selective development of T helper (Th)2 cells induced by continuous administration of low dose soluble proteins to normal or beta(2)-microglobulin-deficient BALB/c mice. *J Exp Med* 1996;183: 485–497.
233. Velupillai P, Harn DA. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets [see comments]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 18–22.
234. Beebe AM, Mauze S, Schork NJ, Coffman RL. Serial backcross mapping of multiple loci associated with resistance to *Leishmania major* in mice. *Immunity* 1997;6:551–557.
235. Guler M, Jacobson NG, Gubler U, Murphy KM. T cell genetic background determines maintenance of IL-12 signaling: effects on BALB/c and B10.D2 T helper cell type 1 phenotype development. *J Immunol* 1997;159:1767–1774.
236. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997;185:817–824.
237. Gorham JD, Guler ML, Steen RG, et al. Genetic mapping of a murine locus controlling development of T helper 1/T helper 2 type responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12467–12472.
238. Pearce EJ, Caspar P, Gryzch JM, Lewis FA, Sher A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a helminth, *Schistosoma mansoni. J Exp Med* 1991;173:159–165.
239. Kierszenbaum F. *Parasitic infections and the immune system.* San Diego, CA: Academic Press, 1994.
240. Schleifer KW, Mansfield JM. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. *J Immunol* 1993;151:5492–5503.
241. VanHeyningen TK, Collins HL, Russell DG. IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. *J Immunol* 1997;158:330–337.
242. Allen JE, Lawrence RA, Maizels RM. APC from mice harbouring the filarial nematode, *Brugia malayi,* prevent cellular proliferation but not cytokine production. *Int Immunol* 1996;8:143–151.
243. Kullberg MC, Pearce EJ, Hieny SA, Sher A, Berzofsky JA. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. *J Immunol* 1992;148:3264–3270.
244. Actor JK, Shirai M, Kullberg MC, Buller RM, Sher A, Berzofsky JA. Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:948–952.
245. Pearlman E, Kazura JW, Hazlett FE Jr, Boom WH. Modulation of murine cytokine responses to mycobacterial antigens by helminth-induced T helper 2 cell responses. *J Immunol* 1993;151:4857–4864.
246. Curry AJ, Else KJ, Jones F, Bancroft A, Grencis RK, Dunne DW. Evidence that cytokine-mediated immune interactions induced by *Schistosoma mansoni* alter disease outcome in mice concurrently infected with *Trichuris muris. J Exp Med* 1995;181:769–774.
247. Sabin EA, Araujo MI, Carvalho EM, Pearce EJ. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni. J Infect Dis* 1996;173:269–272.

248. Cooper PJ, Espinel I, Paredes W, Guderian RH, Nutman TB. Impaired tetanus specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human onchocerciasis: a role for IL-10 (*submitted*).
249. Chaouat G, Menu EM, Clark DA, Dy M, Minkowski TG, Wegmann TG. Control of fetal survival in CBA X DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Fertil* 1990;89:447–453.
250. Krishnan L, Guilbert LJ, Wegmann TG, Belosevic M, Mosmann TR. T helper 1 responses against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. *J Immunol* 1996;156:653 662.
251. Krishnan L, Guilbert LJ, Russell AS, Wegmann TG, Mosmann TR, Belosevic M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J Immunol* 1996;156:644–652.
252. Cooke A, Tonks P, Jones FM, et al. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in NOD mice (*submitted*).
253. Thursz MR, Kwiatkowski D, Torok ME, et al. Association of hepatitis B surface antigen carriage with severe malaria in Gambian children. *Nat Med* 1995;4: 374–375.
254. Pereira LM, Melo MC, Saleh MG, et al. Hepatitis C virus infection in schistosomiasis mansoni in Brazil. *J Med Virol* 1995;45:423–428.
255. Bentwich Z, Weisman Z, Moroz C, Bar-Yehuda S, Kalinkovich A. Immune dysregulation in Ethiopian immigrants in Israel: relevance to helminth infections. *Clin Exp Immunol* 1996;103:239–243.
256. Lobos E, Zahn R, Weiss N, Nutman TB. A major allergen of lymphatic filarial nematodes is a parasite homolog of the gamma-glutamyl transpeptidase. *Mol Med* 31996;2:712–724.
257. Lobos E, Ondo A, Ottesen EA, Nutman TB. Biochemical and immunologic characterization of a major IgE-inducing filarial antigen of *Brugia malayi* and implications for the pathogenesis of tropical pulmonary eosinophilia. *J Immunol* 1992;149:3029 3034.
258. Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3541–3545.
259. Van Voorhis WC, Schlekewy L, Trong HL. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F1-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5993–5997.
260. Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:400–419.
261. Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol Rev* 1989;112:183–207.
262. Tarleton RL, Zhang L, Downs MO. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3932–3927.
263. Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Correa-Oliveira R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet* 1996;348(9031):891–892.
264. Rimoldi MT, Sher A, Heiny S, Lituchy A, Hammer CH, Joiner K. Developmentally regulated expression by *Trypanosoma cruzi* of molecules that accelerate the decay of complement C3 convertases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:193–197.
265. Pearce EJ, Fenton Hall B, Sher A. Host specific evasion of the alternative complement pathway by schistosomes correlates with the presence of a phospholipase C sensitive surface molecule resembling human decay accelerating factor. *J Immunol* 1990;144:2751.
266. Landa A, Laclette JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB. cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol Biochem Parasitol* 1993;60:343–347.
267. Puentes SM, Sacks DL, da Silva RP, Joiner KA. Complement binding by two developmental stages of Leishmania major promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 1988;167:887–902.
268. Russo DC, Williams DJ, Grab DJ. Mechanisms for the elimination of potentially lytic complement-fixing variable surface glycoprotein antibody-complexes in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Res* 1994;80:487–492.
269. Pays E, Vanhamme L, Berberof M. Genetic controls for the expression of surface antigens in African trypanosomes. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:25–52.
270. Borst P, Rudenko G, Taylor MC, et al. Antigenic variation in trypanosomes. *Arch Med Res* 1996;27:379–388.
271. Barry JD. The relative significance of mechanisms of antigenic variation in African trypanosomes. *Parasitol Today* 1997;13:212–218.
272. Brown KN, Brown IN. Immunity to malaria: antigenic variation in chronic infections of *Plasmodium knowlesi*. *Nature* 1965;208:1286–1288.
273. Brown KN. Antigenic variation in malaria. *Adv Exp Med Biol* 1977;93:5 25.
274. Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 1995;82:89–100.
275. Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, et al. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 1995;82:101–110.
276. Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, et al. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 1995;14:77–87.
277. Gardner JP, Pinches RA, Roberts DJ, Newbold CI. Variant antigens and endothelial receptor adhesion in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3503–3508.
278. Baruch DI, Gormely JA, Ma C, Howard RJ, Pasloske BL. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3497–3502.
279. Racoosin EL, Beverley SM. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp Parasitol* 1997;85:283–295.
280. Pearce EJ, Sher A. Mechanisms of immune evasion in schistosomiasis. In: Cruse JM, Lewis RE, eds. *Contributions to microbiology and immunology; Antigenic variation: molecular and genetic mechanisms of relapsing disease*. Basel: Karger, 1987, 219–232.
281. Brindley PJ, Sher A. Immunological involvement in the efficacy of praziquantel. *Exp Parasitol* 1990;71:245–248.
282. Fallon PG, Cooper RO, Probert AJ, Doenhoff MJ. Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. *Parasitology* 1992:S41–S48.
283. Grencis RK, Entwistle GM. Production of an interferon-gamma homologue by an intestinal nematode: functionally significant or interesting artefact? *Parasitology* 1997;115:5101–5106.
284. Engers HD, Bergquist R, Modabber F. Progress on vaccines against parasites. *Dev Biol Stand* 1996;87:73–84.
285. Bruno JM, Feachem R, Godal T, et al. The spirit of Dakar: a call for action on malaria. *Nature* 1997;386:541.
286. Nardin EH, Oliveira GA, Calvo-Calle JM, Nussenzweig RS. The use of multiple antigenic peptides in the analysis and induction of protective immune responses against infectious diseases. *Adv Immunol* 1995;60:105–149.
287. Hoffman SL, Doolan DL, Sedegah M, et al. Strategy for development of a pre-erythrocytic *Plasmodium falciparum* DNA vaccine for human use. *Vaccine* 1997;15:842–845.
288. Hoffman SL, Bancroft WH, Gottlieb M, et al. Funding for malaria genome sequencing. *Nature* 1997;387:647.
289. Hoffman SL, Miller LH. Perspective on malaria vaccine development. In: Hoffman SL, ed. *Malaria vaccine development: a multi-immune response approach*. Washington: American Society for Microbiology, 1996, 1–13.
290. Doolan DL, Hoffman SL. Multi-gene vaccination against malaria: a multistage, multi-immune response approach. *Parasite Immunol* 1997;13:171–178.
291. Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. *Adv Immunol* 1989;45:283 334.
292. Hoffman SL, Franke ED, Hollingdale MR, Druihle P. Attacking the infected hepatocyte. In: Hoffman SL, ed. *Malaria vaccine development: a multi-immune response approach*. Washington: American Society for Microbiology, 1996, 35–75.
293. Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig R, Nussenzweig V. Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 1987;330:664–666.
294. Seguin MC, Klotz FW, Schneider I, et al. Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: involvement of interferon-gamma and CD8+ cells. *J Exp Med* 1994;180: 353–358.
295. Stoute JA, Slaoui M, Heppner G, et al. A preliminary evaluation of a recombinant cicumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 1997;336:86–90.
296. Nussenzweig RS, Zavala F. A malaria vaccine based on a sporozoite antigen. *N Engl J Med* 1997;336:128–130.
297. Chan M-S, Hall BF, Bundy DAP. Modelling of potential schistosomiasis vaccination programmes. *Parasitol Today* 1996;12:457–460.
298. Soisson LM, Masterson CP, Tom TD, McNally MT, Lowell GH, Strand M. Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *J Immunol* 1992;149:3612–3620.
299. Lanar DE, Pearce EJ, James SL, Sher A. Identification of paramyosin as the schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science* 1986; 254:593.
300. Wilson RA. Immunity and immunoregulation in helminth infections. *Curr Opin Immunol* 1993;5:538–547.
301. Wynn TA, Oswald IP, Eltoum IA, et al. Elevated expression of Th1 cytokines and nitric oxide synthase in the lungs of vaccinated mice after challenge infection with *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 1994;153:5200–5209.
302. Coulson PS. The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine? *Adv Parasitol* 1997;39:271–336.
303. Sher A, Coffman RL, Hieny S, Cheever AW. Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J Immunol* 1990;145:3911–3916.
304. Smythies LE, Coulson PS, Wilson RA. Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J Immunol* 1992;149:3654–3658.

305. Wilson RA, Coulson PS, Betts C, Dowling MA, Smythies LE. Impaired immunity and altered pulmonary responses in mice with a disrupted interferon-gamma receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine. *Immunology* 1996;87:275–282.
306. Oswald IP, Eltoum I, Wynn TA, et al. Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill an intravascular parasite, *Schistosoma mansoni*, through the production of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:999–1003.
307. James SL, Glaven J, Goldenberg S, Meltzer MS, Pearce E. Tumour necrosis factor (TNF) as a mediator of macrophage helminthotoxic activity. *Parasite Immunol* 1990;12:1–13.
308. Wynn TA, Jankovic D, Hieny S, Cheever AW, Sher A. IL-12 enhances vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni* in mice and decreases T helper 2 cytokine expression, IgE production, and tissue eosinophilia. *J Immunol* 1995;154:4701–4709.
309. Caulada-Benedetti Z, al-Zamel F, Sher A, James S. Comparison of Th1- and Th2-associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice with irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *J Immunol* 1991; 146:1655–1660.
310. Wynn TA, Reynolds A, James S, et al. IL-12 enhances vaccine-induced immunity to schistosomes by augmenting both humoral and cell-mediated immune responses against the parasite. *J Immunol* 1996;157:4068–4078.
311. Mangold BL, Dean DA. Passive transfer with serum and IgG antibodies of irradiated cercariae-induced resistance against *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 1986;136:2644–2649.
312. Metzger DW, Buchanan JM, Collins JT, et al. Enhancement of humoral immunity by interleukin-12. *Ann NY Acad Sci* 1996;795:100–115.
313. Jankovic D, Caspar P, Zweig M, et al. Adsorption to aluminum hydroxide promotes the activity of IL-12 as an adjuvant for antibody as well as type 1 cytokine responses to HIV-1 gp120. *J Immunol* 1997;159:2409–2417.
314. Afonso LC, Scharton TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 1994;263:235–237.
315. Mougneau E, Altare F, Wakil AE, et al. Expression cloning of a protective Leishmania antigen. *Science* 1995;268:563–566.
316. Nabors GS, Afonso LC, Farrell JP, Scott P. Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3142–3146.
317. Guranathan S, Sacks DL, Brown DR, et al. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major. J Exp Med* 1997;186:1137–1147.
318. Good MF, Kaslow DC, Miller LH. Pathways and strategies for developing a malaria blood stage vaccine. *Annu Rev Immunol* 1998;16:57–87.
319. Sabchareon A, Outtara D, Attanah P, et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45:297–308.
320. Kaslow DC. Transmission-blocking vaccines: uses and current status of development. *Int J Parasitol* 1997;27:183–189.
321. Jakobsen PH, Bate CAW, Taverne J, Playfair JH. Malaria: toxins, cytokines and disease. *Parasite Immunol* 1995;17:223–231.
322. Capron A, Riveau G, M. GJ, Boulanger D, Capron M, Pierce R. Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update. *Trop Geogr Med* 1994;46:242–246.
323. Xu CB, Verwaerde C, Grzych JM, Fontaine J, Capron A. A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur J Immunol* 1991;21: 1801–1807.
324. Pearlman E, Lass JH, Bardenstein DS, et al. IL-12 exacerbates helminth-mediated corneal pathology by augmenting inflammatory cell recruitment and chemokine expression. *J Immunol* 1997;158:827–833.
325. Ottesen EA. Immune responsiveness and the pathogenesis of human onchocerciasis. *J Infect Dis* 1995;171:659–671.
326. Ottesen EA, Nutman TB. Tropical pulmonary eosinophilia. *Annu Rev Med* 1992;43:417–424.
327. von der Weid T, Kopf M, Kohler G, Langhorne J. The immune response to *Plasmodium chabaudi* malaria in interleukin-4-deficient mice. *Eur J Immunol* 1994;24:2285.
328. Marshall E. Serious setback for Patarroyo vaccine. *Science* 1996;273:1652.

第39章　病毒感染与免疫

Rafi Ahmed and Christine A. Biron①

1295 免疫学起源于对感染性疾病的研究,直到20世纪早期,免疫学研究的中心内容,仍停留在对病毒和其他微生物感染的免疫应答研究。但随着公共卫生水平提高和抗生素、疫苗的发展,感染性疾病的危害已明显减轻,许多免疫学家的兴趣也转到利用确定的蛋白和半抗原研究免疫系统。然而现在研究重点又有向病毒感染免疫转移的趋势,促使向该研究领域回归的原因有多种,首先,尽管人类在与病毒的斗争中取得了重要胜利,特别是消灭了天花病毒和即将消灭脊髓灰质炎病毒,但是病毒感染仍是引起人类疾病和死亡的主要原因[1,2],在过去的几十年中,又发现了多种新的病毒。如全球性流行的人类免疫缺陷病毒(HIV)和乙型、丙型肝炎病毒(HBV,HCV),以及最近频频暴发的埃博拉病毒(Ebola)和汉坦病毒(hantavirus)感染。而且,许多老病毒感染仍继续处于重要地位;大量的呼吸道感染仍由流感病毒和呼吸道合胞病毒(RSV)引起;而许多消化道疾病则来自于轮状病毒;近期还流行的麻疹病毒、登革热病毒和出血热病毒感染[1,2]。认识针对这些病毒的免疫应答非常必要,这不仅为了临床诊断和监测,更为了弄清保护性免疫并利用该信息来发展和改进针对这些病毒性疾病的疫苗。除重要的医学意义外,现在免疫学家逐渐认识到,病毒是探索免疫系统的极佳工具,利用确定的病毒模型可窥探免疫系统的运行机制,故越来越多的研究者利用病毒来研究免疫系统的基础问题。

为了更好地介绍病毒免疫,本章分为以下几部分:第一部分是病毒体内生活史和各种病毒感染的概述。

① R. Ahmed: Emory Vaccine Center, Emory University Schol of Medicine, Atlanta, Georgia 30322. C. A. Biron: Department of Molecular Microbiology and Immunology, Brown University, Providence, Rhode ISland 02912.

第二部分则介绍了针对病毒的先天和特异性(后天)免疫及抵御病毒感染的关键机制。接下来第三部分讨论先天免疫和特异性免疫的关系。第四部分则是有关免疫记忆和保护性免疫机制的综述。最后两个部分则分别介绍病毒感染的免疫病理学和病毒免疫逃避、持续感染的机制。

病毒感染:概述

病毒的侵入、增殖与传播

病毒成功感染需要以下条件:侵入易感宿主;在宿主内复制和播散;能排出到体外;感染新宿主(图39.1)。了解上述过程对认识不同病毒诱导的免疫应答类型和病毒感染能被控制的机制非常重要。读者如要详细了解病毒的体内生活史,可阅读病毒学教科书[1~4]。现将病毒感染过程概述如下。 1296

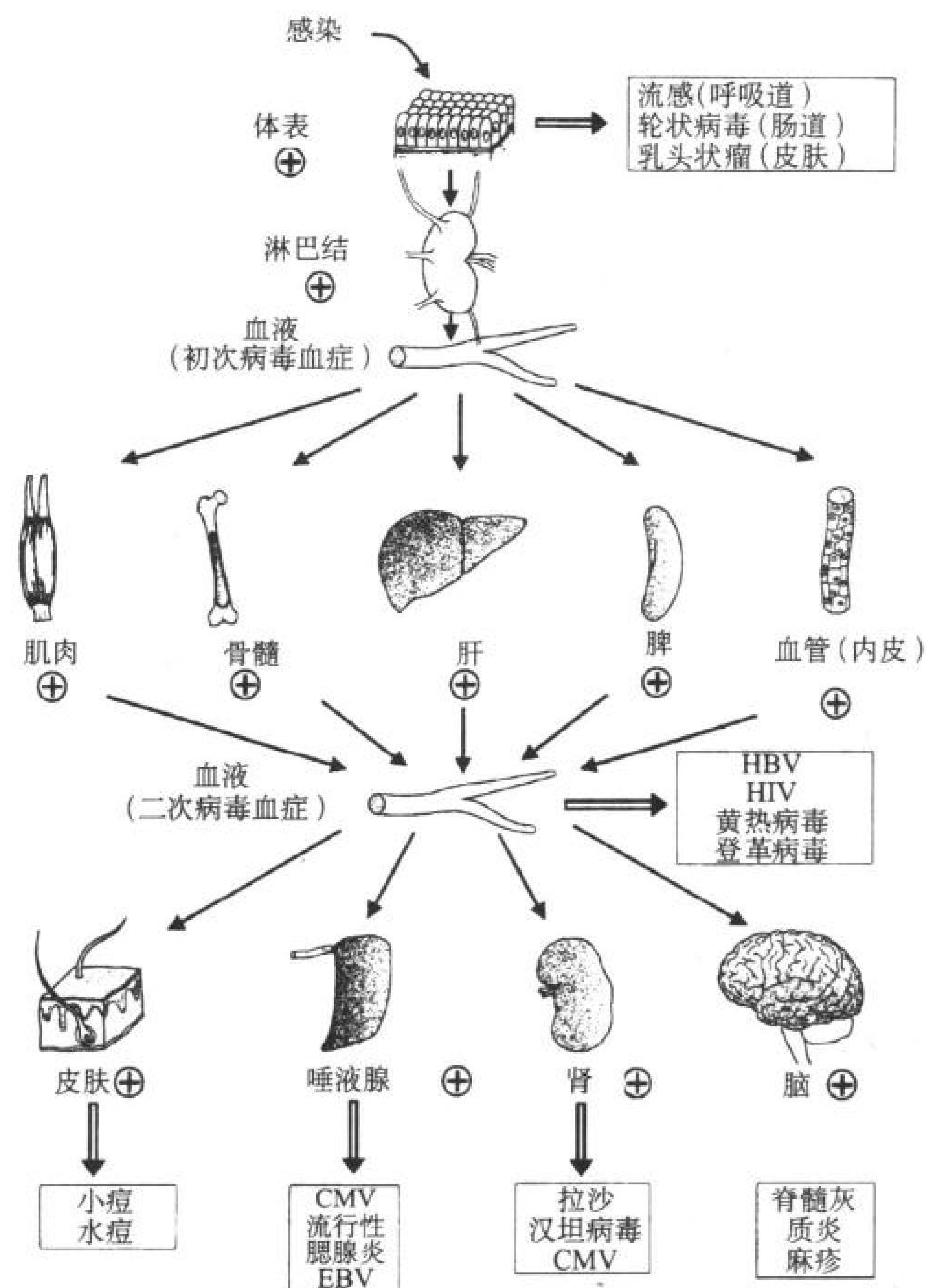


图39.1 病毒体内生活史,包括侵入、播散和排泌。(+)显示病毒的可能复制部位,小箭头显示病毒的运动,大箭头显示病毒的排泌部位。仅列出很少的具体病毒例子。血源性传播包括输血引起的HBV和HIV感染,及昆虫叮咬引起的黄热和登革病毒感染等。本图未列出神经系统播散,因为除血源性播散,病毒还有可能通过外周神经播散到中枢神经系统(CNS),如单纯疱疹病毒(HSV),狂犬病毒和水痘-带状疱疹病毒(VZV)。(引自参考文献[4]。)

病毒侵入

感染的第一部是入侵宿主。可发生在以下部位:皮肤、泌尿生殖道、结膜、呼吸道和消化道。通过这些部

位侵入的各种病毒见表 39.1 至表 39.3。皮肤是人体最大的组织,也是病毒侵入的坚韧屏障。并不是任何病毒都能穿过完整的皮肤,但在注射、动物或昆虫叮咬及微小创伤时,这种身体屏障会失去作用(表 39.1)。眼和生殖道黏膜没有这种身体屏障,靠分泌的黏液,起到一定的保护作用,但不能达到完全阻止感染的目的,对防止病毒侵入黏膜起最佳作用的是分泌的免疫球蛋白。因此,目前有许多研究都集中在发展诱导强有力、长效黏膜免疫的疫苗。

表 39.1 通过皮肤、眼或生殖道感染的病毒

感染部位	感染方式	病毒种类	举例[a]
皮肤	轻微损伤/割伤	嗜肝 DNA 病毒属	乙型肝炎病毒
		疱疹病毒属	单纯疱疹病毒-1
		乳头状瘤空泡病毒属	人乳头状瘤病毒
		痘病毒属	天花
	动物咬伤	疱疹病毒属	猴疱疹病毒 B
		弹状病毒属	狂犬病
	虫媒叮咬	布尼亚病毒属	裂谷热
		黄病毒属	黄热病、登革热
		呼肠病毒属	克罗拉多蜱热
		披膜病毒属	东方脑炎
	注射	黄病毒属	HCV
		嗜肝 DNA 病毒属	HBV
		疱疹病毒属	巨细胞病毒
		反转录病毒	HIV、人 T 细胞白血病病毒 Ⅰ/Ⅱ
结膜	接触	腺病毒属	腺病毒
		小核糖核酸病毒	肠病毒 70
生殖道	接触	黄病毒属	HCV
		嗜肝 DNA 病毒属	HBV
		疱疹病毒属	单纯疱疹-2
		乳头状瘤空泡病毒属反转录病毒	人乳头状瘤病毒
			HIV

[a]仅以人类病毒为例。

大量的病毒是通过呼吸道感染,这是最常见的感染途径(表 39.2)。呼吸道本身存在一些机械屏障,如鼻腔中的黏液纤毛毯。外源颗粒(如病毒)被黏液捕获后从鼻腔或肺转运到咽部,并通过吞咽进入胃肠道(对许多病毒来说是非常恶劣的环境)。而且鼻甲使空气的吸入通过狭窄和复杂的路径,并阻止病毒性颗粒进入呼吸道。但是,所有这些呼吸道的机械障碍都不能完全有效地防止病毒感染,能否阻止感染的关键因素是,是否存在有效的分泌性抗体。呼吸道感染病毒可分为两类。一类是引起局部呼吸道症状,通常仅局限在呼吸道,如流感病毒、鼻病毒(普通感冒)和呼吸道合胞病毒(RSV);另一类是不产生早期呼吸道症状,而是播散到其他组织并引起全身性疾病(如麻疹、流行性腮腺炎、水痘和拉沙热)。

1297

表 39.2 通过呼吸道感染的病毒

发病部位	病毒种类	举例[a]
上呼吸道	腺病毒属	腺病毒
	小核糖核酸病毒	鼻病毒,某些肠病毒
下呼吸道	布尼亚病毒属	Sin Nombre
	冠状病毒	冠状病毒
	正黏病毒	流感
	副黏病毒	副流感、呼吸道合胞病毒
无呼吸道症状的全身性疾病	沙粒病毒属	拉沙热
	布尼亚病毒属	汉坦病毒
	疱疹病毒属	水痘、巨细胞病毒
	乳头瘤空泡病毒属	BK 和 JC 病毒
	副黏病毒	流行性腮腺炎、麻疹
	痘病毒属	天花(已灭绝)
	披膜病毒属	风疹

[a]仅以人类病毒为例。

通过消化道感染的病毒见表39.3。这类病毒部分可引起肠炎(如轮状病毒、诺瓦克病毒),另一些可引起全身性疾病,而无肠道症状(脊髓灰质炎、甲型病毒性肝炎)。肠道具备多种屏障,对病毒来说是恶劣环境,病毒要通过这种途径感染,必须耐受酸、胆汁和蛋白水解酶的破坏作用。胆汁降解脂质,在胆汁和酸的作用下,囊膜病毒迅速被灭活。通常只有非囊膜病毒(如含有蛋白外壳)才能生存并通过肠道感染,最好的例子是HAV和HBV。HAV是非囊膜病毒(与脊髓灰质炎病毒和轮状病毒相似),而HBV是囊膜病毒(与流感病毒和HIV相似),HAV和HBV都能在肝复制并通过胆汁排到肠道。HAV可存活并以传染性形态通过粪便排出(因此具肠道传染性),而HBV则在肠道快速灭活。病毒是否能通过肠道感染,也与耐受蛋白水解酶特性有关。有趣的是,像轮状病毒和呼肠孤病毒,可利用肠道蛋白酶增强感染性。蛋白酶水解切除部分外壳蛋白使病毒颗粒更具感染性[1,2]。

1298

表39.3 通过消化道感染的病毒

感染部位	病毒种类	例子[a]
口腔/咽	疱疹病毒属	单纯疱疹病毒,EB病毒,巨细胞病毒
肠道	腺病毒属	腺病毒40,41
引起肠炎	星状病毒属	星状病毒
	嵌杯病毒属	诺瓦克病毒
	呼肠病毒属	轮状病毒
引起一般非肠道性疾病	小核糖核酸病毒	脊髓灰质炎病毒
		HAV
通常无症状	腺病毒属	某些腺病毒
	小核糖核酸病毒	肠病毒
	呼肠病毒属	呼肠病毒

[a]仅以人类病毒为例。

病毒的播散

病毒侵入宿主后,感染可以局限在侵入部位,也可以播散到全身。可引起局部或全身性疾病的病毒见表39.4。这种差异决定产生的保护性免疫的持续时间,病毒局部感染引起的保护性免疫通常持续时间较短,而出现临床症状的全身性感染引起的保护性免疫持续时间要长得多。引起这种差异的机制将在后面有关免疫记忆章节中讨论。

表39.4 病毒感染初始部位与发病关系[a]

感染部位	局部[b]	全身[c]
口咽部		巨细胞病毒
		EB病毒
		单纯疱疹病毒-1
呼吸道	流感病毒	麻疹
	呼吸道合胞病毒	流行性腮腺炎
	鼻病毒	风疹
		水痘
		拉沙
肠道	诺瓦克病毒	HAV
	轮状病毒	脊髓灰质炎
生殖道	人乳头状瘤病毒[d]	HBV
		HCV
		HIV

[a]仅以人类病毒为例。[b]感染限定在体表,潜伏期短(通常在1周以内发病)。[c]感染最初发生在体表,随后扩散到全身,潜伏期长(超过1周)。[d]感染局限在病毒入侵部位,但乳头状瘤可在数周后发生。

多数病毒在局部侵入部位经早期复制后,进行局部细胞-细胞间传播(图 39.1)。然而,吞噬细胞内的游离病毒或病毒性颗粒可以经输入淋巴管从局部感染部位转运到局部淋巴结。这是病毒生活史中的一个关键阶段。这不仅是感染扩散的第一步,也是特异性免疫应答的开始。目前大多数研究认为,早期免疫应答的抗原呈递最早发生在局部淋巴结。病毒在巨噬细胞中的复制和生存能力是病毒播散的重要决定因素。病毒颗粒在局部淋巴结中被吞噬细胞摄取,能在巨噬细胞中顺利复制的病毒易于扩散。

表 39.5　感染循环血细胞的病毒

细胞类型	病毒[a]
单核细胞	CMV
	登革病毒
	埃博拉病毒
	HIV
	拉沙
	麻疹
	风疹
	黄热
B 细胞	EBV
T 细胞	HIV
	人类 T 细胞白血病病毒Ⅰ/Ⅱ
	人疱疹病毒 6、7
	科罗拉多蜱热[b]

[a]仅以人类病毒为例。[b]科罗拉多蜱热病毒在骨髓红母细胞中复制,在成熟红细胞中循环。

上面所述的是病毒经皮下侵入和淋巴扩散引起局部播散,而感染最重要的传播途径是血液,可以使病毒播散到机体的任何器官。病毒经感染部位和/或淋巴系统进入血液后,称为早期病毒血症。在大多数病例,早期病毒血症的病毒水平是非常低的,通过常规方法不易检出。进入血液后,病毒可能以游离状态存在于血浆中或呈细胞关联状态。细胞关联状态的优越性是为病毒逃避中和性抗体提供一潜在手段。不同病毒由不同细胞携带,例如,EB 病毒(EBV)通过 B 细胞转运;HIV 则由 CD4 T 细胞和单核细胞传递;麻疹病毒通过单核细胞和 T 细胞;巨细胞病毒通过单核细胞等(表 39.5)。所有这些例子中,靶细胞上都存在适当的受体和/或共受体,病毒可通过这些受体和/或共受体感染靶细胞。病毒就可在这些循环血细胞内进行实质性增殖,接着随血流感染其他组织。早期病毒血症可播种的靶器官包括肝、脾、肌肉和骨髓等,不同的病毒在不同的组织中增殖,如 HBV 和 HCV 主要在肝细胞中,而 HIV 主要在 CD4 T 细胞和巨噬细胞中。有些病毒,特别是那些出血热病毒(埃博拉病毒和拉萨病毒)则在血管的内皮细胞中复制。病毒这种有选择性地在靶组织中增殖,可导致血液中病毒数量增多,形成二次病毒血症。二次病毒血症的病毒水平可非常高,并能向远处器官播散,如皮肤(麻疹、天花,水痘-带状疱疹病毒)、唾液腺(腮腺炎病毒和 EBV)、肾(麻疹、CMV、腮腺炎和汉坦病毒)、睾丸(腮腺炎病毒)、脑(脊髓灰质炎、HIV 和麻疹病毒)以及胎盘(风疹病毒和 CMV)。侵入胎盘可导致胎儿感染,引起死胎或先天性异常。网状内皮系统不能起到有效清除血源性病毒颗粒的作用,在与血液接触的细胞内病毒持续复制情况下,这种病毒血症可持续存在。这些细胞包括循环血细胞以及窦状结构器官(肝、脾)细胞。因此,像 HBV、HCV、HIV、麻疹病毒、埃博拉病毒和黄热病毒,可在血中呈高水平,而流感病毒复制局限在肺,其病毒血症不易检出。

1299

病毒的泌出和传染

病毒体内生活史的最后一段是泌出和传染。任何病毒的生物学需要都是传染,因为其生存依赖于对易感宿主感染的延续。一些病毒,像麻疹、脊髓灰质炎和腮腺炎病毒,只有人类一种宿主;而另一些病毒,如流感病毒、黄热病毒和狂犬病毒则有一种以上的宿主。病毒泌出通常通过身体表面的某种途径,其中包括病毒侵入途径。病毒颗粒的泌出可通过唾液、痰、尿、粪、精液和皮肤损伤等。病毒传染的各种模式,包括动物传染病(动物和昆虫)见表 39.6。

上述的有关病毒侵入、播散、传染与病毒免疫是密切相关的。完整评价何种免疫反应对控制感染最有益,了解病毒是如何进入宿主,感染哪种细胞,又怎样进行传染是非常必要的。

表 39.6　病毒传播

传播方式	举例[a]	注释
气溶胶/唾液-呼吸或唾液传播	流感病毒 EBV 麻疹 流行性腮腺炎	传播不容易被控制
粪-口传播	脊髓灰质炎 轮状病毒 HAV	可被公共卫生措施控制
性传播	HSV HIV HPV	适当注意即可控制
动物性传染病		
昆虫-人	登革热	通过控制媒介(昆虫)和/或动物感染，可以控制人类感染。不(或极少)发生人与人之间传播
动物-人	狂犬病 拉沙热 汉坦病毒	
动物-昆虫-人	黄热病	

[a]仅以人类病毒为例。

病毒感染模式

根据机体感染后不同时段病毒的可检测水平，通常把病毒感染分为三类(图 39.2)。如下：①急性感染后病毒被宿主免疫反应清除。许多病毒感染属于这一类，包括脊髓灰质炎病毒、流感病毒、轮状病毒、腮腺炎病毒、黄热病毒和呼吸道合胞病毒等。②急性感染后伴潜伏性感染。病毒可以非感染形式持续存在，并伴有间歇性的病毒活动和泌出。潜伏感染的病毒在活跃期可感染特定细胞，或在某种条件下感染其他非易感细胞。引起这类感染的经典例子是疱疹病毒(HSV、VZV 和 EBV)。③急性感染后转为慢性感染。感染病毒持续泌出或在感染组织中持续存在。这类感染通常发生在宿主免疫反应未能在急性感染期完全清除病毒的情况下。急性期原发感染的宿主细胞可把感染播散到其他低易感细胞，且宿主产生的免疫反应只能减缓病毒复制，不能完全清除病毒。这类病毒感染包括 HIV、HBV 和 HCV。

我们虽然理想化地确定了上述病毒感染模式，但有时在不同的组织或细胞，病毒表现出不同的感染模式，或者包含这些常见模式，或者不能与这些定义完全吻合。例如，EBV 可在 B 细胞内潜伏感染，而其原发感染发生在咽上皮细胞[1,2]。因此，图 39.1 显示的模式只展现了一可变的题目，而不是精确的定义。

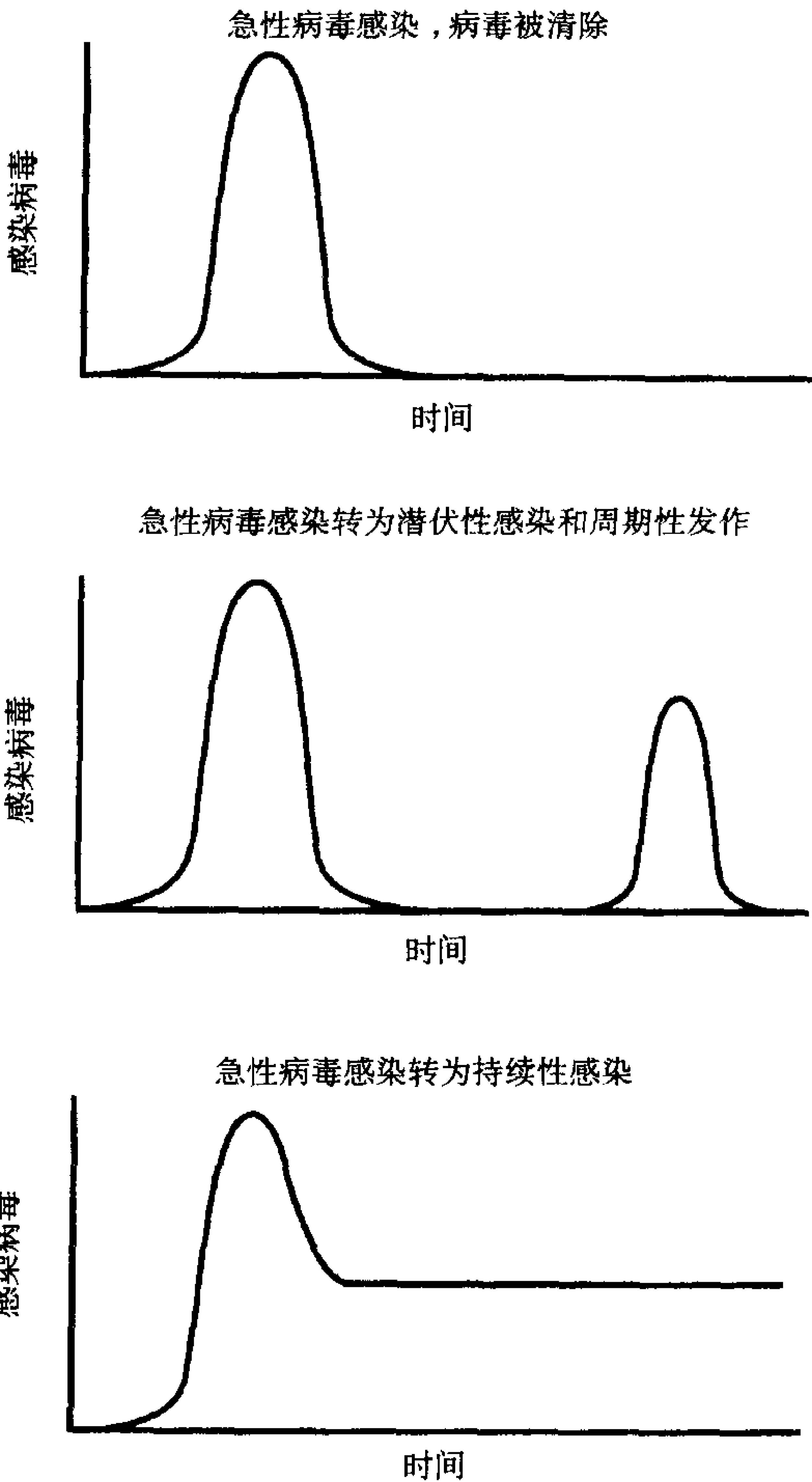


图 39.2　病毒感染的一般模式。

1300

宿主抗病毒防御

免疫系统的组成

本书的其他章节已广泛系统地介绍了哺乳动物免疫系统的发育、结构和功能。但是对病毒免疫的背景，特别是对免疫细胞和二级淋巴组织(淋巴结和脾)进行简单的注释还是必要的。

介导特异性免疫的细胞主要是淋巴细胞，再加上单核细胞，占了正常机体白细胞的大部分。通过淋巴细胞上的特异性识别单位，包括T细胞受体(TCR)、免疫球蛋白(Ig)分子和B细胞受体等，这类细胞可高度精确地识别自我和非我。T细胞群在胸腺被筛选，允许表达TCR前体细胞生存，TCR与表达自身Ⅰ类(CD8亚群)或Ⅱ类(CD4亚群)MHC糖蛋白的细胞亲和力较低，而对因表面MHC分子与经加工的非我(如病毒蛋白)肽结合，提示异常或"危险"信号的体细胞(以后在胸腺以外环境中遭遇)，则有较高亲和力。病毒蛋白可来源于胞浆新合成产物降解(Ⅰ类，内源性途径)，或来源于以内生小泡-溶酶体方式的吞噬作用(主要是Ⅱ类途径，也可以Ⅰ类，外源性途径)[5,6]。MHC分子属于已知最多态的分子，反映出物种为避免因肽MHC糖蛋白复合物形成失败，导致对新病原体的无免疫应答的需要。

2个淋巴细胞亚群的TCR都含α和β二亚单位形成的异聚体，不能仅凭序列差异来判断TCR属于$CD8^+$还是$CD4^+$ T细胞[7]。CD4和CD8分子都具有与特定MHC分子恒定区的辅助结合功能，并且还有6个其他TCR相关链(CD3复合物)，这些都具有向胞浆传导信号的能力。另一类TCR，含γ和δ亚单位异聚体，在小鼠和人，主要表达在皮肤和各种黏膜等各种实质组织的淋巴细胞上，循环T细胞上分布较少[8]。γδ T细胞在鸡、猪、牛和羊等动物分布较广[9,10]。虽然在病毒引起的发生炎症的部位发现γδ T细胞，但要确定其功能性作用还很困难[11~13]。有研究显示，γδ T细胞在调控单纯疱疹病毒(HSV)感染中起重要作用[14]。有人认为γδ TCR的结合特性更接近于免疫球蛋白，倾向于识别已结合其他蛋白衍生肽的热激蛋白。通过细菌系统研究发现，γδ T细胞能识别非肽抗原和含修饰氨基酸的肽[15~17]。这类靶抗原与病毒系统有何关联目前还不清楚。B细胞由骨髓生成，通常局限在二级淋巴组织的生发中心。其受体-免疫球蛋白分子，能直接与病毒蛋白三级结构结合。作为不同分化的结果，B细胞同T细胞应答最重要的差异是免疫球蛋白分子亲和力的成熟。相反，T细胞库(T-cell repertoive，包含所有可用的TCR谱)在离开胸腺时就已经确定。

1301

参与先天免疫的细胞包括单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、树突细胞和多形核白细胞(PMN)。这些细胞群在骨髓发育和成熟。多数时间，NK细胞和PMN集中在血液和脾，但如有局部或全身需要，可迁移到各组织中。虽然全身性病毒感染时，在淋巴结中一般找不到NK细胞，但发现在抗原[18]或寄生虫[19]局部刺激下，NK细胞可被趋化到淋巴系统中。相反，与血液和脾相似，淋巴结中单核细胞、巨噬细胞和树突细胞的密度通常较高。定位在淋巴结和脾，使这些细胞具备抗原加工和呈递功能，从而刺激适应性免疫应答。

尽管在病毒感染组织病理切片中可明确证实PMN存在，但有关其作用研究被严重忽视了，这主要因为以往对PMN功能的概念，偏倚地认为其主要作用于细菌感染而不是病毒感染。新试剂的出现推动了树突细胞的研究，但有关其如何引导先天抗病毒免疫研究仍处于初期阶段。这二类细胞都具备促进先天抗病毒免疫的潜能，因为它们在特定条件刺激下可产生细胞因子。与对PMN和树突细胞不同，对病毒感染时巨噬细胞和NK细胞的活化和功能已有明确的认识，它们针对感染可产生多种可溶性因子介导或影响抗病毒机制，并与其他免疫反应相互作用。

哺乳动物的二级淋巴组织由淋巴结、脾和黏膜相关淋巴组织构成，这些组织都具有两套引流结构：静脉和淋巴系统，分别由脾和淋巴结监控。细胞外液可被采集进入向心淋巴管，并通过机体的正常运动和肌肉收缩泵入局部淋巴结(如颈部、腘窝和腋窝淋巴结)。目前认为真皮注射是进入淋巴管所必需的。病毒通过该途径侵入可被树突细胞(朗格汉斯细胞)或单核细胞和巨噬细胞摄取，并通过淋巴输送至淋巴结，诱导早期免疫反应。相反，如感染病毒直接进入血液，则被转运到脾，在这种情况下，早期免疫反应发生在脾而不是淋巴结。

具初级免疫活性的T、B细胞通过高度专一的内皮小静脉(可表达淋巴细胞膜上L选择素，CD62L的特异性配体)进入淋巴结。进入脾并不是由L选择素依赖的选择性通过途径控制。而记忆T细胞可表达很少的L选择素[20~22]，并能通过向心淋巴管从实体组织的毛细血管后微静脉输送到淋巴结。T、B细胞通过离心淋巴管离开淋巴结，然后在大淋巴管汇合，流入腔静脉，经过肺，被动脉系统输送到全身。受抗原刺激的T、B细胞能渗透到有病毒生长的组织，B细胞主要作用于中枢神经系统(CNS)的病毒感染[23]。确实能在脑脊液中检测到局部产生的免疫球蛋白，且对限制脑组织的感染十分重要(因神经元细胞不表达MHC糖蛋白)。通常主要淋巴细胞在血液-组织-淋巴间持续循环，T细胞亚群的重要功能之一是调节免疫监视。

宿主针对病毒感染免疫应答概述

针对病毒感染的免疫应答可分为两大类:先天性或非特异性免疫应答和适应性或特异性免疫应答。它们分别在不同时间对控制感染起着关键作用。感染后,先天性免疫应答几乎立即启动(<1d),1型干扰素(IFN)产生,NK细胞活性增强(图39.3)。这种早期非特异性免疫应答是总体控制病毒复制和播散的关键。先天性免疫应答虽不能完全清除病毒,但提供了关键的第一道防线,特别是对于年幼宿主(如初次感染)。特异性免疫应答是清除感染的关键,通常在大约一周后形成,效应CD4和CD8 T细胞应答直到病毒感染清除后才停止,而抗体产生则能持续数月至多年[20]。下面就详细介绍针对病毒的先天或特异性免疫应答。

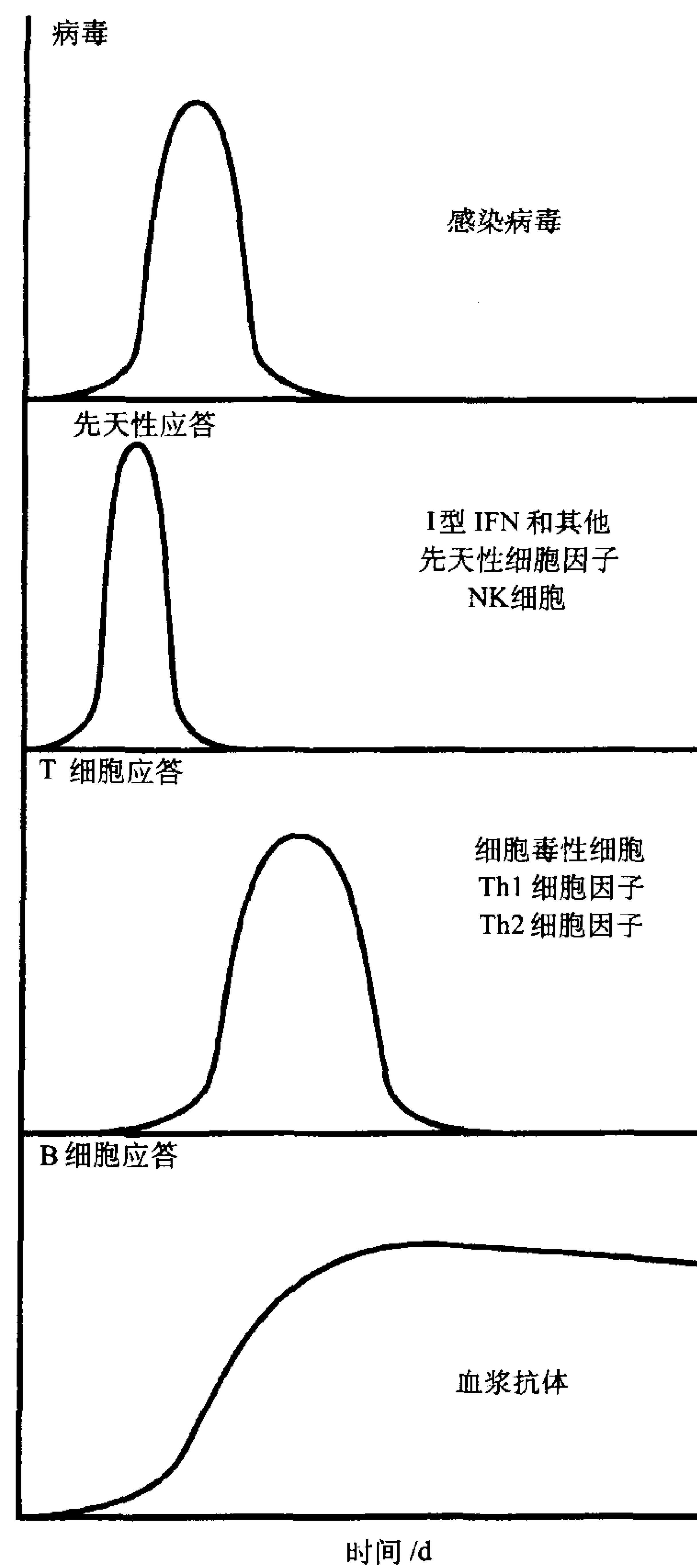


图39.3 病毒初次急性感染宿主应答动力学。

1302

先天免疫

白细胞群,除外适应性免疫应答中的T、B淋巴细胞,构成了先天免疫应答的基础。而这些免疫细胞群和各种不同的非免疫组织细胞产生的可溶性细胞因子也在先天免疫应答中扮演重要角色。由于先天免疫作用在适应性免疫之前,因此在原发感染的早期起着重要的防御功能。先天免疫系统的各组分所介导的保护作用,主要通过抑制病毒复制和(或)清除病毒感染宿主细胞阻断早期病毒感染(图39.4)。事实上,适应性免疫应答常通过先天免疫组分来实现抗病毒效应。在此后数年,先天免疫系统既可通过其细胞内活性成分,又可通过创造特定环境条件来促进和(或)决定往后的适应性免疫。NK细胞、单核细胞和巨噬细胞细胞成分除可立即产生效应外,这些先天免疫应答的可溶性组分还能调节细胞移动,使效应细胞定位在感染部位和使适应性免疫系统的T、B细胞向抗原呈递部位集中。此外,先天性细胞因子应答提供的内源性环境,可调控特定的T细胞和B细胞应答(图39.4)。虽然以往有关这类细胞因子途径研究多集中于细菌和寄生虫感染,发现其控制T细胞Th1或Th2型应答,但现已证实细胞因子途径也能调控病毒感染的免疫应答。图39.4说明不同性质的病原体,由于存在宿主没有的独特化学结构,诱导出的细胞因子应答可依次促进针对这类抗原的有效免疫。总之,先天免疫不仅在适应性免疫产生较慢的情况下起到保护宿主的作用,而且还可控制适应性免疫的质和量。

细胞因子

可溶性细胞因子是抵御病毒感染的重要物质,每种细胞因子通常具有多效性,即具有多方面且不同的影响力。然而研究发现感染的细胞因子应答是连锁的,可同时或依次表达多种因子。多种细胞可合成细胞因子提供给先天性免疫应答,一些受感染的或活化的非免疫细胞,如成纤维细胞和内皮细胞也可产生细胞因子。可提供给先天性免疫的细胞因子见表39.7,已知这些细胞因子在病毒感染的早期产生,对先天性免疫非常重要。不同的病毒感染,应答细胞因子的数量和成分不同,这种差别对控制免疫应答,使其对宿主最有

益是非常重要的。已知针对病毒感染先天免疫主要细胞因子如下。

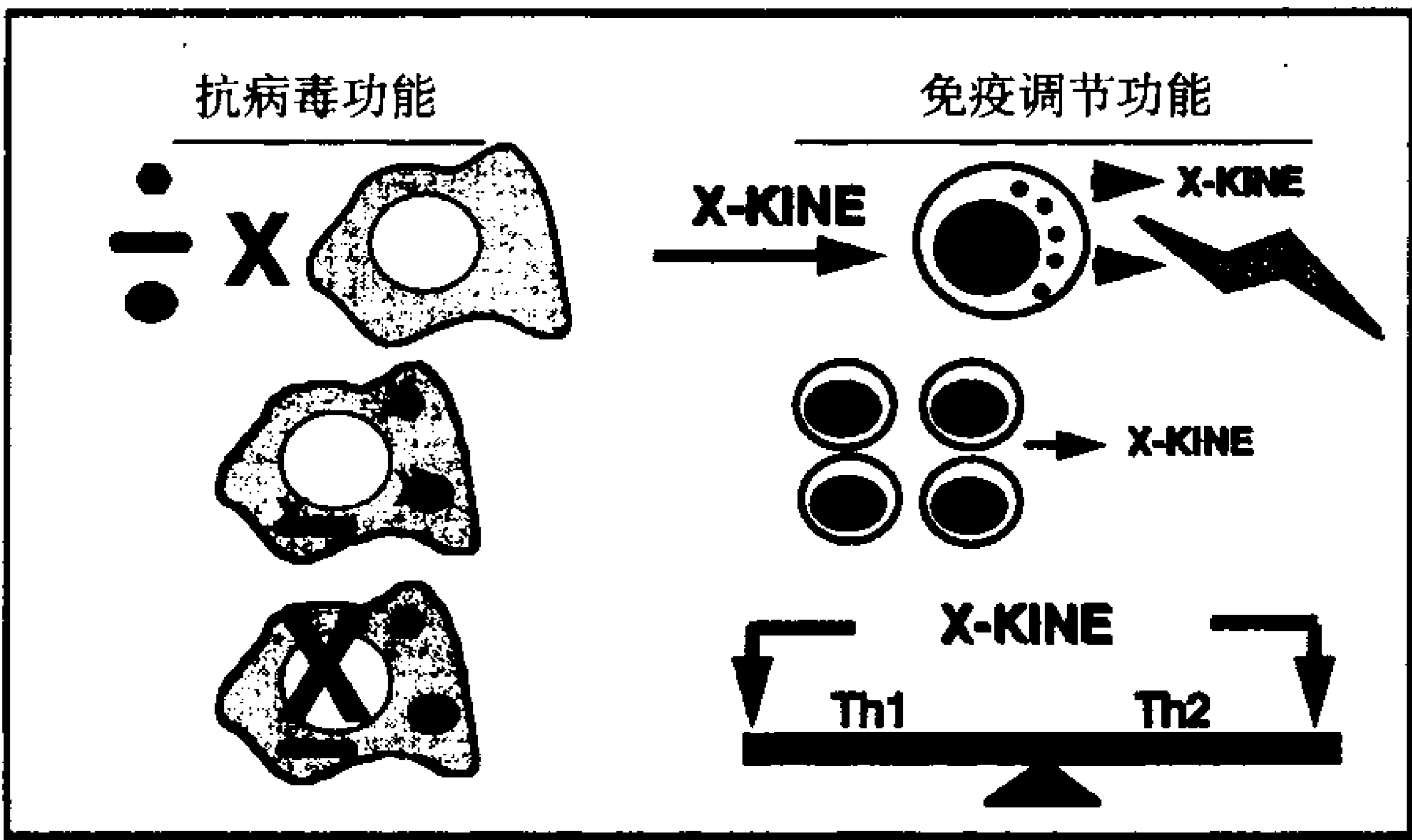


图 39.4 病毒感染先天应答的作用。先天免疫可通过阻断对细胞感染、抑制细胞内病毒复制、和(或)溶解病毒感染细胞等在病毒感染早期提供抗病毒活性。此外,先天免疫系统细胞因子成分(X-KINE)能够介导广泛的免疫调节功能。这包括先天免疫系统(如 NK 细胞、单核细胞和巨噬细胞)细胞组分的活性,可产生其他细胞因子和(或)介导抗病毒活性,此外,早期细胞因子应答能调节细胞转运,有助于免疫细胞活化定位或到达发挥抗病毒功能部位,这些微量内源性细胞因子可促进最有益的获得性免疫,如 Th1 或 Th2 型应答。

表 39.7 病毒感染时具促进先天免疫能力的细胞因子

细胞因子	非适应性细胞来源	功能	
		抗病毒	免疫调节
IFN-α/β	单核细胞/巨噬细胞 病毒感染的免疫和非免疫细胞	XXX	XXX
TNF	单核细胞/巨噬细胞 NK 细胞 其他非免疫细胞	XXX	XXX
IFN-γ	NK 细胞	XXX	XXX
IL-12	单核细胞,巨噬细胞 PMN's, 树突状细胞	XX	XXX
IL-1α, IL-β	单核细胞/巨噬细胞 其他非免疫细胞	?	XX
IL-6	单核细胞/巨噬细胞 其他非免疫细胞	?	XX
IGIF	单核细胞/巨噬细胞 其他非免疫细胞	?	XX
IL-15	单核细胞/巨噬细胞 其他非免疫细胞	?	XX
IL-10	单核细胞/巨噬细胞 其他非免疫细胞	?	XX
TGF-β	单核细胞/巨噬细胞 其他非免疫细胞	X	X

α和β干扰素

最早确定的,也可能是认识最深的具先天防御功能的细胞因子是 1 型干扰素(IFN),具有抑制病毒复制功能[24]。在人类和小鼠,编码该细胞因子家族的基因有多个,其中可编码多个 IFN-α 和单个 IFN-β 蛋白。多数(但不是全部)病毒都能诱导 IFN-α/β,虽然关于诱导途径还有许多有待研究,但发现正常细胞中检测不到的双链 RNA(dsRNA),作为许多 RNA 或 DNA 病毒复制的结果,可在被感染细胞中出现,且目前认为是 IFN-α/β 的诱导物。聚肌胞苷酸(polyinosinic-polycytidylic acid, polyI:C)是一种 dsRNA 合成类似物,也是一种 IFN 化学诱导剂[24,25]。然而还存在一些其他诱导途径,包括特定病毒与其细胞表面受体间交互作用[26~28]等。通常白细胞(包括巨噬细胞)产生的 IFN-α 比 IFN-β 多,而其他类型细胞(包括成纤维细胞)产生的 IFN-β 多。

1303

感染细胞产生的1型IFN可直接使邻近未感染细胞处于抗病毒状态。近几年来,有关IFN-α/β介导效应所需的受体和信号传导分子研究出现了信息爆炸[24,29]。配体结合后细胞内途径激活特异性酪氨酸激酶(如TyK2和JAK1)和下游信号传导及转录活化子(如Stat1、Stat2和Stat4)。但是防御功能的细胞内最终调节器仍不完全清楚[24]。目前研究最透的IFN-α/β抗病毒途径,是通过诱导2'-5'-寡腺苷酸合成酶和dsRNA依赖的蛋白激酶(PKR),在dsRNA存在情况下,这些酶可分别通过活化RNase L降解mRNA,以及使翻译启动因子延长因子2(eIF2)磷酸化,阻止其从非活性结构回复到活性结构,从而抑制宿主细胞蛋白合成(图39.5)。结果导致细胞蛋白合成受阻,病毒复制受抑制。另一组IFN诱导的蛋白是Mx分子,对特定病毒感染具抵抗力。体外研究还发现,足够高浓度的1型IFN可抑制细胞增殖。多数病毒对IFN-α/β介导的抗病毒效应敏感,包括RNA病毒、口腔疱疹病毒(VSV)、流感病毒、小核糖核酸病毒(picornavirus)、DNA病毒、HSV和痘病毒(VV)[24]。

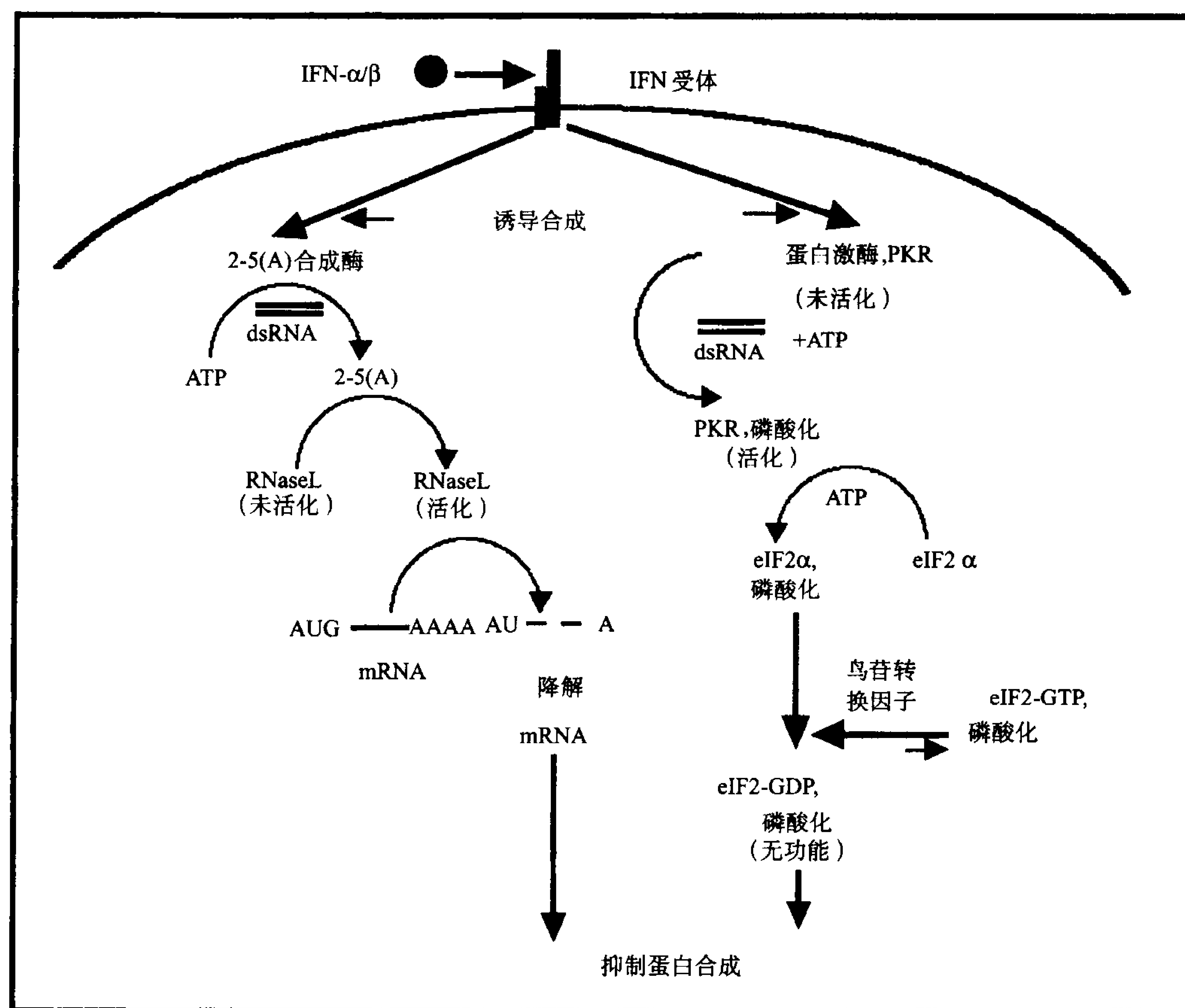


图39.5 IFN-α/β诱导的抗病毒过程。该类细胞因子具有诱导抑制翻译和抑制病毒复制两种独立途径。这两种途径都作用于双链RNA(dsRNA),一种利用2-5(A)合成酶活化Rnase L降解RNA,另一种利用dsRNA依赖的蛋白激酶K(PKR)磷酸化翻译启动因子eIF-2,磷酸化的eIF-2不能再循环,因此其功能被限制在细胞内。(引自参考文献[24]。)

病毒感染小鼠,如果中和了IFN-α/β功能[30],或者造成IFN-α/β受体缺陷[31~33],或通过遗传突变使信号传导分子缺陷[34],均表现出对IFN-α/β途径明显耐受。研究最深的是淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、VV和VSV。IFN-α/β功能缺乏明显抑制抵御感染能力。IFN-α/β除了直接细胞内抗病毒作用外,还具有显著的免疫调节作用,包括改变细胞分布[25,35~37],活化NK细胞细胞毒活性[38],调节细胞因子和细胞因子受体基因表达[39~41],诱导Ⅰ类MHC分子以促进CD8 T细胞应答[42],体内诱导适度的NK细胞和记忆T细胞激增[43~45]。

因此宿主如果失去了 IFN-α/β 诱导途径，则可通过多种机制改变对感染的易感性。

肿瘤坏死因子 α 和 γ 干扰素

在某些病毒感染（并非所有病毒性感染）的早期，其他已知具直接抗病毒作用的细胞因子就是 NK 细胞产生的 γ 干扰素（IFN-γ）和肿瘤坏死因子 α（TNF-α）[46~52]。这些细胞因子产生的抗病毒途径似乎与 1 型 IFN 重叠。与 IFN-α/β 相比，TNF 作用弱得多，但具协同作用。此外 IFN-γ 也是一种有潜力活化剂，与 TNF 一起能协同 IFN-α/β 活化可诱导的一氧化氮合成酶（iNOS），iNOS 依赖途径的抗病毒作用是由巨噬细胞系细胞介导的[53]。TNF 可促进白介素-12（IL-12）诱导 NK 细胞 IFN-γ 的产生[54]，这 2 种细胞因子还具有其他一系列免疫调节作用。

其他细胞因子

1304 先天免疫系统和（或）非免疫细胞还能产生其他一些具介导抗病毒或免疫调节潜能的细胞因子。包括 IL-12、IL-1α、IL-1β、IL-6、IFN-γ 诱导因子（IGIF）、IL-15，IL-10 和转化生长因子-β（TGF-β）等，其中多数（但不是全部）可在某些病毒性感染中被诱导产生。多数病毒性感染 IL-12 mRNA 是升高的，但其中只有部分能检测到具生物学活性 IL-12 蛋白[39,51,55~58]，其产物能被 IFN-α/β 抑制[39]。IL-6 蛋白可在多种感染中出现，包括各种疱疹病毒感染[51,59~62]。TGF-β1 虽仅在少数病毒感染产生，但已在蛋白水平被证实[63,64]。有限的研究表明，人类疱疹病毒-6（HSV-6）和人类疱疹病毒 7（HSV-7）感染可诱导 IL-15 表达[65,66]，IL-10 也能在病毒感染时产生[60]。尽管某些细菌产物可诱导高水平的 IL-1α 和 IL-β，但在 CMV 感染时，该类蛋白因子似乎呈更适度的水平[51,62]。IGIF 仍需进一步研究。

这些细胞因子中，仅部分亚群显示出抗病毒活性。IL-12具有诱导 NK 细胞 IFN-γ 产生的能力，并可通过该途径促进抗病毒和免疫调节[49]。IL-12 还能调节非 IFN-γ 依赖效应。IL-12 介导的其他防御途径似乎发生在 VSV[67] 和小鼠 CMV[50] 感染。由于 IL-12 能增强 TNF 受体表达[68]，因此可潜在促进 TNF 介导的抗病毒效应。IL-12 还可诱导不同的 NOS，并参与 NOS 这一非 TNF 和 IFN-γ 依赖机制介导的抗病毒防御途径[67,69]，TGF-β1 可抑制人乳头状瘤病毒基因表达[70]。

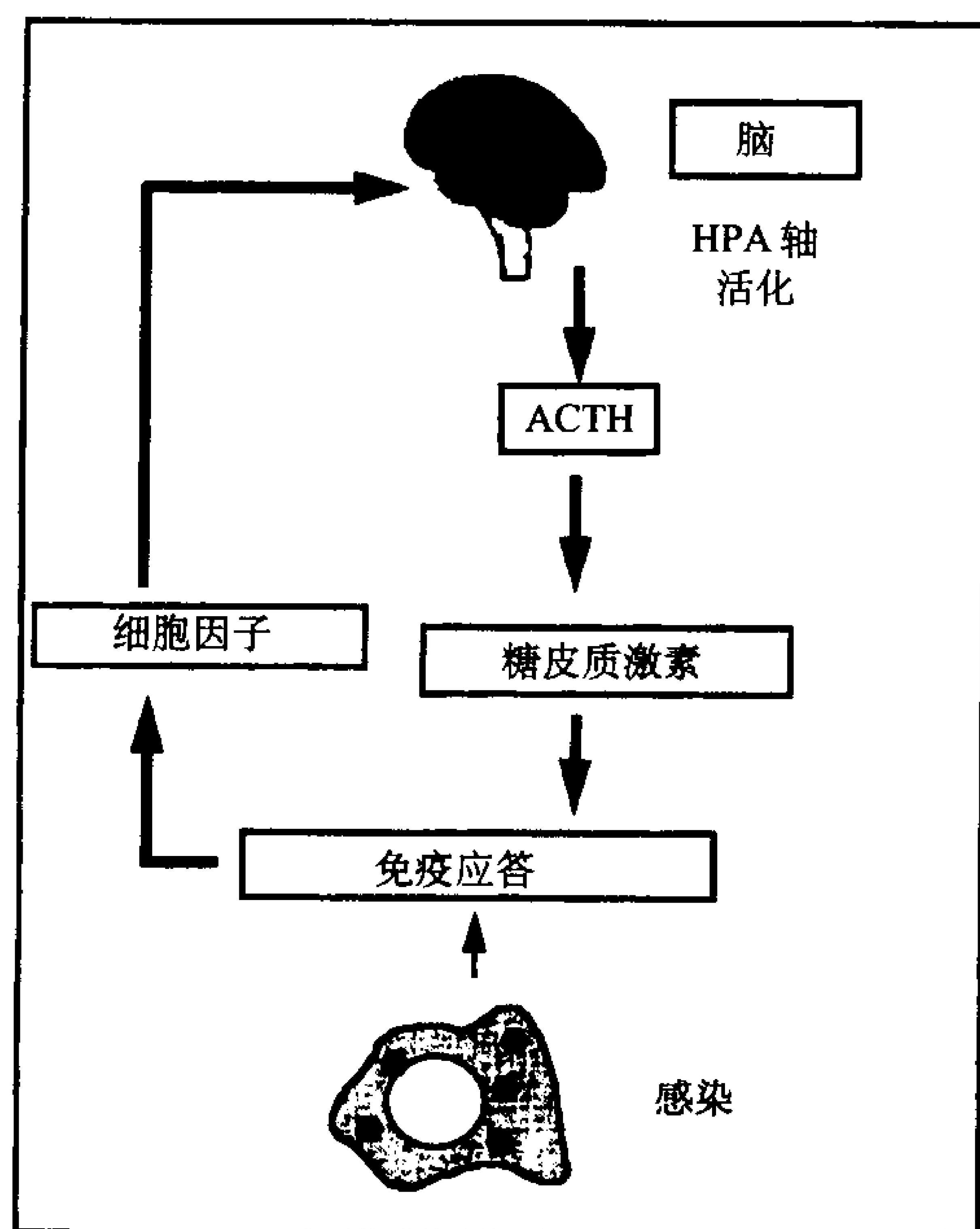


图 39.6 病毒感染中免疫和神经内分泌系统限制内源性免疫应答的关系。高水平的特定细胞因子能介导下丘脑-垂体-肾上腺（HPA）轴。这种活化的最终产物是刺激肾上腺产生糖皮质激素，已知这些激素具有广泛的免疫调节功能，包括抑制细胞基因表达。该途径能够保护宿主不会因高水平的细胞因子而受损伤。

这些细胞因子分别都能通过不同的免疫调节作用影响适应性免疫应答。尽管病毒感染时其相对重要性还有待进一步证明，但已发现 IL-1α、IL-β 和 IGIF 均能增强 IL-12 诱导 NK 细胞 IFN-γ 产生[71]。这些细胞因子其他值得注意的功能是向神经内分泌系统发出潜在损伤性免疫应答的警报，激活下丘脑-脑垂体-肾上腺（HPA）轴，刺激肾上腺分泌糖皮质激素（GC）（图 39.6）[72]。GC 激素本身就具备一定的免疫调节能力，特别是可通过激活 GC 受体，干扰转录调节器从而抑制细胞因子的表达[73,74]。令人感兴趣的是，在 MCMV 感染时，血液中高水平的 IL-6 可诱导出内源性 GC 反应[51]。因此，除了对后续产生的适应性免疫的调节作用外，病毒感染的先天性细胞因子应答可直接介导抗病毒效应，活化先天免疫细胞，并传递信息给免疫应答的激素调节器。

1305

细胞

先天免疫系统细胞由单核细胞和巨噬细胞、NK 细胞、树突细胞及 PMN 构成。目前对 PMN 和树突细胞在病毒性感染先天免疫中的作用认识有限，而对巨噬细胞和 NK 细胞的活化和功能则有较完整的认识。这些细胞群的应答可产生各种可溶性细胞因子，这些因子又可以介导抗病毒机制或参与抗病毒途径。此外它们还能促进其他细胞群的活化(图 39.7)。已知主要的病毒性感染先天性细胞应答概如下。

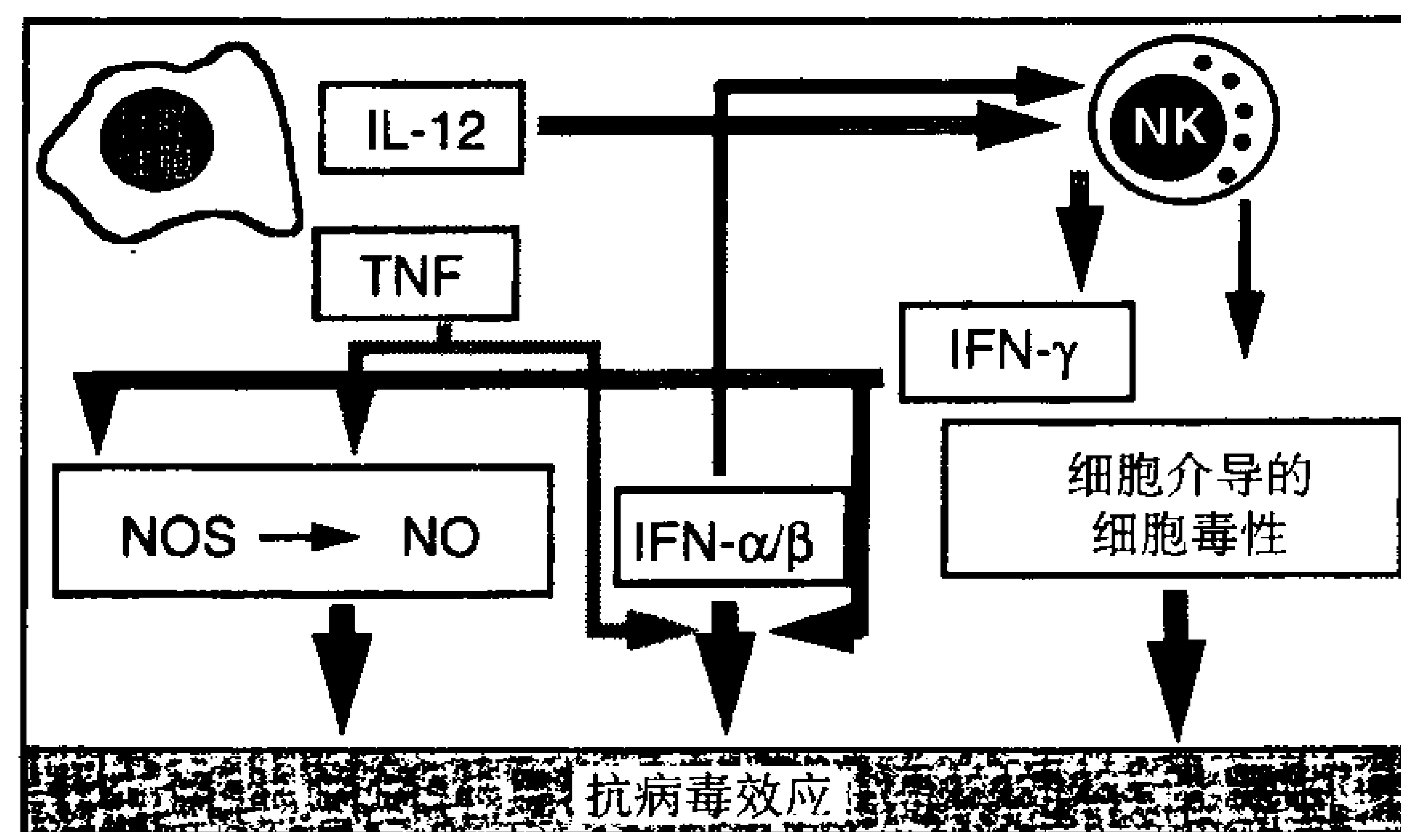


图 39.7 先天免疫应答的主要抗病毒途径。主要有三种已知具有抗病毒活性途径(黑色宽箭头)：IFN-α/β 诱导的多种活性机制，包括抑制蛋白合成；NOS 依赖的机制，包括产生 NO 的作用；和细胞介导的 NK 细胞对感染细胞的溶解。先天免疫应答可以通过多个渠道进入这些途径。尽管通过产生 IFN-α/β 进入 IFN-α/β 诱导活性途径最容易实现(黑色窄箭头)，但 IFN-γ(虚线箭头)和 TNF(灰箭头)也能通过相同机制进入该途径。由于 IFN-γ 诱导 iNOS 能力较强，故也是 NOS 到 NO 途径潜在活化剂。IL-12 可诱导 NK 细胞 IFN-γ 产生，故也具有投入上述两种抗病毒途径的潜力。TNF 能协同其他因子激活 NOS。总之，IFN-α/β 可以促进 NK 细胞的细胞毒活性。先天免疫应答活化多种不同的抗病毒活性。

NK 细胞

NK细胞的发现是因为其具有天然杀伤某些敏感肿瘤细胞株的能力[38]。首先证明其具有抵御病毒性感染能力，是因为观察到 NK 细胞可被病毒诱导的 IFN-α/β 活化，介导敏感靶细胞的胞溶，这种胞溶作用可涉及多种细胞，其中包括病毒感染细胞[38,75~77]，这种胞溶活性是在各种病毒感染后内源性诱导的[78~82]。病毒感染早期，NK 细胞在内源表达的 IFN-α/β 作用下活化，这过程发生在适应性免疫应答之前[50,83]。这种效应细胞不表达识别抗原的成熟 TCR[84,85]，且其效应不需 T、B 细胞参与。因此，NK 细胞是病毒性感染先天性免疫应答的重要组分。

NK 细胞在早期抵御某些病毒性感染中的重要性已经确定[78,86~91]。在各种疱疹病毒感染时，该类细胞可起到明显的保护作用。但 NK 细胞介导效应的机制还不完全清楚。IFN-α/β 体内活化的 NK 细胞是大颗粒淋巴细胞(LGL)，其溶靶细胞的效应分子许多与细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)相同，其中包括穿孔素[92]。然而该抗病毒途径经常使人难以捉摸[50,93]，因为在某些病毒性感染中，虽然 NK 细胞的细胞毒活性增高，但并不能形成病毒抵抗力[88]。

要证明 NK 细胞介导的细胞毒效应在抗病毒中的作用难度较大，因为这是一个复杂的保护功能，还涉及保护正常细胞。这种杀伤作用需要 NK 效应细胞与靶细胞接触以及给予 NK 细胞必要的阳性信号(图 39.8)。目前对先天免疫中的阳性信号分子还知之甚少，发现某些病毒产物具有这种作用[27,94,95]。一旦适应性免疫产生，感染细胞表面的病毒抗原决定簇特异性抗体可通过 Fc 受体Ⅲ(FcRⅢ)如 CD16(见下)呈递阳性信号[38,96]。MHCⅠ类分子则呈递阴性信号给 NK 细胞[97~101]。已发现 NK 细胞上有多种 MHC 分子受体，在小鼠，一种属于 C 型凝集素超家族的Ⅱ型膜糖蛋白 Ly-49 受体，可与 MHCⅠ类分子交互作用从而调控 NK 细胞。在人类，一种属于免疫球蛋白超家族的Ⅰ型糖蛋白，杀伤抑制受体(KIR)，可与人 MHCⅠ类分子交互作用。人和鼠的该类受体均是含多个同源基因基因簇的表达产物。根据 MHCⅠ类等位基因的不同，每种受体都有其特异性配体。它们能通过细胞内基于酪氨酸的抑制基序(ITIM)为 NK 细胞提供阴性信号，即利用酪氨酸磷酸酶切断近端的阳性信号途径[102~104]。虽然这些抑制性受体最早在 NK 细胞上发现，其他细胞群包括某些 T 细胞亚群，也表达这类抑制性分子。除抑制细胞毒活性外，该类受体还潜在具有其他抑制细胞性应答的作用，包括细胞因子的产生、在阳性信号附近提供阴性信号等[105,106]。人类能与Ⅰ类分子结合的 ITIM 相关分子称为白细胞免疫球蛋白样受体(LIR-1)，已被克隆并发现主要表达在单核细胞和 B 细胞群[107]。还发现人 NK 细胞上存在另一种阴性受体复合物，CD94/NKG2A，可识别非经典 MHC 分子 HLA-E 呈递的肽[108]。因

1306

此，越来越多的受体被发现可与 MHC Ⅰ类分子交互作用，传导阴性信号从而调节免疫应答，其中研究最多的是对 NK 细胞介导的细胞毒效应的抑制作用。

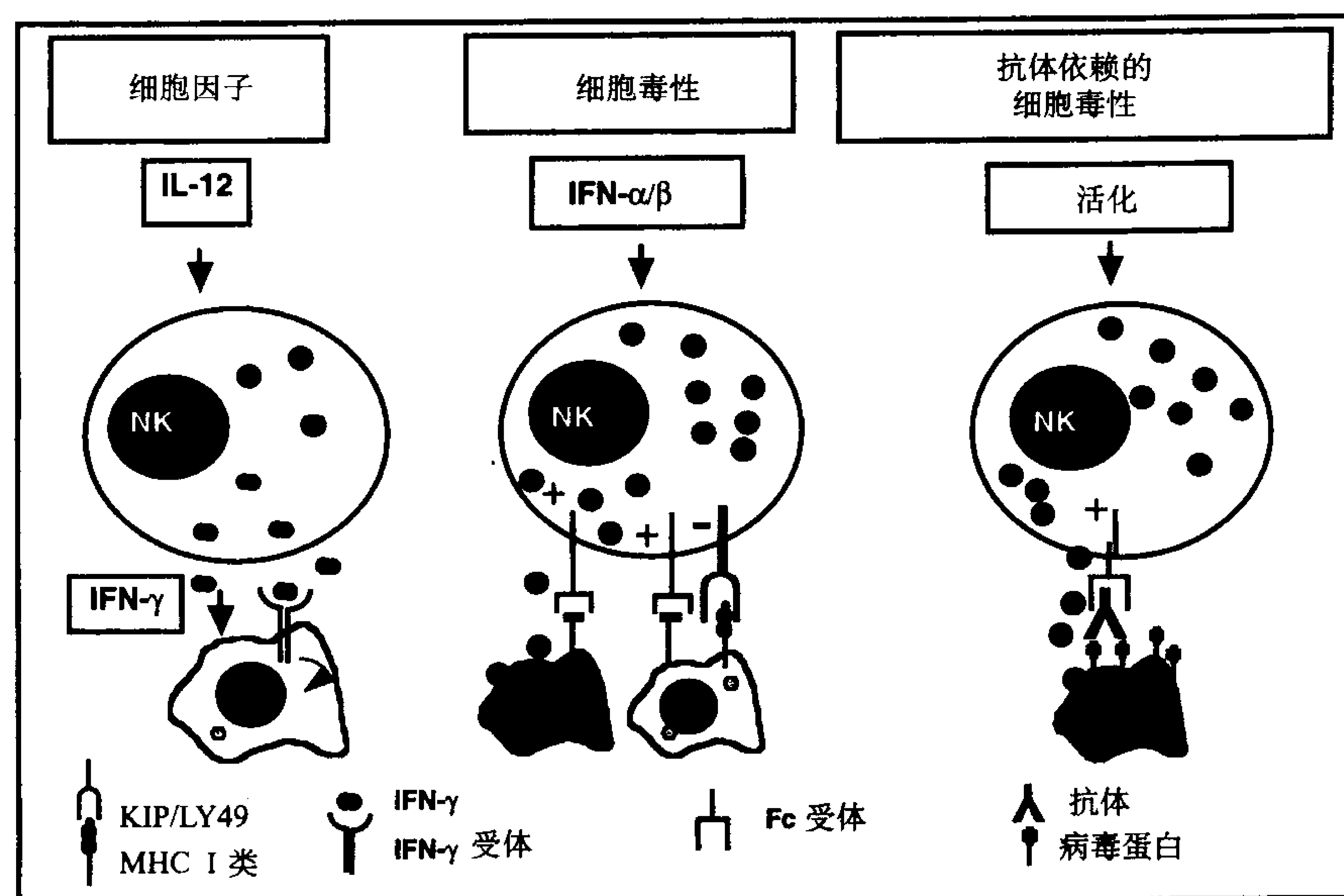


图 39.8　病毒感染时 NK 细胞功能及调控。已知 NK 细胞通过三种不同潜在机制起到抗病毒防御机制。它们活化后可产生高水平的 IFN-γ。IL-1 2 对 NK 细胞 IFN-γ 产生具较强诱导作用。NK 细胞的细胞毒活性能被多种因子活化。一旦病毒特异性抗体产生，NK 细胞能通过抗体依赖机制，利用免疫球蛋白受体溶解感染靶细胞。NK 细胞具有直接溶解靶细胞的能力。MHC Ⅰ分子可提供阴性信号给 NK 细胞表面 KIR/Ly49 分子，抑制胞溶作用。

许多病毒，特别是疱疹病毒具有降低 MHC Ⅰ类分子表达从而逃避 T 细胞识别的作用[103,109~113]。目前认为这种病毒感染细胞表面 MHC Ⅰ类分子水平降低可使促进 NK 细胞介导的胞溶作用，因此在抗病毒防御中，NK 细胞起到次最优 T 细胞效应作用。疱疹病毒感染时，扰乱Ⅰ类分子表达能力与 NK 细胞的作用间可能(未完全证实)存在相关性。引人注目的是，疱疹病毒属的 CMV 存在 MHC Ⅰ类分子的同源基因，如人 CMV (HCMV)的 UL18 和小鼠 CMV(MCMV)的 m144，可作为诱饵传递阴性信号，阻断Ⅰ类分子表达及包括 NK 细胞介导的胞溶作用在内的免疫细胞功能，保护病毒感染细胞[107,114,115]。尽管这种免疫逃避的机制还需进一步证明，但已经注意到能与 MHC Ⅰ类分子结合的 NK 细胞表面受体是由已知基因簇编码，小鼠的某些病毒性耐受基因图谱也已绘制出来[116,117]。因此，虽然对于抗病毒防御中 NK 细胞的阳性和阴性受体信号的重要性，还有很多需要研究，但各种证据表明这种信号途径参与调节宿主 NK 细胞介导效应。

除了溶解靶细胞外，NK 细胞还能产生多种细胞因子，包括 IFN-γ、TNF 和粒细胞-巨噬细胞克隆刺激因子(GM-CSF)。IL-12 可在某些病毒感染的早期出现[50,51,55~58]，能有效刺激 NK 细胞 IFN-γ 产生[118~120]。感染过程中，NK 细胞 IFN-γ 产生是 IL-12 依赖的，而 NK 细胞介导的细胞毒作用则受 IFN-α/β 控制[57]。NK 细胞产生的 IFN-γ 在抗病毒防御中的作用已在 CMV 感染中得到明确证实[49]。其保护作用可通过直接和间接两种机制，因为病毒对 IFN-γ 介导的抑制复制作用[47]和由 IFN-γ 活化的巨噬细胞[53,121]提供的 iNOS 依赖途径[93]都是敏感的。NK 细胞产生的 IFN-γ 的抗病毒作用比 NK 细胞介导的胞溶作用更重要或更易确定，因为全面激活的 NK 细胞表面与感染细胞接触后，IL-12 能废除局部阴性信号(图 39.8)，和(或)IFN-γ 途径能躲避感染细胞的阴性信号，是因其作用远离产生部位。与此一致的是某些病毒感染时，还观察到血中高水平的 IL-12 和 NK 细胞产生的 IFN-γ[51,57]。但即使在这种情况下，要在组织中发挥最大的抗病毒功能，还是需要 NK 细胞与感染细胞接近[122]。NK 细胞产生的 IFN-γ 还可通过影响细胞因子和细胞因子受体表达，起到重要的免疫调节

功能[123~125](见下文)。

NK 细胞能通过其与抗体结合的 Fc 受体,介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)[38]。该防御途径的抗病毒作用需要病毒特异性抗体附着在感染靶细胞上,NK 细胞介导的 ADCC 只可能在原发感染的末期或再次感染抗体已产生后才发生。迄今为止,对于 ADCC 作为一种体内抗病毒防御机制的意义还无定论[126,127]。然而最新研究表明,HIV 感染时 NK 细胞介导 ADCC 可导致 $CD4^+$ T 细胞减少[128]。虽然该发现表明 NK 细胞能介导或促进病理改变,但也同时提供了 NK 细胞体内介导 ADCC 的证据。

巨噬细胞

巨噬细胞在抗病毒防御中能起到一定作用,但矛盾的是,某些情况下这类细胞可作为感染早期的宿主引起病毒的播散[129~134]。由于这类细胞可游走到宿主的各器官(包括脑),因此病毒感染的巨噬细胞可起到帮助病毒在宿主体内播散的作用[64,135]。令人关注的是,抗病毒能力的提高与年龄及巨噬细胞抗病毒感染能力相关,如年幼小鼠的巨噬细胞较年长小鼠对多种病毒(包括疱疹病毒)更易感[136~140],来源于脐带的新生儿巨噬细胞也较成人对多种病毒(包括 HIV)易感得多[141~143]。因此某些情况下,巨噬细胞可以促进病毒复制和播散。

一系列不同研究暗示巨噬细胞在抗病毒感染中起作用[144~146],但还不能明确它们的作用,因为无论直接或间接确定这种作用机制都是比较困难的。巨噬细胞细胞能产生抗病毒细胞因子 TNF-α。还有证据表明巨噬细胞能通过 iNOS 依赖途径介导抗病毒作用,该途径对清除细胞内细菌是非常有效的。有趣的是,发现疱疹病毒属感染时 IFN-γ 和 TNF-α 能促进巨噬细胞活化,且该过程可以是非 T 细胞依赖途径[121]。此外,活化的巨噬细胞能表达 iNOS,是已证实的 NOS2 的一种,虽然多数有关 iNOS 产生研究是在小鼠做的,但已知人炎性巨噬细胞表达 iNOS[53,147]。NOS 酶催化 NO 的产生,*L*-瓜氨酸是其二级产物,是在 NADPH 作用下通过生化途径氧化产生,并消耗 *L*-精氨酸[53]。NO 是脂溶和水溶性气体,能与氧反应且是一些其他反应性分子的媒介物。已发现 iNOS 依赖途径在多种病毒感染中起着防御作用,包括 DNA 病毒如 VV、EBV、HSV、MCMV[53,93,148]等;和 RNA 病毒如 VSV[53,69]等。由于反应性媒介物和产物的多样性,NO 可潜在通过修饰一系列下游靶分子来介导抗病毒作用。尽管 iNOS 依赖效应还有待于进一步研究,但已发现 NO 能通过阻断酶和媒介物干扰 VV 复制和蛋白合成[149,150],还可通过下调一种早期媒介物,转活化蛋白使 EBV 病毒感染潜伏期延长[151]。

除了明显的直接抗病毒功能外,巨噬细胞还具有重要的免疫调节功能。这类细胞可产生多种免疫调节细胞因子,包括 IL-12、TNF-α 和 IL-1α。此外,还能加工和呈递抗原给适应性免疫系统细胞。因此巨噬细胞可通过广泛的直接和间接机制来促进抗病毒免疫。

趋化因子

趋化因子是指各种具有趋化作用的小分子,新的该类因子不断被发现[152~154]。这些因子可以由各种免疫和非免疫细胞产生,具有重要的炎症前功能,可在 VV、LCMV、鼠肝炎病毒(MHV)和 MCMV 等感染时产生[122,155~157]。已证实的趋化因子如巨噬细胞炎性蛋白 1α(MIP-1α),在小鼠流感或 *Coxsackie* 病毒感染后引起组织适应性免疫相关炎症[158]。研究表明这种趋化因子对于先天防御也是重要的,在小鼠 MCMV 感染,炎症中心是病毒复制所在的肝(图 39.9A),NK 细胞往该部位移动(图 39.9B)、聚集(图 39.9C)。MIP-1α 功能缺乏或被抑制后,这种 NK 细胞的炎症反应则受抑制(图 39.9D),使该部位组织的防御能力下降[122]。因此,趋化因子在先天性免疫中的免疫调节作用主要是引导白细胞向适当部位移动。但在特殊环境,趋化因子也可通过阻断感染直接介导抗病毒效应[154,159]。HIV 利用趋化因子受体作为 CD4 分子的共受体来实现感染[154,160,161]。这些特异性趋化因子受体的天然配体能阻止 HIV 感染[154,159]。虽然最早发现 T 细胞能提供这种趋化因子介导的保护机制[159],而其他细胞包括参加先天性免疫的细胞,也能产生趋化因子。因此,先天性应答可提供这种病毒受体阻塞性保护效应(如 HIV 感染)。

1308

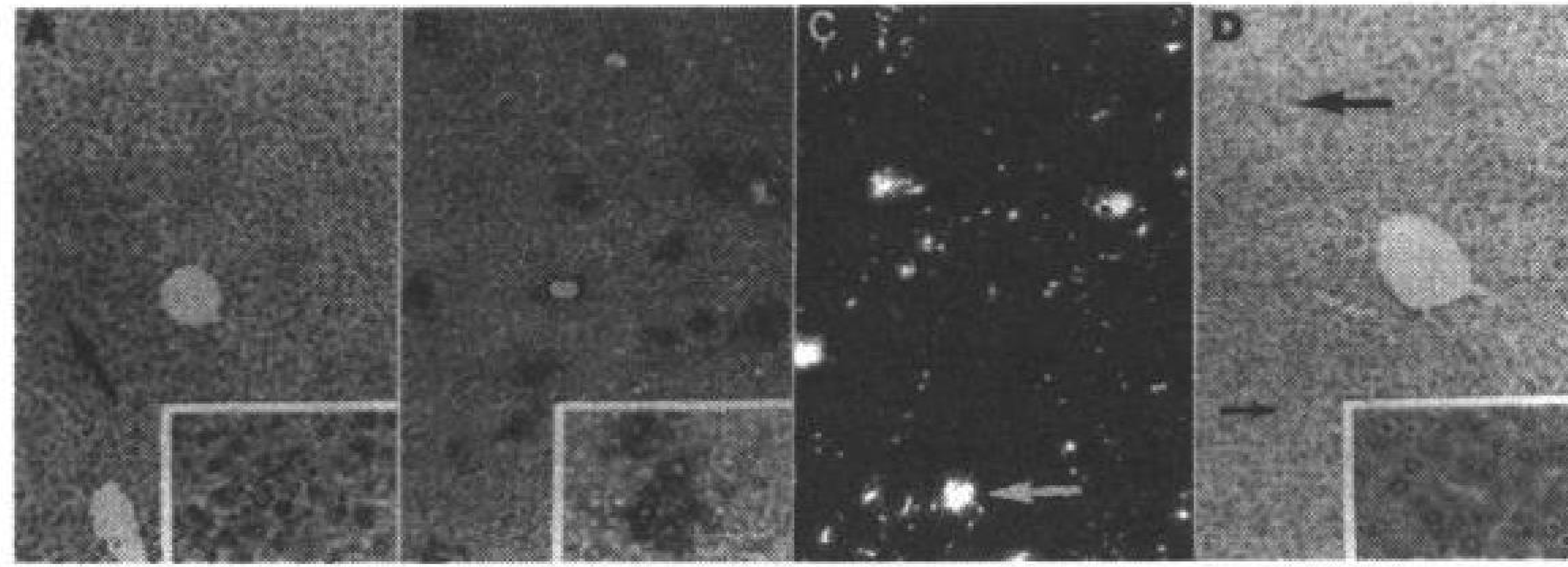


图 39.9　MCMV 感染小鼠肝脏 MIP-1α-依赖 NK 细胞局灶炎症。MCMV 感染的免疫正常小鼠和 T、B 细胞缺陷(非 NK 细胞缺陷)小鼠可发生早期灶性炎症反应,MCMV 感染第 2 天的 C57BL/6SCID 小鼠肝组织切片 HE 染色如图 A 所示,炎性灶主要由 NK 细胞组成。MCMV 感染第 2 天的 C57BL/6 SCID 小鼠肝组织冰冻切片免疫组化染色显示了病毒抗原表达定位和与 NK 细胞的关系(图 B),MCMV 抗原表达通过病毒特异性抗体检测,结果呈较亮的弥散染色,而 NK 细胞用 AGM1 标志杂色证实,结果呈较暗的灶性染色。表明病毒感染时 NK 细胞被诱导转运至炎性灶。未感染小鼠的骨髓白细胞用荧光染料标记,静脉输入后聚集在肝脏。这种供体细胞群实验表明 MCMV 感染引起的这种灶性转运和聚集模式呈 NK 细胞依赖(图 C)。这种肝脏 NK 细胞炎症反应依赖于 MIP-1α,MCMV 感染第 2 天的 MIP-1α 缺陷 C57BL/6 小鼠肝组织切片 HE 染色形态(如图 D)。图 A 中小格显示大箭头所指炎症灶。图 B 中小格显示大箭头所示输入细胞的灶性聚集。图 D 中小格:大箭头所指的一簇细胞具有 CMV 感染细胞的形态学特征(如巨细胞包含体)。(结果来自参考文献[122]。)

特异免疫

抗体系统和 T 细胞系统是应付病毒感染的两种主要抗原特异性效应系统[20,23,162,163]。了解这些细胞如何控制病毒感染及确定参与 T 细胞和抗体识别病毒物质的关键分子(表 39.8)很有必要。抗体能识别游离病毒或病毒感染细胞,通过中和病毒颗粒及通过补体介导的细胞毒作用或 ADCC 来控制病毒感染。该过程中被识别的关键病毒蛋白是其表面糖蛋白或外壳蛋白,虽然也有针对病毒内在和非结构蛋白的抗体产生,但它们不参与中和病毒或抗体介导的感染细胞杀伤。抗体与细胞表面病毒糖蛋白结合后,能下调感染细胞内病毒基因的表达,但该效应发生的机制还不太清楚。这种有趣现象最先在麻疹病毒感染的培养细胞中发现[164],也可能在体内控制神经元 *Sindbis* 病毒感染时发生[165]。利用狂犬病毒和仙台病毒表面糖蛋白抗体也观察到类似现象[166,167]。这些研究还表明抗体能中和细胞内病毒[165~167]。因此抗体能通过多种机制控制病毒感染,其关键的识别分子是病毒表面糖蛋白或外壳蛋白。这些病毒外壳蛋白或表面糖蛋白的结构或表达的改变,有可能是病毒逃避抗体清除的重要机制。其他病毒蛋白(内在和非结构性蛋白)也许不是逃避体液免疫的关键,但有少数报道提示内在或核心蛋白的抗体起重要的保护作用[168]。

1309

与抗体直接识别病毒蛋白相反,T 细胞只识别与宿主 MHC 分子相连的病毒抗原。抗原特异性 TCR 识别与细胞的 MHC 分子结合的短病毒肽。这种识别模式的重要后果之一是 T 细胞不能识别游离病毒,其抗病毒活性限于对感染细胞。免疫系统中的 T 细胞分支进化到主要对感染细胞的监视,而抗体主要抵御游离病毒。T 细胞又可再进一步分为 2 个亚群,CD4 和 CD8 T 细胞。CD4 T 细胞识别与 MHC Ⅱ 类抗原相连的病毒肽,而 CD8 T 细胞识别与 MHC Ⅰ类抗原结合的病毒肽,这些肽片段可衍生于任何病毒蛋白,包括结构(表面或内部)或非结构蛋白。因此所有病毒蛋白都是 T 细胞识别的潜在靶目标,限制性因素是蛋白的细胞内加工和肽与 MHC 分子结合能力(如与各种 MHC 分子结合的亲和力)。病毒特异性 T 细胞与病毒感染细胞的交互作用,依赖于抗原特异性 TCR 与 MHC 肽复合物结合,以及各种促进 T 细胞与感染靶细胞黏附的附属分子[169]。

表 39.8　T 细胞和 B 细胞抗病毒免疫

效应系统	识别分子	控制病毒机制
抗体	病毒颗粒的表面糖蛋白或外壳蛋白	中和病毒 病毒颗粒调理素化
	感染细胞膜上表达的病毒糖蛋白	抗体-补体介导的病毒感染细胞的细胞毒作用 下调细胞内病毒基因表达
CD4 T 细胞	MHC-Ⅱ类分子呈递的病毒肽(10~20 个残基)。这可以是任何病毒蛋白(表面、内在或非结构性)。由 MHCⅡ类分子呈递的肽通常来源于外源性蛋白。	释放抗病毒细胞因子 (IFN-γ、TNF) 活化/招募巨噬细胞 辅助抗病毒抗体产生 辅助 CD8 CTL 应答 杀伤病毒感染细胞?
CD8 T 细胞	MHCⅠ类分子呈递的病毒肽(8~10 个残基)。这可以是任何病毒蛋白。由 MHCⅠ类分子呈递的肽通常来源于内源性蛋白。且有证据表明这种内源途径对装载 MHCⅠ分子同样高效。	杀伤病毒感染细胞 释放抗病毒细胞因子 (IFN-γ、TNF) 活化/招募巨噬细胞

T 细胞怎样控制病毒感染(图 39.10)? CD8 T 细胞主要通过杀伤病毒感染细胞[92,170~172],此外还能产生抗病毒细胞因子,如 IFN-γ 和 TNF 等,能干扰细胞内病毒复制[173]。CD4 T 细胞能通过多种不同途径控制病毒感染,在抗病毒免疫中起核心作用:它们产生的抗病毒细胞因子能参与巨噬细胞的活化和募集,并为抗体产生和 CD8 CTL 应答提供细胞因子介导的辅助作用[20,23,174]。多项研究发现还存在病毒特异性 CD4 CTL,但 CD4 T 细胞的杀伤作用在清除体内病毒感染中的重要性还不清楚[163,175,176]。

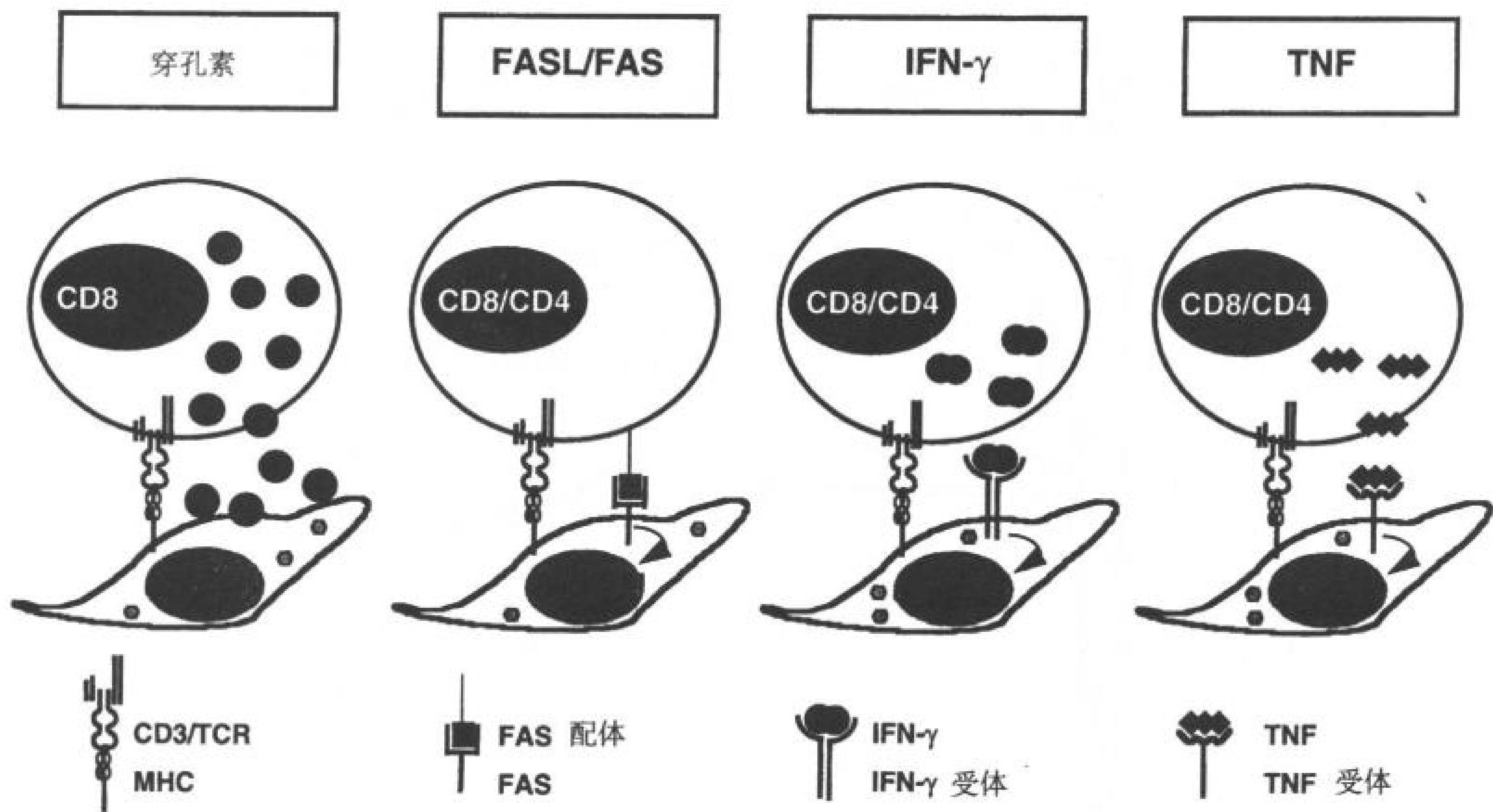


图 39.10　T 细胞控制病毒感染的效应机制。

长时间以来,人们非常感兴趣比较 T、B 细胞免疫在控制病毒感染中的相对重要性,结果导致大量实验和数据来评定 T、B 细胞应答在病毒清除和防止再感染中的作用[20,23,162]。在评价这类研究时应该记住,抗体和 T 细胞已演化为分别承担不同的功能,抗体针对病毒颗粒,而 T 细胞针对感染细胞。从某种角度来说,争论谁更重要没有什么意义,因为它们是功能不同的 2 种抗病毒防御机制,抗体是我们仅有的针对游离病毒的特异性防御,T 细胞是清除病毒感染细胞的最有效手段。

1311

CD8 T 细胞应答

急性病毒感染的原发 CD8 T 细胞应答分 3 个阶段：活化和扩增、衰亡、稳定性或记忆[20]（图 39.11）。第一阶段持续大约一周，其间抗原诱使特异性 T 细胞增殖并分化成效应 CTL(体内直接杀伤)。研究表明病毒特异性 CD8 T 细胞可以有 100～10 000 倍扩增[20,23,162]。接下来是衰亡期(在 1～2 周之间)，大部分活化 T 细胞发生凋亡，效应物活性也随抗原减少逐渐降低[20]。这种 T 细胞应答的萎缩程度与增殖一样是非常显著的，多数研究表明 95%或更多的抗原特异性 T 细胞消失。这种现象称为活化诱导的细胞死亡（AICD），是机体调节细胞数量，维持体内稳定的重要机制。AICD 包括 Fas(CD95)/Fas 配体(FasL)交互作用引起的凋亡，还有关于 TNF 在活化 CD8 T 细胞凋亡中作用的报道[177～179]。T 细胞应答的第三阶段是形成可维持多年的稳定的记忆细胞池[20,180～182]。再感染时，同样再次经历增殖、死亡和稳定这样三个阶段，但进程加快[180,183]，在一些

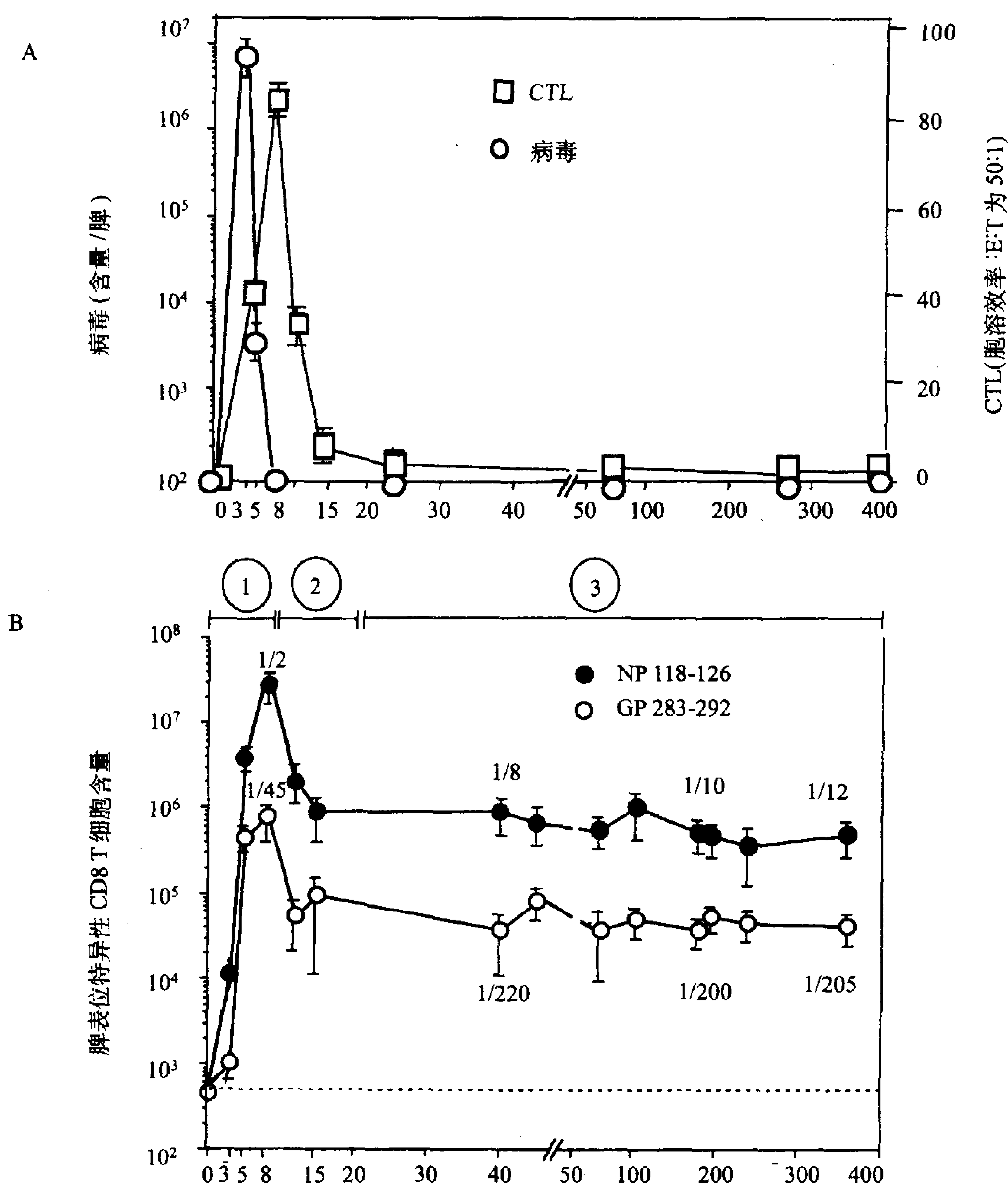


图 39.11 急性病毒感染不同阶段 CTL 应答、病毒清除和抗原特异性 CD8 T 细胞动力学变化。A：LCMV 感染 BALB/c 小鼠后，不同时相点病毒水平和脾脏直接 CTL 活性分析结果。B：利用 MHC-Ⅰ四聚体结合和单细胞水平 IFN-γ 产生分析，定量检测优势病毒抗原表位(NP118-126)和次优势表位(GP2283-2292)特异性的 CD8 T 细胞(参见图 39.12 和图 39.13)。每个表位肽不同时相点肽特异性细胞和总 CD8 T 细胞的出现频度如图所示。CD8 T 细胞应答的增殖、死亡和记忆各期分别标记为①、②、③。可以发现优势和次优势表位特异性细胞的增殖、死亡和记忆库形成具有相似的动力学。这表明记忆 T 细胞库的大小(③期)由增殖期(①期)规模决定，这强调了起始期在诱导长期免疫中的重要性。(引自参考文献[183])。

情况下，记忆应答（包括细胞因子产生、直接杀伤活性和细胞激增）可在再感染的 1～2 天后检测到[180,183]，这种快速的记忆反应可迅速消灭再感染病毒。

病毒特异性 CD8 T 细胞应答的规模

病毒感染可引起体内 CD8 T 细胞广泛激增。这可以在人全身性复制病毒感染的急性期观察到，如 HIV、EBV、麻疹病毒和 CMV 感染[184～191]。动物模型中也发现了 CD8 T 细胞的增殖，如在 VV、VSV、鼠 γ-疱疹病毒和 LCMV 感染小鼠[180,183,192～199]。人们曾关注病毒特异性 CD8 T 细胞的增殖数量和其中属 T 细胞活化而非免疫原特异性细胞数量[45,196,200～203]。有限稀释分析（LDA）测定病毒特异性 CTL 数量显示，即使在原发应答高峰时，也仅有很小比例（至多 1%～5%）的活化 T 细胞是抗原特异性的[20,23,162]。这就导致产生假说：大多数 CD8 T 细胞增殖是非抗原特异性的，代表旁观活化和/或非特异细胞受交叉反应刺激[45]。然而用更敏感的技术对抗原特异性 CD8 T 细胞定量表明，其抗病毒应答的规模比通过 LDA 研究获得的要大，且许多病毒感染中增殖的 CD8 T 细胞是抗原特异性细胞[183,205]。这类研究技术中最好的是利用含 MHC Ⅰ类分子和象征性抗原肽的荧光标记四聚体，对特异性 CD8 T 细胞进行染色（图 39.12 和图 39.13）[183,204]。该方法使抗原特异性 CD8 T 细胞直接显影，且可以分析未经任何体外处理的新鲜外植细胞。其他敏感的新技术还有通过细胞内染色或 ELISPOT 分析，在单细胞水平检测细胞因子产生[183]（图 39.13）。利用这些技术分析小鼠急性 LCMV 感染的 CD8 T 细胞应答，结果显示 50%～70%的活化 CD8 T 细胞是病毒特异性的[183,205]。并反映出在 8 天内有超过 10 000 倍的增长，增殖的高峰发生在第 3～5 天，其间还有大约 8 小时的病毒特异性 CD8 T 细胞测定时间。这些结果表明病毒感染时，CD8 T 细胞有极强的扩增能力。

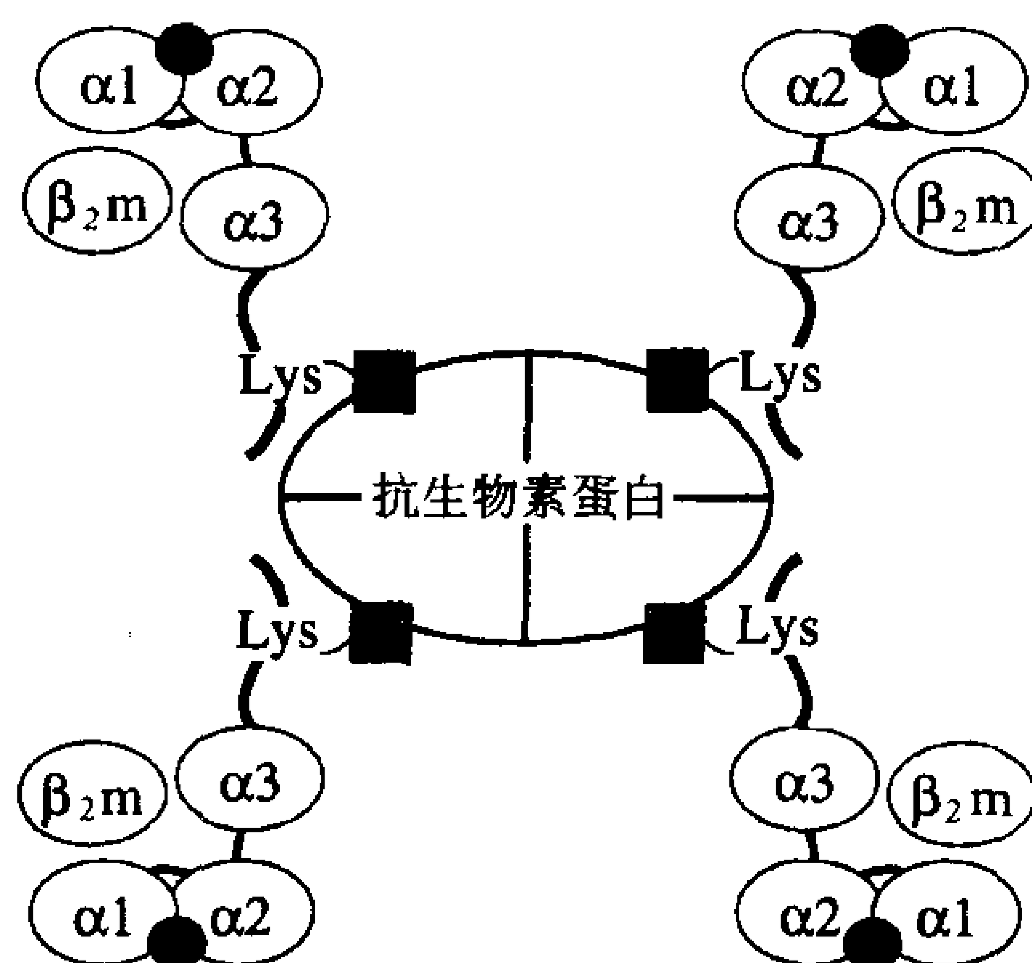


图 39.12　四聚体化 MHC 分子对抗原特性 T 细胞具有较强亲和力。MHC-Ⅰ分子可溶性部分被酶促生物素化，并在 α3 的 C 末端融合一 BirA 底物肽。单一生物素化含特定抗原肽的 MHC 分子与荧光素标记的链亲合素按分子比例 4:1 混合形成 MHC 四聚体，可通过流式细胞仪用于证实抗原特异性 T 细胞[183,204]。

为何以往研究低估了病毒特异性 CD8 T 细胞应答的规模？至今为止几乎有关病毒研究都用 LDA 测定病毒特异性 CTL[20,23,162]。该技术是把细胞按一定梯度放在 96 孔板中，用抗原和 IL-2 刺激 1～2 周，培养末期测定每孔中抗原特异性杀伤细胞数量。这种广泛使用的分析方法有一个重要缺陷，只有能在体外培养生存 1～2 周的细胞才能用于研究并取得阳性结果。多项研究表明活化的 T 细胞在抗原的再刺激下有凋亡的倾向[177]。因此，在 LDA 分析中，似乎死亡的抗原特异性 T 细胞较多，或因增殖不够达不到阳性结果。而 MHC Ⅰ四聚体技术和细胞因子分析没有这些局限性。MHC Ⅰ四聚体染色是一种真实性强、无需体外处理且使抗原特异性 T 细胞直接显色的方法。细胞因子功能分析也只需很短时间的体外刺激（5 小时细胞内染色

1312

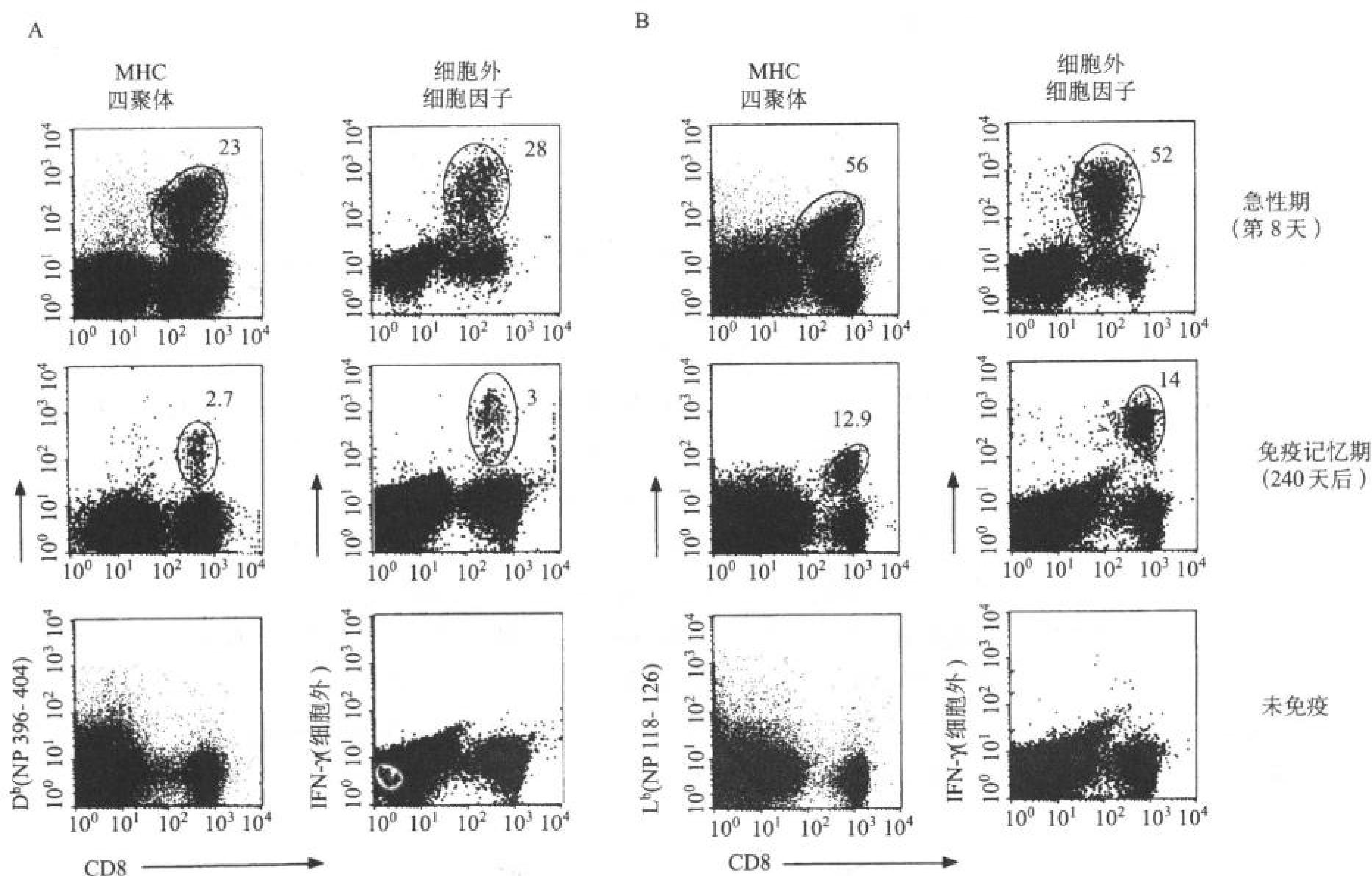


图 39.13 急性病毒感染早期和记忆期抗原特异性 CD8 T 细胞定量和显影 C57BL/6(A)和 BALB/c(B)被 LCMV 感染后，分别于急性期(第 8 天)和记忆期(240 天后)取脾细胞检测抗原特异性 CD8 T 细胞。阴性小鼠作对照。用含特定抗原肽(D^b 限制的 LCMV NP 396~404 肽)的 MHC-Ⅰ四聚体染色新鲜脾细胞或通过细胞内 IFN-γ 染色第二种方法对抗原特异性 CD8 T 细胞显色。细胞内 IFN-γ 染色在 NP396-404(A)或 NP118-126(B)与脾细胞体外共培养 5 小时后进行。数值显示抗原特异性 CD8 T 细胞的百分比。注意到两种技术(四聚体结合和细胞内 IFN-γ 染色)获得了近似的抗原特异性 CD8 T 细胞频度。(引自参考文献[183]。)

和24~36小时 ELISPOT)。这 2 种技术都不需要细胞长期存活或激增。

1313

更令人关注的是来自 LCMV 模型的发现能推广到其他病毒感染，包括人类病原。在这方面，许多年前就已知的急性 EBV 感染(传染性单核细胞增多症)时 CD8 T 细胞数量的大幅增长没有意义[187]，最近还发现在原发 HIV 感染存在实质性 CD8 T 细胞增殖[184,185]。还有报道人类 T 淋巴细胞白血病病毒-1(HTLV-1)感染患者的血液和脑脊液中活化 CD8 T 细胞数量增加[206]。有可能大多数增殖的 CD8 T 细胞是 EBV、HTLV 和 HIV 特异性。事实上，对急性 EBV 和 HIV 感染时 CD8 T 细胞的 TCR 研究表明，存在一定数量优势克隆扩增[185,187]，该寡克隆群与抗原诱导扩增的 T 细胞是一致的。人们感兴趣的是，利用 LCMV 研究中的敏感技术用于人类病毒感染将取得何种结果。即使在对 CD8 T 细胞刺激很弱的病毒性感染，如 HSV，大多数应答细胞仍可能是病毒特异性的。有研究通过分析 HSV 感染部位附近淋巴结中的 CD8 T 细胞应答，发现增殖的 CD8 T 细胞表达限制性的 TCR，表明大部分激增细胞可能是 HSV 特异性的。因此与 LCMV 模型研究中的发现相似，大部分激增 CD8 T 细胞是病毒特异性的，在病毒感染中具代表性。

CD8 T 细胞表位

已通过多种不同病毒体系证实存在大量的表位[208~212]。这些表位的搜寻，主要靠证实能与多种小鼠和人类 MHC Ⅰ类分子结合的 MHC-结合肽，及其等位基因特异性基序[213~216]。MHC Ⅰ类分子结合基序通常为

8~11个氨基酸残基并含有2~3个保守的锚残基。利用这些等位基因特异性基序，有可能推测哪些病毒蛋白来源肽具有与MHC Ⅰ类分子结合的能力。但也要注意到基序吻合肽中，只有少部分具免疫原性。虽然一种蛋白可以包含多个基序吻合肽，但CTL应答通常只直接针对有限数量表位[211,217,223]。有多种影响因素决定针对潜在表位的T细胞应答是否实际产生。首先，不是所有含基序的肽都与MHC Ⅰ类分子结合，即使结合，也存在结合亲和力的差异，推测可能因为存在次级锚残基和其他继发效应。其次，肽的细胞内加工决定了某种肽是否和以何种水平呈递到细胞表面[210,218~222]。最后，T细胞库的空洞也可能限制CTL应答，由于这种限制，病毒感染过程中仅有大约10%含有基序肽最终成为CTL表位[211,223]。表39.9是一个具体例子，LCMV的核心蛋白和糖蛋白共含88个小鼠MHC Ⅰ类分子(D^b、K^b、D^d和K^d)的基序吻合肽，其中29个(32%)分别与MHC分子结合，但LCMV感染时仅有8个(9%)能作为表位被真正识别。结合亲和力和成为CD8 T细胞表位可能性间的关系引人注目，低亲和力结合者均不能成为表位(0/14)，而10个的8个中等亲和力结合者和5个中的2个高亲和力结合者是表位。因此与MHC分子有较好亲和力的肽，大约50%最终成为实质性CTL表位。

1314

表39.9 病毒感染中已知CD8 T细胞表位的MHC Ⅰ等位基因特异性结合基序和结合亲和力预测值

MHC Ⅰ等位基因	LCMV糖蛋白和核心蛋白基序符合肽的总数	MHC Ⅰ分子结合数量[a]			
		高 $IC_{50}<50nmol/L$	中 $IC_{50}50\sim500$	低 $IC_{50}500\sim5000$	LCMV感染中CTL表位数量(占总基序符合肽的百分比)
D^b	26	2(2)[b]	3(2)	3(0)	4(15)
K^b	28	2(0)	4(2)	6(0)	2(7)
D^d	18	0	0	3(0)	0(0)
K^d	16	1(0)	4(2)	2(0)	2(12)
总计	88	5(2)	11(6)	14(0)	8(9)

[a]分别与MHC Ⅰ分子高、中、低亲和力结合肽的分布。

[b]括弧内显示LCMV感染CTL表位数量。

引自参考文献[211]、[223]。

CD8 T细胞效应机制

病毒特异性CD8 T细胞的主要功能是杀伤感染细胞。CTL可通过2种不同机制杀伤靶细胞：①分泌性膜溶解途径，包括穿孔素和颗粒酶；②非分泌性受体介导途径，包括Fas(CD95)[170,224,225]。此外还推测存在TNF和分泌的三磷酸腺苷介导的细胞毒性，但目前公认穿孔素和Fas介导途径是CTL两种主要杀伤机制[226~229]。穿孔素，是一种与补体成分C6-C9有序列同源性的65kDa蛋白，贮存在CTL胞质颗粒中，在分泌性途径中起着主要作用。在CTL与靶细胞结合及TCR适当衔接情况下，含穿孔素和颗粒酶的(丝氨酸蛋白酶)的细胞质颗粒被释放到靶细胞表面。穿孔素单体装配成多聚孔结构，插入靶细胞质膜，使水和小离子能透过膜，这种"钻孔"作用，再加上颗粒酶的作用，最终导致靶细胞凋亡[170,225,226,230,231]。利用穿孔素缺陷小鼠体内研究表明穿孔素介导的细胞毒作用能有效控制LCMV感染[92,172]。这些研究清楚表明，至少在该系统中，本质性杀伤作用是控制感染的关键，穿孔素介导的细胞毒活性又是体内主要的杀伤途径。还认为穿孔素能控制单核细胞增多性利斯特氏杆菌感染和清除某些肿瘤[92,225]。

与穿孔素途径相似，Fas依赖途径的启动也由TCR与适当抗原结合[177,179,232,233]。这种交互作用导致T细胞表面Fas配体(FasL)表达上调，FasL与靶细胞表达的Fas分子结合和交联导致Fas阳性细胞凋亡。诱导死亡的Fas蛋白胞质部分触发靶细胞内凋亡程序，包括IL-1β转化酶(ICE)和(或)其他ICE相关蛋白酶[234,235]。利用转基因小鼠模型研究发现Fas介导的杀伤作用与HBV感染控制相关[236,237]。但Fas或FasL缺陷小鼠(*lpr*或*gld*小鼠)并未表现出对病毒易感性增强。此外，Fas仅表达在某些细胞型(如肝细胞、活化T细胞等)，因此大量不表达该分子的细胞和组织不能被这种机制杀伤，Fas介导的杀伤作用不大可能成为体内主

要效应机理。穿孔素途径不存在这种限制。Fas介导的杀伤作用主要功能似乎只是起免疫调节和维持内环境稳定而并非一种效应机制[172,177,179,225,232,233]。

除了杀伤感染细胞，CD8 T细胞还能分泌多种抗病毒细胞因子[173,188,238,239]。这些细胞因子中，研究最多的是IFN-γ和TNF[173]。（见先天免疫讨论细胞因子怎样调节病毒生长一节）。多个研究总结出IFN-γ在控制病毒感染中的重要性，其中在HBV转基因小鼠模型中进行了广泛而深入的分析[238]。那么对于控制感染，杀伤作用和细胞因子介导效应孰更重要？杀伤作用似乎对于非胞溶性病毒的清除更重要，这类病毒的最好例证是LCMV和HBV，能复制和产生感染性后代而不杀伤宿主细胞。因此杀伤作用本质上是清除感染细胞最有效机制。细胞因子本身能抑制病毒生长，但不能清除非胞溶性病毒感染。相反胞溶性病毒（痘病毒、脊髓灰质炎病毒、VSV等）破坏感染的宿主细胞，实际上破坏了自身的加工厂，病毒持续繁殖要依赖对新细胞的感染，在这种情况下，细胞因子可能是关键因素。IFN-γ能诱导抗病毒状态，使细胞能抵御病毒感染。因此单独凭细胞因子就能清除胞溶性病毒感染。但运用该理论时要小心，最可能的是T细胞介导的杀伤作用和细胞因子效应两方面对病毒感染控制都很重要。即使是胞溶性病毒感染细胞，如果在病毒生活史早期被CTL杀伤，将降低病毒感染规模并有助于感染控制。与之类似，细胞因子在非胞溶病毒感染的总体控制中起重要作用[173,188,238,239]。总之，两种机制都很重要，对胞溶病毒感染，主要的T细胞效应是细胞因子，而对非胞溶病毒感染主要是杀伤作用。

CD4 T细胞应答

CD4 T细胞是抗病毒免疫的核心。它们是适当抗体和CD8 T细胞应答所必需的，并能通过产生抗病毒细胞因子如IFN-γ和TNF作为效应细胞[163,173,239,241,242]。CD4缺乏将对控制病毒感染能力产生重要影响。通过CD4或MHCⅡ类分子缺陷小鼠，多个实验研究结果都支持该结论，其中最引人注目的例子是人AIDS，由于CD4功能低下，导致对病毒感染易感性增加[185,246,247]。

病毒感染时CD4细胞的重要作用之一是辅助病毒特异性B细胞克隆的增殖和分化。虽然有些病毒特异性抗体应答不依赖T细胞[20]，但一般来说如果CD4 T细胞缺乏，抗体应答会受到严重抑制[174,248,249]，这将导致对病毒（如流感病毒、仙台病毒和VSV等）的易感性增加[163,250]。病毒感染时CD4应答以Th1型反应为主，主要特征是产生IFN-γ和IL-12，并导致显著的IgG2a反应[163]。但也能发现Th2型反应，以分泌IL-5和IL-6为主要特征[251,252]。因此与一些寄生虫感染时高度极端的Th1或Th2反应不同，病毒感染时似乎是一个"混合"应答[236,253~255]。

病毒性研究发现，CD8 T细胞应答不同程度需要依赖CD4 T细胞的辅助。像针对LCMV和畸肢病毒（ectromelia）的CTL应答，可对CD8 T细胞提供强刺激，CD4依赖性较低[174,248,256]。CD4缺陷小鼠感染LCMV后所产生的CTL应答，其CTL前体数量比正常小鼠低2倍，但仍足以应付LCMV急性感染。相反，VSV、流感病毒和HSV感染的CTL应答对CD4依赖性高得多。为何某些病毒特异性CD8应答对CD4依赖性高，而有些却低，准确原因还不清楚。一种可能是像LCMV和畸肢病毒可活化大量的CD8 T细胞，是因为其中一些CD8 T细胞能提供CTL扩增和分化所需的细胞因子。另一方面，已知像流感病毒和HSV只活化很少CD8 T细胞，因此更依赖于CD4的辅助。有人认为每个细胞的抗原密度能决定CD8活化是否需要CD4辅助[259,260]。在LCMV或畸肢病毒感染，每个抗原呈递细胞（APC）含大量病毒肽-MHC复合物，并能与许多CD8 T细胞的TCR结合，这些细胞的活化应答对CD4 T细胞和共刺激信号的依赖性较低。而如果病毒不能在APC中有效复制，则与CD8 T细胞上的TCR结合数量很少，将使应答更依赖于CD4 T细胞和（或）共刺激分子。

虽然在某些急性病毒感染，CD4的辅助对诱导CTL应答是多余的，但在病毒慢性感染时，CD4 T细胞对维持CD8 T细胞应答是必要的已达成共识[174,249,257,258]。这项重要观察，最早是通过对LCMV和莫洛尼鼠白血病病毒（Moloney murine leukemia virus）研究，逐渐扩展到其他病毒，包括人HIV感染[257,258]。有研究表明即使在免疫系统受到严重感染情况下，CD8 T细胞仍能长期保持活性并最终清除和（或）限制病毒感染。相反，在CD4缺陷情况下，CD8 T细胞应答迅速丧失，导致无法控制病毒感染（图39.14）[174,197,257]。在慢性刺激条件

下，CD4 T细胞如何维持CD8 T细胞应答？一种可能是CD4 T细胞通过产生IL-2等CD8 T细胞生存必需的细胞因子。已知细胞因子缺失可导致活化T细胞凋亡[261]。另一种可能是通过与APC直接进行细胞对细胞交互作用，CD4 T细胞可增加APC上共刺激分子(B7-1和B7-2)表达。由于CD8 T细胞也能与APC直接交互作用，CD4 T细胞对这些关键共刺激分子上调，也许是慢性刺激条件下阻止CTL“耗竭”所必需的[174,262,263]。

尽管CD4 T细胞在病毒感染中非常重要，但关于定量分析病毒特异性CD4 T细胞应答的动力学和寿命的研究非常少[264]。有些关于CD4 T细胞前体的定量研究是针对小鼠仙台病毒和流感病毒的急性感染[265,266]。这些研究表明，抗病毒CD4应答的规模并不像CD8那么大，但总体来说两种应答是相似的[265]。与CD8类似，CD4应答同样表现为三期①感染第1周是活化和扩增期；②病毒清除后的第2周是死亡期；③持续较长的记忆期。

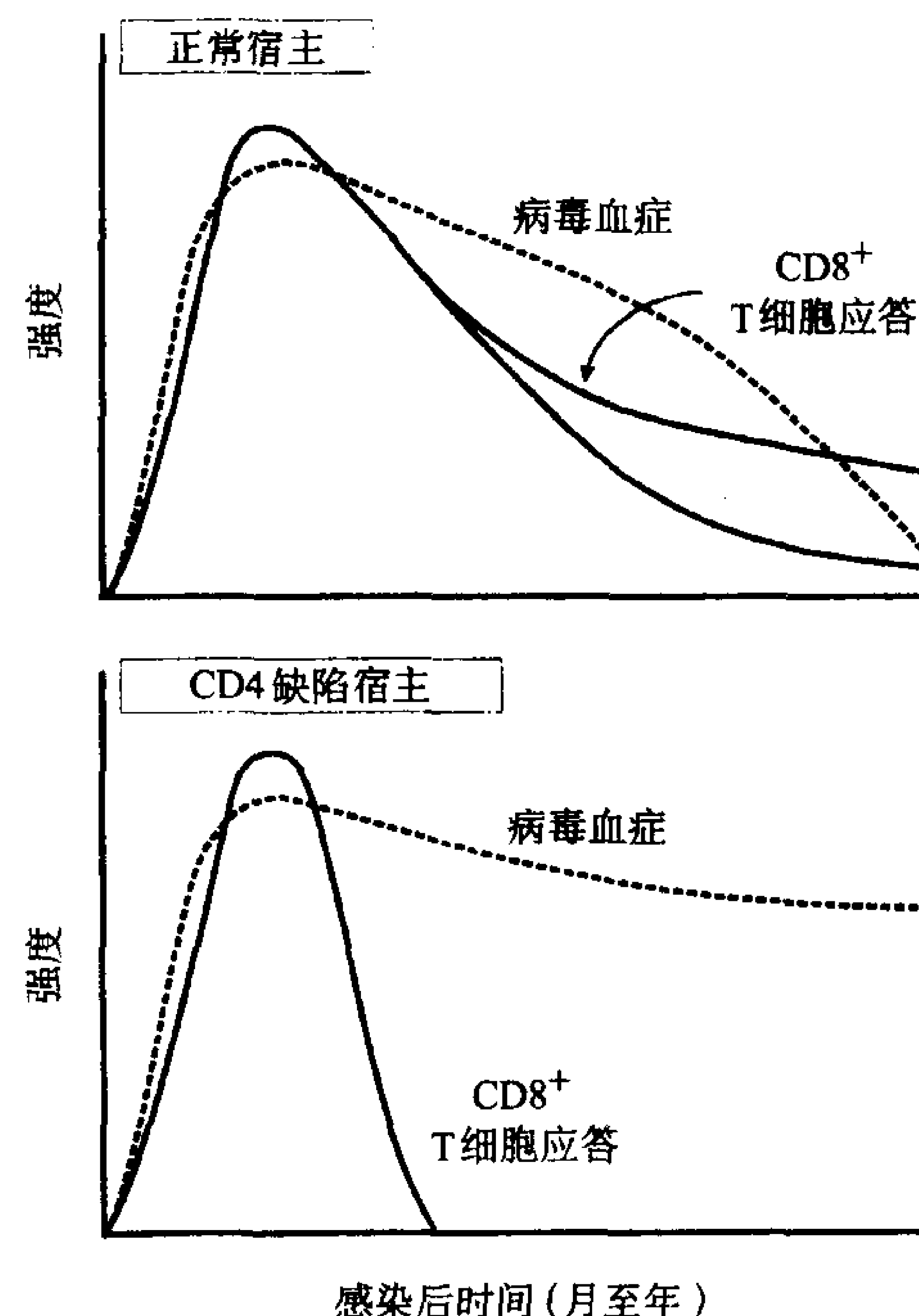


图39.14 慢性病毒感染时CD4 T细胞对维持CD8 T细胞非常重要。(引自参考文献[174]。)

1315

B细胞应答

病毒特异性抗体在防止再感染和控制病毒播散方面起主要作用。如果病毒入侵部位存在足够高浓度的中和性抗体(如黏膜表面的IgA抗体)，则病毒感染刚发生就能被阻止。假如该情况未实现，血浆中的IgG抗体能通过限制病毒在体内扩散阻止发病。这方面的例子如灭活脊髓灰质炎病毒疫苗的应用。这种灭活疫苗可诱导血浆高水平的脊髓灰质炎病毒特异性IgG，但很少或没有肠道(脊髓灰质炎病毒侵入部位)IgA产生。在这个例子中，脊髓灰质炎病毒通过肠道感染，而血浆抗体能防止其向中枢神经系统血行扩散到及脊髓灰质炎发病。除再次感染时能起到阻止感染和(或)发病作用外，抗体应答同样也是原发感染康复的关键[250,265~269]。

病毒感染时，可产生针对多种病毒蛋白的抗体，其中最关键的是直接针对病毒表面蛋白的抗体。然而并不是所有能与病毒表面糖蛋白结合的抗体能中和病毒感染性。事实上在某些例子中，产生的大多数抗体是非中和性的；这可以在HIV gp120的抗体应答中见到[270,271]。只有能阻止病毒与细胞受体结合和/或阻止病毒穿透和脱壳的抗体才能阻断感染。值得注意的是体外中和病毒，通过检测蚀斑形成抑制和对细胞株的细胞病理影响，结果并不总与体内保护作用一致[239,268,272]。补体可与抗体协同，增强中和病毒能力。补体与病毒-抗体复合物结合可增强吞噬细胞摄取及随后降解病毒颗粒的作用。抗体加补体还能直接溶解囊膜病毒。矛盾的是在有些例子，抗体实际上能增强病毒感染性，数种病毒感染可出现该现象，包括登革热、RSV和HIV[273~276]。这种抗体介导的增强作用的具体机制目前还不清楚，但研究模型显示抗体-病毒复合物能通过FC或补体受体，感染巨噬细胞和其他类型细胞从而拓宽其宿主范围。

有些病毒特异性抗体应答是非T细胞依赖的，但大多数IgM转换到IgG应答是T细胞依赖的[277,278]。IgG亚类是由产生的细胞因子决定的，病毒感染倾向于诱导IgG2a抗体应答产生，这反映了IFN-γ的作用[279~281]。多数血浆抗体是由终末分化浆细胞产生的，这种非分裂细胞与记忆B细胞相比有许多差异，例如，浆细胞下调许多典型B细胞表面标志物表达，包括主要MHCⅡ和表面免疫球蛋白[282,283]。这种改变表明，与记忆B细胞不同，成熟浆细胞似乎不参与抗原加工和呈递，其主要功能是持续分泌大量特异性抗体。浆细胞分泌率据估计高达5 000个分子/s[284,285]。相反，记忆B细胞不持续分泌抗体，而是在受适当刺激后激增和分化成抗体分泌细胞(ASC)。由于病毒感染保护作用通常依赖于血浆或黏膜表面先前存在的抗体水平，因此先前存在

浆细胞的数量和特异性是保护性免疫的关键成分。

急性病毒感染后抗体产生的动力学和解剖学定位见图 39.15。IgM 应答是短暂的，而血浆 IgG 应答是长期的，能持续多年(表 39.10)。抗体最初是由脾和引流淋巴结中生发中心的 ASC 产生的，这些组织中抗体应答的高峰发生在感染后的前 2 周，随后 2～4 周下降。这种浆细胞下降似乎是归因于筛选出高亲和力浆细胞同时，低亲和力细胞发生凋亡。随着脾浆细胞减少，抗原特异性浆细胞开始向骨髓腔移行和(或)聚集。在生发中心应答平息后，骨髓成为抗体产生的优势部位，约 80%～90% 的宿主浆细胞位于该解剖腔中[198,286]。浆细胞寿命研究表明，早期抗体应答归功于存活寿命较短的浆细胞，而长期抗体的维持依靠长寿命的浆细胞[287,288]。如果发生再感染，抗体应答再次发生在脾和淋巴结，因为大多数记忆 B 细胞位于这些组织中。发生二次感染后，脾和淋巴结的记忆 B 细胞激增和(或)分化为浆细胞，导致脾 ASC 数量短暂增多。然而一旦二次感染被清除，这种应答就停息，如果再发生感染，骨髓则成为抗体产生的优势部位。病毒感染被清除、内环境恢复稳定后，主要位于骨髓的病毒特异性浆细胞，与脾和淋巴结数量较多的记忆 B 细胞间的解剖学分布差异值得关注。一种看法认为，脾和淋巴结是 B 细胞向浆细胞分化的“工厂”，而骨髓是保存其产品(如浆细胞)的仓库。这使人觉得 B 细胞应该位于“工厂”附近，以便于需要时被动员发挥作用，而浆细胞被运到骨髓作为“工厂”的延伸。位于骨髓中的浆细胞继续其产生抗体的使命，抗体最终入血，对再感染具保护作用。

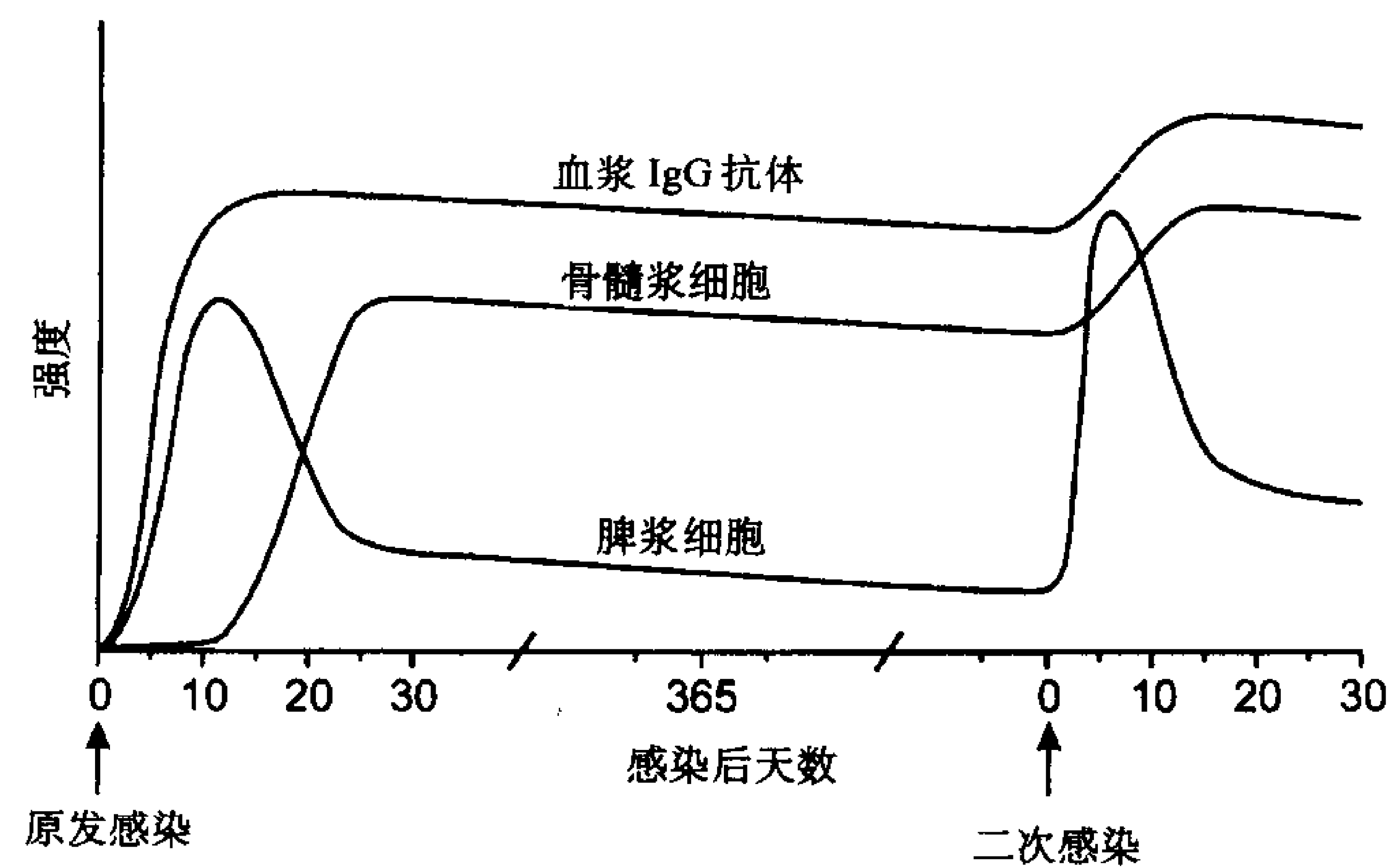


图 39.15 急性病毒感染后抗体产生的动力学和解剖学部位。早期抗体是由脾脏和淋巴结生发中心的浆细胞产生，但病毒感染清除后，骨髓成为抗体长期产生的部位。发生病毒再次感染后，脾脏发生快速但短暂的抗体应答，在内环境稳定后骨髓又成为病毒特异性浆细胞的主要来源。(引自参考文献[287]。)

表 39.10 人类急性病毒感染的体液免疫应答

例子	血浆抗体/年	黏膜抗体ᵃ/月	参考文献
全身性感染			
登革热	32		[439]
黄热病	75		[440]
麻疹	65		[441]
流行性腮腺炎	12		[442]
脊髓灰质炎	40		[443]
HAV	25		[444]
天花	40		[445]
牛痘	15		[446]
风疹	14		[447]
黏膜感染			
冠状病毒		12	[448]
流感病毒		30	[449]
呼吸道合胞病毒		3	[450]
轮状病毒		12	[451,452]

[a]显示的是呼吸道和消化道分泌性抗体应答的持续时间，单一感染的血浆抗体应答持续时间由于这类病毒再感染机率较高而不易确定。

免疫应答的调节

感染免疫应答的活化、定型和调节都受到复杂的细胞因子和细胞间交互作用的影响。原发感染背景下，先天免疫应答的细胞根据有限的种类和激增所需条件来介导或促进效应功能。相反，适应性免疫应答的T、B细胞要发展出不同的效应功能，需要与抗原特异性受体衔接以及满足少数细胞大幅扩增的条件。先天和适应性免疫应答都必须受到严格调节，以促进特定保护效应，为宿主创造免疫屏障，同时又要使宿主免于因"保护过度"导致损害。针对一些非病毒性感染的免疫调节研究已取得了许多成果，如单核细胞增多性利斯特氏杆菌等胞内细菌；硕大利什曼原虫、鼠弓形虫等原生寄生虫以及线虫等胞外寄生虫感染[118,120]。一般来说，对非病毒性胞内病原体的防御是由细胞因子活化的巨噬细胞介导，来自这类生物的抗原主要由MHCⅡ类分子呈递，保护作用的产生还依赖Th1型CD4 T细胞分泌IFN-γ，如果该应答失败和(或)取而代之的是Th2型CD4 T细胞产生IL-4和IL-5，将使宿主更易感和(或)发病。要是细胞内生物有蛋白产物进入MHCⅠ类呈递途径，CD8 T细胞保护作用有可能表现出来。对于胞外寄生虫感染，Th2型CD4 T细胞产生IL-4和IL-5能促进防御，IL-5能促进嗜酸性粒细胞的产生和募集。这些物质的内源性T细胞应答受到特定先天性细胞因子的控制，特别是已知早期IL-12表达和IL-12诱导NK细胞IFN-γ能促进CD4 Th1型应答[289,290]。有趣研究结果表明，在IL-12存在情况下，Th1细胞的顺利扩增至少部分原因是IFN-介导促进Th1上IL-12受体表达[125]。

1317

虽然病毒感染的免疫应答也包括其他生物体感染中所观察到的各种类型，但经常都存在针对病毒感染的独特成分，和/或某种优势。如前所述，这包括血中高水平的IFN-α/β及其介导效应。而且因许多病毒蛋白产物能很快被加工，供MHCⅠ类分子呈递，故CD8 T细胞能够显著应答并在病毒感染控制中起突出作用。本节就病毒感染时，已知主要的先天性和适应性免疫调节过程做一综述，重点放在急性感染原发应答的调节和本章尚未讨论过的细胞因子效应，图39.16是各成员及其效应示意图。然而记住不同的病毒的感染模式与人们想象的有差异非常重要，宿主应答能适应不同的条件，以达到更好活化或获得更恰当的防御机制，因此能出现许多变化。

1318

先天性应答

先天性应答既是免疫调节作用的中介者，又是该作用的接受者。能活化和介导早期防御，能潜在促进适应性免疫应答的特定保护作用和接受反向调节。

IFN-α/β和IL-12

细胞因子IFN-α/β具有广泛的免疫调节功能，影响先天性和适应性应答二者。相反，尽管已经确定胞内细菌和原生寄生虫感染时，先天性应答早期表达的IL-12和IL-12诱导的NK细胞IFN-γ对Th1型应答的形成非常重要，但对病毒感染时保护性T细胞应答的调控过程还不太清楚。病毒感染时，IFN-α/β的主要作用是诱导NK细胞介导的细胞毒作用[38,50,57,75,83]。有些病毒(不是全部)能诱导IL-12蛋白，因此感染时NK细胞IFN-γ产生依赖该反应[57]。然而早期IL-12和IFN-γ对T细胞应答下游效应的影响还有待于确定。有趣的是，LCMV感染能诱导出显著性CD8 T细胞应答，但不能引出可检测IL-12蛋白表达[39,57]。此外，这些感染的T细胞应答，包括IFN-γ产生，均不受IL-12中和作用的抑制[57]。因此病毒感染时肯定存在其他途径来调控不同的T细胞应答。

除表达和功能不力外，IL-12对抗病毒T细胞应答还有其他有害影响，而病毒感染先天性免疫应答成分能负面调节IL-12表达。LCMV感染时，IL-12对CD8 T细胞扩增和CTL功能有干扰和毒性作用[291,292]。该结果出现一部分是靠增强诱导多种细胞因子的协同作用，包括在IL-12和病毒诱导IL-2之间的TNF，反应性CD8 T细胞对TNF介导效应敏感[292]。有趣的是，MCMV病毒虽然诱导早期高水平IL-12表达，却产生更典型

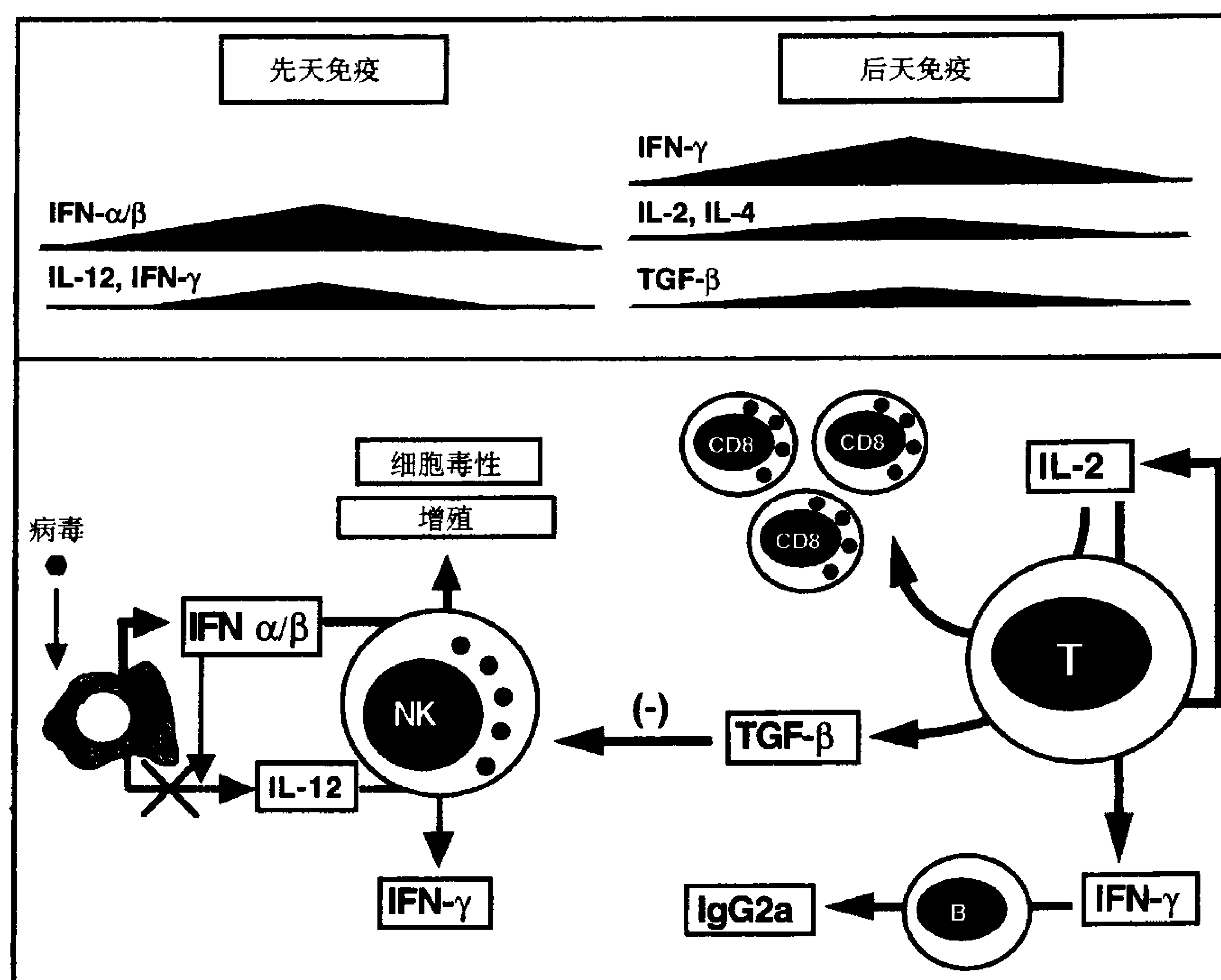


图 39.16　病毒感染免疫应答的调节。早期,多数病毒感染后 IFN-α/β 可以诱导 NK 细胞活化,介导其细胞毒活性和增殖。部分病毒感染可诱导 IL-12 和 NK 细胞 IFN-γ 产生。IFN-α/β 可抑制 IL-12 表达。这些是病毒感染先天应答的主要成分。病毒感染获得性应答包括 CD4 T 细胞、CD8 T 细胞和 B 细胞的活化,伴有诱导 CTL 功能和 B 细胞产生抗体。与病毒诱发获得性免疫相关的主要 T 细胞因子有 IFN-γ,IL-2 和 IL-4。IFN-γ 应答最容易检测,并在随后的 IgG2a 型病毒特异性抗体应答中起重要作用。IL-2 和 IL-4 应答均表现出免疫调节功能。IL-2 能明显促进 CD8 T 细胞激增。T 细胞应答的激活能够促进 TGF-β 的产生和生物学活性,这种应答似乎可以对 NK 细胞应答进行阻性调节。

的 T 细胞应答[57]。这些观察表明,调节 IL-12 表达对病毒感染 CD8 T 细胞应答特别重要。虽然 IFN-α 的确能促进 IL-12 受体表达并增强 Th1 型应答[40,41,293],但病毒感染时,血浆中 IFN-α 和 IFN-β 抑制 IL-12 表达具浓度等效性[39]。因此病毒感染的先天性免疫应答包括诱导具有负面调节 IL-12 及其依赖效应作用的细胞因子。

病毒感染适应性免疫的调节机理还不完全清楚,先天性免疫应答如何创造条件来选择性扩增和发展保护性 CD8 T 细胞应答,目前尚无定论。可能通过一系列不同水平来调节,包括诱导相关增强性细胞因子表达;通过抑制性机制保护细胞;特定增强性细胞因子活化适当的 T 细胞亚群;和/或抑制不恰当的 T 细胞应答。由于 IFN-α/β 能增强抗原通过 MHCI 类途径加工和呈递[42],因此,这些细胞因子也许可以通过增强抗原对 TCR 刺激来促进 CD8 T 细胞应答。然而内源表达的这些细胞因子还能促进特异性淋巴细胞亚群的有限芽基发育和增殖,包括 NK 细胞[43,44,294]和记忆 T 细胞[45]。由于 IFN-α/β 本身不是生长因子,因此这些细胞因子诱导的体内激增反应的中介者还有待证实。

NK 细胞应答的负面调节

与已知 T 细胞产生的 IFN-γ 在巨噬细胞活化中的作用相反,病毒感染的适应性免疫应答似乎倾向于诱导和/或导致一系列免疫调节过程来关闭 NK 细胞应答。某些该类过程诱导细胞消耗掉能潜在增强 NK 细胞应答的细胞因子。例如,虽然 IL-2 能在急性病毒感染时活化和支持 NK 细胞激增,但该细胞因子的表达滞后于 NK 细胞应答的高峰[295]。此外,多数 NK 细胞表达低亲和力 IL-2 受体,而活化 T 细胞表达可容纳 IL-2 α 链

的高亲和力受体[294~297]。其后果是T细胞对IL-2消耗具有竞争性优势，而病毒诱导的IL-2依赖性NK细胞应答仅在激增性CD8 T细胞应答缺乏情况下被证实[298]。还存在其他能促进细胞因子产生的途径来负面调节NK细胞，例如NK细胞对TGF-β介导的对激增、细胞毒活性及细胞因子产生等的抑制作用敏感，[299~305]，而病毒感染的T细胞应答能促进该分子的生物学活性结构产生[63]。有报道，病毒感染时还有一系列其他T细胞因子产生（如IL-4，已知能介导NK细胞的免疫调节作用），但对于它们在体内NK细胞调控中的意义还有待于进一步评价。

T细胞应答

目前仍不清楚各类T细胞群的多种效应功能是否能由相同或重叠T细胞群介导（图39.10）。病毒感染时效应T细胞诱导的最佳研究例子是CD8 T细胞应答与深奥的CD8 T细胞扩增量相关（见上）。CD4 T细胞应答特点似乎更受数量限制。当然还肯定与细胞因子表达相关，特别是IFN-γ、IL-2和IL-4，已知这些细胞因子能对T细胞活化和激增进行免疫调控。抗原清除似乎是该类应答主要的负面调节因素，因为导致缺乏持续性T细胞抗原受体刺激。其他活化途径（前文已讨论过）包括能诱导细胞死亡也能减少应答T细胞的峰值数量。

IFN-γ、IL-2和IL-4

尽管已在多个非病毒性感染中明确证实了Th1和Th2型应答存在，但对于病毒性感染的T细胞应答还不那么清楚。一系列针对小鼠和人类多种病毒感染研究发现，即使是传统分类认为的Th1型应答，在表达IL-2和IFN-γ等Th1型细胞因子同时，还表达一定水平的IL-4等Th2型细胞因子，这些研究包括HIV[306]、HSV[307]、流感病毒[308]、LCMV[297,309]、RSV[310]、仙台病毒[60]和*Sindbis*[311]等感染。通过分别比较来自HIV阳性和阴性血液的克隆T细胞，发现HIV感染的T细胞应答实际上是一种Th0表型，即同时表达Th1和Th2型细胞因子[312,313]。一些细胞因子应答分类差异可能来源于产生水平和（或）定量分析的敏感性。通常，IFN-γ表达水平较高，无论其mRNA还是蛋白都易于检测，而IL-2和IL-4的检测比较困难。而且后者似乎很容易被产生它们的T细胞群消耗掉。例如尽管IL-4难于检测，但如果用其受体抗体阻断消耗[309]和（或）在ELISPOT分析中使用抗体捕获因子[60]，还是能够被检出。此外还可能存在选择性介导细胞因子表达的局部环境差异[307]。尽管如此，总体研究结果表明T细胞IFN-γ应答是病毒感染常见的和主要应答，而IL-2和IL-4虽然难于检测但经常出现。

1319

T细胞产生IFN-γ是抗病毒防御效应机制之一，且很可能是应答中最重要的功能。该细胞因子对于CTL的诱导似乎并不是必需的[33,314,315]。尽管病毒感染时CD8和CD4 T细胞都能产生IFN-γ[60,308,309,316,317]，但至少对于LCMV感染的免疫应答是优先诱导CD8 T细胞增殖，故CD8 T细胞是IFN-γ的主要产生者，大约60%~90%的T细胞表达IFN-γ[309]。几乎所有其他表达IFN-γ的细胞是CD4 T细胞。不同的病毒感染，CD8和CD4 T细胞对IFN-γ应答的贡献大小可能根据特定病毒感染时各亚群应答的比例不同而变化。LCMV感染的免疫应答表明，CD8 T细胞是病毒诱导性IFN-γ应答的主要贡献者。

IL-2既是一种强T细胞生长因子又是一种主要免疫调节因子。虽然某些病毒感染时2种T细胞群都能诱导IL-2 mRNA表达[297,316,318]，但CD4 T细胞看来还是IL-2的主要产生者，而CD8 T细胞可能是该因子的主要消耗者[309,318]。已对LCMV感染时IL-2促进内源性T细胞应答作用进行了深入研究，发现该系统中，病毒诱导性CD8 T细胞急性增殖或CTL活化，既不需要CD4 T细胞[248,309,318,319]，也不需要B细胞，但CD4 T细胞能创造促进IFN-γ峰值表达的条件[309]。其他细胞（如CD8 T细胞）产生的IL-2也有重要的生物学意义，因为在CD4 T细胞缺陷情况下，IL-2缺乏对CD8 T细胞增殖、CTL网络形成及CD8 T细胞IFN-γ产生都具有高度抑制作用[194,309]。与其促进T细胞增殖相比，IL-2对CTL影响显得是次要的，因为在该因子缺乏情况下，仍可产生低水平的CTL效应[194,321]。IL-2对CD8 T细胞IFN-γ反应的影响是通过促进T细胞增殖和增进活化细胞持续产生细胞因子[309]。病毒感染时CTL诱导的关键条件尚未证实。LCMV或VV感染时，IL-4缺乏对CTL

应答无明显影响[322]。比较这些病毒感染时 IL-4 和 IL-2 二者缺乏对 CTL 应答影响发现,在不同条件下,各种细胞因子的重要性有明显差异。虽然在该条件下,VV 感染的 CTL 活化几乎被完全阻断,但在 LCMV 感染仍可被低水平检测[322]。对于内源性 IL-2 和 IL-4 的特殊作用,这些研究显示病毒感染时这些细胞因子肯定会表达并发挥生物学功能。

IL-5

对于病毒感染时 Th2 细胞因子 IL-5 的表达和功能还了解不多。该因子相关的主要活性是诱导和活化嗜酸性粒细胞,还没有这类细胞介导病毒感染防御的报道。它们曾在某些呼吸道感染时检出,特别是 RSV 感染[323]。目前已知用来自该病毒的高度糖基化的 G 蛋白预先免疫小鼠,在二次细胞刺激[324]和感染[325~327]等特定条件下产生 Th2 细胞因子应答,包括 IL-5。这种免疫还可导致感染发生时肺嗜酸性粒细胞增多[326,328]。最早发现这种免疫介导的免疫调控的临床关联是在 20 世纪 60 年代,因为经福尔马林灭活 RSV 免疫的婴儿发生自然感染时,出现了有害的免疫反应[329]。在实验模型中,包括 IL-5 产生在内的 Th2 型应答倾向的诱因可能是 RSV G 蛋白的独有特性,因为相似条件下用其他 RSV 蛋白免疫并未产生近似的反应[324~326,328]。G 蛋白的独特之处是广泛糖基化,且有报道认为该蛋白是一种弱的 CD8 T 细胞应答的诱导剂[330]。然而使人有点惊讶的是,RSV 感染引起的状况不能克服 G 蛋白免疫诱导的 Th2 型反应倾向。有趣的研究得出结论认为,G 蛋白免疫时,RSV 表位呈递给 CD8 T 细胞诱发 CD8 T 细胞应答。感染过程中随着诱发的 CD8 T 细胞应答的出现,将抑制 Th2 型应答及相关嗜酸性粒细胞增多症的发展[330]。因此在该系统中,看来需要同时诱发和唤醒 CD8 T 细胞应答来负面调节 Th2 型应答。

B 细胞应答

细胞因子能调节针对病毒的 B 细胞抗体应答。免疫正常小鼠感染,其全身性病毒特异性抗体应答包含多种同型抗体,但通过 IFN-γ 依赖机制偏向 IgG2a[33,314,315]。在 IFN-γ 缺乏的情况下,更多的 IgG1 产生[33]。虽然有报道 IgG2a 抗体应答是非 T 细胞依赖的[277],但病毒感染时,产生抗体的 B 细胞应答高峰出现需要 CD4 T 细胞参与[163,197,248,319]。对于抗体应答中,活化 T 细胞上的 CD40L 和其位于 B 细胞上的受体 CD40 功能性交互作用的重要性,已达成一致意见[331~334]。有研究发现一种明显的 CTL 介导途径能调控早期病毒中和性抗体产生。认为该途径是 B 细胞感染的后果之一,受中和性抗体受体促进,随后呈递与 MHC-I 分子结合抗原给 CTL[335]。

1320

免疫记忆

急性病毒感染诱导 T、B 细胞记忆[20,23,162]。但 T、B 细胞记忆的本质是不同的(图 39.17)。抗病毒 B 细胞记忆常通过持续性抗体产生表现出来,甚至延续到疾病康复后。许多人(见表 39.10)和动物病毒[20,23,162]感染或免疫接种后可以观察到长期的抗体产生(持续数十年)。相反 T 细胞应答的效应期是短暂的(数周),T 细胞的“记忆”是由于存在记忆 T 细胞,记忆 T 细胞数量众多,能快速反应衍生为比初始 T 细胞效率更高的效应 T 细胞(如 CTL 或细胞因子制造者)[20,23,162,183,336~338]。一般来说,多数急性病毒性感染(还包括免疫接种)都具有体液性反应和细胞性反应两方面特征,且具有目的性。细胞因子的持续分泌或过度产生会对免疫系统产生有害影响,而如果其中一些 CTL 对自身抗原交叉反应,则可导致免疫病理损伤。因此通过在效应期携带一高价标签来维护 T 细胞免疫性。因为记忆 T 细胞能迅速发展成效应细胞并很快到达感染部位,故对大多数病例来说,并不需要预先存在效应 T 细胞来提供保护。某些黏膜感染可能是一个例外(保护性免疫一节)。

T 细胞记忆

病毒再暴露时 T 细胞应答加速是由于记忆 T 细胞存在,抗原特异性 T 细胞的质和量都大大提

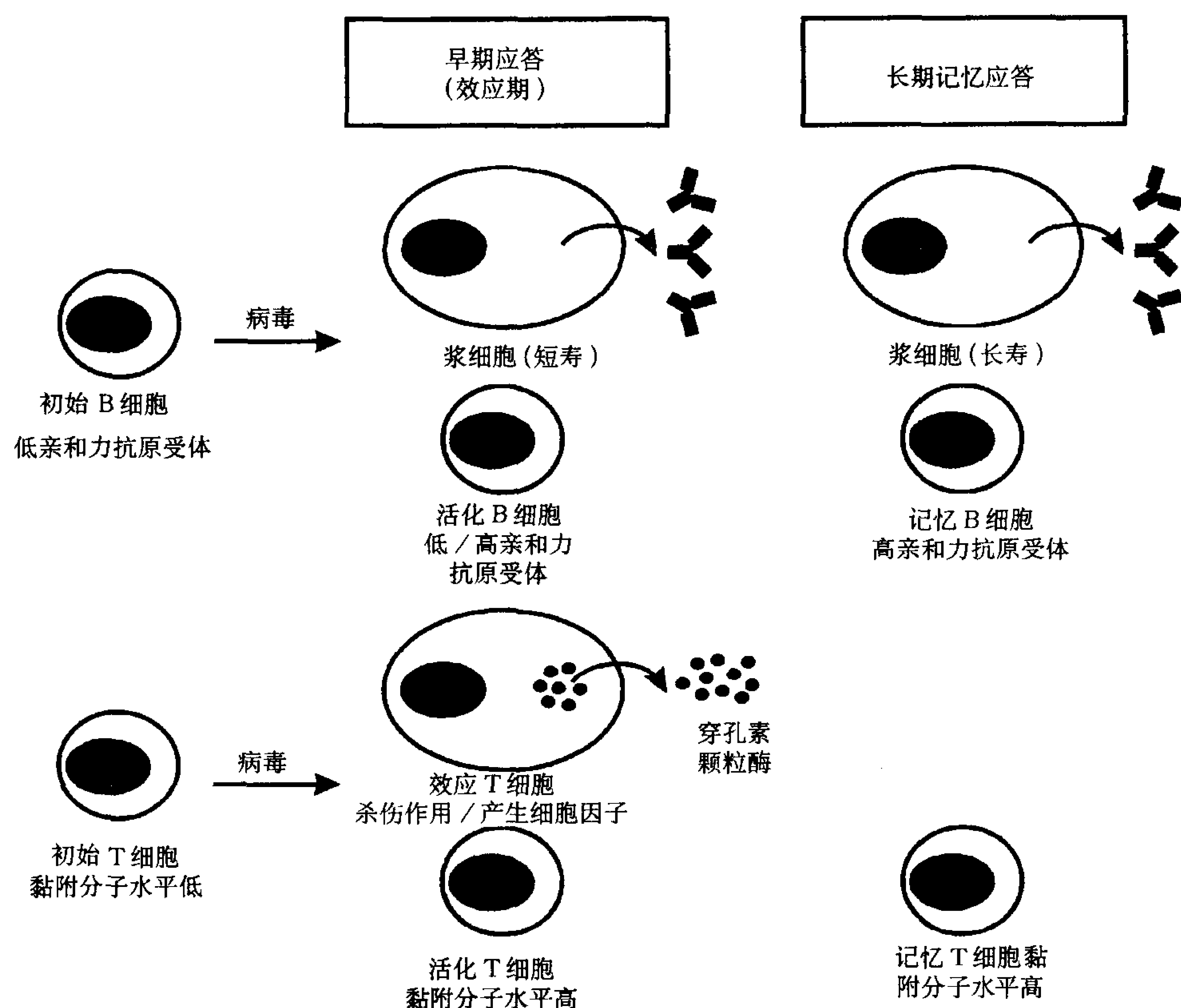


图 39.17　急性病毒感染消退后的抗病毒免疫。T 细胞和 B 细胞记忆特性是不同的。B 细胞的记忆通过存在记忆 B 细胞和持续性抗体产生证实,这种预存在的抗体为抵御再感染提供第一线防御,是抗病毒保护性免疫的重要手段之一。相反 T 细胞应答的效应期非常短,长期的 T 细胞记忆归功于持续存在的抗原特异性记忆 T 细胞,它们出现频率较高并表达高水平的细胞表面黏附分子。病毒特异性记忆 T 细胞的高频度和快速激增为效应 T 细胞能力为抵御病毒感染提供了高效的二线防御。记忆 T 细胞应答不能直接阻止感染,但对限制感染的严重程度和清除病毒感染细胞是非常重要的。

高[20,23,162,183,269,339,340]。因为记忆细胞黏附分子表达水平增高,故与 APC 黏附效率也随着提高。这也许能够解释与初始细胞相比,为何记忆细胞在低剂量抗原刺激下比初始细胞活化更快[180,183,265,341~344]。这种反应性增加可能还归 因于 IL-2 受体的高亲和力。记忆 T 细胞上黏附分子表达改变还影响到这类细胞的循环和(或)归巢。在这方面,值得注意的是记忆 T 细胞上 2 种归巢受体 CD44 和 CD62L 发生表达改变[265,343,344],这 2 种标志的改变将影响记忆 T 细胞的循环,起到更好地监视病毒作用。

对于特异性抗原在维持 T 细胞记忆中的作用还存在争论[20,162,345~349]。首先应该肯定的是抗原存在对于维持效应 T 细胞是必要的,还应该指出的是周期性的抗原再暴露会增强 T 细胞记忆水平;实验表明,再接触病毒性抗原可增加记忆 T 细胞数量(或保护性免疫水平),但这并不能作为 T 细胞记忆是严格抗原依赖性的证据。实际问题是感染或免疫后形成的记忆 T 细胞池,能否在缺乏内源特异性抗原补给情况下保持相对稳定,或是否严格依赖于特异性抗原的刺激。这种慢性刺激可来自长期病毒性感染和(或)小结树突细胞(FDC)的持续抗原携带[20,350]。该问题的解决不仅具有重要的实用意义(疫苗),而且探索了免疫记忆的基础问题。

T 细胞记忆抗原依赖性实验研究通常是通过继承性转移制敏 T 细胞给初始接受者,然后观察抗原缺乏条件下的生存情况[20,23,180,344]。B 细胞缺陷小鼠的应用为研究该领域提供了新手段,因为 FDC 上的抗原-抗体复合物与维持 T 细胞记忆有关[20,350]。FDC 能捕获抗原形成抗原-抗体复合物并长期保留在其细胞表面。有假说认为,B 细胞或其他 APC 能拾起这种捕获性抗原并呈递给 T 细胞[350]。这种抗原输送模式以 MHC Ⅱ型

呈递为主,但目前越来越多的证据表明,巨噬细胞和树突细胞能加工和呈递内源性抗原给 MHC Ⅰ类分子[351~356]。因此,FDC 上的抗原储存可能在维持 CD4 和 CD8 T 细胞记忆方面起着重要作用。两种实验手段(继承性转移和 B 细胞缺陷小鼠)都被用于测定 CD8 和 CD4 T 细胞记忆的抗原依赖性。研究最多的是对 CD8 记忆,一致结论是,CD8 记忆细胞可以在特异性病毒抗原缺乏情况下持续存在[20,23,180~182,320,357~361]。Lau 等[180]提供了有关特异性抗原缺乏情况下 CD8 记忆持续存在的令人信服证据。在该实验中,不含任何病毒遗传物质(PCR 阴性)的 LCMV 特异性 CD8 记忆细胞被继承性转移进未感染小鼠后,能持续存在并提供超过两年的保护性免疫。Mullbacher[181]和 Hou 等[182]研究流感病毒和仙台病毒的 CTL 应答也得出近似的结论。通过数组 B 细胞缺陷小鼠的 CD8 应答分析,发现 CTL 记忆不出现减弱[20,320,362]。由此看来 B 细胞和抗原-抗体复合物都不是维持 CD8 T 细胞记忆所必需的。除这些实验外,有证据表明在特异性抗原缺乏情况下人 CTL 可长期存在。研究[357]表明 VV 特异性记忆 CTL 能在 30 多年前免疫接种过的个体中检出。这种长期的 CTL 记忆不大可能由抗原持续存在引起,因为 VV 不会引起人慢性或潜在性感染,且天花病毒疫苗的免疫接种已于 1977 年停止,故没有 VV 再暴露的可能性。急性 HBV 感染后也能出现长时间(30 年或更长)的 CD8 T 细胞记忆[363,364]。然而在这些病例中,不能排除抗原的作用,因为其中一些研究对象带有微量水平的 HBV DNA。有关 CD4 T 细胞记忆的维持是否需要抗原的研究很少。其中一个研究表明流感病毒的 CD4 T 细胞记忆在 B 细胞缺乏情况下是完整的[269]。然而还需要其他研究来进一步证实,确定 CD4 和 CD8 T 细胞记忆的维持机制是否相同是一个非常吸引人的课题[20]。

B 细胞记忆

病毒感染不仅诱导可持续存在多年的记忆 B 细胞,而且还具有诱导持续数十年的慢性抗体产生的特性(表 39.10)。尽管一定时间后,血浆中的抗体水平会下降,但可以肯定的是感染和(或)免疫接种后 25~50 年内,循环抗体始终可以检出[20,23,162,239]。由于游离免疫球蛋白的半衰期不超过 3 周[365,366],因此持续性抗体产生对于维持血浆中抗原特异性抗体水平非常重要。长期抗体产生是如何维持?传统模型提示长期抗体应答是记忆 B 细胞不断分化成分泌抗体的浆细胞的结果,基于浆细胞寿命较短,故需要记忆 B 细胞不断补充。刺激病毒特异性记忆 B 细胞不断分化为浆细胞的抗原可能有多种来源,包括病毒再暴露;低水平慢性感染;FDC 上的抗原抗体复合物;以及对自身或环境抗原的交叉反应(表 39.11)。病毒感染后出现长期抗体应答的机制有可能超过一种。然而有研究发现存在长寿命的浆细胞,为体液免疫维持提供了新机制[287]。

表 39.11 长期抗体产生的模式

机制	注释
再暴露于病毒 病毒持续性感染 滤泡树突细胞上形成免疫复合物 自身或环境抗原的交叉反应 独特型网络(Idiotypic network)	维持体液免疫的常规模式,短寿命浆细胞通过记忆 B 细胞激增和分化成浆细胞不断被补充
长寿命浆细胞	长寿命浆细胞为维持持续性抗体产生提供了另外一种机制

保护作用:全身与黏膜免疫

如前所述,病毒感染后血浆中抗病毒抗体能持续数十年。相反,黏膜抗体应答持续时间相对较短(通常数月至一年)(表 39.10)。黏膜感染的保护性免疫产生存在复杂的因果关系。短期免疫通常与局部黏膜感染相关这一结论并不成立(如轮状病毒、RSV、鼻病毒,等等),而长期保护性免疫是许多全身性感染的特征之一(像麻疹、黄热病、脊髓灰质炎、流行性腮腺炎和天花)[72]。出现黏膜性和全身性抗体应答明显差异的原因还不清楚。大多数血浆抗体来自于骨髓中的浆细胞[1,20]。而黏膜抗体水平则主要反映了黏膜部位浆细胞的数量。这两种解剖学部位浆细胞存在明显的寿命跨度差异是完全可能的。骨髓微环境可提供长期(长达许多年)维持浆细胞的信号和细胞因子[287,288],相反,也许黏膜表面的浆细胞寿命较短。经过证实促进浆细胞存活延长的因素,使设计高效疫苗成为可能,因此可以减少维持黏膜感染保护性免疫所需的免疫接种量。

记忆B细胞和T细胞本身不能阻止感染,但它们能在病原再暴露情况下迅速激增和分化成效应细胞;这种快速回忆性应答是控制感染蔓延和阻止发病的关键[20,198]。在阻止发病方面,通常全身性感染的记忆应答比黏膜感染更有效。对于麻疹、脊髓灰质炎等病毒,病毒在侵入部位(麻疹病毒在呼吸道,脊髓灰质炎病毒在肠道)复制不出现任何临床症状;发病是因为病毒播散到其他组织[1,2]。在这类全身性感染,记忆T、B细胞有足够时间来扩增、分化为效应细胞,控制感染,阻止临床发病。这种机会对于在侵入部位(如轮状病毒在肠道,RSV在呼吸道)进行复制并导致组织损伤的病毒感染要小得多[1,2]。这类黏膜感染,临床症状迅速出现(1~2天内),因此没有足够时间等到记忆T细胞的介入。等到记忆T细胞扩增、分化成效应细胞并到达感染部位,部分或主要损伤已经发生。在这种情况下黏膜部位需要效应T细胞来阻止发病。RSV和轮状病毒感染的实验模型可能属于上述情况,据报道其保护性CTL免疫持续时间很短[367,368]。由于效应CTL是严格抗原依赖的,在抗原数量减少情况下,CTL应答迅速减弱并不奇怪。因此对于黏膜感染,免疫记忆能保持完整,但保护性免疫随着黏膜部位效应细胞的减少而减弱。

病毒感染的免疫病理学

免疫应答是一把双刃剑,病毒感染控制的同时几乎总伴随一定程度的组织损伤。大多数病例耐受较好,不产生任何明显疾病。但直接针对病毒的免疫应答有可能造成严重的组织损伤和疾病[242,369~371]。这一节我们主要就一些病毒诱导免疫病理学的实例进行综述。要详细了解免疫病理学机制,请参考本书炎症和自身免疫相关章节(第31~34章)。

免疫复合物病

慢性病毒感染时持续性抗体产生可导致可溶性病毒抗原-抗体复合物形成,在肾和小动脉沉积。免疫复合物持续在肾小球、动脉和脉络丛等处沉积可引起肾小球肾炎、动脉炎和脉络膜炎[372,373]。我们对动物(小鼠LCMV、水貂阿留申病毒、马感染性贫血病毒)和人类(HBV、HIV、HCV)慢性感染的免疫复合物病的各种临床症状已有一定了解。

T细胞和细胞因子介导损伤

小鼠LCMV感染是T细胞介导损伤的经典例子[225,374,375]。因为LCMV是非胞溶性病毒,该模型中出现的多数疾病(脑膜炎、肝炎、糖尿病等)都是抗LCMV T细胞应答引起,并可通过抑制免疫应答来阻断。这些组织损伤的主要介导者是病毒特异性CD8 T细胞,穿孔素介导的杀伤作用和IFN-γ产生都与免疫病理损伤有关[225,369]。研究表明,持续LCMV感染时CD4 T细胞能引起慢性消耗综合征[256]。人类T细胞介导损伤的最佳例子是慢性HBV感染[376,377]。HBV携带者中,"慢性活动性肝炎"的周期性发作是由于HBV特异性CD8 T细胞引起的肝损伤[376,377]。这种肝损伤的机制已通过HBV转基因小鼠进行了深入研究。有人提出AIDS时CD4 T细胞的严重缺乏是因为感染的CD4 T细胞被HIV特异性CD8 T细胞杀伤[378]。HIV感染期间体内T细胞更新和病毒负荷的动力学实验研究结果并不支持这种简单的AIDS模型[274,379,380]。尽管如此,HIV感染存在免疫介导损伤这一问题值得重视。HIV持续存在于CD4 T细胞、巨噬细胞和单核细胞、树突细胞,这些都是免疫系统的关键成分。同时,在慢性感染和慢性免疫激活背景下,大量HIV特异性CD8 T细胞产生[247]。这种慢性免疫激活可引起T细胞内环境稳定性改变,甚至导致T细胞减少和免疫功能障碍。在此情况下,值得注意的是活化T细胞和某些细胞因子能抑制骨髓功能。先天性免疫应答产生的细胞因子也能引起免疫病理损伤。这已在细菌感染中得到很好证实。例如,革兰氏阴性菌败血症及其产生的脂多糖(LPS)内毒素和革兰氏阳性菌毒素,如葡萄球菌肠毒素(葡萄球菌肠毒素A和葡萄球菌肠毒素B)都能诱导引起有害后果的细胞因子产生。一般来说,第一类物质的高水平暴露通过先天性免疫应答机制诱导炎性细胞因子,而第二类物质暴露则活化大部分T细胞亚群产生细胞因子,对先天性免疫细胞因子作用进行级联放大。如果不加以控

制，将导致凝血、血管塌陷和多器官衰竭。虽然这些反应对健康产生主要影响，但对其在病毒感染时的激活还重视不够。研究显示，MCMV 感染可诱导与已知 LPS 暴露时所产生相似的全身性炎性细胞因子，包括 IL-12、IFN-γ、TNF，MCMV 感染时 IL-6 水平很高，而 IL-1 应答很低，不能检出[49~51]。这种条件下，出现非适应性免疫依赖，却是 TNF 依赖的肝坏死，引起明显器官损伤[383]。其他病毒感染时，该过程同样可能引起肝病。特别是 3 型鼠肝炎病毒(MHV-3)感染能诱导肝坏死，且疾病与巨噬细胞活化和凝血相关[384~386]。用 IL-12 处理提示，病毒感染的 T 细胞应答也许还可以促进细胞因子介导或细胞因子依赖的疾病[292]。虽然该途径在登革热病毒感染时很可能产生病理作用[387,388]，但仍需进一步研究。

对宿主免疫的逃避

病毒可通过多种策略逃避宿主免疫应答而在体内持续存在(表 39.12 和表 39.13)。如表 39.12 所示，持续感染能力并不局限某一种病毒，多种 DNA 和 RNA 病毒能发生长期感染。持续存在的病毒增加了人类病毒性疾病的比重，HIV 引起 AIDS；HBV 和 HCV 导致慢性肝炎和肝细胞癌；人乳头状瘤病毒(HPV)相关外阴部癌；新生儿 2 型 HSV 感染等[1,2]。

表 39.12　引起人类持续性感染的病毒

病毒种类	持续感染部位	后　果
DNA 病毒		
腺病毒	腺体，扁桃体，淋巴细胞	不清楚
CMV	肾，唾液腺，淋巴细胞？巨噬细胞，间质细胞	肺炎，视网膜炎
EBV	巨噬细胞，间质细胞，咽上皮细胞，B 细胞	传染性单核细胞增多症，伯基特淋巴瘤，非咽部癌，非霍奇金淋巴瘤，口腔毛状白斑
单纯疱疹病毒 1、2	感觉神经节神经元	感冒疮，生殖器疱疹，脑炎，角化病
人类疱疹病毒 6	淋巴细胞	幼儿急疹
人类疱疹病毒 8	PBMC？内皮梭形细胞？	卡波西肉瘤
水痘-带状疱疹病毒	感觉神经节神经元和(或)卫星细胞	带状疱疹
HBV	肝细胞	肝炎、肝细胞癌
HDV	肝细胞	慢性 HBV 感染恶化
人乳头状瘤病毒	皮肤上皮细胞	乳头状瘤、癌
小 DNA 病毒 B19	骨髓中红细胞系祖细胞	溶血性贫血的再生障碍性危象、慢性骨髓缺陷
多瘤病素 BK	肾	出血性膀胱炎
多瘤病素 JC	肾，CNS 中的少突胶质细胞	进行性多灶性白质脑病
PNA 病素[a]		
HCV	肝细胞	肝炎、肝细胞癌
麻疹病毒[a]	CNS 中的神经元和支持细胞	亚急性硬化性全脑炎、麻疹包含体脑炎
风疹病毒[a]	CNS	进行性风疹全脑炎、胰岛素依赖糖尿病？ 幼年关节炎？
HIV	CD4T 细胞，单核细胞/巨噬细胞，小胶质细胞	AIDS
HTLV Ⅰ	T 细胞	T 细胞白血病、热带痉挛性下肢轻瘫、多肌炎未知
HTLV Ⅱ	T 细胞	

[a]麻疹和风疹病毒主要引起急性感染，然而发现在少数病例，这些病毒可以在 CNS 中持续存在。

病毒逃避策略

免疫逃避是病毒持续感染的本质。病毒用来躲避免疫系统监视和清除作用的多种策略见下文所述，概括于表 39.13。

表 39.13 病毒逃避免疫系统的各种策略

逃避机制	举例[a]
限制基因表达;病毒在细胞内处于潜伏状态,很少或不表达病毒蛋白	HSV 和 VZV 潜伏感染神经元,EBV 在 B 细胞,HIV 在静止 T 细胞
感染发生在免疫系统不能轻易到达的部位	HSV,VZV,麻疹和风疹持续存在于神经元/CNS;CMV,多瘤病毒 BK 和 JC 在肾;EBV 和 CMV 在唾液腺;乳头状瘤病毒在表皮
抑制 NK 细胞功能	CMV 蛋白 UL18 是一种 MHCⅠ分子类似物,能抑制 NK 细胞活性
抗原变异;病毒快速变异,抗原突变发生在抗体和 T 细胞识别的关键部位	慢病毒的抗体逃避变异株;HIV,EBV 和 HBV 的 CTL 逃避变异株;HIV 和 HBV 变异株对 TCR 的拮抗作用
抑制 T 细胞识别所需的细胞表面分子	腺病毒、CMV、HSV 和 HIV 能抑制 MHCⅠ分子 EBV 能减低细胞黏附分子 LFA-3 和 ICAM1 表达 CMV、HIV 和麻疹病毒能抑制 MHC-Ⅱ分子
干扰抗原加工和呈递	HSV ICP47 蛋白和 CMV U6 蛋白通过干扰 TAP 抑制 MHCⅠ类抗原呈递 EBV 蛋白 EBNA-1 含重复 Gly-Ala,对蛋白酶体介导的降解及随后 MHCⅠ类呈递产生耐受 CMV 蛋白 pp65 使 CMV 的主要早期中介蛋白磷酸化并抑制其加工和/或呈递
妨碍抗病毒细胞因子和趋化因子功能的病毒性"防御"分子	腺病毒蛋白 E3 和 E1B 能保护感染细胞不被 TNF 溶解 腺病毒 VA RNA、EBV EBER RNA 和 HIV TAR RNA 能抑制干扰素功能 EBV 蛋白 BCRF1(一种 IL-10 类似物)能阻断 IL-2 和 IFN-γ 等细胞因子合成
免疫耐受	克隆性缺失-HBV 携带者,HIV(?)病毒特异性 CTL 无应答
通过合胞体进行细胞-细胞传播	麻疹病毒引起的亚急性硬化性全脑炎(SSPE)

[a]引用的是已知存在于人类的病毒的仅有例子。

病毒基因的限制性表达

限制性病毒基因表达为感染细胞逃避宿主免疫应答的监测提供了一简单而高效机制。该策略可以改变几乎所有体内持续感染病毒的水平。疱疹病毒和轮状病毒是最好的例证。研究最深入的是神经元 HSV 潜伏感染,除了基因组一个区转录外,病毒基因表达被完全关闭,感染神经原中没有病毒蛋白表达[389,390]。在这种情况下,对于免疫系统来说病毒本质上变成隐形,这种绝对潜伏是逃避宿主免疫的理想方法。然而这种方法并不总行得通,因为潜在状态下病毒 DNA 复制经常需要某些特定蛋白。例如 B 细胞 EBV 潜在感染时,表达一种叫 EBNA-1 的 EBV 蛋白,该蛋白是游离 EBV 基因组通过细胞分裂周期进行繁殖所必需的。此外,从病毒传播角度来看,一直处于潜在状态对病毒是不利的。没有感染性病毒产生,病毒重要的传染模式——水平传播就不能实现。因此,即使是潜在感染效率非常高的病毒,也要间歇性进行生产性感染。

1324

免疫特权部位感染

病毒的另一种策略是感染免疫系统不易接近的组织或细胞型[391]。许多病毒都喜欢持续感染的一个部位是中枢神经系统(CNS),其原因至少有二:血-脑屏障的存在限制了淋巴细胞进入 CNS,而像神经元等特殊细胞,MHCⅠ类分子表达很少或不表达,也不表达 MHCⅡ类分子,因此不能被 T 细胞有效识别[392~395]。肾是病毒易于持续感染的另一个器官[392,396,397]。人多瘤病毒(polyomavirus)BK 和 JC 在肾中复制,引起长期尿中排毒。CMV 也在肾中发现,并出现长期排毒。免疫系统清除肾中病毒效率极低的原因还不十分清楚,因为不存在血-肾屏障,淋巴细胞的活动不应受任何限制。然而有研究显示尽管肾中有 T 细胞浸润,但其与感染上皮细胞接近受到限制[398]。这些细胞受到完整基底膜和微血管内皮的保护,该屏障在 T 细胞与其靶细胞接触前必须被打破。这种 T 细胞接近限制还有能出现在其他内分泌和外分泌腺的上皮表面,应注意到唾液腺是 CMV 和 EBV 持续感染的喜好部位。表皮中乳头状瘤病毒复制提供了另一个病毒在免疫特权部位持续存在的例子,这种复制只发生于正在分化的角质形成细胞中,其后果是基底膜把感染细胞和病毒颗粒与宿主免疫应答物理性分割开来。

病毒逃避抗体识别

1325

有许多抗体耐受变异的例子,病毒蛋白关键性抗体识别位点突变是一种逃避中和性抗体的高效手段。

典型例子是流感病毒发生的抗原性“漂移”(shift)和“漂流”(drift)[399,400]。这种抗原性变化是流感病毒血凝素和神经氨酸酶2种表面糖蛋白改变的结果。流感病毒不会在某一个体中持续感染,但抗原变异株的不断出现导致流感病毒在整个人群水平持续存在。持续性感染中的抗原变异的最好例子来自慢病毒。马传染性贫血病毒、绵羊脱髓鞘性脑白质炎病毒、山羊关节炎-脑炎病毒、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)和人HIV持续性感染过程中都出现抗原变异[401~404]。但这些病毒抗原变异的生物学重要性还不完全清楚。根据对马传染性贫血病毒感染的可能解释,疾病的反复发作(与病毒血症相关的临床症状)与出现抗体逃避变异株有关,慢病毒中的抗原变异现象似乎并不一定是持续感染或发病所必须的。在许多病例,尽管存在中和性抗体,亲代病毒与变异株却能在感染宿主中一起持续存在。尽管中和性抗体能选择出抗原变异株,但却不能完全清除亲代野生型病毒,而且变异株和野生型病毒经常共存于持续性感染宿主。

病毒逃避T细胞识别

病毒性肽的抗原变异如果发生在参与肽呈递给MHC分子的加工性和结合性残基,或者与TCR直接接触的病毒性肽发生改变,能导致正常T细胞识别失败。理论上这种改变如果发生在被MHCⅠ或MHCⅡ类分子呈递的病毒性肽,将分别引起对CD8和CD4 T细胞的逃避。很少有研究系统性分析CD4 T细胞识别表位内的病毒抗原变异,这主要因为有关CD4 T细胞识别病毒性肽的信息匮乏。相反,有关CD8 T细胞表位的信息丰富,已有多个资料完备的关于抗原变异导致病毒逃避CTL识别的例子[405]。CTL逃避变异株最早是通过LCMV感染体系发现的[406],在该研究中单个氨基酸改变就能废除CTL识别,引起突变病毒体内持续存在。CTL逃避变异株这种深奥的生物学效应,还能在表达单一LCMV特异性TCR,并且仅产生单克隆CTL应答的转基因小鼠中见到。在复杂的生理条件下,抗病毒CTL应答很可能是多克隆和多特异性的,届时是否CTL逃避变异株还具有类似的优势还需进一步观察。

已发现人类多种病毒感染能出现CTL逃避变异株,这包括HIV、EBV和HBV[405~409]。目前已有实质性证据表明,所有这三种病毒感染的控制CTL起着或至少从某种程度上起着重要作用。这提示在这些病例中,CTL逃避变异株的产生是维持持续性感染的关键。然而,在大多数证实了CTL逃避变异株存在的研究中,这些变异株并不能发展成为优势病毒株[405]。另外,对HIV感染者的纵向研究显示,14个月内没有检测出逃避变异株,表明这类变异株存在可能并不一定是HIV持续感染的必要条件[410]。SIV感染中也观察到类似结果[411]。尽管这些研究怀疑CTL逃避变异株在病毒持续性感染中的作用,但CTL逃避还可以通过其他几种机制实现(见下文)。但当呈递到细胞表面的病毒性肽密度太低,不能触发有效溶解靶细胞效应,就能躲避CTL的胞溶作用。有研究表明HIV自然感染细胞上某些病毒肽的低密度限制了HIV特异性CTL的效应[412],为上述理论提供了证据。

针对HIV和HBV的两项研究为一种抵御CTL应答的新策略提供了证据[413,414]。这些研究证实了HIV和HBV突变能在体外阻碍CTL的功能,这些变异株的CTL识别表位发生了改变。然而与CTL逃避变异株不能被CTL识别(不能被TCR识别)有所不同的是,这些突变表位仍能与TCR交互作用,但不能产生刺激信号,而是作为拮抗物致使CTL无功能。这种现象称为TCR拮抗,尽管其机制还不完全清楚,但为逃避CTL应答提供了一种高效手段[415,416]。该策略的一个重要方面是,“拮抗性”变异株能阻断CTL介导的对含野生型在内的多型病毒共感染细胞的胞溶作用。这为野生型病毒面临CTL应答生存下来提供了可能解释。这些令人振奋研究的局限性是还不清楚TCR拮抗作用在体内是否有效。

抑制T细胞识别所需的细胞表面分子

病毒能够通过下调T细胞有效识别病毒感染细胞所必需的细胞表面分子,来逃避T细胞识别。这些分子包括宿主MHCⅠ类(作用CD8细胞)或MHCⅡ类分子(作用CD4细胞)以及多种黏附分子,如ICAM-1和LFA-3。病毒能采取策略选择性抑制这些关键性宿主细胞分子表达,来瓦解这种多聚性交互作用。

对多种病毒研究发现,病毒感染能引起宿主细胞MHCⅠ类抗原表达下降[417~419]。病毒介导性MHCⅠ类

抗原抑制的最佳例子是腺病毒和 CMV[418,420]。人类腺病毒能通过两种不同机制下调 MHC 表达。2 型腺病毒的一种早期蛋白 E3 蛋白,能与 MHC 分子结合并形成复合物,形成的 E3-MHCⅠ复合物能通过抑制 MHC 分子的末端糖基化来阻止其被正确加工,导致细胞表面Ⅰ类分子表达减少。另一种早期蛋白 12 型腺病毒的 E1 蛋白,能通过另一种机制阻止 MHCⅠ类分子表达,包括转录抑制或核中信息 RNA(mRNA)输出缺乏。HCMV 和 MCMV 均含有多个妨碍 MHCⅠ类分子表达的基因[109,110,112,113,418]。MCMV gpm152 蛋白可以使 MHCⅠ类分子滞留在前高尔基体中,而 MCMV gpm04 在内质网中与 MHCⅠ类分子连接,并一起转运到细胞表面,抑制 MHCⅠ类分子功能,但具体机制还不清楚。HCMV 编码的 2 个基因,US2 和 US11,能介导新合成的 MHCⅠ类分子迅速降解。这是因为病毒蛋白把新合成的 MHCⅠ类分子挤进胞质,在 *N*-聚糖酶作用下去糖基化,这种去糖基化使 MHCⅠ类分子易被蛋白酶降解。HCMV 编码的另一种蛋白 gpUS3,能与 MHCⅠ类分子结合,并使其滞留在内质网。

1326

很多报道证实了病毒介导的对 MHCⅡ类分子抑制[417,418]。在病毒感染者中,发现 CMV、HIV 和麻疹病毒能阻碍 MHCⅡ类分子表达,妨碍机制还不清楚,但经对所有病例进行研究发现,病毒感染并不影响 MHCⅡ类分子基础水平表达,而是直接抑制 IFN-γ 介导的上调 MHCⅡ mRNA 转录。MHCⅡ类分子表达增强对抗原呈递可能起着重要作用,如果该过程受阻,将妨碍有效抗病毒免疫应答的产生。

EBV 能下调细胞表面黏附分子 LFA3 和 ICAM1 的表达[421],其后果是某些伯基特淋巴瘤细胞株不能被 CTL 有效杀伤。这些黏附分子被选择性抑制的机制还不清楚,但这些研究说明病毒确实存在其他避开免疫应答的策略。

妨碍抗原呈递

有研究根据 HSV 抑制 MHCⅠ类分子的抗原呈递提出了一种新机制[418]。ICP47 是 HSV 的一种早期蛋白,可以与抗原加工相关转运子(TAP)结合,阻止肽易位到内质网。结果使肽不能安装到 MHCⅠ类分子上,而空的 MHCⅠ类分子仍插在内质网中不能呈现到细胞表面。确定 ICP47 在体内 HSV 持续感染和发病机制中的作用令人关注。在这方面通过 ICP47 突变,利用适当动物模型进行了探索。在该背景下,注意到 HSV 潜伏部位是表达很少或不表达 MHCⅠ类分子的神经元。在潜伏期和感染早期 HSV 停留在神经元,因此其活动性感染可能不会受到 ICP47 抑制抗原呈递给 MHCⅠ类分子的影响。当 HSV 在表达 MHCⅠ类分子的细胞(上皮细胞、成纤维细胞)中复制,并应该被 HSV 特异性 CD8 CTL 识别和杀伤时,ICP47 的这种新功能显得更加重要。ICP47 干扰这些细胞中 TAP 功能并抑制抗原呈递,可能引起 HSV 泌出增多、感染新宿主效率提高。CMV 也编码一种 U6 蛋白,能抑制 TAP 功能[418,422],虽然准确机制还属未知,但研究表明 U6 糖蛋白可与 TAP 的内腔表面交互作用,这与 HSV ICP47 与 TAP 胞质表面结合不同。因此,看来这 2 种病毒蛋白通过不同机制达到相同目的(抑制 TAP 功能)。

还存在病毒蛋白对抗原呈递天生耐受的例子。EBV 的 EBNA1 蛋白含重复的 Gly-Ala 序列,可耐受蛋白酶的降解[418,423,424],结果 EBNA1 上的肽不能被内源性呈递给 CD8 T 细胞。应该指出的是 EBNA1 的表达是潜伏性感染 B 细胞内 EBV 基因组复制所必需的。因此,EBNA1 抑制呈递作用也许是 EBV 体内持续性感染的关键。有研究发现了针对 EBNA1 蛋白的 CD8 T 细胞应答,但这是因为 EBNA1 的外源性加工[423]。然而在该例子中,经交叉致敏虽可诱导 CTL,但这些 EBNA1 特异性 CD8 T 细胞不能识别潜伏感染细胞,因为在这些感染 B 细胞中 EBNA1 没能被内源性加工。CMV 的 pp65 蛋白则通过与 EBNA1 不同的策略。pp65 能有效呈递给 CD8 T 细胞,但 pp65 能使 CMV 的主要早期中介蛋白磷酸化,并阻止其呈递[418,425]。

干扰细胞因子和趋化因子功能

在多种不同病毒感染中都证实了病毒蛋白能干扰细胞因子功能[420,426~429]。某些腺病毒早期蛋白(E3、E1B)能保护病毒感染细胞不被 TNF 溶解。痘病毒也编码一种 T2 蛋白能抑制 TNF 活性。痘病毒 T2 蛋白是一种细胞 TNF 受体的类似物,是感染细胞释放的一种诱饵。T2 与 TNF 结合就可以阻止 TNF 与其真正的细

胞受体结合及发挥抗病毒效应。其他病毒防御分子的例子包括 EBV 的 BCRF1 蛋白，为 IL-10 的类似物，能阻断 IL-2 和 IFN-γ 的合成，而黏液瘤病毒编码的一种分泌性蛋白可以与 IFN-γ 结合[430,431]。有些病毒本身 RNA 可起到防御分子的作用，腺病毒 VA RNA、HIV TAR RNA 和 EBV EBER RNA 能抑制 IFN-α/β 的抗病毒效应。IFN 能诱导磷蛋白 DAI 的合成，在 dsRNA 参与下使启动因子 *eIF2* 磷酸化，阻止翻译启动(图 39.5)。这些病毒 RNA 二级结构的多态性允许其与 DAI 结合，抑制 dsRNA 结合和妨碍 IFN 活性。

某些病毒含有与趋化因子和(或)趋化因子受体同源基因，以及其他具有趋化因子结合活性的基因产物[429,432-435]。是否所有这些功能都有助于病毒免疫逃避还不清楚。其可溶性形式可能成为趋化因子受体拮抗剂或阻断剂。然而趋化因子类似物也有可能通过吸引流动的敏感细胞到达感染启动部位，促进病毒播散。趋化因子受体类似物如果表达在细胞表面，也许可以作为宿主趋化因子结合的主要负面调节信号，阻止自然受体的信号传导；和(或)接受宿主趋化因子信号，增强病毒对细胞的感染。然而，在黏液瘤病毒感染，发现某些具有趋化因子结合活性的病毒产物是感染的致病因子，干扰招募白细胞到病毒感染组织。

免疫耐受

也许建立和维持持续性感染最有效手段，是选择性地使清除病毒的效应系统沉寂下来。这种情况的经典例子是先天感染 LCMV 小鼠，LCMV 特异性 CTL 应答被抑制[20,239]。成年 LCMV 感染小鼠产生强烈的细胞和体液免疫应答，在 2 周内清除感染。这种清除主要依赖 LCMV 特异性 CD8 CTL[20,239]。与成年小鼠急性感染相反，在出生时或子宫内感染 LCMV 并发展成慢性感染的小鼠，则表现出长期病毒血症，伴随其主要器官中高水平感染性病毒和病毒抗原。这种小鼠 LCMV 持续携带伴随对病毒 T 细胞应答缺乏。这是一种高度特异性缺陷。这些持续感染小鼠表现出非广泛性免疫抑制，对其他抗原免疫应答正常，但不能产生可检测的针对 LCMV 的 T 细胞应答，这主要因为发现病毒抗原时，胸腺中病毒特异性 T 细胞已发生克隆性缺失[396,436]。病毒携带小鼠清除病毒能力丧失主要因为 T 细胞缺陷，因为获得 LCMV 特异性 T 细胞输入后能清除病毒[20,239]。

1327

免疫耐受同样在慢性 HBV 感染发生中起着重要作用。HBV 感染母亲出生的大多数儿童(> 90%)成为 HBV 携带者。这些新生儿感染携带者，至少有部分可能发生胸腺或外周 HBV 特异性 T 细胞克隆性缺失。甚至在成人 HBV 感染，大剂量的病毒抗原过度刺激可以引起外周一些病毒特异性 T 细胞缺失，与前述的亲巨噬细胞性和侵袭性 LCMV 感染成年小鼠，多种组织中迅速产生大量抗原相似[130,263,437]。在这种条件下，病毒特异性 CD8 CTL 受到过度刺激，引起外周克隆性耗竭(缺失)。研究表明慢性感染时，CD4 T 细胞在维持 CD8 CTL 应答中起着关键作用；在 CD4 T 细胞缺陷情况下，外周 LCMV 特异性 CTL 迅速耗竭[174,438](图 39.14)。这一发现涉及一般的慢性病毒感染，并为 AIDS 晚期 CD4 T 细胞数量降至维持 CTL 功能必需的域值以下时，HIV 特异性 CTL 活性消失提供一可能解释。

已讨论的各种病毒逃避机制总结于表 39.13。虽然引证了一些特例来证明各种策略，但不大可能用单一机制来解释一种病毒的持续性感染。每个不同免疫活性宿主病毒持续性感染形成，很可能通过这些策略的组合，还包括一些未知机制。

致谢

感谢 Kaja Murali-Krishna，Khuong B. Nguyen 和 Joe Blattman 对本文的帮助，感谢 John Altman 提供图 39.12 以及 Ganes Sen，Barney Graham 和 Mark Hogarth 的宝贵建议。

(周吉军 译)

参 考 文 献

1. Fields BN. *Fields' virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996.
2. Nathenson N, ed. *Viral pathogenesis*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996.
3. Mims CA, ed. *The pathogenesis of infectious disease*. 3rd ed. London: Academic Press, 1987.
4. Mims CA, White DO, eds. *Viral pathogenesis and immunology*. Oxford: Blackwell Science, 1984.
5. Watts C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 1997;15:821–850.
6. York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996;14:369–396.
7. Bentley GA. The structure of the T cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 1996;14:563–590.
8. Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* 1993;11: 637–685.
9. Bucy RP, Chen CH, Cooper MD. Ontogeny of T cell receptors in the chicken thymus. *J Immunol* 1990;144:1161–1168.
10. Hein WR, Mackay CR. Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunol Today* 1991;12:30–34.
11. Eichelberger M, Allan W, Carding SR, Bottomly K, Doherty PC. Activation status of the CD4-8- cells recovered from mice with influenza pneumonia. *J Immunol* 1991;147:2069–2074.
12. Hou S, Katz JM, Doherty PC, Carding SR. Extent of gamma delta T cell involvement in the pneumonia caused by Sendai virus. *Cell* Immunol 1992;143: 183–193.
13. Welsh RM, Lin MY, Lohman BL, Varga SM, Zarozinski CC, Selin LK. Alpha beta and gamma delta T-cell networks and their roles in natural resistance to viral infections. *Immunol Rev* 1997;159:79–93.
14. Sciammas R, Kodukula P, Tang Q, Hendricks RL, Bluestone JA. T cell receptor-gamma/delta cells protect mice from herpes simplex virus type 1-induced lethal encephalitis. *J Exp Med* 1997;185:1969–1975.
15. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, et al. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8175–8179.
16. Lenz LL, Dere B, Bevan MJ. Identification of an H2-M3-restricted Listeria epitope: implications for antigen presentation by M3. *Immunity* 1996;5:63–72.
17. Gulden PH, Fischer P III, Sherman NE, et al. A Listeria monocytogenes pentapeptide is presented to cytolytic T lymphocytes by the H2-M3 MHC class Ib molecule. *Immunity* 1996;5:73–79.
18. Bogen SA, Fogelman I, Abbas AK. Analysis of IL-2, IL-4, and IFN-gamma-producing cells in situ during immune responses to protein antigens. *J Immunol* 1993;150:4197–4205.
19. Scharton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice. *J Exp Med* 1993;178:567–577.
20. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996;272:54–60.
21. Bradley LM, Watson SR, Swain SL. Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin. *J Exp Med* 1994;180:2401–2406.
22. Hou S, Doherty PC. Partitioning of responder CD8+ T cells in lymph node and lung of mice with Sendai virus pneumonia by LECAM-1 and CD45RB phenotype. *J Immunol* 1993;150:5494–5500.
23. Doherty PC, Allan W, Eichelberger M, Carding SR. Roles of alpha beta and gamma delta T cell subsets in viral immunity. *Annu Rev Immunol* 1992:10: 123–151.
24. Vilcek J, Sen GC. Interferons and other cytokines. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fundamental Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996:341–365.
25. Ishikawa R, Biron CA. IFN induction and associated changes in splenic leukocyte distribution. *J Immunol* 1993;150:3713–3727.
26. Feldman SB, Ferraro M, Zheng H-M, Patel N, Gould-Fogerite, Fitzgerald-Bocarsly P. Viral induction of low frequency interferon-α producing cells. *Virology* 1994;201:1–7.
27. Fitzgerald-Bocarsly P, Howell DM, Pettera L, Tehrani S, Lopez-C. Immediate-early gene expression is sufficient for induction of natural killer cell-mediated lysis of herpes simplex virus type 1-infected fibroblasts. *J Virol* 1991;65: 3151–3160.
28. Lebon P. Inhibition of herpes simplex virus type-1 induced interferon synthesis by monoclonal antibodies against viral glycoprotein D and by lysosomotropic drugs. *J Gen Virol* 1985;66:2781–2786.
29. Darnell, JE. STATS and gene regulation. *Science* 1997;277:1630–1635.
30. Rivière Y, Gresser I, Guillon JC, Tovey MG. Inhibition by anti-interferon serum of lymphocytic choriomeningitis virus disease in suckling mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:2135–2139.
31. Fiette L, Aubert C, Muller U, et al. Theiler's virus infection of 129Sv mice that lack the interferon alpha/beta or interferon gamma receptors. *J Exp Med* 1995;181:2069–2076.
32. Müller U, Steinhoff U, Reis LFL, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994;264:1918–1921.
33. van den Broek MF, Müller U, Huang S, Aguet M, Zinkernagel RM. Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta, and gamma interferon receptors. *J Virol* 1995;69:4792–4796.
34. Meraz MA, White JM, Sheehan KC, et al. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 1996;84:431–442.
35. Gresser I, Guy-Grand D, Maury C, Maunoury MT. Interferon induces peripheral lymphademopathy in mice. *J Immunol* 1981;127:1569–1575.
36. Korngold R, Blank KJ, Murasko DM. Effect of interferon on thoracic duct lymphocyte output: induction with either polyI:polyC or vaccinia virus. *J Immunol* 1983;130:2236–2240.
37. Woodruff JF, Woodruff JJ. Virus-induced alterations of lymphocyte tissues. I. Modification of the recirculating pool of small lymphocytes by Newcastle Disease Virus. *Cell Immunol* 1970;1:333–354.
38. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989;47:187–376.
39. Cousens LP, Orange JS, Su HC, Biron CA. Interferon-α/β inhibition of interleukin 12 and interferon-γ production *in vitro* and endogenously during viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:634–639.
40. Manetti R, Annuziato F, Tomasevic L, et al. Polyinosinic acid: polycytidylic acid promotes T helper type 1-specific immune responses by stimulating macrophage production of interferon-alpha and interleukin-12. *Eur J Immunol* 1995;25: 2656–2660.
41. Rogge L, Barberis-Maino, Biffi M, et al. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 1997;185: 825–831.
42. Lindahl P, Gresser I, Leary P, Tovey M. Interferon treatment of mice. Enhanced expression of histocompatibility antigens on lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:1284–1287.
43. Biron CA, Welsh RM. Blastogenesis of natural killer cells during viral infection in vivo. *J Immunol* 1982;129:2788–2795.
44. Biron CA, Sonnenfeld G, Welsh RM. Interferon induces natural killer cell blastogenesis in vivo. *J Leukoc Biol* 1984;35:31–37.
45. Tough DF, Borrow P, Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* 1996;272:1947–1950.
46. Gilles PN, Fey G, Chisari FV. Tumor necrosis factor alpha negatively regulates hepatitis B virus gene expression in transgenic mice. *J Virol* 1992;66: 3955–3960.
47. Lucin P, Jonjic S, Messerle M, Polic B, Hengel H, Koszinowski UH. Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon-gamma and tumour necrosis factor. *J Gen Virol* 1994;75:101–110.
48. Neuzil KM, Tang YW, Graham BS. Protective Role of TNF-alpha in respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo. *Am J Med Sci* 1996;311:201–204.
49. Orange JS, Wang B, Terhorst C, Biron CA. Requirement for natural killer (NK) cell-produced interferon γ in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interelukin 12 administration. *J Exp Med* 1995;182:1045–1056.
50. Orange JS, Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN-α/β, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 1996;156:4746–4756.
51. Ruzek MC, Miller AH, Opal SM, Pearce BD, Biron CA. Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 1997;185:1185–1192.
52. Wong GHW, Goeddel DV. Tumor necrosis factors alpha and beta inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature* 1986;323:819–822.
53. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:323–350.
54. Chan SH, Perussia B, Gupta JW, et al. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 1991;173:869–879.
55. Coutelier JP, Van Broeck J, Wolf SF. Interleukin-12 gene expression after viral infection in the mouse. *J Virol* 1995;69:1955–1958.
56. Kanangat S, Thomas J, Gangappa S, Babu JS, Rouse BT. Herpes simplex virus type 1-mediated up-regulation of IL-12 (p40) mRNA expression. Implications in immunopathogenesis and protection. *J Immunol* 1996;156:1110–1116.
57. Orange JS, Biron CA. An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-γ production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J Immunol* 1996;156:1138–1142.
58. Schijns VECJ, Wierda CMH, van Hoeij M, Horzinek MC. Exacerbated viral hepatitis in IFN-γ receptor-deficient mice is not suppressed by IL-12. *J Immunol* 1996;157:815–821.
59. Kanangat S, Babu JS, Knipe DM, Rouse BT. HSV-1-mediated modulation of cytokine gene expression in a permissive cell line: selective upregulation of IL-6 gene expression. *Virology* 1996;219:295–300.
60. Mo XY, Sarawar SR; Doherty PC. Induction of cytokines in mice with parainfluenza pneumonia. *J Virol* 1995;69:1288–1291.

61. Moskophidis D, Frei K, Lohler J, Fontana A, Zinkernagel RM. Production of random classes of immunoglobulins in brain tissue during persistent viral infection paralleled by secretion of interleukin-6 (IL-6) but not IL-4, IL-5, and gamma interferon. *J Virol* 1991;65:1364–1369.
62. Pulliam L, Moore D, West DC. Human cytomegalovirus induces IL-6 and TNF alpha from macrophages and microglial cells: possible role in neurotoxicity. *J Neurovirol* 1995;1:219–227.
63. Su HC, Ishikawa R, Biron CA. Transforming growth factor-β expression and natural killer cell responses during virus infection of normal, nude, and SCID mice. *J Immunol* 1993;151:4874–4890.
64. Wahl SM, Allen JB, McCartney-Francis N, et al. Macrophage- and astrocyte-derived transforming growth factor beta as a mediator of central nervous system dysfunction in acquired immune deficiency syndrome. *J Exp Med* 1991;173: 981–991.
65. Atedzoe BN, Ahmad A, Menezes J. Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by the human herpesvirus-7 via IL-15 induction. *J Immunol* 1997;159: 4966–4972.
66. Flamand L, Stefanescu I, Menezes J. Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J Clin Invest* 1996;97:1373–1378.
67. Komatsu T, Reiss CS. IFN-γ is not required in the IL-12 response to vesicular stomatitis virus infeciton of the olfactory bulb. *J Immunol* 1997;159:3444–3452.
68. Naume B, Johnsen AC, Espevik T, Sundan A. Gene expression and secretion of cytokines and cytokine receptors from highly purified CD56+ natural killer cells stimulated with interleukin-2, interleukin-7 and interleukin-12. *Eur J Immunol* 1993;23:1831–1838.
69. Bi Z, Reiss CS. Inhibition of vesicular stomatitits virus infection by nitric oxide. *J Virol* 1995;69:2208–2213.
70. Braun L, Durst M, Mikumo R, Crowley A, Robinson M. Regulation of growth and gene expression in human papillomavirus-transformed keratinocytes by transforming growth factor-beta: implications for the control of papillomavirus infection. *Mol Carcinog* 1992;6:100–111.
71. Hunter CA, Timans J, Pisacane P, et al. Comparison of the effects of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interferon-gamma-inducing factor on the production of interferon-gamma by natural killer. *Eur J Immunol* 1997;27:2787–2792.
72. McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, et al. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res Brain Res Rev* 1997;23:79–133.
73. Vacca A, Felli MP, Farina AR, et al. Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. *J Exp Med* 1992;175:637–646.
74. Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995;270:283–286.
75. Biron CA. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin* Immunol 1997;9:24–34.
76. Gidlund M, Örn A, Wigzell H, Senik A, Gresser I. Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature* 1978;273: 759–761.
77. Santoli D, Trinchieri G, Koprowski H. Cell-mediated cytotoxicity against virus-infected target cells in humans. II. Interferon induction and activation of natural killer cells. *J Immunol* 1978;121:532–538.
78. Bancroft GJ, Shellam GR, Chalmer JE. Genetic influences on the augmentation of natural killer (NK) cells during murine cytomegalovirus infection: correlation with patterns of resistance. *J Immunol* 1981;126:988–994.
79. Macfarlan RI, Burns WH, White DO. Two cytotoxic cells in peritoneal cavity of virus-infected mice: antibody-dependent macrophages and non-specific killer cells. *J Immunol* 1977;119:1569–1574.
80. Pfizenmaier K, Trostmann H, Rollinghoff M, Wagner H. Temporary presence of self-reactive cytotoxic T-lymphocytes during murine lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Nature* 1975;258:238–240.
81. Shellam GR, Allan JE, Papadimitriou JM, Bancroft GJ. Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:5104–5108.
82. Welsh RM. Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. I. Characterization of natural killer cell induction. *J Exp Med* 1978;148:163–181.
83. Grundy (Chalmer) JE, Trapman J, Allan JE, Shellam GR, Melief CJM. Evidence for a protective role of interferon in resistance to murine cytomegalovirus and its control by non-H-2-linked genes. *Infect Immun* 1982;37:143–150.
84. Biron CA, van den Elsen P, Tutt MM, Medveczky P, Kumar V, Terhorst C. Murine natural killer cells stimulated *in vivo* do not express the T cell receptor α, β, T3δ, or T3ε genes. *J Immunol* 1987;139:1704–1710.
85. Wang B, Biron C, She J, et al. A block in both early T lymphocyte and natural killer cell development in transgenic mice with high-copy numbers of the human CD3ε gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9402–9406.
86. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 1989;320:1731–1735.
87. Bonavida B, Katz J, Gottlieb M. Mechanism of defective NK cell activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Immunol* 1986;137:1157–1163.
88. Bukowski JF, Woda BA, Habu S, Okumura K, Welsh RM. Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J Immunol* 1983;131:1531–1538.
89. Habu S, Akamatsu K, Tamaoki N, Okumura K. *In vivo* significance of NK cells on resistance against virus (HSV-1) infections in mice. *J Immunol* 1984;133:2743–2747.
90. Rager-Zisman B, Quan P-C, Rosner M, Moller JR, Bloom BR. Role of NK cells in protection of mice against herpes simplex virus-1 infection. *J Immunol* 1987;138:884–888.
91. Sullivan JL, Byron KS, Brewster FE, Purtillo DT. Deficient natural killer cell activity in the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Science* 1980;210: 543–545.
92. Kägi D, Ledermann B, Burki K, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994;369: 31–37.
93. Tay CH, Welsh RM. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J Virol* 1997;71:267–275.
94. Borysiewicz LK, Rodgers B, Morris S, Graham S, Sissons JG. Lysis of human cytomegolovirus infected fibroblasts by natural killer cells: demonstration of an interferon-independent component requiring expression of early viral proteins and characterization of effector cells. *J Immunol* 1985;134:2695–2701.
95. Welsh RM, Hallenbeck LA. Effect of virus infections on target cell susceptibility to natural killer cell-mediated lysis. *J Immunol* 1980;124:2491 2497.
96. Perussia B, Tutt MM, Qiu WQ, et al. Murine natural killer cells express functional Fc gamma receptor II encoded by the Fc gamma R alpha gene. *J Exp Med* 1989;170:73–86.
97. Yokoyama WM. Right-side-up and up-side-down NK cell-receptors. *Curr Biol* 1995;5:982–985.
98. Colonna M. Natural killer cell receptors specific for MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 1996;8:101–107.
99. Lanier, LL. Natural killer cell receptors and MHC class I interactions. *Curr Opin Immunol* 1997;9:126–131.
100. Moretta A, Moretta L. HLA class I specific inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* 1997;9:694–701.
101. Parham P, ed. NK cells, MHC class I antigens and missing self. *Immunol Rev* 1997;155:1–221.
102. Burshtyn DN, Scharenberg AM, Wagtmann N, et al. Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity* 1996; 4:77–85.
103. Campbell AE, Slater JS. Down-regulation of major histocompatibility complex class I synthesis by murine cytomegalovirus early gene expression. *J Virol* 1994;68:1805–1811.
104. Olcese L, Lang P, Vély F, et al. Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 1996;156: 4531–4534.
105. D'Andrea A, Chang C, Phillips JH, Lanier LL. Regulation of T cell lymphokine production by killer cell inhibitory receptor recognition of self HLA class I alleles. *J Exp Med* 1996;184:789–794.
106. Ortaldo JR, Mason LH, Gregorio TA, Stoll J, Winkler-Pickett RT. The Ly-49 family: regulation of cytokine production in murine NK cells. *J Leukoc Biol* 1997;62:381–388.
107. Cosman D, Fanger N, Borges L, et al. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 1997;7: 273–282.
108. Braud VM, Allan SJ, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B, and C. *Nature* 1998;391:795 799.
109. Del Val M, Hengel H, Häcker H, et al. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-golgi compartment. *J Exp Med* 1992;176:729–738.
110. Hengel H, Koszinowski UH. Interference with antigen processing by viruses. *Curr Opin Immunol* 1997;9:470–476.
111. Hill A, Jugovic P, York I, et al. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 1995;375:411–515.
112. Jones TR, Hanson LK, Sun L, Slater JS, Stenberg RM, Campbell AE. Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol* 1995;69:4830–4841.
113. Wiertz EJHJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 1996;84:769–779.
114. Farrell HE, Hally H, Lynch DM, et al. Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature* 1997;386:510–514.
115. Reyburn HT, Mandelboim O, Valès-Gomez M, Davis DM, Pazmani L, Strominger JL. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 1997:386:514–517.
116. Scalzo AA, Lyons PA, Fitzgerald NA, Forbes CA, Yokoyama WM, Shellam GR. Genetic mapping of Cmv1 in the region of mouse chromosome 6 encoding the NK gene complex-associated loci Ly49 and musNKR-P1. *Genomics* 1995;27: 435–441.
117. Delano ML, Brownstein DG. *Innate resistance to lethal mousepox is genetically* linked to the NK gene complex on chromosome 6 and correlates with early

restriction of virus replication by cells with an NK phenotype. *J Virol* 1995;69: 5875–5877.

118. Biron CA, Gazzinelli RT. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Curr Opin Immunol* 1995;7:485–496.
119. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:827–845.
120. Romani L, Puccetti P, Bistoni F. Interleukin-12 in infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:611–636.
121. Heise MT, Virgin IV HW. The T cell independent role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in macrophage activation during murine cytomegalovirus and herpes simplex virus infections. ϑ ςρολ 1995;69:904–909.
122. Salazar-Mather TP, Orange JS, Biron CA. Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1α (MIP-1α)-dependent pathways. *J Exp Med* 1998;187:1–14.
123. Gollob JA, Kawasaki H, Ritz J. Interferon-gamma and interleukin-4 regulate T cell interleukin-12 responsiveness through the differential modulation of high-affinity interleukin-12 receptor expression. *Eur J Immunol* 1997;27:647–652.
124. Ma X, Chow JM, Gri G, et al. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med* 1996;183:147–157.
125. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997;185:817–824.
126. Allison AC. Interactions of antibodies, complement components and various cell types in immunity against viruses and pyogenic bacteria. *Transplant Rev* 1974; 19:3–55.
127. Ching C, Lopez C. Natural killing of herpes simplex virus type-1 infected target cells: normal human responses and influence of antiviral antibody. *Infect Immun* 1979;26:49–56.
128. Skowron G, Cole BF, Zheng D, Accetta G, Yen-Lieberman B. gp120-directed antibody-dependent cellular cytotoxicity as a major determinant of the rate of decline in CD4 percentage in HIV-1 disease. AIDS *1997;11:1807–1814.*
129. Brautigam AR, Dutko FJ, Olding LB, Oldstone MBA. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection: the macrophage as a permissive cell for cytomegalovirus infection, replication and latency. J Gen Virol *1979;44:349–359.*
130. Matloubian M, Kolhekar SR, Somasundaram T, Ahmed R. Molecular determinants of macrophage-tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 1993;67:7340–7349.
131. Mims CA, Gould J. The role of macrophages in mice infected with murine cytomegalovirus. *J Gen Virol* 1978;41:143–153.
132. Mims CA, Murphy FA. Parainfluenza virus Sendai infection in macrophages, ependyma, choroid plexus, vascular endothelium, and respiratory tract of mice. *Am J Pathol* 1973;70:315–328.
133. Narayan O, Kennedy-Stoskopf S, Sheffer D, Griffin DE, Clements JE. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infect Immun* 1983;41:67–73.
134. Roberts JA. Growth of virulent and attenuated ectromelia virus in cultured macrophages from normal and ectromelia-immune mice. *J Immunol* 1964;92: 837–842.
135. Cafruny WA, Bradley SE. Trojan Horse macrophages: studies with the murine lactate dehydrogenase-elevating virus and implications for sexually transmitted infection. *J Gen Virol* 1996;77:3005–3012.
136. Bang FB. Genetics of resistance of animal to viruses: I. Introduction and studies in mice. *Adv Virus Res* 1978;23:269–348.
137. Bang FB, Warwick A. Mouse macrophages as host cells for the mouse hepatitis virus and genetic basis of their susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1960;46: 1065–1075.
138. Ben-Hur T, Hadar J, Shtram Y, Gilden DH, Becker Y. Neurovirulence of herpes simplex virus type 1 depends on age in mice and thymidine kinase expression. *Arch Virol* 1983;78:303–308.
139. Goodman GT, Koprowski H. Macrophages as a cellular expression of inherited natural resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1961;48:160–165.
140. Mogensen SC. Role of marophages in natural resistance to virus infections. *Microbiol Rev* 1979;43:1–26.
141. Ho WZ, Lioy J, Song L, Cutilli JR, Polin RA, Douglas SD. Infection of cord blood monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1992;66:573–579.
142. Sperduto AR, Bryson YJ, Chen IS. Increased susceptibility of neonatal monocyte/macropahes to HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993;9: 1277–1285.
143. Sullivan JL, Barry DW, Lucas SJ, Albrecht P. Measles infection of human mononuclear cells. I. Acute infection of peripheral blood lymphocytes and monocytes. *J Exp Med* 1975;142:773–784.
144. Selgrade MK, Osborn JE. Role of macrophages in resistance to murine cytomegalovirus. *Infect Immun* 1974;10:1383–1390.
145. Zisman B, Hirsch MS, Allison AC. Selective effects of anti-macrophage serum, silica and anti-lymphocyte serum on pathogenesis of herpes virus infection of young adult mice. *J Immunol* 1970;104:1155–1159.
146. Zisman B, Wheelock EF, Allison AC. Role of macrophages and antibody in resistance of mice against yellow fever virus. *J Immunol* 1971;107:236–243.
147. Nicholson S, Bonecini-Almeida M-da-G, Lapa-e-Silva JR, et al. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* 1996;183:2293–2302.
148. Karupiah G, Xie QW, Buller RM, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* 1993;261:1445–1448.
149. Melkova Z, Esteban M. Inhibition of vaccinia virus DNA replication by inducible expression of nitric oxide synthase. *J Immunol* 1995;155:5711–5718.
150. Karupiah G, Harris N. Inhibition of viral replication by nitric oxide and its reversal by ferrous sulfate and tricarboxylic acid cycle metabolites. *J Exp Med* 1995; 181:2171–2179.
151. Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stamler JS. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 1994;79:1137–1146.
152. Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev* Immunol 1991;9:617–648.
153. Schall TJ, Bacon KB. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol* 1994:6:865–873.
154. Berger EA. HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS* 1997;11:S3–S16.
155. Asensio VC, Campbell IL. Chemokine gene expression in the brains of mice with lymphocytic choriomeningitis. *Virology* 1997;71:7832–7840.
156. Lane TE, Asensio VC, Yu N, Paoletti AD, Campbell IL, Buchmeir MJ. Dynamic regulation of alpha- and beta-chemokine expression in the central nervous system during mouse hepatitis virus-induced demyelinating disease. *J Immunol* 1998;160:970–978.
157. Amichay D, Gazzinelli RT, Karupiah G, Moench TR, Sher A, Farber JM. Genes for chemokines mumig and crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN-gamma with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles in vivo. *J Immunol* 1996;157:4511–4520.
158. Cook DN, Beck MA, Coffman TM, et al. Requirement of MIP-1α for an inflammatory response to viral infection. *Science* 1995;268:1583–1585.
159. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995;270:1811–1815.
160. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996;272:1955–1958.
161. Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, et al. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* 1996;87:745–756.
162. Zinkernagel RM, Bachmann MF, Kundig TM, Oehen S, Pircher H, Hengartner H. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 1996;14:333–367.
163. Doherty PC, Topham DJ, Tripp RA, Cardin RD, Brooks JW, Stevenson PG. Effector CD4+ and CD8+ T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections. *Immunol Rev* 1997;159:105–117.
164. Fujinami RS, Oldstone MBA. Antibody initiates virus persistence:immune modulation and measles virus infection. In: Nokins AL, Oldstone MBA, eds. *Concepts in viral pathogenesis.* New York: Springer-Verlag, 1984:187–193.
165. Levine B, Hadwick JM, Trapp BD, Crawford TO, Bollinger RC, Griffin DE. Antibody-mediated clearance of alphavirus infection from neurons. *Science* 1991;254:856–860.
166. Dietzschold B, Kao M, Zheng YM, et al. Delineation of putative mechanisms involved in antibody-mediated clearance of rabies virus from the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7252–7256.
167. Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME, Fletcher D, Nedrud JG. Intracellular neutralisation of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6901–6905.
168. Lodmell DL, Esposito JJ, Ewalt LC. Rabies virus antinucleoprotein antibody protects against rabies virus challenge in vivo and inhibits rabies virus replication in vitro. *J Virol* 1993;67:6080–6086.
169. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346:425–433.
170. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular targets. *Annu Rev Immunol* 1994;12:735–773.
171. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T-cell mediated cytotoxicity. *Science* 1994;265:528–530.
172. Walsh CM, Matloubian M, Liu C-C, et al. Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10854–10858.
173. Biron CA. Cytokines in the generation of immune responses to and resolution of virus infection. *Curr Opin Immunol* 1994;6:530–538.
174. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 1994; 68:8056–8063.
175. LehmanGrube F, Lohler J, Utermohlen O, Gegin C. Antiviral immune responses of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice lacking CD8+ T lymphocytes because of disruption of the b2-microglobulin gene. *J Virol* 1993;67: 332–339.
176. Muller D, Koller BH, Whitton JL, LaPan KE, Brigman KK, Frelinger JA.

LCMV-specific, class II restricted cytotoxic T cells in b2-microglobulin-deficient mice. *Science* 1992;255:1576–1578.
177. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449–1456.
178. Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 1995;377: 348–351.
179. Singer GG, Abbas AK. The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1994;1: 365–371.
180. Lau LL, Jamieson BD, Somasundaram T, Ahmed R. Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* 1994;369:648–652.
181. Mullbacher A. The long-term maintenance of cytotoxic T cell memory does not require persistence of antigen. *J Exp Med* 1994;179:317–321.
182. Hou S, Hyland L, Ryan KW, Portner A, Doherty PC. Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature* 1994;369:652–654.
183. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998;8:177–187.
184. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994;68:4650–4655.
185. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. Virologic and immunologic events in primary HIV infection. *Springer Semin Immunopathol* 1997;18:257–266.
186. Griffin DE. Immune responses during measles virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;191:117–134.
187. Callan MF, Steven N, Krausa P, et al. Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat Med* 1996;2:906–911.
188. Oldstone MB. Virus-lymphoid cell interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12756–12758.
189. Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, et al. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 1996;70:7569–7579.
190. Borrow P, Lewicki H, Wei X, et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 1997;3:205–211.
191. Steven NM, Annels NE, Kumar A, Leese AM, Kurilla MG, Rickinson AB. Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med* 1997;185:1605–1617.
192. Sunil-Chandra NP, Arno J, Fazakerley J, Nash AA. Lymphoproliferative disease in mice infected with murine gammaherpesvirus 68. *Am J Pathol* 1994;145: 818–826.
193. Bi Z, Barna M, Komatsu T, Reiss CS. Vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system activates both innate and acquired immunity. *J Virol* 1995;69:6466–6472.
194. Cousens LP, Orange JS, Biron CA. Endogenous IL-2 contributes to T cell expansion and IFN-γ production during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 1995;155:5690–5699.
195. Murata K, Garcia-Sastre A, Tsuji M, et al. Characterization of in vivo primary and secondary CD8+ T cell responses induced by recombinant influenza and vaccinia viruses. Cell *Immunol* 1996;173:96–107.
196. Selin LK, Vergilis K, Welsh RM, Nahill SR. Reduction of otherwise remarkably stable virus-specific cytotoxic T lymphocyte memory by heterologous viral infections. *J Exp Med* 1996;183:2489–2499.
197. Doherty PC, Tripp RA, Hamilton-Easton AM, Cardin RD, Woodland DL, Blackman MA. Tuning into immunological dissonance: an experimental model for infectious mononucleosis. *Curr Opin Immunol* 1997;9:477–483.
198. Slifka MK, Whitmire JK, Ahmed R. Bone marrow contains virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 1997;90:2103–2108.
199. Biron CA, Pederson KF, Welsh RM. Aberrant T cells in beige mutant mice. *J Immunol* 1987;138:2050–2056.
200. Nahill SR, Welsh RM. High frequency of cross-reactive cytotoxic T lymphocytes elicited during the virus-induced polyclonal cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med* 1993;177:317–327.
201. Razvi ES, Welsh RM, McFarland HI. In vivo state of antiviral CTL precursors. Characterization of a cycling cell population containing CTL precursors in immune mice. *J Immunol* 1995;154:620–632.
202. Ehl S, Hombach J, Aichele P, Hengartner H, Zinkernagel RM. Bystander activation of cytotoxic T cells: studies on the mechanism and evaluation of in vivo significance in a transgenic mouse model. *J Exp Med* 1997;185:1241–1251.
203. Zarozinski CC, Welsh RM. Minimal bystander activation of CD8 T cells during the virus-induced polyclonal T cell response. *J Exp Med* 1997;185:1629–1639.
204. Altman JD, Moss PAH, Goulder PJR, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996;274:94–96.
205. Butz EA, Bevan MJ. Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* 1998;8:167–175.
206. Utz U, Banks D, Jacobson S, Biddison WE. Analysis of the T-cell receptor repertoire of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes from patients with HTLV-1-associated disease: evidence for oligoclonal expansion. *J Virol* 1996;70:843–851.
207. Cose SC, Jones CM, Wallace ME, Heath WR, Carbone FR. Antigen-specific CD8+ T cell subset distribution in lymph nodes draining the site of herpes simplex virus infection. *Eur J Immunol* 1997;27:2310–2316.
208. Feltkamp MC, Vreugdenhil GR, Vierboom MP, et al. Cytotoxic T lymphocytes raised against a subdominant epitope offered as a synthetic peptide eradicate human papillomavirus type 16-induced tumors. *Eur J Immunol* 1995;25: 2638–2642.
209. Jameson SC, Bevan MJ. Dissection of major histocompatibility complex (MHC) and T cell receptor contact residues in a Kb-restricted ovalbumin peptide and an assessment of the predictive power of MHC-binding motifs. *Eur J Immunol* 1992;22:2663–2667.
210. Oukka M, Riche N, Kosmatopoulos K. A nonimmunodominant nucleoprotein-derived peptide is presented by influenza A virus-infected H-2b cells. *J Immunol* 1994;152:4843–4851.
211. van der Most RG, Murali-Krishna K, Whitton JL, et al. Identification of Db- and Kb-restricted subdominant cytotoxic T-cell responses in lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice. *Virology* 1998;240:158–167.
212. Vitiello A, Yuan L, Chesnut RW, et al. Immunodominance analysis of CTL responses to influenza PR8 virus reveals two new dominant and subdominant Kb-restricted epitopes. *J Immunol* 1996;157:5555–5562.
213. Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991;351:290–296.
214. Rotzschke O, Falk K, Deres K, et al. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* 1990;348:252–254.
215. Corr M, Boyd LF, Padlan EA, Margulies DH. H-2Dd exploits a four residue peptide binding motif. *J Exp Med* 1993;178:1877–1892.
216. Rammensee HG, Friede T, Stevanoviic S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 1995;41:178–228.
217. Barber LD, Parham P. The essence of epitopes. *J Exp Med* 1994;180:1191–1194.
218. Sette A, Vitiello A, Reherman B, et al. The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol* 1994;153:5586–5592.
219. Feltkamp MC, Vierboom MP, Kast WM, Melief CJ. Efficient MHC class I-peptide binding is required but does not ensure MHC class I-restricted immunogenicity. *Mol Immunol* 1994;31:1391–1401.
220. Chen W, Khilko S, Fecondo J, Margulies DH, McCluskey J. Determinant selection of major histocompatibility complex class I-restricted antigenic peptides is explained by class I-peptide affinity and is strongly influenced by nondominant anchor residues. *J Exp Med* 1994;180:1471–1483.
221. Ruppert J, Sidney J, Celis E, Kubo RT, Grey HM, Sette A. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell* 1993; 74:929–937.
222. Sadovnikova E, Zhu X, Collins SM, et al. Limitations of predictive motifs revealed by cytotoxic T lymphocyte epitope mapping of the human papilloma virus E7 protein. *Int Immunol* 1994;6:289–296.
223. van der Most RG, Sette A, Oseroff C, et al. Analysis of cytotoxic T cell responses to dominant and subdominant epitopes during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 1996;157:5543–5554.
224. Clark WR, Walsh CM, Glass AA, Hayashi F, Matloubian M, Ahmed R. Molecular pathways of CTL-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev* 1995;146:33–44.
225. Kägi D, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* 1996;14:207–232.
226. Liu C, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. *Immunol Today* 1995;16:194–201.
227. Di Virgilio F, Pizzo P, Zanovello P, Bronte V, Collavo D. Extracellular ATP as a possible mediator of cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 1990;11: 274–276.
228. Filipini A, Traffs RA, Sitovsky MV. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 8267–8271.
229. Tian Q, Streuli M, Saito H, Schlossman SF, Anderson P. A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 1991;67:629–639.
230. Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 1994;76:977–987.
231. Shresta S, Heusel JW, Macivor DM, Wesselschmidt RL, Russell JH, Ley TJ. Granzyme B plays a critical role in cytotoxic lymphocyte-induced apoptosis. *Immunol Rev* 1995;146:211–221.
232. Lenardo MJ. Fas and the art of lymphocyte maintenance. *J Exp Med* 1996;183: 721–724.
233. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today* 1995;16:569–574.
234. Henkart PA. ICE family proteases: mediators of all apoptotic death? *Immunity* 1996;4:195–201.
235. Hyland L, Sangster M, Sealy R, Coleclough C. Respiratory virus infection of mice provokes a permanent humoral immune response. *J Virol* 1994;68: 6083–6086.
236. Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol 1996;206:149–173.*

237. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996;4:25–36.
238. Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989;59:1145–1156.
239. Zinkernagel RM. Immunology taught by viruses. *Science* 1996;271:173–178
240. Belyakov IM, Derby MA, Ahlers JD, et al. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1709–1714.
241. Koszinowski UH, Reddehase MJ, Jonjic S. The role of CD4 and CD8 T cells in viral infections. *Curr Opin Immunol* 1991;3:471–475.
242. von Herrath MG, Oldstone MB. Interferon-gamma is essential for destruction of beta cells and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1997;185:531–539.
243. Ghiasi H, Cai S, Nesburn AB, Wechsler SL. MHC-II but not MHC-I responses are required for vaccine-induced protection against ocular challenge with HSV-1. *Curr Eye Res* 1997;16:1152–1158.
244. Thomsen AR, Johansen J, Marker O, Christensen JP. Exhaustion of CTL memory and recrudescence of viremia in lymphocytic choriomeningitis virus-infected MHC class II-deficient mice and B cell-deficient mice. *J Immunol* 1996;157:3074–3080.
245. Christensen JP, Marker O, Thomsen AR. The role of CD4+ T cells in cell-mediated immunity to LCMV: studies in MHC class I and class II deficient mice. *Scand J Immunol* 1994;40:373–382.
246. McMichael AJ, Phillips RE. Escape of human immunodeficiency virus from immune control. *Annu Rev Immunol* 1997;15:271–296.
247. Perelson AS, Essunger P, Ho DD. Dynamics of HIV-1 and CD4+ lymphocytes in vivo. *AIDS* 1997;11:S17–S24.
248. Ahmed R, Butler LD, Bhatti L. T4+ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody responses. *J Virol* 1988;62:2102–2106.
249. Cardin RD, Brooks JW, Sarawar SR, Doherty PC. Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996;184:863–871.
250. Graham MB, Braciale TJ. Resistance to and recovery from lethal influenza virus infection in B lymphocyte-deficient mice. *J Exp Med* 1997;186:2063–2068.
251. Cohen J. T cell shift: key to AIDS therapy? *Science* 1993;262:175–176.
252. Fujimura T, Yamanashi R, Masuzawa M, et al. Conversion of the CD4+ T cell profile from T(H2)-dominant type to T(H1)-dominant type after varicella-zoster virus infection in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:274–282.
253. Wasik TJ, Jagodzinski PP, Hyjek EM, et al. Diminished HIV-specific CTL activity is associated with lower type 1 and enhanced type 2 responses to HIV-specific peptides during perinatal HIV infection. *J Immunol* 1997;158:6029–6036.
254. Alonso K, Pontiggia P, Medenica R, Rizzo S. Cytokine patterns in adults with AIDS. *Immunol Invest* 1997;26:341–350.
255. Peterson JD, Waltenbaugh C, Miller SD. IgG subclass responses to Theiler's murine encephalomyelitis virus infection and immunization suggest a dominant role for Th1 cells in susceptible mouse strains. *Immunology* 1992;75:652–658.
256. Doherty PC. Virus infections in mice with targeted gene disruptions. *Curr Opin Immunol* 1993;5:479–483.
257. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, et al. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 1997;278:1447–1450.
258. Saha K, Wong PK. Protective role of cytotoxic lymphocytes against murine leukemia virus-induced neurologic disease and immunodeficiency is enhanced by the presence of helper T cells. *Virology* 1992;188:921–925.
259. Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 1996;273:104–106.
260. Sebzda E, Choi M, Fung-Leung WP, Mak TW, Ohashi PS. Peptide-induced positive selection of TCR transgenic thymocytes in a coreceptor-independent manner. *Immunity* 1997;6:643–653.
261. Akbar AN, Salmon M. Cellular environments and apoptosis: tissue microenvironments control activated T-cell death. *Immunol Today* 1997;18:72–76.
262. Wodarz D, Klenerman P, Nowak MA. Dynamics of cytotoxic T-lymphocyte exhaustion. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1998;265:191–203.
263. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 1993;362:758–761.
264. Doherty PC, Topham DJ, Tripp RA. Establishment and persistence of virus-specific CD4+ and CD8+ T cell memory. *Immunol Rev* 1996;150:23–44.
265. Topham DJ, Tripp RA, Hamilton-Easton AM, Sarawar SR, Doherty PC. Quantitative analysis of the influenza virus-specific CD4+ T cell memory in the absence of B cells and Ig. *J Immunol* 1996;157:2947–2952.
266. Ewing C, Topham DJ, Doherty PC. Prevalence and activation phenotype of Sendai virus-specific CD4+ T cells. *Virology* 1995;210:179–185.
267. Mozdzanowska K, Furchner M, Maiese K, Gerhard W. CD4+ T cells are ineffective in clearing a pulmonary infection with influenza type A virus in the absence of B cells. *Virology* 1997;239:217–225.
268. Bachmann MF, Kalinke U, Althage A, et al. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* 1997;276:2024–2027.
269. Topham DJ, Doherty PC. Clearance of an influenza A virus by CD4+ T cells is inefficient in the absence of B cells. *J Virol* 1998;72:882–885.
270. Farzadegan H. HIV-1 antibodies and serology. *Clin Lab Med* 1994;14:257–269.
271. Kent KA. Neutralising epitopes of simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J Med Primatol* 1995;24:145–149.
272. Buchmeier MJ, Welsh RM, Dutko FJ, Oldstone MBA. The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Adv Immunol* 1980;30:275–331.
273. Bielefeldt-Ohmann H. Pathogenesis of dengue virus diseases: missing pieces in the jigsaw. *Trends Microbiol* 1997;5:409–413.
274. Morens DM. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis* 1994;19:500–512.
275. Osiowy C, Horne D, Anderson R. Antibody-dependent enhancement of respiratory syncytial virus infection by sera from young infants. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994;1:670–677.
276. Gimenez HB, Chisholm S, Dornan J, Cash P. Neutralizing and enhancing activities of human respiratory syncytial virus-specific antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:280–286.
277. Szomolanyi-Tsuda E, Welsh RM. T cell-independent antibody-mediated clearance of polyoma virus in T cell-deficient mice. *J Exp Med* 1996;183:403–411.
278. Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* 1995;13:655–692.
279. Coutelier JP, Coulie PG, Wauters P, Heremans H, van der Logt JT. In vivo polyclonal B-lymphocyte activation elicited by murine viruses. *J Virol* 1990; 64:5383–5388.
280. Maloy KJ, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM. Interferon gamma-producing gammadelta T cell-dependent antibody isotype switching in the absence of germinal center formation during virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1160–1165.
281. Sarawar SR, Sangster M, Coffman RL, Doherty PC. Administration of anti-IFN-gamma antibody to beta 2-microglobulin-deficient mice delays influenza virus clearance but does not switch the response to a T helper cell 2 phenotype. *J Immunol* 1994;153:1246–1253.
282. Abney ER, Cooper MD, Kearney JF, Lawton AR, Parkhouse RM. Sequential expression of immunoglobulin on developing mouse B lymphocytes: a systematic survey that suggests a model for the generation of immunoglobulin isotype diversity. *J Immunol* 1978;120:2041–2049.
283. Halper J, Fu SM, Wang CY, Winchester R, Kunkel HG. Patterns of expression of human "Ia-like" antigens during the terminal stages of B cell development. *J Immunol* 1978;120:1480–1484.
284. Helmreich E, Kern M, Eisen HN. The secretion of antibody by isolated lymph node cells. *J Biol Chem* 1961;236:464–473.
285. Hibi T, Dosch HM. Limiting dilution analysis of the B cell compartment in human bone marrow. *Eur J Immunol* 1986;16:139–145.
286. Hyland L, Sangster M, Sealy R, Coleclough C. Respiratory virus infection of mice provokes a permanent humoral immune response. *J Virol* 1994;68: 6083–6086.
287. Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long lived plasma cells. *Immunity* 1998;8:177–187.
288. Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 1997;388:133–134.
289. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. *J Exp Med* 1993;177:1199–1204.
290. Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. IL-12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for IFN-γ production and diminishes IL-4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10188–10192.
291. Orange JS, Wolf SF, Biron CA. Effects of IL-12 on the response and susceptibility to experimental viral infections. *J Immunol* 1994;152:1253–1264.
292. Orange JS, Salazar-Mather TP, Opal SM, et al. Mechanism of interleukin 12-mediated toxicities during experimental viral infections: role of tumor necrosis factor and glucocorticoids. *J Exp Med* 1995;181:901–914.
293. Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1993; 178:1655–1663.
294. Biron CA, Young HA, Kasaian MT. Interleukin 2-induced proliferation of murine natural killer cells in vivo. *J Exp Med* 1990;171:173–188.
295. Kasaian MT, Biron CA. Effects of cyclosporin A on IL-2 production and lymphocyte proliferation during infection of mice with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* 1990;144:299–306.
296. Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, Ritz J. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med* 1990;171:1509–1526.
297. Kasaian MT, Biron CA. The activation of IL-2 transcription in L3T4+ and Lyt-2+ lymphocytes during virus infection *in vivo*. *J Immunol* 1989;142:1287–1292.
298. Su HC, Orange JS, Fast LD, et al. IL-2-dependent NK cell responses discovered in virus-infected beta 2-microglobulin-deficient mice. *J Immunol* 1994;153: 5674–5681.
299. Bellone G, Aste-Amezaga M, Trinchieri G, Rodeck U. Regulation of NK cell functions by TGF-β1. *J Immunol 1995;155:1066–1073.*

300. Hunter CA, Bermudez L, Beernink H, Waegell W, Remington JS. Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell-independent resistance to Toxoplasma gondii. *Eur J Immunol* 1995;25:994–1000.
301. Rook AH, Kehrl JH, Wakefield LM, et al. Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol* 1986;136:3916–3920.
302. Migliorati G, Cannarile L, Herberman RB, Riccardi C. Effect of various cytokines and growth factors on the interleukin-2-dependent in vitro differentiation of natural killer cells from bone marrow. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1989;8:48–55.
303. Ortaldo JR, Mason AT, O'Shea JJ, et al. Mechanistic studies of transforming growth factor-beta inhibition of IL-2-dependent activation of CD3– large granular lymphocyte functions. Regulation of IL-2R beta (p75) signal transduction. *J Immunol* 1991;146:3791–3798.
304. Scharton-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1995;154:5320–5330.
305. Su HC, Leite-Morris KA, Braun L, Biron CA. A role for transforming growth factor-β1 in regulating natural killer cell and T lymphocyte proliferative responses during acute infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* 1991;147:2717–2727.
306. Graziosi C, Pantaleo G, Gantt KR, et al. Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. *Science* 1994;265: 248–252.
307. Niemialtowski MG, Rouse BT. Predominance of Th1 cells in ocular tissues during herpetic stromal keratitis. *J Immunol* 1992;149:3035–3039.
308. Sarawar SR, Doherty PC. Concurrent production of interleukin-2, interleukin-10, and gamma interferon in the regional lymph nodes of mice with influenza pneumonia. *J Virol* 1994;68:3112–3119.
309. Su HC, Cousens LP, Fast LD, et al. CD4⁺ and CD8⁺ T cell interactions in IFN-γ and IL-4 responses to viral infections: requirements for IL-2. *J Immunol* 1998; 160:5007–5017.
310. Hussell T, Spender LC, Georgiou A, O'Garra A, Openshaw PJ. Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1996;77:2447–2455.
311. Wesselingh SL, Levine B, Fox RJ, Choi S, Griffin DE. Intracerebral cytokine mRNA expression during fatal and nonfatal alphavirus encephalitis suggests a predominant type 2 T cell response. *J Immunol* 1994;152:1289–1297.
312. Maggi E, Manetti R, Annunziato F, et al. Functional characterization and modulation of cytokine production by CD8+ T cells from human immunodeficiency virus-infected individuals. *Blood* 1997;89:3672–3681.
313. Romagnani S, Del-Prete G, Manetti R, et al. Role of TH1/TH2 cytokines in HIV infection. *Immunol Rev* 1994;140:73–92.
314. Graham MB, Dalton DK, Giltinan D, Braciale VL, Stewart TA, Braciale TJ. Response to influenza infection in mice with a targeted disruption in the interferon gamma gene. *J Exp Med* 1993;178:1725–1732.
315. Huang S, Hendriks W, Althage A, et al. Immune response in mice that lack the interferon-γ receptor. *Science* 1993;259:1742–1745.
316. Carding SR, Allan W, McMickle A, Doherty PC. Activation of cytokine genes in T cells during primary and secondary murine influenza pneumonia. *J Exp Med* 1993;177:475–482.
317. Gessner A, Moskophidis D, Lehmann-Grube F. Enumeration of single IFN-γ producing cells in mice during viral and bacterial infection. *J Immunol* 1989;142:1293–1298.
318. Kasaian MT, Leite-Morris KA, Biron CA. The role of CD4+ cells in sustaining lymphocyte proliferation during lymphocytic choriomenigitis virus infection. *J Immunol* 1991;146:1955–1963.
319. Rahemtulla A, Fung-Leung WP, Schilham MW, et al. Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 1991;353:180–184.
320. Asano MS, Ahmed R. CD8 T cell memory in B cell-deficient mice. *J Exp Med* 1996;183:2165–2174.
321. Kündig TM, Schorle H, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM, Horak I. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science* 1993;262: 1059–1061.
322. Bachmann MF, Schorle H, Kuhn R, et al. Antiviral immune responses in mice deficient for both interleukin-2 and interleukin-4. *J Virol* 1995;69:4842–4846.
323. Garofalo R, Kimpen JL, Welliver RC, Ogra PL. Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr* 1992;120:28–32.
324. Alwan WH, Kozlowska WJ, Openshaw PJ. Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. *J Exp Med* 1994;179:81–89.
325. Hancock GE, Speelman DJ, Heers K, Bortell E, Smith J, Cosco C. Generation of atypical pulmonary inflammatory responses in BALB/c mice after immunization with the native attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol* 1996;70:7783–7791.
326. Srikiatkhachorn A, Braciale TJ. Virus-specific CD8+ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J Exp Med* 1997; 186:421–432.
327. Waris ME, Tsou C, Erdman DD, Zaki SR, Anderson LJ. Respiratory synctial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. *J Virol* 1996;70:2852–2860.
328. Openshaw PJ, Clarke SL, Record FM. Pulmonary eosinophilic response to respiratory syncytial virus infection in mice sensitized to the major surface glycoprotein G. *Int Immunol* 1992;4:493–500.
329. Graham BS. Pathogenesis of respiratory syncytial virus vaccine-augmented pathology. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:S63–S66.
330. Srikiatkhachorn A, Braciale TJ. Virus-specific CD8+ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J Exp Med* 1997a; 186:421–432.
331. Borrow P, Tishon A, Lee S, et al. CD40L-deficient mice show deficits in antiviral immunity and have an impaired memory CD8+ CTL response. *J Exp Med* 1996;183:2129–2142.
332. Oxenius A, Campbell KA, Maliszewski CR, et al. CD40-CD40 ligand interactions are critical in T-B cooperation but not for other anti-viral CD4+ T cell functions. *J Exp Med* 1996;183:2209–2218.
333. Yang Y, Su Q, Grewal IS, Schilz R, Flavell RA, Wilson JM. Transient subversion of CD40 ligand function diminishes immune responses to adenovirus vectors in mouse liver and lung tissues. *J Virol* 1996;70:6370.
334. Whitmire JK, Slifka MK, Grewal IS, Flavell RA, Ahmed R. CD40 ligand-deficient mice generate a normal primary cytotoxic T-lymphocyte response but a defective humoral response to a viral infection. *J Virol* 1996;70:8375–8381.
335. Planz O, Seiler P, Hengartner H, Zinkernagel RM. Specific cytotoxic T cells eliminate cells producing neutralizing antibodies. *Nature* 1996;382:726–729.
336. Lalvani A, Brookes R, Hambleton S, Britton WJ, Hill AV, McMichael AJ. Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J Exp Med* 1997;186:859–865.
337. Pihlgren M, Dubois PM, Tomkowiak M, Sjogren T, Marvel J. Resting memory CD8+ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *J Exp Med* 1996;184:2141–2151.
338. McHeyzer-Williams MG, Davis MM. Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo. *Science* 1995;268:106–111.
339. Morimoto C, Schlossman SF. P. Rambotti lecture. Human naive and memory T cells revisited: new markers (CD31 and CD27) that help define CD4+ T cell subsets. *Clin Exp Rheumatol* 1993;11:241–247.
340. Mitchison A, Sieper J. Immunological basis of oral tolerance. *Z Rheumatol* 1995;54:141–144.
341. Pape KA, Kearney ER, Khoruts A, et al. Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cell for the study of T-cell activation in vivo. *Immunol Rev* 1997;156:67–78.
342. Ingulli E, Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J Exp Med* 1997;185:2133–214.
343. Wang L, Robb CW, Cloyd MW. HIV induces homing of resting T lymphocytes to lymph nodes. *Virology* 1997;228:141–152.
344. Zimmerman C, Brduscha-Riem K, Blaser C, Zinkernagel RM, Pircher H. Visualization, characterization, and turnover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts. *J Exp Med* 1996;183:1367–1375.
345. Mackay CR. Immunological memory. *Adv Immunol* 1993;53:217–265.
346. Sprent J, Webb SR. Function and specificity of T cell subsets in the mouse. *Adv Immunol* 1987;41:39–133.
347. Beverley PC. Human T-cell memory. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990;159: 111–122.
348. Vitetta ES, Berton MT, Burger C, Kepron M, Lee WT, Yin XM. Memory B and T cells. *Annu Rev Immunol* 1991;9:193–217.
349. Swain SL, Bradley LM, Croft M, et al. Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. *Immunol Rev* 1991;123:115–144.
350. MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994;12:117–139.
351. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998;5:392:86–89.
352. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994;76:287–299.
353. Bevan MJ. Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 1995;182:639–641.
354. Rock KL. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* 1996;17:131–137.
355. Shen H, Miller JF, Fan X, Kolwyck D, Ahmed R, Harty JT. Compartmentalization of bacterial antigens: differential effects on priming of CD8 T cells and protective immunity. *Cell* 1998;92:535–545.
356. Albert M, Sauter B, Bharadwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I restricted CTLs. *Nature* 1998;392:82–89.
357. Demkowicz WE Jr, Littaua RA, Wang J, Ennis FA. Human cytotoxic T-cell memory: long-lived responses to vaccinia virus. *J Virol* 1996;70:2627–2631.
358. Oehen S, Waldner H, Kundig TM, Hengartner H, Zinkernagel RM. Antivirally protective cytotoxic T cell memory to lymphocytic choriomeningitis virus is governed by persisting antigen. *J Exp Med* 1992;176:1273–1281.
359. Di Rosa F, Matzinger P. Long-lasting CD8 T cell memory in the absence of CD4 T cells or B cells. *J Exp Med* 1996;183:2153–2163.

360. Bruno L, Kirberg J, von Boehmer H. On the cellular basis of immunological T cell memory. *Immunity* 1995;2:37–43.
361. Gray D, Matzinger P. T cell memory is short-lived in the absence of antigen. *J Exp Med* 1991;174:969–974.
362. Brundler MA, Aichele P, Bachmann M, Kitamura D, Rajewsky K, Zinkernagel RM. Immunity to viruses in B cell-deficient mice: influence of antibodies on virus persistence and on T cell memory. *Eur J Immunol* 1996;26:2257–2262.
363. Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med* 1996;2: 1104–1108.
364. Penna A, Artini M, Cavalli A, et al. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest* 1996;98:1185–1194.
365. Talbot PJ, Buchmeir MJ. Catabolism of homologous murine monoclonal hybridoma IgG antibodies in mice. *Immunology* 1987;60:485–489.
366. Vieira P, Rajewsky K. The half lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur J Immunol* 1988;18:313–316.
367. Kulkarni AB, Connors M, Firestone CY, Morse HC III, Murphy BR. The cytolytic activity of pulmonary CD8+ lymphocytes, induced by infection with a vaccinia virus recombinant expressing the M2 protein of respiratory syncytial virus (RSV), correlates with resistance to RSV infection in mice. *J Virol* 1993;67:1044–1049.
368. Franco MA, Greenberg H. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology* 1997;238:169–179.
369. von Herrath MG, Homann D, Gairin JE, Oldstone MB. Pathogenesis and treatment of virus-induced autoimmune diabetes: novel insights gained from the RIP-LCMV transgenic mouse model. *Biochem Soc Trans* 1997;25:630–635.
370. Aichele P, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM. Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. *Immunol Rev* 1996;152:21–45.
371. Zinkernagel RM. Immune protection vs. immunopathology vs. autoimmunity: a question of balance and of knowledge. *Brain Pathol* 1993;3:115–121.
372. Oldstone MB. Virus neutralization and virus-induced immune complex disease. Virus-antibody union resulting in immunoprotection or immunologic injury—two sides of the same coin. *Prog Med Virol* 1975;19:84–119.
373. Oldstone MB, Tishon A, Buchmeier MJ. Virus-induced immune complex disease: genetic control of C1q binding complexes in the circulation of mice persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* 1983; 130:912–918.
374. Rall GF, Mucke L, Oldstone MB. Consequences of cytotoxic T lymphocyte interaction with major histocompatibility complex class I-expressing neurons in vivo. *J Exp Med* 1995;182:1201–1212.
375. Asano MS, Ahmed R. Immune conflicts in lymphocytic choriomeningitis virus. *Springer Semin Immunopathol* 1995;17:247–259.
376. Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, et al. Immune pathogenesis of hepatitis B. *Arch Virol* 1992;4:11–18.
377. Eddleston AL. Virus- and immune-mediated liver damage in hepatitis. *Intervirology* 1993;35:122–132.
378. Zinkernagel RM. Are HIV-specific CTL responses salutary or pathogenic? *Curr Opin Immunol* 1995;7:462–470.
379. Miedema F. Immunological abnormalities in the natural history of HIV infection: mechanisms and clinical relevance. *Immunodefic Rev* 1992;3:173–193.
380. Ho DD. Viral counts count in HIV infection. *Science* 1996;272:1124–1125.
381. Gutierrez-Ramos JC, Bluethmann H. Molecules and mechanisms operating in septic shock: lessons from knockout mice. *Immunol Today* 1997;18:329–334.
382. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990;248:705–711.
383. Orange JS, Salazar-Mather TP, Opal SM, Biron CA. Mechanisms for virus-induced liver disease: tumor necrosis factor-mediated pathology independent of natural killer and T cells during murine cytomegalovirus infection. *J Virol* 1997; 71:9248–9258.
384. Ding JW, Ning Q, Liu MF, et al. Fulminant hepatic failure in murine hapatitis virus strain 3 infection: tissue-specific expression of a novel fgl2 prothrombinase. *J Virol* 1997;71:9223–9230.
385. Levy GA, Leibowitz JL, Edgington TS. Induction of monocyte procoagulant activity by murine hepatitis virus type 3 parallels disease susceptibility in mice. J Exp Med 1981;154:1150–1163.
386. Li C, Fung LS, Chung S, et al. Monoclonal antiprothrombinase (3D4.3) prevents mortality from murine hepatitis virus (MHV-3) infection. *J Exp Med* 1992; 176:689–697.
387. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, et al. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-γ in sera of children with dengue. *J Clin Invest* 1991;88:1473–1480.
388. Kurane I, Rothman AL, Livingston PG, et al. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol Suppl* 1994;9:59–64.
389. Stevens JG. Human herpesviruses: a consideration of the latent state. *Microbiol Rev* 1989;53:318–332.
390. Stevens JG. Overview of herpesvirus latency. *Semin Virol* 1994;5:191–196.
391. Barker, CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 1977;25:1–54.
392. Ahmed R, Jamieson BD, Porter DD. Immune therapy of a persistent and disseminated viral infection. *J Virol* 1987;61:3920.
393. Joly E, Mucke L, Oldstone MB. Viral persistence in neuron explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science* 1991;253:1283–1285.
394. Jamieson BD, Butler LD, Ahmed R. Effective clearance of a persistent viral infection requires cooperation between virus-specific Lyt2+ T cells and nonspecific bone marrow-derived cells. *J Virol* 1987;61:3930–3937.
395. Oldstone MBA, Blount P, Southern P. Cytoimmunotherapy for persistent virus infection reveals a unique clearance pattern from the central nervous system. *Nature* 1986;321:239–243.
396. Jamieson BD, Somasundaram T, Ahmed R. Abrogation of tolerance to a chronic viral infection. *J Immunol* 1991;147:3521–3529.
397. Butler JC, Peters CJ. Hantaviruses and hantavirus pulmonary syndrome. *Clin Infect Dis* 1994;19:387–394.
398. Ando K, Guidotti LG, Cerny A, et al. CTL access to tissue antigen is restricted *in vivo*. *J Immunol* 1994;153:482–488.
399. Palese P, Young JF. Variation of influenza A, B, and C viruses. *Science* 1982; 215:1468–1474.
400. Webster RG, Laver WG, Air GM, Schild GC. Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature* 1982;296:115–121.
401. Burns DP, Collignon C, Desrosiers RC. Simian immunodeficiency virus mutants resistent to serum neutralization arise during persistent infection of rhesus monkeys. *J Virol* 1993;67:4104–4113.
402. Fauci A. Immunopathogenesis of HIV infection. *AIDS* 1993;6:655–662.
403. Narayan O, Zink MC, Huso D, et al. Lentiviruses of animals are biological models of the human immunodeficiency viruses. *Microb Pathog* 1988;5:149–157.
404. Montelaro CR, Parekh B, Orrego A, Issel CJ. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. *J Biol Chem* 1984;259:10539–10544.
405. Koup RA. Virus escape from CTL recognition. *J Exp Med* 1994;180:779.
406. Pircher H, Moskophidis D, Rohrer U, Burki K, Hengartner H, Zinkernagel RM. Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants *in vivo*. *Nature* 1990;346:629.
407. de Campos-Lima P-O, Levitsky V, Brooks J, et al. T cell responses and virus evolution: loss of HLA A11-restricted CTL epitopes in Epstein-Barr virus isolates from highly A11-positive populations by selective mutation at anchor residues. *J Exp Med* 1994;179:1297.
408. Eisenlohr LC, Yewdell JW, Bennink JR. Flanking sequences influence the presentation of an endogenously synthesized peptide to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1992;175:481.
409. Lill NL, Tevethia MJ, Hendrickson WG, Tevethia SS. Cytotoxic T lymphocytes (CTL) against a transforming gene product select for transformed cells with point mutations within sequences encoding CTL recognition epitopes. *J Exp Med* 1992;176:449.
410. Meyerhans A, Dadaglio G, Vartanian J-P, et al. *In vivo* persistence of a HIV-1-encoded HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope despite specific *in vitro* reactivity. *Eur J Immunol* 1991;21:2637–2640.
411. Chen AX, Shen L, Miller MD, Ghim SH, Hughes AL, Letvin NL. Cytotoxic T lymphocytes do not appear to select for mutations in an immunodominant epitope of simian immunodeficiency virus gag. *J Immunol* 1992;149:4060.
412. Tsomides TH, Aldovini A, Johnson RP, Walker BD, Young RA, Eisen HN. Naturally processed viral peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes on cells chronically infected by human immunodeficiency virus type 1. *J Exp Med* 1994;180:1283–1293.
413. Bertoletti A, Sette A, Chisari FV, et al. Natural variants of cytotoxic epitopes are T cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* 1994;369:407.
414. Klenerman P, Rowland-Jones S, McAdams S, et al. Cytotoxic T cell activity antagonized by naturally occurring HIV-1 gag variants. *Nature* 1994;369:403.
415. Jameson SC, Carbone FR, Bevan MJ. Clone-specific T cell receptor antagonists of major histocompatibility complex class-I-restricted cytotoxic T cells. *J Exp Med* 1993;177:1541.
416. Sloan-Lancaster J, Evavold BD, Allen PM. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligands on live antigen presenting cells. *Nature* 1993;363:156.
417. Rinaldo CR Jr. Modulation of major histocompatibility complex antigen expression by viral infection. *Am J Pathol* 1994;144:637–650.
418. Johnson DC, Hill AB. Herpesviruses and immune evasion. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998 (*in press*).
419. Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1998;391:397–401.
420. Wold WSM, Gooding LR. Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology* 1991;184:1–8.
421. Gregory CD, Murray RJ, Edwards CF, Rickinson AB. Down regulation of cell adhesion molecules LFA-3 and ICAM-1 in Epstein-Barr virus-positive Burkitt's lymphoma underlies tumor cell escape from virus-specific T cell surveillance. *J Exp Med* 1988;167:1811–1824.
422. Ahn K, Gruhler A, Galocha B, et al. The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* 1997;6:613–621.
423. Blake N, Lee S, Redchenko I, et al. Human CD8+ T cell responses to EBV EBNA1: HLA class I presentation of the (Gly-Ala)-containing protein requires

exogenous processing. *Immunity* 1997;7:791–802

424. Levitskaya J, Coram M, Levitsky V, et al. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 1995;375:685–688.
425. Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg PD. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* 1996;383:720–722.
426. Marrack P, Kappler J. Subversion of the immune system by pathogens. *Cell* 1994;76:323–332.
427. Spriggs MK. Cytokine and cytokine receptor genes captured by viruses. *Curr Opin Immunol* 1994;6:526–529.
428. Gooding LR. Virus proteins that counteract host immune defenses. *Cell* 1992; 71:5–7.
429. Smith GL. Virus proteins that bind cytokines, chemokines or interferons. *Curr Opin Immunol* 1996;8:467–471.
430. Upton C, Mossman K, McFadden G. Encoding of a homolog of the IFN-receptor by myxoma virus. *Science* 1992;258:1369–1372.
431. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165–190.
432. Lalani AS, Graham K, Mossman K, et al. The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines. *J Virol* 1997;71:4356–4363.
433. McDonald MR, Li XY, Virgin HW. Late expression of a beta chemokine homolog by murine cytomegalovirus. *J Virol* 1997;71:1671–1678.
434. Gao JL, Murphy PM. Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional B chemokine receptor. *J Biol Chem* 1994;268: 28539–28542.
435. Graham KA, Lalani AS, Macen JL, et al. The T1/35KDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. *Virology* 1997;229:12–24.
436. Pircher H, Burki K, Lang R, Hengartner H, Zinkernagel RM. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 1989;342:559–561.
437. Ahmed R, Salmi A, Butler LD, Chiller JM, Oldstone MBA. Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice: role in suppression of cytotoxic T lymphocyte response and viral persistence. *J Exp Med* 1984;60:521–540.
438. Battegay M, Moskophidis D, Rahemtulla A, Hengartner H, Mak TW, Zinkernagel RM. Enhanced establishment of a virus carrier state in adult CD4+ T-cell-deficient mice. *J Virol* 1994;68;4700–4704.
439. Fujita N, Yoshida K. Follow-up studies on Dengue endemic in Nagasaki, Japan: detection of specific antibodies in serum taken more than 30 years after a single attack of dengue. *Kobe J Med Sci* 1979;25:217–224.
440. Sawyer WA. Persistence of yellow fever immunity. *J Prev Med* 1930;5:413–428.
441. Panum PL. Beobachtungen uber das Maserncontagium. *Virchows Arch* 1847; 1:492–503.
442. Weibel RE, Buynak EB, Mclean AA, Hilleman MR. Follow-up surveillance for antibody in human subjects following live attenuated measles, mumps, and rubella virus vaccines (40675). *Proc Soc Exp Biol Med* 1979;162:328–332.
443. Paul JR, Riiordan JT, Melnick JL. Antibodies to three different antigenic types of poliomyelitis virus in sera from North Alaskan Eskimos. *Am J Hyg* 1951;54:275–285.
444. Jia XY, Summers DF, Ehrenfeld E. Host antibody response to viral stuctural and nonstructural proteins after hepatitis A virus infection. *J Infect Dis* 1992;165: 273–280.
445. Burnet FM, Fenner F. *The production of antibodies.* Melbourne: Macmillan, 1949.
446. Cooney EL, Collier AC, Greenberg PD, et al. Safety of and immunological response to a recombinant vaccinia virus vaccine expressing HIV envelope glycoprotein. *Lancet* 1991;337:567–572.
447. Plotkin SA, Buser F. History of RA27/3 rubella vaccine. *Rev Infect Dis* 1985; 7:S77–S78.
448. Callow KA, Parry HF, Sergeant M, Tyrrell DAJ. The time course of the immune response to experimental coronavirus infection of man. *Epidemiol Infect* 1990;105:435–446.
449. Johnson PRJ, Feldman S, Thompson M, Mahoney JD, Wright PF. Comparison of long-term systemic and secretory antibody responses in children given live, attentuated, or inactivated influenza A vaccine. *J Med Virol* 1985;17:325–335.
450. Hornsleth A, Friis B, Grauballe C, Krasilnikof A. Detection by ELISA of IgA and IgM antibodies in secretion and IgM antibodies in serum in primary lower respiratory syncytial virus infection. *J Med Virol* 1984;13:149–161.
451. Coulson BS, Grimwood K, Masendycz PJ, et al. Comparison of rotavirus immunoglobin A coproconversion with other indices of rotavirus infection in a longitudinal study in childhood. *J Clin Microbiol* 1990;28:1367–1374.
452. Davidson GP, Hogg RJ, Kirubakaran CP. Serum and intestinal immune response to rotavirus enteritis in children. *Infect Immun* 1983;40:447–452.

第 40 章　抗胞内菌免疫

Stefan H. E. Kaufmann[①]

胞内菌的致病性与毒力

胞内菌的特征 • “理想化的”胞内菌的特点 • 两类胞内菌:兼性胞内菌和专性胞内菌

几种胞内菌的特点及引起的疾病

结核分枝杆菌与结核病 • 麻风分枝杆菌与麻风病 • 单核细胞增多性利斯特氏菌与利斯特氏菌病 • 肠沙门氏菌与沙门氏菌病

胞内菌进入宿主细胞及在宿主细胞内生存的机制

黏附和入侵 • 专职吞噬细胞的吞噬作用 • 入侵非专职吞噬细胞 • 吞噬体的成熟、酸化及吞噬体-溶酶体融合 • 胞内铁 • 色氨酸降解 • 毒性效应分子 • 逃避 ROI 和 RNI 的杀伤作用 • 逃避至细胞质 • 细胞至细胞的直接扩散 • 凋亡 • 与胞内生存有关的基因表达的调控 • 胞内菌广泛的生存因子——热激蛋白

专职吞噬细胞

单核吞噬细胞 • 多形核粒细胞

T 细胞的主要作用

历史上的观点 • T 细胞亚群

T 细胞在感染过程中的作用

T 细胞的功能 • 传统 T 细胞和非传统 T 细胞对保护作用的贡献:提示疫苗设计 • 感染的动力学

细胞因子在抗菌防御中的作用

白细胞募集 • 肉芽肿形成 • 巨噬细胞活化 • 诱导保护性 T 细胞应答 • 下调宿主抗菌应答以避免有害的后遗症

胞内菌感染中 Th1 细胞的作用优势超过 Th2 细胞:先天免疫系统的影响

感染细胞的死亡

肉芽肿性病变

“理想化的”肉芽肿

迟发型超敏反应

胞内菌感染中的特异性和非特异性无应答

缺乏迟发型超敏反应 • 特异性无应答 • 非特异性无应答 • 与特异性无应答有关的机制

抗胞内菌的遗传控制

Nramp1 基因控制先天抗菌力 • 主要组织相容性复合体控制疾病的严重程度和类型 • 小鼠利斯特氏菌病和军团菌病的遗传控制

结论和展望

致谢

参考文献

本章主要讲述胞内菌(intracellular bacteria)感染,重点是胞内菌的致病性以及机体保护作用的免疫机制。 *1335* 胞内菌包括很多病原体,其中一些具有极其重要的医学意义。胞内菌可引起很多疾病,包括古老的(但仍存

① S. H. E. Kaufmann: Department of Immunology, Max-Planck-Institute for Infection Biology, 10117 Berlin, Germany.

在)以及新近出现的一些疾病。对人类最为重要的胞内菌有结核分枝杆菌、麻风分枝杆菌、伤寒沙门氏菌及沙眼衣原体,它们分别引起结核、麻风、伤寒及沙眼等疾病,使6亿多人受到病痛的折磨。随着获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)等免疫缺陷患者的日益增多,一些机会感染病原体(如鸟-胞内分枝杆菌)也越来越重要。

1336

从其命名上就可以推断出,胞内菌大部分时间都生活在宿主细胞内[1,2]。胞内生活意指与宿主细胞共存。因此,许多胞内菌的毒性小。胞内菌的这些特征决定了其引起的免疫应答的模式。由于其胞内寄居生活,所以避免了体液免疫对它们的作用。但是,在胞内生活期间,微生物蛋白质可被处理、加工为肽而与主要组织相容性复合体(major hist ocompatibility complex, MHC)分子结合形成复合物一起被呈递给T淋巴细胞,从而活化T淋巴细胞。因此,获得性抗胞内菌免疫及胞内菌感染致病主要依靠T淋巴细胞[1]。$CD4^+$ T淋巴细胞在获得性抗胞内菌免疫中起主要作用,此外也有$CD8^+$ T细胞及非传统(unconventional)T细胞的参与。另外,IFN-γ(interferon γ)活化巨噬细胞在抗菌保护中起着重要作用,但对感染的清除常常还需要其他机制的作用。

胞内菌的致病性与毒力

胞内菌的特征

病原菌(bacterial pathogen)是能够引起宿主发生疾病的微生物。病原菌致病性的强弱程度以毒力(virulence)来表示。各种病原菌的毒力常不一致。在同一种病原菌中,也有毒力不同的菌株之分。很少感染性疾病是宿主和病原体相遇后直接的、不变的结果,而是它们之间复杂的相互作用的最终结果。因为这与我们对胞内菌感染的理解很有关,所以下面将简要讨论由胞内菌引起疾病的主要步骤。

一些胞内菌,特别是立克次氏体属,是通过昆虫叮咬直接进入宿主血流,由此可到达宿主的内部组织。而大多数胞内菌则是经黏膜进入宿主体内的,常常是通过与黏膜上皮细胞黏附而发动进入[3~6]。空气传播的病原体(如结核分枝杆菌和嗜肺军团菌)主要经肺进入,而食物传播的病原体(如肠沙门氏菌和单核细胞增多性利斯特氏菌)则主要经肠进入。随后,胞内菌穿过上皮层。它们或者通过主动诱导穿胞吞吐作用(即胞吞作用和胞吐作用)穿过上皮细胞,或者在巨噬细胞内被动移位(translocated)。宿主可通过非特异性防御机制(如纤毛运动、肠蠕动,或专职吞噬细胞)来清除细菌,而无需免疫系统的特异性关注。逃脱了非特异性防御反应的感染细胞,则到更深的组织部位,找到一个合适的“龛”(niche)定居,从而造成对宿主的持续性感染。在这个阶段,随着特异性免疫应答的产生,宿主通常会对感染因子(infectious agent)足够注意。

在明显的临床疾病出现前,免疫系统如能够成功消灭病原体,则感染宣告失败。而如果在免疫系统成功有效控制病原体前,组织损伤已达到一定程度,则会导致临床疾病的发生。这是许多胞外菌引起急性疾病的情况,而很少见于胞内菌。胞内菌感染往往可能出现免疫应答抑制感染因子但却不能完全消灭它的情况。这样,微生物的持续存在与免疫应答之间就会处于一种长时间的动态平衡之中。但是,这种平衡蕴含着不稳定性,在以后有利于病原体的某个时候可能会被打破,从而由感染转变为疾病。

入侵宿主至出现临床症状这一段时期,称为潜伏期。对于许多胞内菌感染,潜伏期可以持续终生。通过增强免疫反应或削弱细菌生长(主要通过化学治疗),或二者结合,能够战胜疾病。理想的是能够完全消灭细菌。否则,一些潜伏细菌则继续留在“龛”里,而不易受到免疫应答的影响。

综上所述,胞内菌引起疾病的有关步骤如下。①感染和疾病通常可以清楚分开。在感染阶段,免疫应答已经产生。②在病原体和免疫机制的动态相互作用下,感染持续存在。③宿主-病原菌关系代表了一种高度复杂的寄生形式,可不引起疾病,而允许长时间共存。④感染隐含着在以后某个时期严重伤害宿主的可能性。免疫应答对致病有很大影响。

“理想化的”胞内菌的特点

胞内菌是一个异质性菌群,但它们也具有一些共同的特点。下面将首先描述不存在的“理想化的”胞内

菌感染的主要特点以及与"理想化的"胞外菌感染的比较(表 40.1)。随后,将详述几种胞内菌的特点。

表 40.1 胞内菌感染的特点

基本的
胞内寄生
T细胞介导的保护作用
迟发型超敏反应
肉芽肿性组织反应
条件性的(conditional)
低毒性/免疫病理
感染和保护性免疫之间处于动态平衡
潜伏期长/慢性疾病
感染与疾病分离

细胞内寄生 正如其命名所隐含的意义,胞内生活方式代表了胞内菌一个显著的特征。但是,入侵宿主细胞并不是胞内菌的专利。短暂入侵上皮细胞是胞内菌和胞外菌共同的入侵机制。

T细胞介导的保护作用 T细胞是抗胞内菌感染保护作用的主要介导者。这些T细胞并不是直接作用于胞内菌,而是作用于其感染的宿主细胞。相反,体液免疫中的抗体能与病原菌直接接触,在抵御胞外菌感染中甚为重要。

迟发型超敏反应 胞内菌感染常伴有迟发型超敏反应(delayed-type hypersensitivity, DTH)。若在患者局部注射相应的可溶性抗原,则在注射局部会出现由T细胞介导、巨噬细胞参与的迟发的组织反应,即迟发型超敏反应。

1337

肉芽肿性组织反应 胞内菌感染引起的组织反应主要呈肉芽肿性。这种反应具有双重作用,既有阻挡病原体向四周或全身播散的保护效应,也可在局部造成一定的病理损害。因此抗胞内菌保护作用以及胞内菌引起的病理损害都集中于这些肉芽肿性病变中。肉芽肿的破裂将促进细菌播散到其他组织部位,形成新的病变。而胞外菌感染的组织反应主要呈化脓性,可导致形成脓肿或全身反应。

低毒性/免疫病理 胞内菌对宿主细胞的毒性小或无毒性,所致病变主要由病理性免疫反应引起,尤其是T淋巴细胞介导的。而胞外菌感染中的组织破坏,则由胞外菌产生的毒素造成。

慢性疾病过程 胞内菌能与宿主细胞长期共存。感染的持续存在与保护性免疫之间可形成一种动态平衡状态,从而导致胞内菌感染的潜伏期较长,引起慢性疾病。因此,感染与疾病分离。而相反,胞外菌感染多呈急性过程,当它们进入宿主后,很快引起疾病;而一旦免疫应答产生,感染又很快终止。因此,感染后很快发生临床疾病。

对于定义胞内菌的标准来说,1~4特点是基本的,5、6是条件性的。事实上,完全符合上述6项特征的"理想化的"胞内菌是不存在的。结核杆菌可算是最接近上述标准的。但在一些高度活动性结核病,结核杆菌可在溶解的宿主细胞的碎屑中进行无限制地胞外繁殖[7]。又小鼠实验性利斯特氏菌病具有胞内菌感染的许多特征,但其病程却是急性的[8]。另外,在伤寒中,抗体可能参与了保护性免疫应答;而在麻风病中,抗体与致病有关。

两类胞内菌:兼性胞内菌和专性胞内菌

根据胞内菌的寄居情况,可将其分为两类。一类并不必须依赖细胞内寄生,也可在细胞外生存并繁殖,称为兼性胞内菌(facultative intracellular bacteria),包括结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、麻风分枝杆菌、肠沙门氏菌、布鲁氏菌属、嗜肺军团菌、单核细胞增多性利斯特氏菌及土拉菌(表 40.2)[1,7,9~15]。这些胞内菌偏爱寄居在单核吞噬细胞(mononuclear phagocyte, MP)中,但其他宿主细胞亦可寄居。例如,麻风分枝杆菌的寄居细胞很广,重要的如神经膜细胞(Schwann cell);肝细胞为单核细胞增多性利斯特氏菌的重要贮主。结核分枝杆菌在体外可感染多种哺乳动物细胞,而在体内似只寄居在巨噬细胞内。

所谓的专性胞内菌(obligate intracellular bacteria)则不能在宿主细胞外生存,只能在宿主细胞内生存和繁殖[2]。这些细菌偏爱非专职吞噬细胞(如内皮细胞和上皮细胞)作为寄居细胞,但有时也可在MP中发现。立克次氏体和衣原体是这一类的代表。立克次氏体包括普氏立克次氏体、立氏立克次氏体、伤寒立克次氏体,恙虫病立克次氏体及贝纳柯克斯体,分别是引起虱传斑疹伤寒、洛基山斑点热、斑疹伤寒、恙虫病及Q热的病原因子[16]。沙眼衣原体的各个生物变种分别引起沙眼、结膜炎、泌尿生殖道感染及性病淋巴肉芽肿,鹦鹉热衣原体、肺炎衣原体分别引起鹦鹉热及各型肺炎(表 40.3)[17~19]。尽管目前仍缺乏证据,但有人提出肺

炎衣原体感染可能是引起心血管动脉粥样硬化疾病的因素之一[20]。

表 40.2　兼性胞内菌引起的人类主要感染

病原菌	疾病	主要靶细胞	宿主细胞内的定位	主要入侵途径
结核分枝杆菌/牛分枝杆菌	结核病	巨噬细胞	吞噬体	肺
麻风分枝杆菌	麻风	巨噬细胞 神经膜细胞,其他细胞	吞噬溶酶体(?)	鼻咽部黏膜
肠伤寒沙门氏菌	伤寒热	巨噬细胞	吞噬体	肠
布鲁氏菌属	布氏菌病	巨噬细胞	吞噬溶酶体	黏膜
嗜肺军团菌	军团菌病	巨噬细胞	吞噬体	肺
单核细胞增多性利斯特氏菌	利斯特氏菌病	巨噬细胞,肝细胞	细胞质	肠
土拉菌	土拉菌病(兔热病)	巨噬细胞	吞噬体	皮肤、黏膜、肺

表 40.3　专性胞内菌引起的人类主要感染

病原菌	疾病	主要靶细胞	宿主细胞内的定位	主要入侵途径
立氏立克次氏体	洛基山斑点热	内皮细胞 平滑肌细胞	细胞溶胶	血管(蜱叮咬)
普氏立克次氏体	流行性斑疹伤寒	内皮细胞	细胞溶胶	破损皮肤、黏膜
伤寒立克次氏体	伤寒	内皮细胞	细胞溶胶	血管(蚤叮咬)
恙虫病立克次氏体	恙虫病	内皮细胞	细胞溶胶	血管(螨叮咬)
柯克斯体属	Q 热	巨噬细胞 肺实质细胞	晚期吞噬体	肺
沙眼衣原体	泌尿生殖道感染、结膜炎、沙眼、性病淋巴肉芽肿(不同血清型)	上皮细胞	吞噬体	眼、泌尿生殖道黏膜
鹦鹉热衣原体	鹦鹉热	巨噬细胞 肺实质细胞	吞噬体	肺
肺炎衣原体	肺炎、冠心病(?)	肺实质细胞	吞噬体	肺

以巨噬细胞作为寄居细胞,不需要特异性的入侵机制,而需要高度复杂的胞内生存战略。但大多数兼性胞内菌在通过上皮层时,也要表达特异性的入侵因子。相反,选择非专职吞噬细胞作为寄居细胞则必须依赖入侵分子,而在这些细胞内生存通常很少危险。

因为本章的中心是抗胞内菌免疫应答的机制,所以下面将选择性地、重点讨论:
①小鼠实验性利斯特氏菌病,因为该模型已证明对探讨获得性抗胞内菌免疫机制最有效;
②人结核病,不仅代表了胞内菌感染的范例,而且也具有最重要的医学意义;
③人麻风病,其特征是具有多种临床类型;
④肠沙门氏菌感染,越来越多地被用来阐明细菌的胞内生活方式。

在适当处,也会讨论到其他一些胞内菌感染。

几种胞内菌的特点及引起的疾病

结核分枝杆菌与结核病

1338

该例胞内菌为抗酸杆菌,约 12 小时复制一次。结核杆菌是专性需氧生长,因此喜 pO 值高的组织部位(如肺)。结核分枝杆菌及其他分枝杆菌含有丰富的脂类、糖脂及蜡质,它们不仅与分枝杆菌的疏水性有关,也与分枝杆菌的抗酸性、强的辅佐性(分枝杆菌是完全弗氏佐剂的重要组分)、抗补体溶解作用、抗酸碱及抗简单消毒剂有关。最重要的是,这些类脂对于胞内菌在活化的 MP 中生存很重要。近来更多的研究结果揭

示，某些分枝杆菌的脂类、脂聚糖是人类一小群非传统T细胞的靶抗原。结核分枝杆菌（人型结核杆菌）和牛分枝杆菌（牛型结核杆菌）引起的人结核病，在全世界都具有最重要的医学意义[7,21~23]。该病具有潜伏期长、潜伏感染及病程长的特点。据估计，全球约有6千万人患结核，每年出现8百万新患者。每年有3百万人死于该病，因此结核分枝杆菌成为了所有感染因子中的主要杀手。另一方面，据估计全球有1/3人口（20亿人）感染结核分枝杆菌。感染者体内的结核分枝杆菌躲藏在隐蔽组织部位的小肉芽肿里。结核分枝杆菌在这些隐蔽部位的持续存在不会一直不被免疫系统识别，而是受到T细胞的控制[24]。因此，大多数（90%以上）感染者能保持健康，而仅一小部分人因免疫应答低下而发病。原发感染通常通过空气传播，因此肺是感染和病变的主要部位。但是，随着潜伏病灶的重新活动以及血-淋巴道播散，任何其他的组织部位也可被感染。成年人结核病主要由于潜伏病灶重新活动而引起；若潜伏结核分枝杆菌已被局限，很少再次感染致病。1927年，Calmette和Guérin发明了牛分枝杆菌的减毒株，称卡介苗（bacille Calmette-Guérin，BCG）。现在，该菌株是全球用得最广的活疫苗[25]。但是，对于成年人，它的保护效力是不够的[26]。

麻风分枝杆菌与麻风病

该病原菌在体外人工培养尚未成功。将麻风分枝杆菌接种于小鼠足垫，其生长速率极慢，需11~30天；在病人体内，其繁殖时间可能更慢[11]。麻风分枝杆菌在相对低温（27~30℃）下生长最好，该特征可能与其偏爱侵犯周围神经有关。麻风分枝杆菌也富含类脂，其中以Ⅰ型酚糖脂最多。据估计约1200万人患麻风病[11,27]。麻风病是一种潜伏期长、病程长的慢性传染病。从以强的T细胞免疫、病变处麻风分枝杆菌少为特征的结核样型极到以细胞免疫功能低下、病变处麻风分枝杆菌多为特征的瘤型极，该病具有多种临床类型[11,27,28]。结核样型麻风病中有力的免疫机制与结核病相似；而瘤型麻风病则以抑制性免疫机制为其特征。因麻风分枝杆菌通常侵犯皮肤，所以病变组织易接近。对麻风病皮损处的免疫组织学分析，使人们能深入认识肉芽肿性病变的机制。

单核细胞增多性利斯特氏菌与利斯特氏菌病

该菌是革兰氏阳性、无芽孢、兼性厌氧杆菌。分子生物学分析已揭示了与单核细胞增多性利斯特氏菌入侵细胞、胞内复制及细胞至细胞扩散有关的几种毒力因子[29,30]。利斯特氏菌溶胞素（listeriolysin）是一种巯基活化的、能形成孔的溶细胞素（ytolysin），在吞噬体中的低pH值下有活性，并能促进利斯特氏菌从吞噬体逃避至细胞质[31,32]。两种不同的磷酸脂酶C分子和一种卵磷脂酶也与单核细胞增多性利斯特氏菌逃逸至细胞质及细胞至细胞的扩散有关[33~35]。从吞噬体转换至细胞溶胶（cytosol）是其毒力所致，且将显著影响其引起的T细胞应答的类型，因为转换至细胞溶胶将促进MHCⅠ类分子与抗原肽的装载。*actA*基因产物与单核细胞增多性利斯特氏菌的胞内运动有关，并能促进其细胞至细胞的扩散；而一种金属蛋白酶可进一步促进其胞内生存[36~38]。内在化素（internalin）和一种由iap基因编码的分泌型蛋白质（6kDa）与单核细胞增多性利斯特氏菌入侵非吞噬细胞有关[39,40]。由*prfA*基因编码的蛋白能调节诸如利斯特氏菌溶胞素、卵磷脂酶及磷酸脂酶C等几种毒力因子的表达[41]。利斯特氏菌病主要发生于牛、羊，很少发生于人[14,42]。实验性小鼠单核细胞增多性利斯特氏菌感染模型为我们阐明抗胞内菌感染的免疫机制提供了有益帮助[1,8]。尽管单核细胞增多性利斯特氏菌能在静止的巨噬细胞内生存，但一旦巨噬细胞活化，它们很快就会被杀死。因此，小鼠利斯特氏菌病是一种急性感染，随着T细胞活化便会很容易地被终止。甚至在T细胞缺乏的情况下，利斯特氏菌病也能够被很有效地控制[43]。这些特征可帮助解释来自鼠利斯特氏菌病实验研究的资料。

1339

肠沙门氏菌与沙门氏菌病

按照最新的命名法，所有沙门氏菌都称为肠沙门氏菌（*Salmonellae enterica*）[15,44~46]。该菌属包含2000多种血清型，包括引起人类伤寒的伤寒肠沙门氏菌以及在鼠中引起类似疾病的鼠伤寒肠沙门氏菌。沙门氏菌在自然界广泛存在，可感染很多不同的动物，包括哺乳动物、爬行动物及鸟类。有的沙门氏菌，如鼠伤寒肠沙

门氏菌,有广泛的宿主;有的则高度限制,如伤寒肠沙门氏菌,只限制于人。沙门氏菌病一般经食物传播。在易感宿主,这些病原菌可引起从温和的小肠结肠炎到严重腹泻轻重不同的疾病。一些沙门氏菌穿过肠上皮,能导致菌血症,常引起肠热症或伤寒。人伤寒严重影响了全球人类的健康,对它的控制现在比以前好多了。由不同血清型肠沙门氏菌所致的腹泻疾病是对人类的一个主要威胁。在本章节的其余部分所描述的研究结果,几乎都来自对鼠伤寒沙门氏菌的研究。因此,尽管在本文中都被称为肠沙门氏菌,但要记住这些研究结果不能外推至其他血清型的肠沙门氏菌。

胞内菌进入宿主细胞及在宿主细胞内生存的机制

对于胞内菌来说,进入宿主细胞是在宿主内生存及被宿主消灭的必要条件[1,2]。宿主细胞直接的摄取称为吞噬作用,它是所谓的专职吞噬细胞的特征。专职吞噬细胞包括多形核粒细胞(morphonuclear granulocyte,PNG)和 MP。由病原体诱导的进入称为入侵,它可使病原体进入非吞噬细胞(非专职吞噬细胞)。宿主细胞

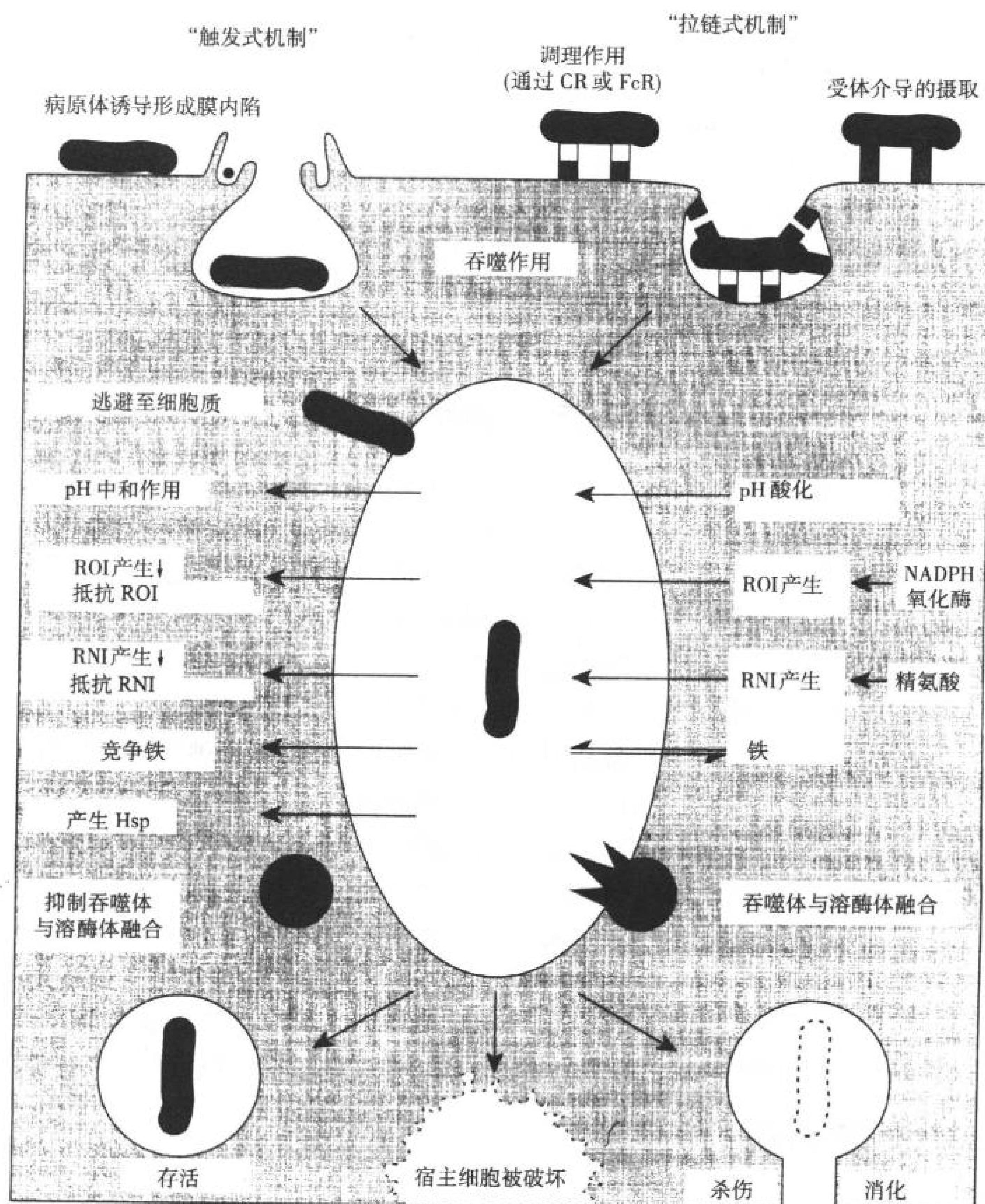


图 40.1 MP和胞内菌之间相互作用的多种结果。

和病原体之间可以通过受体-配体相互作用而直接接触,也可以通过病原体表面沉积的宿主分子与靶细胞上的相应受体相互作用而间接接触。

针对不同靶细胞,病原菌进入后的最终结果显著不同:

①PNG 是短寿命的。它们具有高度的吞噬作用,组成型表达强大的抗菌活性,所以病原菌被 PNG 摄取后通常致死。

②非专职吞噬细胞无吞噬作用,因此病原菌进入依靠其表面受体的表达。因为它们的低抗菌活性,所以主要作为病原菌的一个寄居地(habitat)。

③MP 具有吞噬作用,在不同的活化状态下,表达中度到高度的抗菌活性。因此,它们既是寄居细胞,又作为效应细胞。

下面,将以胞内菌的主要靶细胞 MP 为重点,讲述从摄取细菌到细菌被宿主细胞消灭或者在宿主细胞内生存的主要步骤(图 40.1,表 40.4)。

表 40.4　活化巨噬细胞的主要抗菌能力和微生物的逃避机制

巨噬细胞效应力	微生物的逃避机制
防御素	未知
吞噬体酸化	对吞噬体酸化的中和作用
吞噬体-溶酶体融合	抑制吞噬体-溶酶体融合
溶酶体酶	抵抗酶的攻击
吞噬溶酶体内的杀伤	逃避至细胞溶胶
	坚厚的细胞壁
ROI	CR 介导的摄取、ROI 解毒分子、ROI 清除剂
RNI	未知(ROI 解毒分子可能干扰 RNI)
铁饥饿(starvation)	微生物的铁清除剂(如载铁体)
色氨酸饥饿	未知

ROI,活性氧中介物(reactive oxygen intermediate);RNI,活性氮中介物(reactive nitrogen intermediate)。

黏附和入侵

对哺乳动物细胞的黏附是病原菌的一个共同特征[47~49]。它是细胞外定居及入侵宿主细胞的一个先决条件。许多胞外菌都表达细菌黏附素(adhensin),其作用仅是促进对宿主细胞的黏附。而入侵诱导分子则是长久或短暂进入宿主细胞的细菌的特征。在这里提到的胞内菌能在宿主细胞长久居住,而其他一些病原菌如志贺氏菌属和耶尔森氏菌属入侵宿主细胞是短暂的[15,47,49~53]。

尽管入侵是由细菌诱导的,但主要还是宿主细胞的功能。细菌黏附至靶细胞后,通过以下两种方式诱导入侵:一是通过被误用作黏附的宿主细胞受体诱导摄取;二是不依赖介导黏附的分子诱导的摄取[49,50,54]。“拉链式”机制(zipper mechanism)被认为是高度选择性的受体介导的细菌进入机制,而“触发式”机制(trigger mechanism)被认为是无选择性的、不依赖黏附的摄取[54]。

“拉链式”入侵机制

耶尔森氏菌属和单核细胞增多性利斯特氏菌是通过“拉链式”机制入侵宿主细胞的一个例子[49,55]。耶尔森氏菌属的入侵是整合素受体特异性的,通过细菌表面的侵袭素与非专职吞噬细胞上的整合素结合,从而诱导非专职吞噬细胞的吞噬机制,此与专职吞噬细胞 MP 的吞噬机制相似。单核细胞增多性利斯特氏菌通过肠上皮进入宿主,是由病原菌表面的内在化素与上皮细胞的钙调素 E 之间的相互作用介导的[49,56]。麻风分枝杆菌的主要靶细胞是神经膜细胞,神经膜细胞由层粘连蛋白(laminin)、胶原蛋白及蛋白多糖组成的基底层(basal lamina)所包裹。证据显示,麻风分枝杆菌对外周神经独特的亲嗜性是由于细菌与层粘连蛋白的结合。因此,作为整合素天然配体的层粘连蛋白,提供了病原菌与神经膜细胞之间相互作用的桥梁[57]。

"触发式"入侵机制

1340 不同的分子、机制参与了肠沙门氏菌进入宿主细胞。肠沙门氏菌与宿主细胞的相互作用导致了在接触部位形成"膜内陷"(membrane ruffling),紧接着细菌进入宿主细胞[49,51,52]。"膜内陷"诱导了宿主细胞无选择性的摄取,甚至包括肠沙门氏菌附近的其他颗粒,这个过程称作"大吞饮作用"(macropinocytosis)。肠沙门氏菌通过利用宿主细胞的"信号机器"(signaling machinery)诱导细胞骨架的重排,从而触发对其的摄取。但是,与沙门氏菌相互作用的宿主细胞上的受体的确切本质还不清楚。肠沙门氏菌能诱导某些小鼠细胞表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)受体的磷酸化[58]。但是,肠沙门氏菌也能进入不表达 EGF 受体的细胞[15,52]。该病原菌具有一个Ⅲ型分泌器,可直接控制宿主细胞胞内信号的级取反应[15,49]。与 Ras 超家族的鸟苷三磷酸(guanosine triphosphate, GTP)结合蛋白 CDC42 的相互作用提示细菌通过"膜内陷"入侵宿主细胞[59]。

专职吞噬细胞的吞噬作用

专职吞噬细胞表达能识别病原微生物分子结构(哺乳动物通常没有这些分子结构)的受体。病原微生物上的分子与这些受体的结合,能诱导专职吞噬细胞的吞噬作用。这些所谓的模式识别受体(pattern-recognition receptor)赋予专职吞噬细胞迅速识别入侵细菌的能力[60]。这些识别受体包括:

①能特异性识别细菌细胞表面共有的糖分子的外源凝集素样糖蛋白[61];

1341 ②表面分子,尤其是 CD14,能特异性识别糖脂,如革兰阴性菌的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)以及分枝杆菌属的某些脂阿拉伯糖甘露聚糖(lipoarabinomannan, LAM)[62~64]。

专职吞噬细胞表面有三种外源凝集素样受体[61,65]:甘露糖型受体识别 *N*-乙酰基葡萄糖胺、甘露糖、葡萄糖及 *L*-岩藻糖;半乳糖型受体能特异性识别 *N*-乙酰基葡萄糖胺和半乳糖;岩藻糖型受体能特异性识别 *L*-岩藻糖。这些糖分子在各种微生物上的广泛分布,保证了专职吞噬细胞广大的微生物靶谱。具有末端甘露聚糖的 LAM(ManLAM)主要被甘露糖型受体识别[66],而没有甘露糖帽、具有末端阿拉伯糖的 LAM 则不能被这些受体识别。有证据显示 CD14 与对这些 AraLAM 的识别有关[66]。

一群受体被统称为清除剂受体(scavenger receptor),能与宿主的血清脂蛋白反应[67,68]。其中有些受体也能与微生物表面分子结合,详尽的证据提示它们可能参与了宿主抗细菌感染[67,69,69a]。

细菌与专职吞噬细胞的间接结合包括 IgG、补体成分 C3 的降触产物或纤连蛋白(fibronectin, Fn)作为配体,受体则分别为宿主细胞上的 FcR、补体受体(CR1、CR3、CR4)及 FnR[70~73]。特异性 IgG 或补体活化产物 C3b 与细菌结合后,通过 IgG 或 C3b 与吞噬细胞上的 FcR 或 CR1、CR3、CR4 结合,可促进对细菌的吞噬作用。IgG-FcR 结合通常可激活吞噬细胞的呼吸爆发,导致 ROI 产生(见后文)[74,75]。许多胞内菌(如结核分枝杆菌、麻风分枝杆菌及嗜肺军团菌)可诱发 C3 降解,必然的结果就是促进对它们的摄取[76~79]。例如,麻风分枝杆菌的酚糖脂、嗜肺军团菌的主要外层膜蛋白固定 C3b 于其表面后,通过 C3b 与吞噬细胞上的 CR 结合,从而促进吞噬细胞对它们的摄取[76,78]。麻风分枝杆菌表面的糖脂可通过不依赖抗体的替代途径或通过低浓度的交叉反应性血清抗体激活补体经典途径而促进 C3 的活化与固定。补体成分 C2a 可促进 C3b 在病原性分枝杆菌属如结核分枝杆菌、麻风分枝杆菌及鸟分枝杆菌细胞壁上沉积。显然,这些微生物首先裂解血清 C2 形成 C3 转化酶、C2a,其中 C3 转化酶裂解 C3 为 C3b,而 C2a 则促进 C3b 结合到激活 C3 所在部位附近的微生物上[79a]。一些胞内菌可直接与 CR3 结合,而不依赖 C3 活化[80,80a]。与 CR3 的直接结合需要有 RGD 序列或能与 β-葡聚糖结合的外源凝集素样位点。因此,CR3 既作为模式识别受体,又作为宿主分子的受体。CR 促进的摄取可干扰 MP 中 ROI 的产生,因此可能代表了细菌的一种逃避机制(见后文)[76~78]。

一些胞内菌(如嗜肺军团菌和鹦鹉热衣原体)通过一种不寻常的吞噬过程进入 MP,称为"卷入吞噬(coiling phagocytosis)"[76,81]。C3 裂解物可促进细菌的卷入,并且不刺激 ROI 的分泌。而 FcR 促进的对嗜肺军团菌的摄取是一种通常的方式,既不引起卷入,也不干扰 ROI 产生。CR 介导的对颗粒性物质的摄取不触发

氧化反应的产生，提示它代表了一种普遍的逃避机制，有利于胞内菌的胞内生存。

纤连蛋白也是通过含 RGD 的序列与 FnR 结合，因此表达纤连蛋白结合分子的胞内菌可能通过该途径被摄取。例如，结核分枝杆菌分泌一族具有纤连蛋白结合活性的 32KDa 分子[82,83]。但是，纤连蛋白似乎是吞噬作用弱的、无效的启动者，因此由纤连蛋白介导的吞噬作用可能需要其他的内在化（internalization）机制[71,84,85]。实际上，近来更多的研究提供的证据表明，该 32kDa 分子复合体成员担当 mycolyl 转移酶，与细胞壁的生物合成有关，而不是参与对宿主细胞的黏附[85a]。因此，胞内菌可能误用了血清或者分泌物中的种种蛋白质。例如，研究发现结核分枝杆菌能与肝素或表面活性蛋白结合，由此可促进其对宿主肺部细胞的黏附以及可能促进宿主肺部细胞对其的摄取[85b,85c]。

入侵非专职吞噬细胞

胞内菌通常不企图避免吞噬作用，相反，它们常促进宿主细胞对它们的吞噬。对微生物的直接摄取允许误用非吞噬细胞，这可以看作是逃避专职吞噬细胞吞噬作用的一种机制。胞内菌的靶细胞谱可以从非常广泛到高度特异。在多种宿主细胞中可以发现麻风分枝杆菌，显示了麻风分枝杆菌广泛的靶细胞谱[27,86]。单核细胞增多性利斯特氏菌通过肠上皮进入宿主，它的主要靶细胞，除了 MP，就是肝细胞[87,88]；结核分枝杆菌的靶细胞几乎就限制在 MP。对于专性胞内菌，则更偏爱非专职吞噬细胞（而不是 MP）作为寄居细胞[2]，它们主要存在于内皮细胞和上皮细胞中[17]。

吞噬体的成熟、酸化及吞噬体-溶酶体融合

对颗粒性物质的吞噬作用引发了一系列事件，最终导致吞噬溶酶体的形成[49,89,90]。可分为三个主要阶段。
①早期吞噬体：pH 为 6（弱酸性），有甘露糖受体、转铁蛋白及转铁蛋白受体等膜标志。
②晚期吞噬体：pH < 5.5，有 ATP 酶质子泵。

1342

③吞噬体和溶酶体融合形成吞噬溶酶体：pH < 5.5，有高密度的溶酶体相关性膜蛋白（lysosome-associated membrane protein，LAMP）和典型的溶酶体酶。

不能把这三个阶段截然分开，而是形成了一个包括膜蛋白的分选（sorting）、囊泡的芽生以及与其他囊泡融合的一个连续过程。在这个动态过程中，吞噬体接连与相应的内体融合，随后与溶酶体融合[91]。

吞噬体内的 pH 值由 ATP 酶质子泵控制，该质子泵与酸化作用有关[92]。吞噬作用发生后，吞噬体的 pH 值先变碱再转酸。碱性微环境适于防御素（defensin）及一些碱性蛋白质发挥活性，而酸性 pH 值有利于溶酶体酶的活性发挥[93]。防御素（3.5～4.0kDa）是富含精氨酸和半胱氨酸的小肽[94,95]。它们在 PNG 中富有，也存在于某些 MP（取决于 MP 的种属和组织定位）中。纯化的防御素对某些胞内菌（如肠沙门氏菌和单核细胞增多性利斯特氏菌）具有杀伤作用。肠沙门氏菌对小鼠的一种毒力因子 phoP，与抗防御素有关[95,96]。溶酶体酶直接杀菌力弱，主要是分解已被杀死的菌体。这些酶存在于溶酶体内，通过溶酶体和吞噬体两者融合而进入含菌的吞噬体中，并在晚期（即在吞噬溶酶体中）到达它们的最佳活性状态。

大多数胞内菌（包括嗜肺军团菌、结核分枝杆菌、肠沙门氏菌及鹦鹉热衣原体）能干扰吞噬体成熟[89,90,97,98]。分枝杆菌的硫酸脑苷脂和某些糖脂能阻止吞噬体与溶酶体融合，但其机制还不完全清楚[99～102]。被抗体覆盖的结核分枝杆菌失去了阻止溶酶体酶释放的能力，提示抗体在以细胞介导的保护作用为主的结核病中有一定的辅助作用[103]。最后，分枝杆菌富含脂质的坚厚细胞壁使之能高度抵抗酶类的攻击。结核分枝杆菌和鸟分枝杆菌可通过排除吞噬体的质子泵而限制吞噬体酸化[92,104]。其他的机制如结核分枝杆菌产生 NH_4^+ 也对此起一定的作用[105]。吞噬体内 NH_4^+ 的产生与结核杆菌的尿素酶在低 pH 值具有活性相适应。此外，NH_4^+ 还能干扰吞噬体与溶酶体融合。已证明外源性 ATP 能促进吞噬体与溶酶体融合，导致伴发巨噬细胞死亡以及对牛分枝杆菌减毒株 BCG 的杀伤[105a,105b]。

结核分枝杆菌、牛分枝杆菌减毒株 BCG、嗜肺军团菌、肠沙门氏菌及沙眼衣原体（均在非酸化的囊泡内生长繁殖）可使吞噬体的成熟过程停留在早期与晚期之间的某个时候[81,106～109]。肠沙门氏菌可继续留在经“触

发式"机制被摄取后所形成的吞噬体中。含沙眼衣原体的囊泡,缺乏任何特异性的吞噬体标志,以一种未知机制装载上 ATP(此为衣原体所需)[109]。含嗜肺军团菌的吞噬体被线粒体包绕,后又被与内质网连接的核糖体包绕[110]。证据显示嗜肺军团菌利用了一个具有某些自噬体特征的胞内区室[110,111]。

胞内铁

胞内菌需要铁,ROI 和 RNI 的产生也需要铁。因此,胞内病原体与宿主细胞对胞内铁的竞争将显著影响二者相互作用的最终结果[112~116]。为了提高铁的供给,哺乳动物细胞利用了一些特异性分子。在胞内环境,铁与铁蛋白、血红素及铁硫蛋白等结合[117]。在宿主胞外环境,铁与转铁蛋白、乳铁蛋白紧密结合,并通过转铁蛋白受体被宿主细胞摄取。如前文所提到的,已在早期吞噬体中鉴定出转铁蛋白和转铁蛋白受体。转铁蛋白受体接受载有铁的转铁蛋白,在早期吞噬体中的还原条件下,转铁蛋白释放出铁。另外,有人提出 Nramp 系统与铁输送至吞噬体有关。因此,多条途径可控制对铁的利用,包括细胞表面和吞噬体中转铁蛋白受体的表达、乳铁蛋白中铁的释放及细胞溶胶中铁蛋白的浓度等。为了成功竞争到铁,许多细菌具有铁结合蛋白。例如,它们分泌称作载铁体(siderophore)的低分子质量铁清除剂。IFN-γ 活化的 MP 可下调转铁蛋白受体的表达及胞内铁蛋白,从而导致吞噬体内的铁利用减少。对嗜肺军团菌的研究揭示,静止 MP 的吞噬体中有充足的铁可用,而在 IFN-γ 活化的 MP 中可用的铁则显著减少,因此缺乏有效的铁摄取机制的嗜肺军团菌将因铁缺乏而死亡。而相反的,结核分枝杆菌具有一个由铁外螯合素和分枝杆菌生长素组成的强有力的铁获取系统。铁外螯合素能够在有限的条件下成功竞争到铁,并将它转移给细胞壁中的分枝杆菌生长素[118,119]。

色氨酸降解

色氨酸降解增加与对鹦鹉热衣原体和胞内原虫病原体刚地弓形虫的杀伤作用有关[120,121]。可能通过限制这些病原体在细胞内对必需氨基酸的利用,从而提供一个强有力的抗微生物机制。除此外,对于其在抗胞内菌中的作用所知很少。

毒性效应分子

MP 和(或)PNG 杀伤胞内菌主要靠具有高度活性的毒性分子来完成,尤其是 ROI 和 RNI[74,75,122~126]。在体外,许多细菌对 ROI 敏感。但是,MP 产生的 ROI 在杀伤胞内菌中所起的作用仍不清楚。对于鼠巨噬细胞,RNI 似乎更重要[122,126~131]。与 RNI 在抗菌防御中起主要作用相一致,诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)(与 RNI 产生有关;见后文)缺陷的基因敲除(knock-out, KO)小鼠,患上了加重的利斯特氏菌病和结核病[126,130,132]。另一方面,人 MP 是否能产生足够多的 RNI 来杀伤细菌还存在争论[126,133~138]。但是,现在越来越多的证据表明,来自胞内菌感染部位的人 MP 具有产生 RNI 的潜力[126,138]。例如,用对人 iNOS 特异性的抗体,可从来自结核病患者的大部分肺泡巨噬细胞中检测到 iNOS[138]。RNI 的产生代表了鼠巨噬细胞抑制结核菌的主要效应机制,因此可推测人巨噬细胞产生 RNI 相对低,至少与人类对结核病的高度易感有部分关系。

1343

膜结合型的 NADPH 氧化酶被 IFN-γ 或通过 IgG-FcR 结合而被活化后,可发动 ROI 的产生:



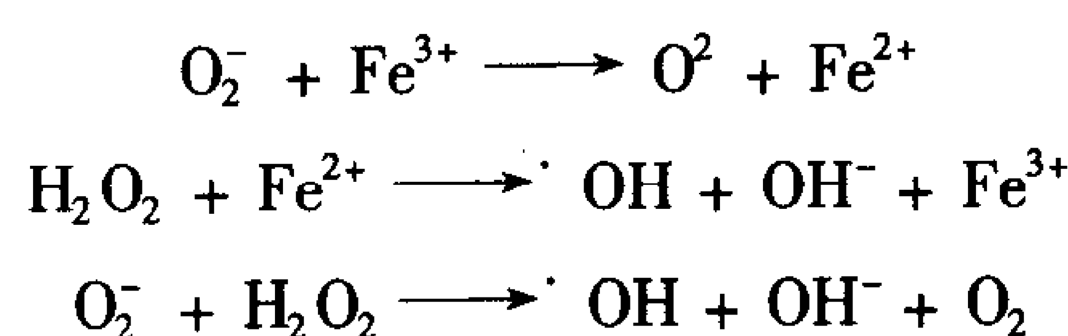
$$O_2 + NADPH \xrightarrow{\text{NADPH 氧化酶}} NADP + O_2^- + H^+$$

在超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的作用下,O_2^- 进一步发生代谢反应:



$$O_2^- + H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$$

在适宜的铁催化剂的作用下,将发生 Haber-Weiss 反应:



$$O_2^- + Fe^{3+} \longrightarrow O^2 + Fe^{2+}$$
$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow {}^{\cdot}OH + OH^- + Fe^{3+}$$
$$O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow {}^{\cdot}OH + OH^- + O_2$$

此外，O_2^- 可转变为单态氧（$'O_2$）。$'O_2$ 和 OH 基均属作用短暂、具有高度抗菌活性的强氧化剂，能破坏细菌的 DNA、膜脂类和蛋白质（O_2^-，过氧化物阴离子；$^{\cdot}OH$，带一个自由电子的氢氧基团；$'O_2$，单态氧，一种高活性氧）。

粒细胞和血中的单核细胞具有髓过氧化物酶（myeloperoxidase，MPO），而组织中的巨噬细胞无。因此粒细胞和血中的单核细胞可使微生物蛋白质发生卤化反应[74]：



$$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{MPO} OCl^- + H_2O$$

通过上述反应除生成次氯酸外，尚形成氯胺。二者经氯化作用破坏生物学上重要的蛋白质，从而进一步增加 ROI 系统的杀菌力。

一氧化氮（nitric oxide，NO）来自 *L*-精氨酸的末端胍-氮原子（图 40.2）[123,124]。该反应由 iNOS 催化，生成 *L*-瓜氨酸（*L*-citrulline）和 $NO^{\cdot}$。

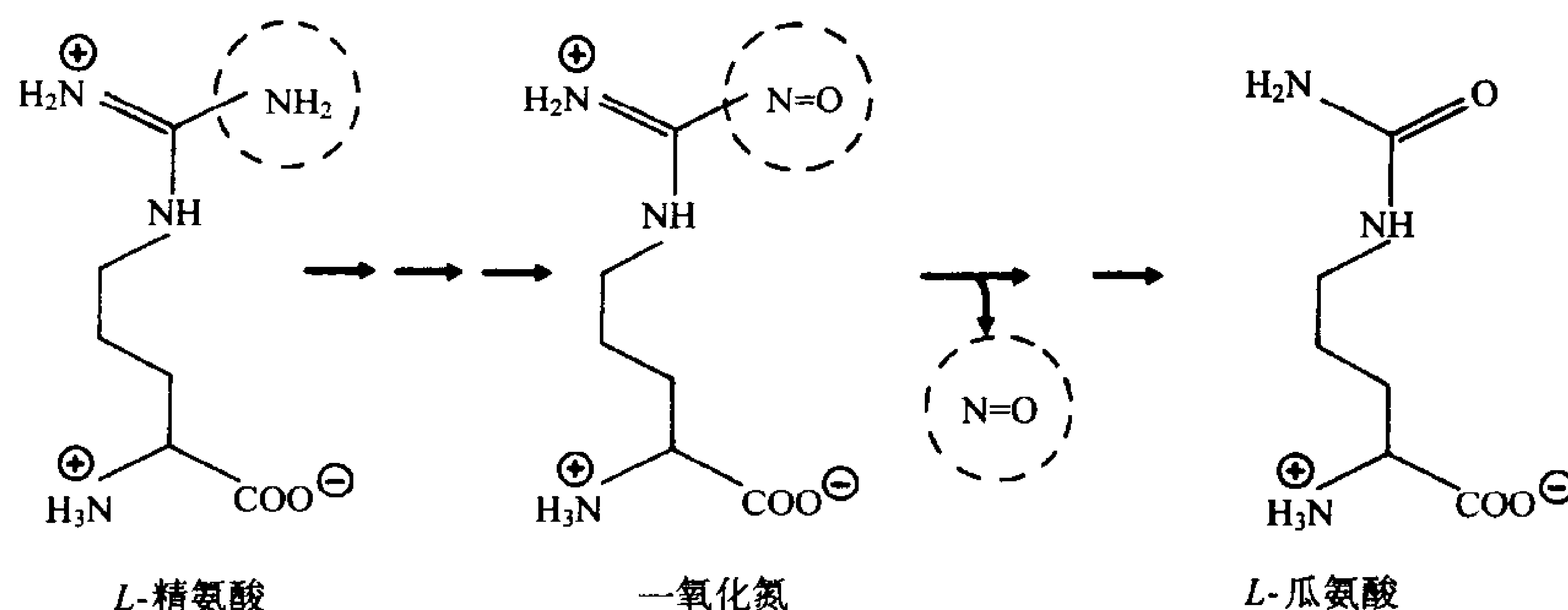
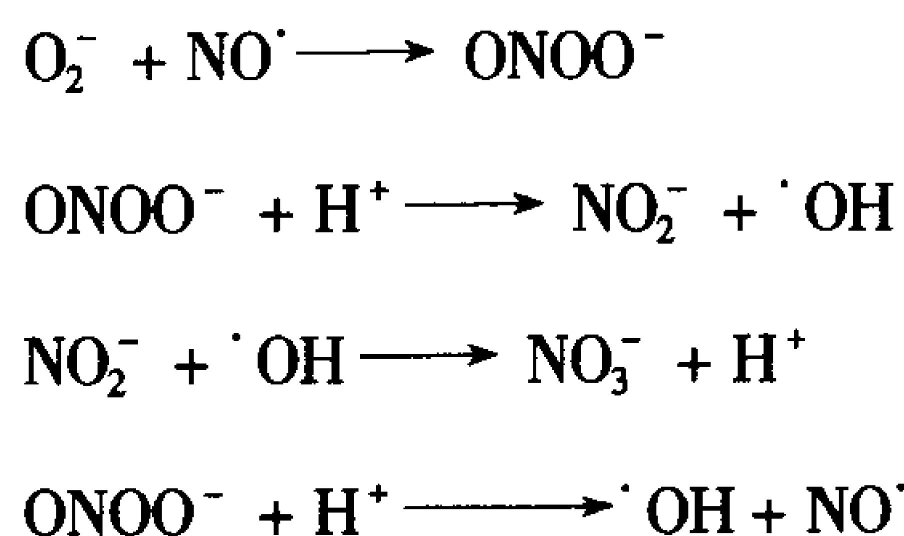


图 40.2　*L*-精氨酸产生 NO 的过程。

$NO^{\cdot}$ 可作为氧化剂，也可与 O_2^- 反应生成不稳定的过亚硝酸盐阴离子（$ONOO^-$）。$ONOO^-$ 可再转化生成稳定的 NO_2^- 和 NO_3^-，或分解为 $NO^{\cdot}$：



$$O_2^- + NO^{\cdot} \longrightarrow ONOO^-$$
$$ONOO^- + H^+ \longrightarrow NO_2^- + {}^{\cdot}OH$$
$$NO_2^- + {}^{\cdot}OH \longrightarrow NO_3^- + H^+$$
$$ONOO^- + H^+ \longrightarrow {}^{\cdot}OH + NO^{\cdot}$$

$NO^{\cdot}$ 和 $ONOO^-$ 是具有高度活性的抗微生物剂。$NO^{\cdot}$ 可再转化为具有最大抗微生物活性的亚硝基硫醇（nitrosothiol）。而 NO_2^- 和 NO_3^- 对微生物无显著作用。

$NO^{\cdot}$ 的产生依赖 NADPH，并需要四氢蝶呤作为辅因子。现已知有 3 种 NOS 同工酶。两种组成型 NOS（constitutive NOS，cNOS）存在于各种宿主细胞，与 NO 的基础合成有关；而 iNOS 主要存在于专职吞噬细胞中，与对微生物的杀伤有关[126]。iNOS 的产生受外源性刺激物（如 IFN-γ）的控制。在 iNOS 的作用下可快速产生高浓度的具有杀微生物作用的 RNI，而在 cNOS 作用下产生的低水平 NO 主要维持生理功能。RNI 通过直接灭活含铁-硫的酶、S-亚硝基化蛋白质、破坏 DNA 或与 ROI 协同作用发挥它们的杀菌活性。

逃避 ROI 和 RNI 的杀伤作用

与靶细胞上的 CR1/CR3 结合不会引起呼吸爆发、ROI 产生[76,78,79,114]，因此 CR 为胞内菌提供了一条少危险的人侵途径。分枝杆菌属的一些低分子质量组分（如麻风分枝杆菌的 I 型酚糖脂）可清除 ROI[139,140]。一些胞内菌可通过干扰蛋白激酶 C 的活性而阻止呼吸爆发、影响 iNOS活性。此外，许多胞内菌能产生歧化酶和过氧化氢酶，可分别对 O_2^- 和 H_2O_2 解毒[141]。胞内菌产生 ROI 去毒分子不是组成型的，而是受控于有关的调节子如 soxR 或 oxyR，它们能分别对 O_2^- 和 H_2O_2 的浓度传感（sense）。因此，几种不能在鼠 MP 中存活的肠沙门氏菌转座子（transposon）突变株，在体外对 ROI 都高度敏感[142]。对胞内菌干扰 RNI 杀菌作用的特异性机制所知甚少，但发现过氧化氢酶和其他一些抗氧化酶能间接抑制 RNI 的功能[143,144]。ROI 和 RNI 亦可影响宿主分子，因此这些效应分子的过度产生也将对宿主有害。

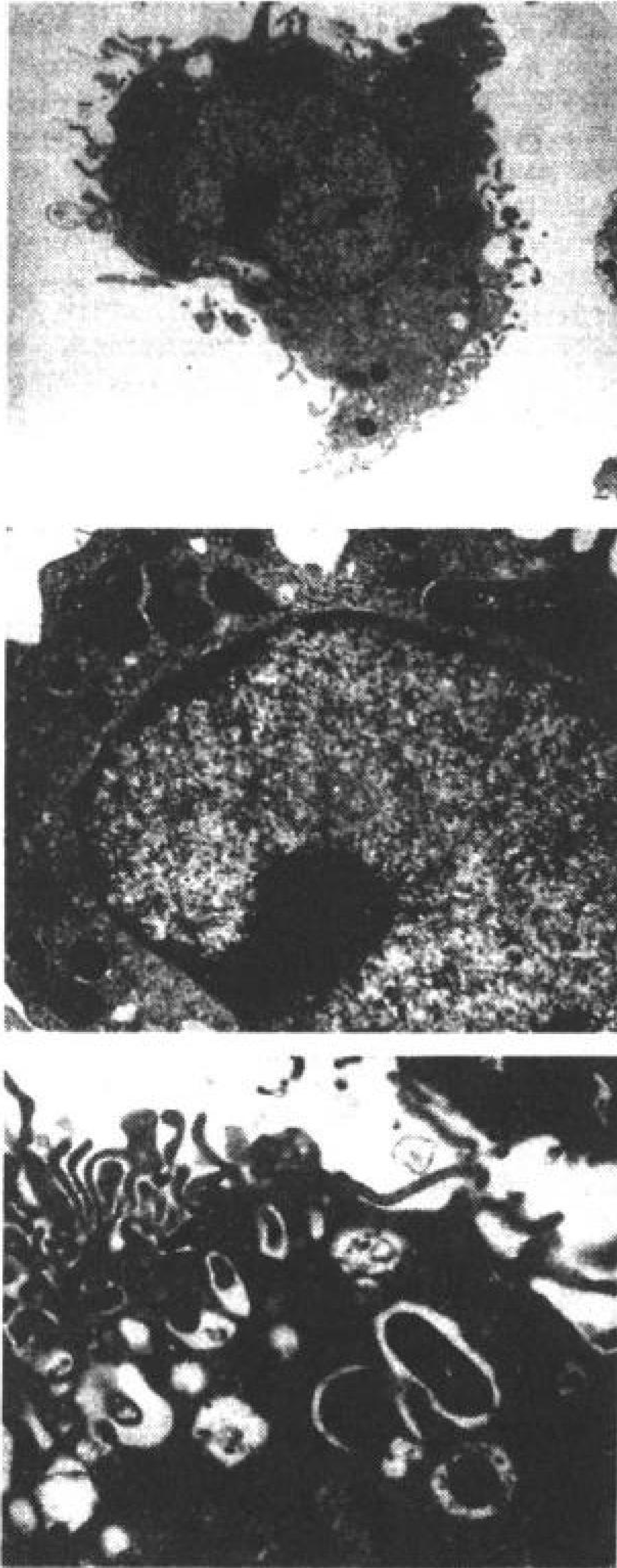


图 40.3 单核细胞增多性利斯特氏菌在 MP 中的定位。上：感染单核细胞增多性利斯特氏菌的巨噬细胞的电子显微照片。中：单核细胞增多性利斯特氏菌在细胞质。下：单核细胞增多性利斯特氏菌在吞噬体。（由 G. Szalay、S. H. E. Kaufmann 和 J. Golecki 提供。）

逃避至细胞质

为了减少对自身的损伤，MP 杀伤细菌集中在吞噬溶酶体，所以从吞噬体逃避至细胞质，代表了细菌的一种非常成功的生存策略。对单核细胞增多性利斯特氏菌的该出路问题进行了大量研究，但其他的胞内病原体也可有同样的出路（图 40.3）[29~32,145~149]。单核细胞增多性利斯特氏菌入侵细胞质依赖利斯特氏菌溶胞素（一种 SH 活化的溶细胞素）。该基因的缺失（deletion）使得单核细胞增多性利斯特氏菌变为无毒力。其他溶细胞素（如磷脂酶、卵磷脂酶及金属蛋白酶）可能也与此膜转换（membrane transition）有关，但凭借其各自的能量都不足以实现膜转换。在 IFN-γ 活化的巨噬细胞中，单核细胞增多性利斯特氏菌逃避至细胞质则显著减少，进入吞噬体的细菌很快受到 ROI、RNI 和（或）防御素的攻击而死亡[150]。

细胞至细胞的直接扩散

血液中的单核细胞增多性利斯特氏菌可被肝脏库普弗细胞（Kupffer cell）清除，也可从 Kupffer 细胞直接扩散到邻近的肝细胞而不经过细胞外环境[87,151,152]。在体外，对此细胞至细胞的扩散机制进行了仔细的研究[152~154]。单核细胞增多性利斯特氏菌在 Kupffer 细胞中从吞噬体逃逸至细胞质后，被原纤维物质围绕，随后由肌动蛋白丝形成“尾”状，将细菌推向细胞外缘形成伪足。细菌在细胞内的移动通过肌动蛋白在细菌表面的聚合和解聚来实现。由 *act A* 基因编码的位于细菌表面的一种 90kDa 蛋白质与此肌动蛋白为基础的移动有关[36,38]。现已鉴定出一种由 8 个多肽组成的宿主细胞溶胶复合物，其通过与 Act A 结合，引起肌动蛋白聚合[155]。而后含单核细胞增多性利斯特氏菌的伪足被邻近细胞吞噬，单核细胞增多性利斯特氏菌到达受体细胞的吞噬体，此时该菌仍围有供体细胞的细胞骨架物质。继而该菌横越双层膜（供体细胞肌动蛋白聚合膜和受体细胞吞噬体膜），进入受体细胞的细胞质。如此单核细胞增多性利斯特氏菌可感染许多宿主细胞而不接触细胞外的防御机制。立氏立克次氏体似乎也使用与此相似的扩散机制，而普氏立克次氏体和伤寒立克次氏体不使用这种扩散机制[16]。

凋亡

哺乳动物细胞有两种不同的死亡方式：意外死亡和程序性细胞死亡，分别引起坏死和凋亡[156]。坏死是由补体、溶细胞性 T 淋巴细胞(cytolytic T-lymphocyte，CTL)等各种外源性效应机制导致的细胞破坏。而凋亡是由细胞自身内在机制引起的。程序性细胞死亡包含一系列酶促反应事件，尤其是胞内 caspase 家族蛋白酶。研究揭示，包括结核分枝杆菌、肠沙门氏菌及单核细胞增多性利斯特氏菌在内的几种病原菌被宿主细胞摄取后，能激活这些细胞中的“凋亡机器”(apoptotic machinery)[157~163]。肠沙门氏菌可诱导其感染的巨噬细胞凋亡，而单核细胞增多性利斯特氏菌引则引起其感染的肝细胞和树突细胞凋亡(而不引起其感染的巨噬细胞凋亡)[159~161,164]。有关的主要分子和机制还不完全清楚。由单核细胞增多性利斯特氏菌产生的利斯特氏菌溶胞素以及肠沙门氏菌的 SipB 导致的小孔形成可能启动凋亡[165]。对福氏志贺氏菌引起的凋亡进行了更加详细的研究，发现它的毒力因子 IpaB 不仅参与孔的形成，而且通过与 caspase 家族成员结合、并使之活化而与“凋亡机器”相互作用[166,167]。现在还不知道凋亡主要是对宿主还是病原菌有利。外源性 ATP 可导致含牛分枝杆菌减毒株 BCG 的宿主细胞死亡以及对分枝杆菌的杀伤[105a,105b]。由此引起的巨噬细胞的死亡与凋亡相似，但是与 CD95 和 caspase 介导的传统意义上的凋亡有区别。

与胞内生存有关的基因表达的调控

越来越多的证据显示病原菌并不是组成型表达毒力基因，而只在需要的时候表达[168~170]。肠沙门氏菌、结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、单核细胞增多性利斯特氏菌及嗜肺军团菌并不只限制在哺乳动物宿主内生存，它们生命的相当多时间都生活在外界环境中。在外界环境，许多毒力因子不需要，因此不必组成型表达。同样地，立克次氏体在昆虫和人宿主细胞中的生存条件显著不同。因此胞内菌毒力因子的表达受特异性感受器的控制，从而使胞内菌能够以一种协调的方式表达适宜的毒力因子[168~170]。与毒力基因表达有关的外部刺激物还不完全清楚，可能包括 pH、pO_2、渗透性、温度、N_2 或磷酸盐等因素的改变。这些感受器包括肠沙门氏菌的 PhoP/PhoQ 系统以及单核细胞增多性利斯特氏菌的调节基因 *prf A*，*prf A* 能正向调节与胞内生存有关的各种因子(包括利斯特氏菌溶胞素)的表达[168~171]。有人提出 Hsp70 也作为一种应激感受器[172]。

胞内菌广泛的生存因子——热激蛋白

当细菌受到各种应激刺激(如 pO_2、pH 或温度的改变以及各种饥饿现象)的危害时，热激蛋白(heat-shock protein，Hsp)的产生会增多[173,175]。在 MP 内，胞内菌就面临几种应激刺激，它们的应激反应之一就是 Hsp 合成增加[176]。因此，Hsp 表达缺陷的肠沙门氏菌突变体在体内外更易被 MP 杀伤[142,177,178]。Hsp 与蛋白质的折叠和蛋白复合物的装配有关。反过来说，即它们阻碍蛋白质去折叠(unfolding)。当细菌受到吞噬细胞的毒性效应分子攻击时，会产生蛋白质的去折叠和(或)蛋白复合体的分解，而 Hsp 至少可部分阻止其发生。这样，Hsp 以一种普遍的方式促进胞内菌在细胞内的生存。

专职吞噬细胞

单核吞噬细胞

Metchnikoff[179]首先意识到专职吞噬细胞在获得性抗细胞感染中的作用。他观察到白细胞聚集到炎症和细菌生长部位，参与对细菌的吞噬和破坏。Metchnikoff 辨别出有两种类型的吞噬细胞：①一类为先出现的、寿命短的小吞噬细胞(microphage)，现称作 PNG；②另一为后出现的、寿命长的巨噬细胞(macrophage)，现仍用此命名。Koch[180]和 Metchnikoff[179]发现，结核杆菌喜寄居在巨噬细胞中，说明了吞噬细胞在抗胞内菌防御中的重要作用。Metchnikoff 又观察到，在感染期间巨噬细胞被非特异性活化[179]。Lurie[181]进一步证实巨噬细胞活化是获得性抗细菌感染的重要因素，并由 Machaness 和 Blanden[182]证明其受淋巴细胞控制。以后，细胞因

子被证实为巨噬细胞活化的介质[183~186]。

现已清楚，前文提到的、表 40.4 总结的许多抗菌活性不是组成型表达于 MP 内。MP 抗菌活性的充分表达依赖细胞因子适宜的刺激作用，以 IFN-γ 最为重要[93,184,186]。来自不同种属的或处于不同成熟阶段的 MP 其性能具有显著差异。例如，人血液中的单核细胞具有髓过氧化物酶活性，而组织中的巨噬细胞无。鼠 MP 能产生高水平的 RNI，而人 MP 则可能要在某些条件下方产生。MP 活化后，其吞噬作用增强、CR 表达增加、FcR 表达减少、代谢率增高。最为重要的是，巨噬细胞活化期间，分别引发 RNI 和 ROI 产生的 iNOS 和 NADPH 氧化酶也受到刺激。换句话说，细胞因子引起的 MP 活化使 MP 从一个支持微生物繁殖的寄居地变为一个终止或至少限制微生物生存的效应细胞[187]。

多形核粒细胞

尽管 PNG 在抗胞内菌感染中的作用常被忽略，但它们的高度抗菌潜力使其能杀灭许多胞内菌[188,189]。然而，PNG 寿命短暂，且胞内菌常隐藏在胞内的“龛”里不易与之接触，因此 PNG 对胞内菌引起的慢性感染作用不大。但在急性炎症反应早期，它们有助于减少初期的细菌载量[190]。这在实验性利斯特氏菌病（一种急性病）尤其明显：感染第 1 天在利斯特氏菌生长部位就有大量中性粒细胞浸润[87,191]，用单抗消除 PNG 会显著加重病情[192,193]。用单抗处理过的小鼠，其肝部位的利斯特氏菌显著增加，而脾脏无变化。该研究结果显示了 PNG 在早期抗利斯特氏菌中的作用具有器官特异性。

PNG 又是 ROI、次氯酸以及蛋白水解酶[如弹性蛋白酶（一种丝氨酸酶）、胶原酶及明胶酶]强有力的分泌细胞[74,189]。这些分泌产物为破坏组织的介质。在细胞外环境，正常存在的蛋白酶抑制物可阻止这些蛋白酶对组织的破坏。但因同时分泌的次氯酸却灭活蛋白酶抑制物，所以结果是引起细胞溶解。实验性利斯特氏菌病早期形成的炎性肝损害，就是破坏受感染的肝细胞所致[191]。与 PNG 不同，MP 分泌的蛋白酶较少，主要的蛋白酶抑制物次氯酸亦不产生。因此所致病变肉芽肿（如慢性结核病中的增生性肉芽肿）是以 MP 浸润为主，以坏死、纤维化、无组织液化为特征。当再次活动性发作时，PNG 可被募集至结核性肉芽肿部位，使肉芽肿发生干酪样坏死和液化。

T 细胞的主要作用

1346

获得性抗胞内菌免疫主要依赖 T 淋巴细胞，理想的状态是实现对细菌的完全消灭。在机体免疫功能正常的情况下，可很快完成对敏感菌（如单核细胞增多性利斯特氏菌）的清除。对于具有抵抗力的病原菌（如结核分枝杆菌），则通常不能完全消灭它们，而是停留于细菌被遏制于病灶处、其生长受到控制的阶段。肉芽肿性病变可遏制细菌的播散，也可消灭细菌。宿主和病原微生物之间抗争持续的时间越长，肉芽肿就显得越重要。肉芽肿的形成及持久存在受 T 淋巴细胞控制。肉芽肿中 T 淋巴细胞、MP 以及其他细胞之间通过细胞因子相互作用。

T 细胞在抗胞内菌感染中是必不可少的，在 T 细胞免疫缺陷患者（尤其是 AIDS 病人）中结核和其他胞内菌感染的高发病率就是最好的例证。与实验显示的 *nu*/*nu* 和重症联合免疫缺陷（severe combined immunodeficient，SCID）小鼠能短暂抵抗实验性利斯特氏菌病不相抵触[43,194]。尽管这些 T 细胞免疫缺陷小鼠能控制实验性利斯特氏菌病较长一段时间，但它们最终还是不能消灭这些病原菌，终要死于播散性的利斯特氏菌病。

同时，T 淋巴细胞也是胞内菌感染致病的一种不可避免的因素。例如不断扩增的肉芽肿压迫周围组织造成损伤，特异性 T 淋巴细胞可影响被感染宿主细胞的生理功能等。

历史上的观点

自从 19 世纪末，Behring 和 Kitasato 证实免疫动物的血清可经被动转移，在由细菌外毒素引起的疾病中发

挥保护作用后,抗体在抗菌保护中的作用越来越清楚[195]。以后有人提出抗结核免疫可经免疫动物的血清转移,但大多数研究提供了相反的证据[1]。直到20世纪60年代,科学家(以G.B.Mackaness最为著名)才揭示获得性抗胞内菌免疫能够经免疫动物的活淋巴细胞转移[8,182]。Mackaness和他的同事建立了小鼠实验性利斯特氏菌病模型,该模型证明是非常有用的。

静脉注射亚致死剂量单核细胞增多性利斯特氏菌至小鼠后,隔不同时间剖杀小鼠取肝和脾。器官匀浆经一系列稀释后,于琼脂平皿上接种,而后计数活菌数。实验结果是:注射15分钟后,大于95%的利斯特氏菌已从外周血迁移出,这时可在在肝和脾中发现;在细菌数量发生迅速而短暂的下降后,可持续生长直到第4~6天;嗣后,细菌数量迅速减少,第8~10天时已测不出。可见,注射细菌后的第5~6天是一个转折期,此时正是能转移保护性免疫至未免疫正常鼠的特异性T细胞出现之际。以上说明单核细胞增多性利斯特氏菌感染能诱导产生保护性免疫。实验小鼠若能战胜单核细胞增多性利斯特氏菌的初次亚致死性感染,则能抵抗比亚致死剂量高得多的致死剂量的同样活菌的再次攻击(图40.4)。对结核病也可进行类似的研究,但更困难,免疫小鼠和未免疫小鼠之间差异不显著,通常在几周至几月后才能观察到。

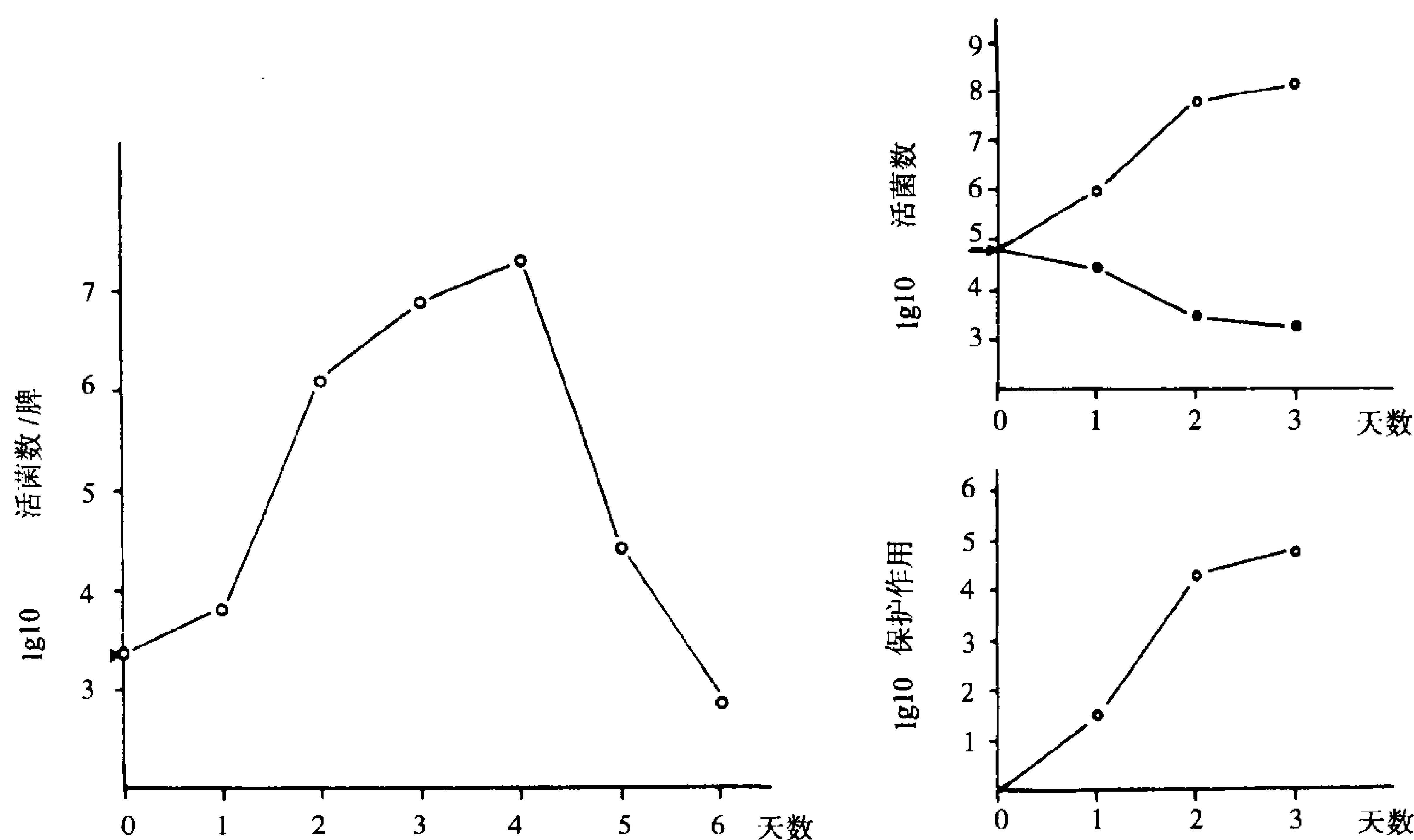


图40.4 小鼠实验性利斯特氏菌病模型的建立过程。左图:感染亚致死剂量(5×10^3 静脉注射)单核细胞增多性利斯特氏菌后发生的初次利斯特氏菌病。通过计数肝和脾中的菌落数(colony-forming unit,CFU)来监测感染情况。图中仅显示脾中的CFU。右上图:未免疫小鼠(空心圈)发生的初次利斯特氏菌病与已免疫(接种)小鼠(实心圈)再次感染致死剂量的单核细胞增多性利斯特氏菌后发生的再次利斯特氏菌病的比较。右下图:未免疫小鼠和接种小鼠在CFU上的差异被称为保护作用。

T细胞亚群

外周T细胞系统包含多种表型不同的T细胞亚群[196,197](表40.5,表40.6)。表达αβ T细胞受体(T-cell recepter,TCR)的T细胞占人类和小鼠外周淋巴器官和外周血中T细胞总数的90%以上。αβ T细胞又进一步分为:①CD4αβ T细胞,识别由MHC Ⅱ类分子呈递的抗原肽;②CD8αβ T细胞,识别由MHC Ⅰ类分子呈递的抗原肽。

1347

毫无疑问,以上所说的这些传统的(conventional)αβ T细胞在抗菌中起主要作用。但除此以外,有证据显示非传统T细胞也参与了对胞内菌的控制[197,198]。它们包括:

①识别由非经典的MHC-Ⅰb类分子呈递的细菌肽的CD8αβ T细胞;

②识别由1类CD1分子呈递的细菌脂类或糖脂的双阴性(double-negative,DN)或CD8αβ T细胞;

③共表达自然杀伤标志、对2类CD1分子特异性的CD4或DNαβ T细胞;

④对以很不同的方式呈递的抗原配体特异性的γδ T淋巴细胞。

表 40.5 抗菌免疫中的传统 T 细胞和非传统 T 细胞

T 细胞群	抗原呈递分子			配体	配体装载场所
	类型	组织分布	多态性		
CD4αβ T 细胞	MHC Ⅱ类	受限制(APC)	高	12～20mer 肽	内体
CD8αβ T 细胞	MHC Ⅰ a 类(+ β_2m)	广泛	高	九肽	细胞溶胶
CD8αβ T 细胞	MHC Ⅰ b 类(+ β_2m)	广泛	低	*N*-甲酰甲硫氨酸五肽	内体、细胞溶胶(?)
DN(CD8)αβ T 细胞	1 类 CD1(+ β_2m)	受限制(APC)	低	脂类、脂聚糖	内体
CD4(DN)αβ T 细胞	2 类 CD1(+ β_2m)	不清楚	低	?	?
DNγδ T 细胞	未知	不清楚	不清楚	磷酸配体及其他	?

表 40.6 抗菌免疫中的传统 T 细胞和非传统 T 细胞

T 细胞群	种 属	主要的体外功能	抗菌保护中的作用	注 释
CD4αβ T 细胞	人、鼠	IFN-γ、CTL	已证实	对“内体病原体”的控制
CD8αβ T 细胞(MHC Ⅰ a)	人、鼠	CTL、IFN-γ	已证实	对“细胞溶胶病原体”的控制
CD8αβ T 细胞(MHC Ⅰ b)	鼠	CTL、IFN-γ	已证实	在鼠利斯特氏菌病中,对其特性有详细描述
DN(CD8)αβ T 细胞	人	CTL、IFN-γ	可能	对分枝杆菌(和相关菌属?)特异;已知配体:霉菌酸、LAM
CD4(DN) αβ T 细胞	人、鼠	IL－4、IFN-γ	未知(调节作用?)	微生物配体未知;很可能识别 CD1,CD1 表达可能受感染影响
DNγδ T 细胞	人	IFN-γ、CTL	已证实(代偿作用、调节作用)	人类系统中的已知配体:异五烯焦磷酸盐和烷基衍生物(存在于原核和真核生物);对磷酸配体具有反应性的鼠 γδ T 细胞未知

传统的 CD4 和 CD8αβ T 细胞

MHC Ⅱ类分子限制性 CD4αβ T 细胞和 MHC Ⅰ类分子限制性 CD8αβ T 细胞均参与了获得性抗胞内菌免疫,这在单核细胞增多性利斯特氏菌感染的小鼠中研究得最多。

①过继转移抗利斯特氏菌免疫,决定于转移的 T 细胞与受鼠者间 MHC Ⅱ类和Ⅰ类基因座的相容性[199～200]。

②用经体外去除 CD4 和 CD8T 细胞的利斯特氏菌-免疫淋巴细胞进行过继转移,则抗单核细胞增多性利斯特氏菌的保护作用将显著减弱[201～204]。

③已从单核细胞增多性利斯特氏菌感染的小鼠中分离出对该菌特异性的、能过继转移保护作用的 CD4 和 CD8T 细胞克隆[205～207]。

④MHC Ⅱ或 MHC Ⅰ类分子缺陷的基因缺失突变小鼠(所谓的 KO 小鼠)分别缺乏传统的 CD4 或 CD8 细胞,均患上了加重的利斯特氏菌病[208]。

大多数胞内菌主要存在于 MP 的吞噬体中,故来自这些病原体的肽易进入 MHC Ⅱ类分子呈递途径(图 40.5)。但一些胞内菌能从吞噬体外逸至细胞溶胶中(见前文)。因此,胞内菌可分为吞噬体病原体和细胞溶胶病原体[209,210]。除立克次氏体属和单核细胞增多性利斯特氏菌是细胞溶胶病原体外,大多数胞内菌属吞噬体病原体[32,149,211]。麻风分枝杆菌和结核分枝杆菌能否在某些特殊情况下离开吞噬体存在争论[145～148,212,213]。显而易见,来自细胞溶胶病原体的抗原易进入 MHC Ⅰ类分子加工(processing)途径,从而活化 CD8 T 细胞[209,211,214～216]。但是,从吞噬体病原体(如牛分枝杆菌和肠沙门氏菌)感染的小鼠中也已分离出 CD8 T 细胞[217～219]。因此推测可能存在不依赖细菌从吞噬体外逸至细胞溶胶而使胞内菌抗原从吞噬体转移至细胞溶胶的途径。

1348

①一些胞内菌(如结核分枝杆菌)具有溶细胞素,从而允许其分泌的蛋白质或肽转移至细胞溶胶,而菌本身不必离开吞噬体[220]。

②含有结核分枝杆菌的早期吞噬体保留有 MHC Ⅰ类分子,可以直接装载上来自结核分枝杆菌的肽[213]。

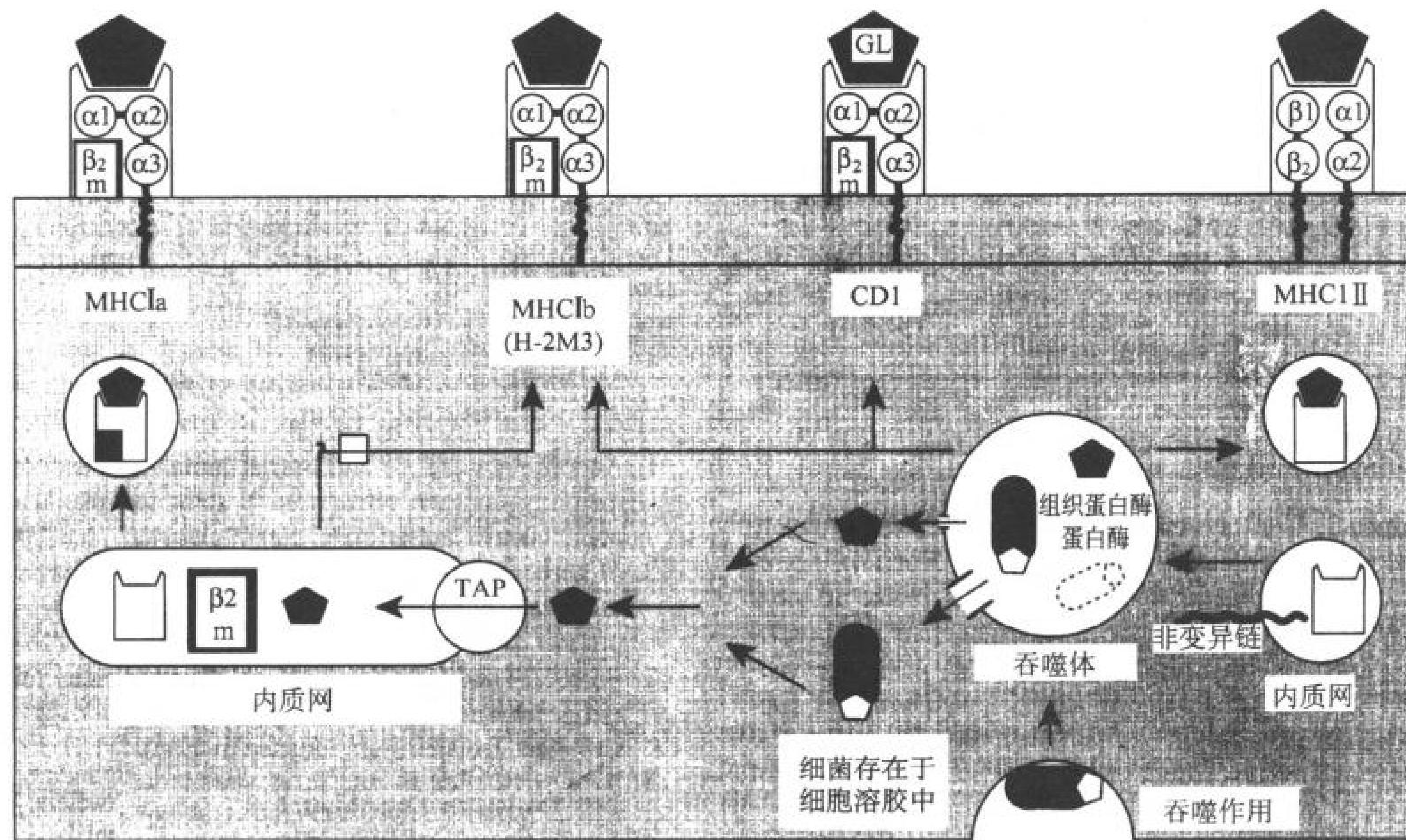


图 40.5　细菌感染期间激活 T 细胞的多种抗原加工途径。注意至少有 3 种不同的呈递分子(MHCⅡ、MHCⅠb 和 CD1)在吞噬体中被装载上抗原肽。GL,糖脂。

③一些吞噬体细菌(如肠沙门氏菌)具有一种特异性的分泌器,可促进细菌蛋白质转移至宿主细胞的细胞溶胶中[15]。

④含菌的吞噬体能够与相应内体充分交流(exchange),从而可使细菌肽装载上来自内体的 MHCⅠ类分子[221]。

⑤来自存在于吞噬体中的细菌的抗原可渗漏(leak)入细胞溶胶中[222]。

⑥来自吞噬体细菌的抗原肽通过被反吐(regurgitation)至细胞外而被装载到膜表面的 MHCⅠ类分子上[221,223]。该途径可能引起旁路细胞致敏[224]。

现在人们不再怀疑存在 MHCⅠ类分子抗原呈递旁路途径[209,224~226]。甚至被杀死的细菌、变性的蛋白质及与惰性颗粒(inert particle)(如乳胶颗粒)结合的蛋白质,也能进入 MHCⅠ类分子途径[224]。但是,不同的 MHCⅠ类分子加工途径在功效方面有显著不同。抗原进入 MHCⅠ类分子"加工机器(processing machinery)"最有效的方式是细菌外逸至细胞溶胶中。因此,细胞溶胶病原体是 CD8T 细胞最强有力的刺激物。而 CD4 T 细胞主要被吞噬体病原体激活。相应地,吞噬体和细胞溶胶病原体分别主要受 CD4 和 CD8 T 细胞控制。

胞内菌也可入侵非专职吞噬细胞。其中一些非专职吞噬细胞不组成型表达 MHCⅡ类分子。因此,这些细胞不被 CD4T 淋巴细胞识别,从而为胞内菌提供了一个藏身之处——这直接影响病程。几乎每个细胞都表达 MHCⅠ类分子,因此 CD8 T 淋巴细胞具有检查整个身体的潜能,这对于那些藏在 MHCⅡ$^-$宿主细胞中的胞内菌尤为重要。显然,对这些细菌的识别依赖 CD8 T 淋巴细胞(可能还有非传统 T 细胞;见后文)。单核细胞增多性利斯特氏菌一方面主要存在于低抗菌潜能的非专职吞噬细胞内;另一方面,可促进 MHCⅠ类分子呈递它的 Ag。这可以解释 MHCⅠ类分子限制性 CD8 T 淋巴细胞在抗实验性利斯特氏菌病中数量和生物学上的优势[208~211]。而牛分枝杆菌则主要存在于 MP 的吞噬体中,这与其主要受 MHCⅡ类分子限制性 CD4 T 淋巴细胞控制相一致[227]。结核分枝杆菌虽然主要存在于 MP 中,但它对抗菌效应机制的高度抵抗力使得对它的控制需要 CD4 和 CD8 T 细胞的协同作用[228,229]。麻风分枝杆菌似乎也是 MHCⅠ类分子限制性 CD8 T 细胞的一种弱刺激物,然而它又存在于各种不同的宿主细胞中。因此,在这种情况下,就会出现很依赖 CD8 T 细胞、但又不足以活化这些细胞的情形。总之,对细菌抗原特异性的 CD4 T 细胞和 CD8 T 细胞表达相似的生物学功能,而靶细胞谱的差异可能具有更大意义。

非传统 T 细胞

近年来，已鉴定出几个非传统 T 细胞亚群，其中一些显示出对细菌配体独特的特异性。一些非传统 T 细胞，不遵循通常的 MHC-肽识别方式，而是直接或以非典型 MHC Ⅰb 类或 CD1 分子-肽复合物形式识别一些独特的配体。某些情况下，这些非传统 T 细胞识别一些细菌独有的配体，提示这些 T 细胞在抗菌中的重要作用，同时也为表明这些非传统 T 细胞是病原菌与它们的哺乳动物宿主之间长期共发展的结果提供了强有力的证据。可以想像，对细菌独有的配体的特异性提供了区别外来入侵抗原和自身抗原强有力的手段。

1349

MHC Ⅰb 类分子限制性 CD8 T 细胞

人们已鉴定出在鼠利斯特氏菌病中具有保护作用的 CD8 T 细胞不受经典 MHC Ⅰa 类分子限制[230,231]。这些 CD8 T 细胞识别由非经典 MHC Ⅰb 类分子呈递的含 *N*-甲酰甲硫氨酸（*N*-formyl-methionine，*N*-f-met）的肽[232,233]。在哺乳动物细胞中，仅有很少的源自线粒体的 *N*-甲酰化蛋白质存在。而相反，许多细菌蛋白含有 *N*-f-met 序列。（而且，含 *N*-f-met 的蛋白质对 MP 和 PNG 具有促炎（proinflammatory）活性；见后文。）这样看来，似乎 MHC Ⅰb 类分子为专门呈递细菌抗原的分子[234]。小鼠 MHC Ⅰb 类分子 H2-M3 的肽结合沟仅可容纳小肽[235]，这与近来鉴定出的来自单核细胞增多性利斯特氏菌的 *N*-f-met 肽是五肽或六肽的结果相吻合，而由 MHC Ⅰa 类分子呈递的通常为九肽[236,237]。与经典 MHC Ⅰa 类分子一样，非经典 MHC Ⅰb 类分子也是与 β_2 微球蛋白（β_2-microglobulin，β_2m）共价结合于细胞表面，但其对 *N*-f-met 肽的呈递则似乎始于吞噬体（图 40.5）[237,238]。与此一致，有文献报道杀死的利斯特氏菌是 H2-M3 呈递的 *N*-f-met 肽的一个来源[238]。通过该途径激活的非传统 CD8 T 淋巴细胞可能具有保护作用，这可用热杀死的单核细胞增多性利斯特氏菌接种诱导产生[239]。但是，有文献报道很可能来自存在于细胞溶胶中的利斯特氏菌的 *N*-f-met 肽也能被装载到 H2-M3 上[238]。MHC Ⅰa 类分子非依赖性 CD8 T 细胞已从感染牛型结核杆菌或用杀死的人型结核杆菌免疫的小鼠中分离出[217]。由此看来，MHC Ⅰb 类分子限制性、*N*-f-met 肽特异性 CD8 T 细胞的活化可能是小鼠胞内菌感染的一个普遍现象。但人类是否也存在一种与此类似的非传统 CD8 T 细胞，还有待研究。

CD1 分子和抗原呈递

CD1 多肽与 MHC Ⅰa/Ⅰb 类分子之间有一些共同特征，但 CD1 基因位于 MHC 之外[240]。一方面，CD1 与 MHC Ⅰa 或Ⅰb 类分子重链间有一些同源性，且 CD1 和 MHC Ⅰ类分子通常都与 β_2m 结合，表达于细胞表面；另一方面，它们独特的功能特征以及基因位于 MHC 之外又决定了 CD1 多肽作为非多态性抗原呈递分子的一个独立家族。人 CD1 分子主要有四种类型（CD1a 到 CD1d ），被分为两类：1 类包括 CD1a/b/c，2 类包括 CD1d。1 类 CD1 分子，主要表达于传统的抗原呈递细胞（antigen-presenting cell，APC）上，能够呈递分枝杆菌的糖脂和脂类抗原给 T 细胞[241~243]。2 类 CD1 分子的分布及功能不是很清楚[240]。但是，2 类 CD1 分子已经从许多宿主细胞上鉴定出。在小鼠中仅存在 2 类 CD1 分子（称 CD1.1 和 1.2）。这些 2 类 CD1 分子被鼠 NK T 细胞识别，描述见后[244]。近来更多的证据显示所有的 CD1 分子都是形成一个疏水性沟槽（cleft），可容纳疏水肽或脂类-脂聚糖[245]。

1 类 CD1 分子限制性双阴性或 CD8 T 细胞

人类 DN 或 CD8 表型的非传统 αβ T 细胞具有识别由 CD1 分子呈递的分枝杆菌的脂类或糖脂的独特能力[241~243]。1 类 CD1 分子呈递抗原始于晚期内体中（图 40.5）[241,242,246]。现已鉴定出两个分枝杆菌配体，它们是来自结核分枝杆菌的霉菌酸和来自麻风分枝杆菌的 LAM[241,242]。两个分子都是分枝杆菌以及一些相关菌属（如诺卡氏菌属和棒状杆菌属）细胞壁的重要成分[247]。来自不同菌属的类脂结构不同，显然被不同的 TCR 识别[242]。这些糖脂特异性的非传统 αβ T 细胞产生 IFN-γ、溶解靶细胞，强烈提示它们参与了抗感染免疫。未从小鼠中鉴定出类似的 T 淋巴细胞，可能是由于该种属缺乏 1 类 CD1 分子。由于缺乏适宜的小鼠模型，因

此 1 类 CD1 分子限制性 T 细胞在抗菌免疫中的明确作用还不清楚。但是,有关人类 T 细胞的资料证明病原菌对 T 淋巴细胞系统的进化有最重要的影响,这显然可能导致产生对细菌组分具有高度特异性的高度特化的 T 细胞亚群。

对 2 类 CD1 分子特异性的自然杀伤 T 细胞

已从小鼠中鉴定出共表达 αβ TCR 和 NK 细胞标志 NK1 的淋巴细胞[244]。因此,这些细胞与 NK 细胞和 αβ T细胞有共同的表型特征。这些 NK T 细胞是对 2 类 CD1 分子(仅有的在小鼠中存在的 CD1 分子)特异性的 T 细胞[248~251]。已知 CD1d 和高疏水肽结合,并显然能被 T 细胞识别[245],但仍不知 NK T 细胞是直接识别 2 类 CD1 分子还是识别由这些分子呈递的自身或非自身配体[244]。因此,不清楚来自胞内菌的抗原是否能被 2 类 CD1 分子呈递。用一个限制性的 TCR 库和恒定的 $V_{\alpha}14/J_{\alpha}281$ 链,将得出与之一致的结果:直接识别 CD1 或识别高度保守的抗原配体[244]。有可能感染因子调节 2 类 CD1 分子的表达,从而间接影响对 NK T 细胞的刺激作用[252]。含有长链脂肪酸和鞘氨醇碱的糖基神经酰胺(glycosylceramide)已被证实为鼠 NK T 细胞的配体[252a]。因为这些化合物在哺乳动物和细菌中少有,所以 NK T 细胞的自然配体是在宿主里、或是在入侵的病原体里、或是二者中都有,还需进一步鉴定。迄今为止,提示 NK T 细胞具有抗感染免疫作用的证据来自通过 TCR 对它们的刺激作用下,其强有力的、快速的细胞因子的产生,并且偏向于产生 IL-4[253]。下面将更详细地讨论到,这些细胞可能因此而参与抗感染免疫的调节。尽管对 NK T 细胞特性的描述主要限于小鼠系统,但表达同源性的恒定 V_{α} 链的人类 T 淋巴细胞已有报道[244]。因此,类似的细胞可能也存在于人类。

1350

γδ T 细胞

在人类外周血和淋巴器官中有一占少数的 T 细胞亚群,表达由 γ 链和 δ 链组成的 TCR。虽然 γδ T 细胞在抗菌免疫中的作用还未被完全揭示,但近年来有证据表明 γδ T 细胞在抗菌免疫中有重要作用[254]。

健康人外周血中的 γδ T 细胞在体外能对分枝杆菌组分发生强烈反应[255~257]。该组分系一种小分子质量的、主要由磷酸盐组成的非蛋白分子[258~262]。异五烯焦磷酸盐和烷基衍生物因此被定义为天然配体,其他组分包括磷糖、磷酸酯及核苷酸可能也作为抗原配体。这些磷酸配体刺激人类 γδ T 细胞的主要亚类(表达 $V_{\gamma}2$ $V_{\delta}2$TCR)。尽管是寡克隆活化,但还是需要一个保守的 TCR 结合位点来刺激。异五烯焦磷酸盐代表了原核生物和真核生物中普遍存在的各种代谢产物的前体,它在宿主细胞膜上被呈递给 γδ T 细胞,不依赖 MHC 或 CD1 抗原呈递分子[263]。对这些研究结果最可能的解释是 TCRγδ 直接识别磷酸配体。与人类系统相反,鼠 γδ T 细胞不对这些磷酸配体发生反应[254,264]。

用 γδ T 细胞缺陷的 TCR δ 基因缺失突变小鼠或用抗 γδ TCR 单抗处理过的小鼠进行研究,提示 γδ T 细胞在抗利斯特氏菌保护中有一定的辅助作用[265~268]。在 γδ T 细胞缺陷的 KO 小鼠中可观察到 γδ T 细胞缺陷更深刻的影响,该小鼠死于结核分枝杆菌的高接种物[269,270]。现在,可以有把握地说,γδ T 细胞参与了抗菌免疫。但是,在多数情况下,它们似乎是执行辅助作用,而不是起主要作用。

在炎症部位常常发现 γδ T 细胞数量增加,尤其在处于反应期的麻风病人病变处以及麻风菌素诱发的 DTH 反应部位[271]。感染胞内菌(单核细胞增多性利斯特氏菌或结核分枝杆菌)的 TCR δ KO 小鼠,不产生代表胞内菌感染特征性的肉芽肿[267,269,270],而是出现炎性的脓肿样病变,使人联想起对化脓性胞外菌特征性的组织反应。综上所述,这些研究结果表明了 γδ T 细胞在炎症中的调节作用,尤其在肉芽肿形成中。

γδ T 细胞的活化早于 αβ T 细胞,因而它们具有填补早期先天免疫系统介导的非特异性抵抗和后期 αβ T 细胞介导的高度特异性获得性免疫应答间的"空隙"(gap)的作用。但 γδ T 细胞的主要作用似乎是调节作用,尤其是它们似乎能在微生物植入部位(如肉芽肿形成处)调节炎症反应。人 $V_{\gamma}2V_{\delta}2$ T 细胞对普遍存在的磷酸配体的识别与这些细胞在感染期间对炎症及维持自身稳定的调节作用相一致。尽管 γδ T 细胞仅代表外周血和淋巴器官中全部 T 细胞的少数,但病原菌能活化高数量的 γδ T 细胞。与抗原特异性 αβ T 细胞的克隆活化相比,磷酸配体可寡克隆活化约 80% 的 γδ T 细胞。在 αβ T 细胞完全缺乏时,γδ T 细胞能承担 αβ T 细胞

在正常情况下执行的生物学功能。因此，γδ T 细胞具有高度的代偿可塑性。

在人和小鼠的黏膜上皮，γδ T 细胞占全部 T 细胞的大部分[272]。因为黏膜上皮是许多胞内菌进入的主要门户，所以可以推测肠和肺上皮内的 γδ T 细胞具有第一道防线的作用。这虽然是一个能引起人们兴趣的推测，但还缺乏有说服力的证据支持。

T 细胞在感染过程中的作用

T 细胞的功能

一般来说，T 淋巴细胞主要执行三个功能：溶细胞功能和 T 辅助(T helper，Th)1 型或 2 型功能。Th 细胞可产生多种细胞因子，Th1 细胞主要分泌 IL-2 和 IFN-γ，Th2 细胞主要分泌 IL-4 和 IL-5[273]。CTL 通过直接接触感染靶细胞而使之溶解[274]。原则上，前面提到的每一种 T 细胞亚群都能执行多种生物学功能，但有一定程度的偏向性。CD8T 细胞(MHCⅠa 类或 MHCⅠb 类分子限制性)偏向于溶细胞作用[275]。CTL 在抗单核细胞增多性利斯特氏菌中的作用已被 CTL 功能缺陷的 KO 小鼠所证实[276]。CD4T 细胞和 γδ T 细胞是典型的产生细胞因子的 Th 细胞。同样地，人的 1 类 CD1 分子限制性 αβ T 细胞和鼠的 2 类 CD1 分子特异性 NK T 细胞也是强有力的产生细胞因子的细胞。分泌 IFN-γ 的 Th1 细胞在获得性抗胞内菌免疫中具有最重要的作用。而与 Th1 细胞相反，Th2 在获得性抗胞内菌免疫中的作用不显著。但如果 Th2 细胞活化欠缺，则疾病会加重。

传统 T 细胞和非传统 T 细胞对保护作用的贡献：提示疫苗设计

以上所述的研究结果强调多种不同的 T 细胞亚群参与了宿主抗菌应答。但毫无疑问，不同 T 细胞亚群其贡献有大小之分，其中传统的 CD4 和 CD8 αβ T 细胞最重要。而占少数的非传统 T 细胞可能对其进行有效的控制。这可能在对付具有高度抵抗力的细菌(如结核分枝杆菌)时尤其重要。因此，尽管我们对非传统 T 细胞的了解有限，但它们参与抗胞内菌免疫应答的事实不再被忽视。DNαβ T 细胞对某些细菌独特组分的特异性以及 γδ T 细胞对生物圈普遍存在的组分的寡克隆反应性，说明了抗感染免疫应答的柔性。原则上，每一种 T 细胞亚群都能表达与抗菌免疫相关的多种生物学功能。因此，如果认为高度的免疫功能冗余是一种不充分的解释，那么就必然存在差异。这些差异如下。

1351

①限制性分子的组织表达不同(MHCⅠ类分子广泛分布，MHCⅡ类分子和 1 类 CD1 分子主要表达于 APC)。

②抗原加工途径的起始部位不同(MHCⅠa 类分子加工途径始于细胞溶胶；MHCⅡ、MHCⅠb 类及 1 类 CD1 分子加工途径始于内体)。

③活化的动力学不同(γδ T 细胞常先于传统的 αβT 细胞)。

④抗原配体的物理化学性质不同(肽由 MHCⅠ和 MHCⅡ类分子呈递；糖脂由 CD1 分子呈递；磷酸配体被 γδ T 细胞直接识别)。

与抗菌免疫有关的 T 细胞群谱的鉴定以及刺激性抗原配体的特性是合理设计有效的胞内菌疫苗的基础。关于传统 CD4 和 CD8 T 细胞的活化，两个主要的问题值得特别思考(图 40.6)：第一，病原菌在宿主细胞内的定位影响 CD4 或 CD8 T 细胞对抗菌保护作用的贡献。因此，若所用疫苗偏爱存在于内体，则主要活化 CD4 T 细胞，而可能不足以控制主要应由 CD8 T 细胞对付的病原菌[277]。这种矛盾可解释 BCG 对结核病的低效力。然而，如前文所讨论的，存在替代途径允许来自内体疫苗的抗原进入 MHCⅠ类分子“加工机器”。第二，以分泌型还是菌体型展示(display)抗原对疫苗的效力有深刻影响[278]。文献报道，只有当肠沙门氏菌疫苗载体以分泌型展示利斯特氏菌抗原时，才能诱导抗单核细胞增多性利斯特氏菌感染的保护作用。因为胞内菌能在静止的巨噬细胞内生存，所以在感染早期主要是其分泌的蛋白质抗原被呈递。因此，在感染早期仅有针对这些分泌型抗原的 T 细胞能被活化。一旦 MP 被 T 细胞活化，它们能杀伤和降解这些胞内病原体，从而菌体蛋白质抗原可被呈递。因此，在感染后期，产生对菌体抗原的 T 细胞应答。因为有效的疫苗应该是在感染后能立刻激活 T 细胞应答，所以分泌型蛋白质是比菌体蛋白质更好的疫苗抗原候选者。由 MHCⅠb 类

或 1 类 CD1 分子呈递抗原配体有两个潜在的优点：第一，MHC Ⅰb 类或 1 类 CD1 分子的非多态性特征避开了由疫苗的遗传变异所带来的问题(即由具有高度多态性的经典 MHC 分子提呈肽时将会遇到的问题)。第二，由于宿主细胞缺乏由 MHC Ⅰb 类或 1 类 CD1 分子呈递的这些抗原配体，因此显著减少了自身免疫应答发生的危险性。显然，对抗原加工及不同 T 细胞亚群活化机制的揭示将促进胞内菌疫苗的合理设计。

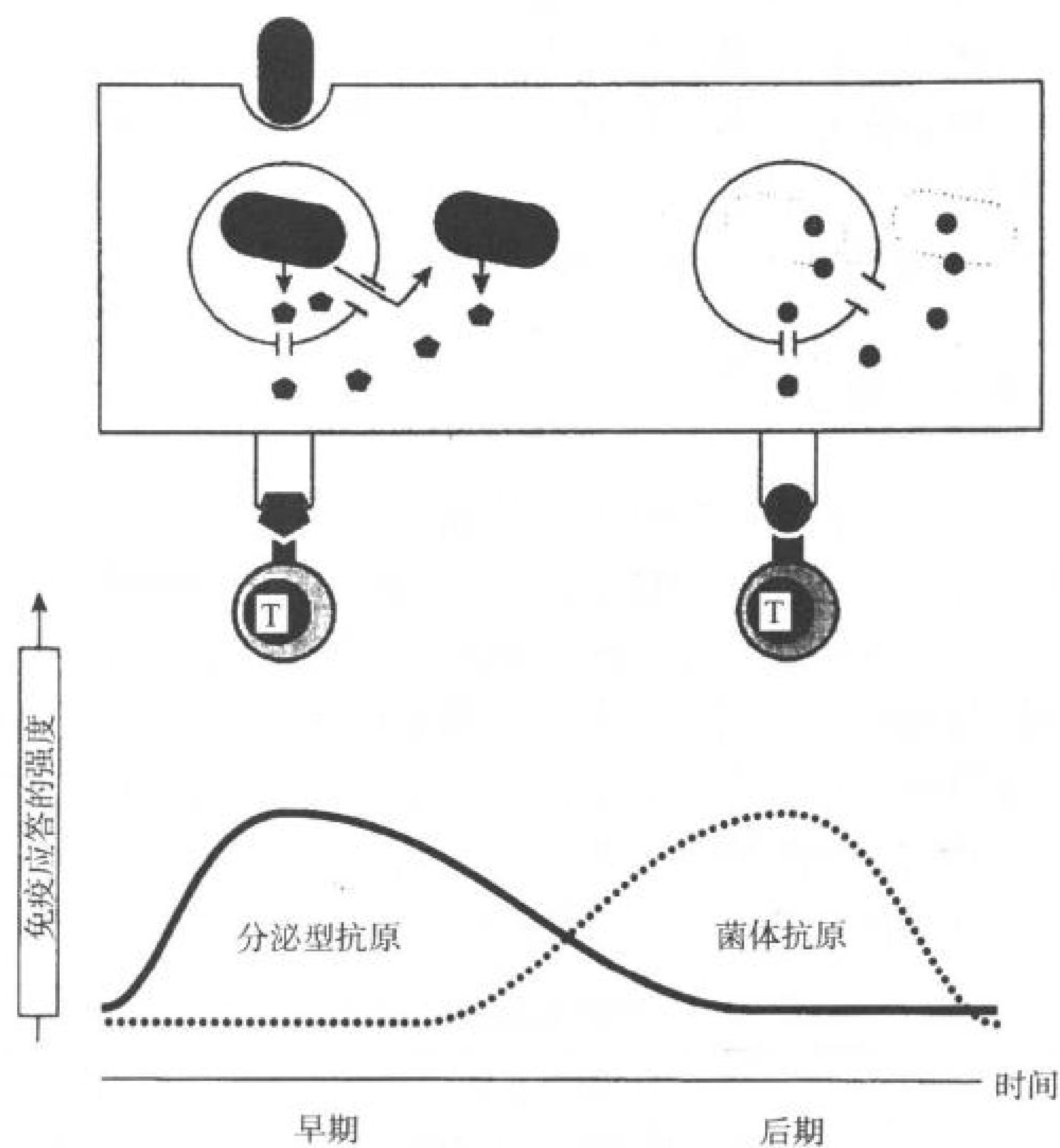


图 40.6　胞内定位和抗原展示对保护性 T 细胞应答的影响。

感染的动力学

胞内菌感染过程可分为三个阶段(图 40.7)。在每个阶段，产生的细胞因子执行两个功能：①执行效应功能，减少微生物载量；②表达调节功能影响后续的感染过程[279,280]。微生物进入后数分钟之内，即开始了感染早期，此期主要是先天免疫系统的细胞起作用，尤其是 PNG 和 MP，它们被趋化因子和促炎细胞因子吸引至细菌繁殖部位。PNG 和 MP 对病原菌的吞噬作用及胞内杀伤可能代表了早期主要的效应功能。早期产生的细胞因子

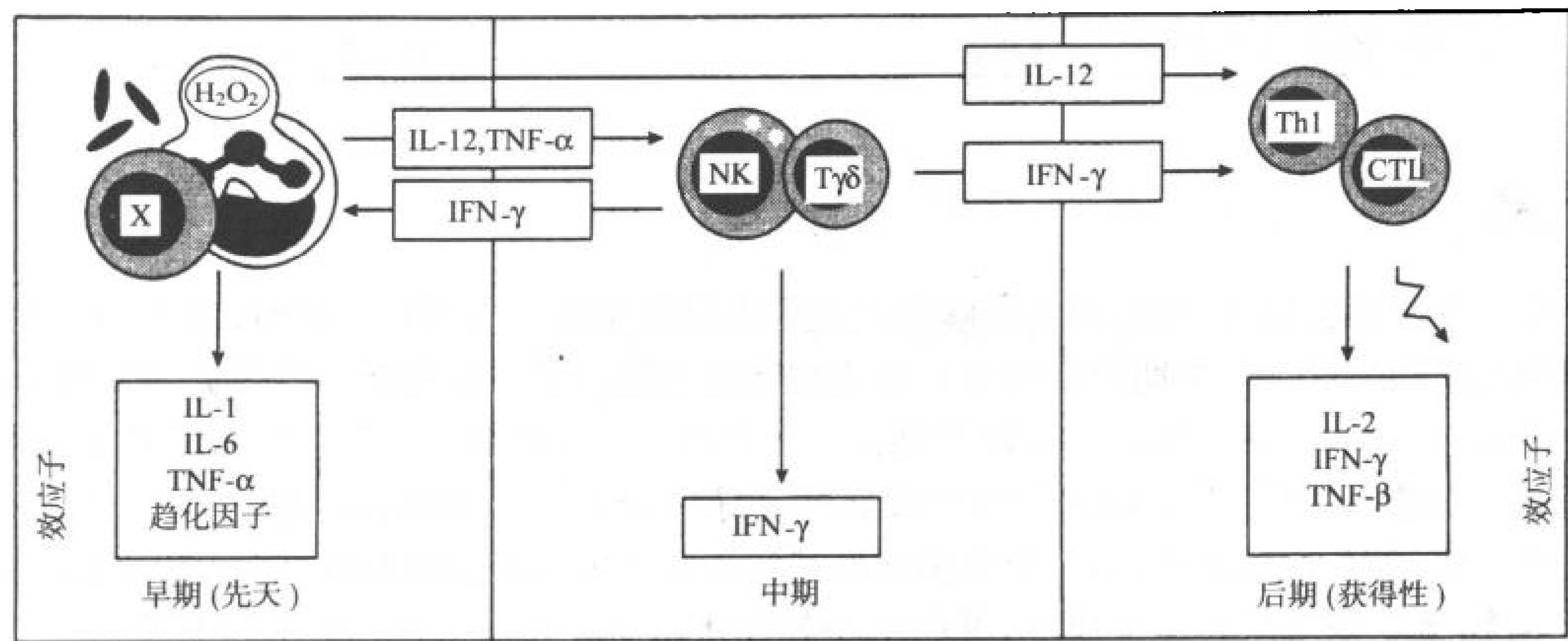


图 40.7　抗胞内菌免疫应答的三个阶段。

(主要是 MP 产生的 IL-12)通过促进具有保护作用的获得性免疫应答的产生而影响后续阶段。中期以 NK 细胞和 γδ T 细胞为特征,二者均产生 IFN-γ。它联系着早期(先天)和后期(获得性)免疫应答。在后期,αβT 细胞主要在肉芽肿性病变中动员和维持宿主的防御机制方面起作用,从而能够有效控制、甚至完全消灭病原体。

各阶段的时间长短和重要性受胞内菌类型的显著影响。对于小鼠实验性利斯特氏菌病,宿主应答的整个过程持续少于 10 天;而对于人结核病,这个过程可能持续几年。早期对单核细胞增多性利斯特氏菌的控制特别重要,因其迅速分裂,且此时对胞内杀伤作用也高度敏感。而更加强健的、分裂更慢的结核分枝杆菌则不易受到早期应答的攻击。中期受先天和获得性免疫应答强度的显著影响。早期和后期之间的间隔越长,中期就越重要。对于 T 细胞缺陷小鼠(如 nu/nu 小鼠、SCID 小鼠或 RAG KO 小鼠),则不出现后期。因此,中期不得不为此作出代偿[43,281]。这些小鼠为分析 NK 细胞在抗菌免疫中的作用提供了有用的模型。

细胞因子在抗菌防御中的作用

细胞因子在抗胞内菌中具有重要作用(表 40.7)。在各个阶段,细胞因子执行调节和(或)效应功能。虽然细胞因子是控制感染所必不可少的,但它们也能对宿主造成伤害。为避免这种有害的结果,在感染后期需下调免疫应答。用细胞因子特异性抗体中和细胞因子或应用缺乏某种细胞因子或细胞因子受体基因的 KO 小鼠,可深入研究单一细胞因子的作用。对病变(尤其是来自麻风患者的病变)中细胞因子的鉴定,提供了关于细胞因子在抗菌免疫中作用的进一步信息。细胞因子控制以下抗感染免疫应答步骤:①白细胞募集至细菌聚集部位;②肉芽肿性病变的形成;③细菌繁殖处 MP 抗菌功能的活化;④保护性 T 细胞应答的诱导;⑤下调宿主抗菌应答,避免过强的免疫应答对宿主产生有害的后遗症。

表 40.7　抗菌免疫中的细胞因子

细胞因子	对抗菌保护作用的贡献	主要产生细胞	主要功能
趋化因子	可能	上皮细胞、内皮细胞、巨噬细胞、PNG	白细胞募集和活化
IL-1	重要作用(已证实)	巨噬细胞	白细胞募集以及对白细胞的刺激作用
IL-6	主要作用(已证实)	巨噬细胞、T 细胞	白细胞募集、T 细胞分化
TNF-α	主要作用(已证实)	巨噬细胞、肥大细胞	白细胞募集、NK 细胞活化、肉芽肿形成、与 IFN-γ 的协同刺激作用
IFN-γ	主要作用(已证实)	Th1 细胞、NK 细胞	巨噬细胞活化、肉芽肿形成
IL-12	重要作用(已证实)	巨噬细胞	刺激 Th1 细胞、NK 细胞
IL-18	可能(未证实)	巨噬细胞	刺激 Th1 细胞
IL-4	加重病情	NKT 细胞、Th2 细胞、嗜碱性粒细胞(?)、嗜酸性粒细胞(?)	抑制 Th1 细胞
IL-10	加重病情	巨噬细胞	抑制巨噬细胞
TGF-β	可能加重病情(未证实)	巨噬细胞	抑制巨噬细胞

白细胞募集

在特异性 T 淋巴细胞出现之前,炎性吞噬细胞先汇集至微生物入侵部位。此时,细胞因子主要由 MP 以及上皮细胞和内皮细胞产生。早期产生的具有效应功能的细胞因子主要包括一些促炎细胞因子如肿瘤坏死因子(tumor necrosis facor, TNF)、IL-1、IL-6 以及仍在扩大的趋化因子家族[282~288]。趋化因子超家族包含 50 多个相关的小分子质量多肽[288~290]。据保守的半胱氨酸基序可分为三个亚组:CC 趋化因子,含两个未分开的末端半胱氨酸残基;CXC 趋化因子,由一个非保守氨基酸将两个末端半胱氨酸残基隔开;C 趋化因子,仅有一个末端半胱氨酸,至今该组只有一个成员(淋巴细胞趋化蛋白,lymphotactin)。据不同的趋化因子受体,趋化因子家族可进一步分组[291]。CC 趋化因子(也称作 β 趋化因子)主要作用于 MP,而 PNG 主要被 CXC 趋化因子活化(也称作 α 趋化因子)。这些趋化因子也可作用于其他白细胞(包括淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性

1353

粒细胞)。C 趋化因子(γ 趋化因子)即淋巴细胞趋化蛋白,主要募集淋巴细胞。

表明趋化因子在抗胞内菌防御中具有重要作用的明确证据仍旧缺乏,但可推想其在宿主防御的早期动员中起重要作用[292,293]。文献报道缺乏 CC 趋化因子 MCP-1 受体的 KO 小鼠显示出对利斯特氏菌病的易感性增加[291a]。在其他系统的实验也揭示趋化因子在早期炎症中起主要作用,尤其对于 PNG 和单核细胞的外渗(见图 40.10)。此外,一些趋化因子可活化专职吞噬细胞,由此可能促进早期细菌载量的减少。促炎细胞因子 IL-1、IL-6 及 TNF 也与炎性吞噬细胞在细菌生长部位的早期聚集有关[282~285,287]。IL-6 和 TNF 在抗菌免疫中起主要作用已被 IL-6 或 TNF1 型受体(TNF-R1)基因缺陷的 KO 小鼠对利斯特氏菌病和结核病高度易感的实验显著证实[294~299]。当这些促炎细胞因子大量产生时,可通过诱导各种血浆蛋白从肝细胞释放而引起急性期反应。但另一方面,它们作为内源性致热源可引起发热,TNF 还与恶病质(为许多胞内菌感染引起消瘦的一个典型特征,尤其在结核病)的发生有关。临床试验显示在结核和麻风病患者中,TNF 的过度产生引起的有害影响,可经反应停治疗而好转,这强调了 TNF 在慢性感染中作用的两面性[300~302]。

肉芽肿形成

用 IFN-γ 或 TNF-R1 基因缺陷的 KO 小鼠所做的实验,强调了 IFN-γ 和 TNF 在结核病肉芽肿形成中的作用[299,303,304]。虽然两种突变小鼠均发生了坏死性病变,但显然不能遏制结核杆菌,结果导致了播散性的结核病。人类遗传性 IFN-γR 缺陷已有报道,这些免疫缺陷患者易遭受严重的胞内菌感染,并最终死于胞内菌感染[305,306]。这种高度易感性伴有肉芽肿形成减弱。而相反的,已有证据显示转化生长因子 β(transforming growth factor-β,TGF-β)和 IL-10 具有阻碍肉芽肿形成的作用[307~311]。这些细胞因子可能通过阻止大量病变的形成而使免疫病理减小到最低的程度。但过早抑制肉芽肿形成可影响最佳的保护作用。由于麻风病变相对容易接近,从而常常能使人们从中获得对细胞因子在肉芽肿性病变中作用的补充性认识。对结核样型麻风病变处细胞因子 mRNA 的分析,发现有大量的 IL-1、TNF、粒细胞-巨噬细胞克隆刺激因子(GM-CSF)、TGF-β、IL-6、IL-2、IL-12 及 IFN-γ mRNA,提示这些细胞因子与对肉芽肿持久存在的控制有关[311~313]。而相反的,IL-4、IL-5 及 IL-10 含量低至检测不出。但它们在瘤型病变中相对高,提示这些细胞因子对肉芽肿有下调作用。

巨噬细胞活化

细胞因子活化巨噬细胞抗菌能力是获得性抗胞内菌中极为重要的一步。对此用鼠巨噬细胞在体外进行了大量研究,证实 IFN-γ 是 MP 活化的主要细胞因子[314~316]。IFN-γ 活化的巨噬细胞能迅速杀死易感胞内菌(如单核细胞增多性利斯特氏菌)[317]。IFN-γ 活化的 MP 能否杀死结核分枝杆菌还存在争论,但它们能显著抑制这些病原菌的生长[314,318]。RNI 是活化 MP 对抗大多数胞内菌的主要抑菌-杀菌效应子[126,132],尽管一些病原菌可能对 ROI 更敏感。IFN-γ 活化的 MP 常产生 TNF,TNF 能与 IFN-γ 协同活化巨噬细胞的抗菌功能[319]。与 IFN-γ 在抗菌免疫中的重要作用相一致,IFN-γ 或 IFN-γR 缺陷的 KO 小鼠会很快死于单核细胞增多性利斯特氏菌、结核分枝杆菌、肠沙门氏菌或其他一些胞内菌感染[303,304,320~322]。对细胞因子活化人类 MP 抗菌功能的了解不多。首先,对于人类 MP 能否产生高水平 RNI 还存在争论。尽管近来更多的资料显示,来自传染病患者的 MP 能合成多量 RNI[126,132,138]。第二,IFN-γ 不能持续诱导人类巨噬细胞对结核杆菌的抑制作用[323~326]。在 IFN-γ 与 TNF 的协同刺激作用下,人 MP 表现出一定程度的结核杆菌抑制作用[323]。若再加入 1,25-二羟维生素 D3(维生素 D3 生物活性代谢物),则表现出最大的结核杆菌抑制作用[323~326]。维生素 D3 可从食物中摄取或经日光中的紫外线照射皮肤后产生[327]。经 1α 羟化作用,维生素 D3 转变为它的循环代谢物 1α-羟维生素 D3。再在 C25 发生羟化作用,则生成生物活性成分 1,25-二羟维生素 D3。巨噬细胞具有 1α-羟化酶活性,并受 IFN-γ 控制。因此很可能 IFN-γ 能在原位诱生自分泌 1,25-二羟维生素 D3,而在某种体外系统中则失去该作用。遗传性 IFN-γR 缺陷的青少年死于各种胞内菌感染或者甚至是牛分枝杆菌 BCG 接种,又进一步支持 IFN-γ 在人类对胞内菌感染的控制中起主要作用[305,306]。而且,IFN-γ 作为化学治疗的辅助手段,已成功地用于麻风病、结核病及非典型分枝杆菌病的治疗[328~331]。因此,IFN-γ 在人类抗胞内菌防御中

也起主要作用。该细胞因子可由不同细胞产生,按细胞浸润至病变的先后顺序,依次是 NK 细胞、$\gamma\delta$ T 细胞以及 CD4、CD8$\alpha\beta$T 细胞或 DN$\alpha\beta$T 细胞[43,206,266,332,333]。在小鼠实验性利斯特氏菌病,感染后第一天 NK 细胞就产生 IFN-γ,第二天出现产生 IFN-γ 的 $\gamma\delta$ T 细胞,分泌 IFN-γ 的 CD4 和 CD8$\alpha\beta$T 细胞在第 5 天出现(图 40.7)。

诱导保护性 T 细胞应答

免疫应答的类型在细菌进入宿主后很快就被决定了,由此感染的过程以及最终的结局也因此而被决定了[280]。IL-12 是保护性免疫应答的重要启动子[334,335]。感染胞内菌的巨噬细胞很快产生 IL-12,IL-12 能活化 NK 细胞、刺激 Th1 细胞成熟[334~337]。二者的结果则是 IFN-γ 产生。感染巨噬细胞产生的 TNF-α 与 IL-12 协同作用活化 NK 细胞,活化 NK 细胞产生的 IFN-γ 又通过正反馈机制进一步促进 IL-12 的分泌[338]。在弱刺激力微生物感染的情况下,相当量的 IL-12 的分泌可能需要 IFN-γ[339~341]。在鼠利斯特氏菌病, IL-12 显然对于保护性初次免疫应答的产生是必不可少的,但对于已接种小鼠再次接触单核细胞增多性利斯特氏菌则显示部分 IL-12 非依赖[342]。同样地,对于抗结核免疫,IL-12 似乎很重要,但又不是绝对需要[343,344,344a]。这些研究结果与 IFN-γ 的诱生完全依赖 IL-12 的观点存在争论。近来鉴定出的细胞因子 IL-18[IFN-γ 诱生因子(IFN-γ-inducing factor, IGIF)]可能与此部分 IL-12 非依赖有关[345]。与在小鼠中的研究一致,IL-12 固有缺陷的病人 IFN-γ 滴度低,并伴有播散性的鸟分枝杆菌感染[346]。

下调宿主抗菌应答以避免有害的后遗症

产生 IL-4 的 Th2 细胞在胞内菌感染中通常活化不显著。但是在感染期间有与抗感染作用相反的细胞因子产生。感染发生后 IL-10 很快分泌,可能控制 Th1 细胞的产生[338,347]。在对细菌感染的应答中,鼠和人的巨噬细胞均在产生 IL-12 的同时伴随产生 IL-10。而且发现 IL-10 减少 IL-12 的分泌,从而必然地 IFN-γ 的产生也减少[334,335]。与 IL-10 在抗菌免疫中的下调作用一致,IL-10 缺乏的 KO 小鼠能更有效地控制利斯特氏菌病,这与包括 IL-12 和 IFN-γ 在内的与保护作用有关的多种细胞因子的产生增加有关[348]。在鼠弓形体病,IL-10通过阻止因 IL-12 和 IFN-γ 的过度作用而引起的免疫病理的产生,从而在抗微生物免疫的控制上起重要作用。一旦病原菌被成功战胜,继续进行的免疫应答则必须被限制,以避免对宿主的严重伤害。在某种系统中,在病原菌慢性感染的后期,已检测到产生 IL-4 的 Th2 细胞,可能对抗分泌 IFN-γ 的 Th1 细胞的作用[349,350]。TGF-β 和 IL-10 使巨噬细胞去活化以及对 Th1 细胞的抑制作用可对此起进一步的作用[308,309,319,338,351,352]。尽管对抗感染免疫应答的下调作用被大大地忽视了,但它可能是使活化的免疫应答回复到正常水平所必须的。另一方面,在病原菌被成功击败前,过早调动免疫下调机制,可导致疾病加重。在后面将讨论到,这种异常情况可导致形成瘤型麻风。

胞内菌感染中 Th1 细胞的作用优势超过 Th2 细胞:先天免疫系统的影响

感染因子进入宿主机体后究竟诱发产生 Th1 抑或 Th2 细胞作为最适宜的防御机制则视其种类而定(图 40.8)[273,280,353]。Th1 和 Tt2 细胞都来自共同的前体细胞(称作 Th0),Th1 细胞主要分泌 IFN-γ 和 IL-2,Th2 细胞主要产生 IL-4 和 IL-5[354,355]。Th1 细胞主要在抗细菌、原虫及真菌等胞内病原体感染中起作用,而 Th2 细胞主要在抗蠕虫感染中起作用[273,356,357]。对于存在于胞外环境中的细菌和病毒也主要由 Th2 细胞起作用。不受控制的 Th1 或 Th2 细胞应答将分别引起自身免疫性疾病或变态反应性(allergic)疾病。Th1 和 Th2 细胞是以产生细胞因子的不同来区分的,但这个区分并不是绝对的。区分 Th1 和 Th2 细胞的稳定的表面标志还未被明确鉴定出[355]。有人提出 CD30 为人 Th2 细胞的特征性标志,但发现产生 IFN-γ、对胞内菌具有反应性的 Th 细胞也共表达 CD30,因此表明至少在胞内菌感染中,该分子不能作为 Th2 细胞的特异性标志[358,359]。近来更多的证据提示 IL-12 受体的 β2 链(IL-2Rβ2)可区分人和鼠的 Th1 细胞[360,361]。

Th1 和 Th2 细胞的分化经历了几个阶段,在微生物进入宿主后迅速被发动(图 40.8)。在 Th1 和 Th2 细

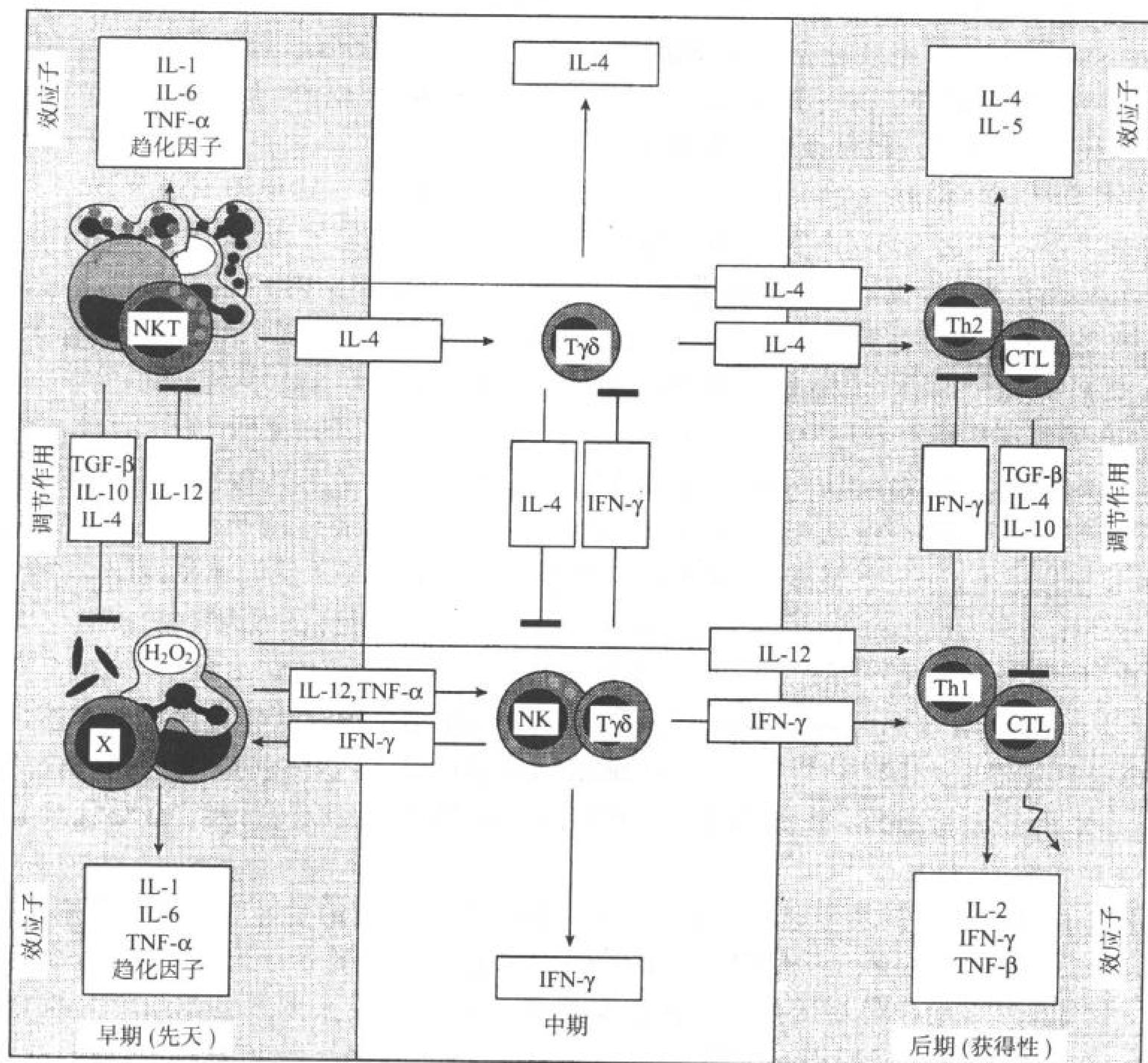


图 40.8 在抗胞内菌免疫应答的三个阶段,Th1 细胞的作用优势超过 Th2 细胞。

胞因子相反的调节作用下,向 Th1 或 Th2 的极化(polarization)逐渐变得更稳定[273]。现已清楚,先天免疫系统通过与微生物组分迅速反应,决定了恰当的免疫应答的产生[280]。因此,如果先天免疫系统对感染因子的识别欠缺则将导致不恰当的免疫应答产生,从而使感染加重,而不是产生保护作用。这在感染胞内病原体大利什曼原虫的小鼠模型中研究得最为清楚[362]。当 C57BL/6 小鼠感染大利什曼原虫后,产生强有力的 Th1 应答,从而被保护;而相反的,BALB/c 小鼠感染大利什曼原虫后,则产生 Th2 应答,并伴有对利什曼病的易感性增加。

如上所述,几乎所有胞内菌感染都是产生强有力的 Th1 应答,而几乎缺乏 Th2 应答。有些人甚至提示由这些感染引起的优势 Th1 应答能够拮抗变态反应性疾病的发生[363]。仅在麻风病发生向具有抵抗力的结核样型极或易感的瘤型极两个方向的极化。一些证据提示 Th1/Th2 二分法至少是该极化的部分基础。

在抗感染免疫的不同阶段,优势 Th1 应答是怎么实现的呢?在感染早期,微生物进入宿主后,巨噬细胞迅速产生 IL-12,作为 Th1 细胞产生的主要信号[334,335]。而可能由嗜碱性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和 NK 细胞迅速分泌的 IL-4 则量少,且分泌作用短暂[253,273,354,364]。与 IL-12 迅速分泌有关的微生物组分已被鉴定出。细菌细胞壁的成分如糖类、脂类及糖脂等能诱导 IL-12 的分泌。例如,革兰氏阴性菌的 LPS、革兰氏阳性菌的磷壁酸以及分枝杆菌的双分枝菌酸海藻糖和 LAM 都能诱导 IL-12 的分泌[365~367]。因 MP 表达针对这些脂聚糖的膜式识别受体(如 CD14),所以它们能与入侵的细菌迅速反应。对细菌特异性模式分子的直接识别似乎是指导先天免疫系统的主要机制。但此外,也有其他机制的参与[60]。第一,细菌的糖类、脂类及糖脂

1355

也可通过旁路途径活化补体[280]。活化产物 C3b 与巨噬细胞 CR 的结合可进一步促进巨噬细胞的活化。(但注意,该机制也可促进微生物进入巨噬细胞,而避免了导致 ROI 产生的呼吸爆发。)第二,病原体诱导的对宿主细胞的杀伤可能导致促炎细胞因子的释放,从而进一步支持 Th1 细胞产生。第三,在细菌 DNA 中富有的含非甲基化 CpG 基序的寡核苷酸是强有力的 IL-12 诱导子[367]。

IL-12 不仅作用于 Th1 细胞,也作用于在感染中期主要的执行者 NK 细胞和 γδ T 细胞。NK 细胞和 γδ T 细胞的活化还需 TNF-α 的协同刺激作用,TNF-α 随活化的巨噬细胞分泌 IL-12 而伴发产生。NK 细胞产生的 IFN-γ 又通过正反馈环进一步促进巨噬细胞分泌 IL-12,从而极大提高了 IL-12 的产量。在 IFN-γ 和 IL-12 的协同作用下,则实现了 Th1 细胞的稳定产生。在胞内菌感染期间,传统的 CD4 和 CD8T 细胞、MHC Ⅰb 类分子限制性 CD8T 细胞、1 类 CD1 分子限制性 T 细胞以及 γδ T 细胞都获得了 Th1 表型。

体外研究发现 IL-4 的优势超过 IL-12,提示在此二种细胞因子存在的情况下,有 Th2 细胞的产生[368]。而且发现,NK T 细胞在受到刺激作用后迅速产生 IL-4[253]。那么,为什么在胞内菌感染中,Th1 细胞的产生未受到抑制呢? 这可能是由于对产生 IL-4 的 NK T 细胞和 Th2 细胞的下调作用[279]。在胞内菌感染中,可通过 IL-12对 NK T 细胞分泌IL-4产生下调作用,就支持该观点[369]。而且,NK T 细胞在长时间持续的刺激作用下,显然能够从产生 IL-4 变为产生 IFN-γ[279,369a](Emoto et al.待发表)。因此,在胞内菌感染中,NK T 细胞可促进而不是阻碍 Th1 细胞极化。此外,在感染单核细胞增多性利斯特氏菌的 IFN-γR 缺陷小鼠中,发现有分泌IL-4的多量 Th2 细胞产生,其分泌的 IL-4 又进一步加重 IFN-γR$^{-/-}$ KO 小鼠对利斯特氏菌病的易感性[370]。文献报道 IL-12Rβ2 链可能与 Th1 极化有关[360,361]:当 Th1 细胞仍高表达 IL-12Rβ2 链时,Th2 在成熟过程中则失去了该链,即失去了对 IL-12 反应的能力。这与极化早期极化方向的可变性以及后期 Th2 细胞对 IL-12 的无反应性相一致。

细胞因子是 Th 极化主要的信号递质(transmitter),同时同源(cognate)受体间的相互作用也参与了这一过程。其中 CD40/CD40 配体(CD40L)系统和 B7/CD28/CTLA-4 系统最重要[371~375]。CD40/CD40L 系统最初被认为是 B 细胞活化和免疫球蛋白类型转换的一种重要的调节子[376]。后来发现巨噬细胞上的 CD40 与 T 细胞上的 CD40L(现称作 CD154)之间的相互作用,参与了双方细胞的活化。因此,CD40/CD40L 的相互作用可参与抗感染 Th1 应答的整个过程——从开始一直到效应功能的执行。CD40 或 CD40L 基因缺陷的 KO 小鼠,其 IL-12 和 IFN-γ 的分泌减弱,导致对胞内寄生虫大利什曼原虫的易感性增加[377~379]。但对于一 CD40L 缺陷的实验性利斯特氏菌病小鼠突变体,却未见其病情加重[380]。B7 系统包括存在于巨噬细胞以及其他 APC 上的 B7-1(CD80)和 B7-2(CD86)分子以及 T 细胞上与之相应的 CD28 和 CTLA-4(CD152)受体[371,372,374,375]。这些受体-共同受体(receptor-coreceptor)之间的相互作用支持对初次 T 细胞应答的诱导,但不是必不可少的。微生物的糖类、脂类及糖脂可调节膜表面 B7 分子的表达;而 APC 表面 B7-1 和 B7-2 分子的相对密度,可向 Th0 细胞提供协同刺激信号,指导其向 Th1 或 Th2 极化[252]。

细胞因子及同源受体间的相互作用对抗感染免疫应答不仅起平衡放大作用,也具有严密的控制作用。细胞因子为微生物繁殖部位白细胞的聚集和活化提供了广谱信号。细胞表面受体间同源的相互作用更加局限,因此避免了旁路细胞的活化以及由此引起的组织反应、甚至自身免疫应答的发生。

感染细胞的死亡

一些证据显示,感染细胞的死亡在胞内菌致病及抗胞内菌保护中都起着重要作用(图 40.9)[157,158,187,191,211]。首先,包括肠沙门氏菌、分枝杆菌属及单核细胞增多性利斯特氏菌在内的几种胞内菌能诱导其感染的宿主细胞凋亡(见前文)。感染单核细胞增多性利斯特氏菌的肝细胞和树突细胞很快发生凋亡,并引起一种炎性环境,吸引 PNG 到细菌繁殖部位[160,161]。而相反的,巨噬细胞感染单核细胞增多性利斯特氏菌后显然并不发生凋亡[164]。随后,具有杀伤潜力的各种宿主细胞相继出现,它们出现的顺序依次是:PNG、NK 细胞、γδ T 细胞及 αβ T 细胞(图 40.7)。PNG 迅速浸润到单核细胞增多性利斯特氏菌感染的肝脏,它

们不仅杀伤利斯特氏菌,也破坏肝细胞[190,191]。对 PNG 的清除将显著加重利斯特氏菌病[192,193]。肝细胞高度允许利斯特氏菌生长,因此单核细胞增多性利斯特氏菌诱导的凋亡以及 PNG 介导的对这些宿主细胞的溶解,似乎在早期抗利斯特氏菌防御中起着重要作用[281]。在胞内菌感染期间,NK 细胞被活化[281,381]。在体外,活化的 NK 细胞能溶解各种胞内菌感染的 MP,而不影响未感染的靶细胞[382~385]。活化的 γδ T 细胞和 1 类 CD1 分子限制性 αβ T 细胞也能溶解细菌感染的靶细胞[386,387]。感染胞内菌的小鼠的 MHC Ⅰa、MHC Ⅰb 类分子限制性 CD8 T 细胞以及 MHC Ⅱ 类分子限制性 CD4 T 细胞,在体外受到再次刺激后,迅速表现出溶细胞活性[211,238]。同样地,也已从胞内菌感染患者体内分离出表现特异性溶细胞活性的 CD8 和 CD4 T 细胞[388~391]。CTL 在抗利斯特氏菌中的作用已被穿孔素缺陷的 KO 小鼠所证实:CTL 活性减弱的穿孔素缺陷的 KO 小鼠患上了加重的利斯特氏菌病[276]。同时,有证据显示在实验性利斯特氏菌病中,CD8 T 细胞可引起肝的损害,导致血清转氨酶水平升高[392]。文献报道在结核样型麻风病患者病变处的 CD4 和 CD8 T 细胞也表达表示溶细胞活性的表型标志[330,393,394]。CTL 通常有两种杀伤机制:通过 Fas/Fas 配体(FasL)相互作用引起凋亡以及依赖穿孔素的细胞溶解机制[274]。在小鼠模型,CTL 对感染巨噬细胞的杀伤伴随有对分枝杆菌的抑制作用[217]。用表达两种溶细胞机制的人 CTL 克隆进行研究,显示穿孔素依赖性的(而不是凋亡性的)巨噬细胞死亡参与了对结核分枝杆菌的生长抑制[387]。而用小鼠突变体进行研究,迄今为止未发现穿孔素或 Fas/FasL 相互作用介导的传统 CTL 活性在对结核病的控制中起着重要作用[395,396]。但已证明由 ATP 引起的巨噬细胞死亡可导致对分枝杆菌的抑制作用[105a,105b]。CTL 能通过分泌 ATP 而诱导细胞死亡,从而通过该途径,它们可参与对分枝杆菌的抑制作用[396a]。外源性 ATP 与 P2Z 受体结合显然可引起含分枝杆菌的吞噬体与溶酶体融合,而该融合可导致细胞死亡以及对分枝杆菌的抑制作用(不依赖 ROI 和 RNI)。虽然对该新的抑制分枝杆菌的途径的分析至今只限于牛型结核杆菌 BCG,而未用人型结核杆菌进行分析,但它可能代表了结核病的一种重要的控制机制。

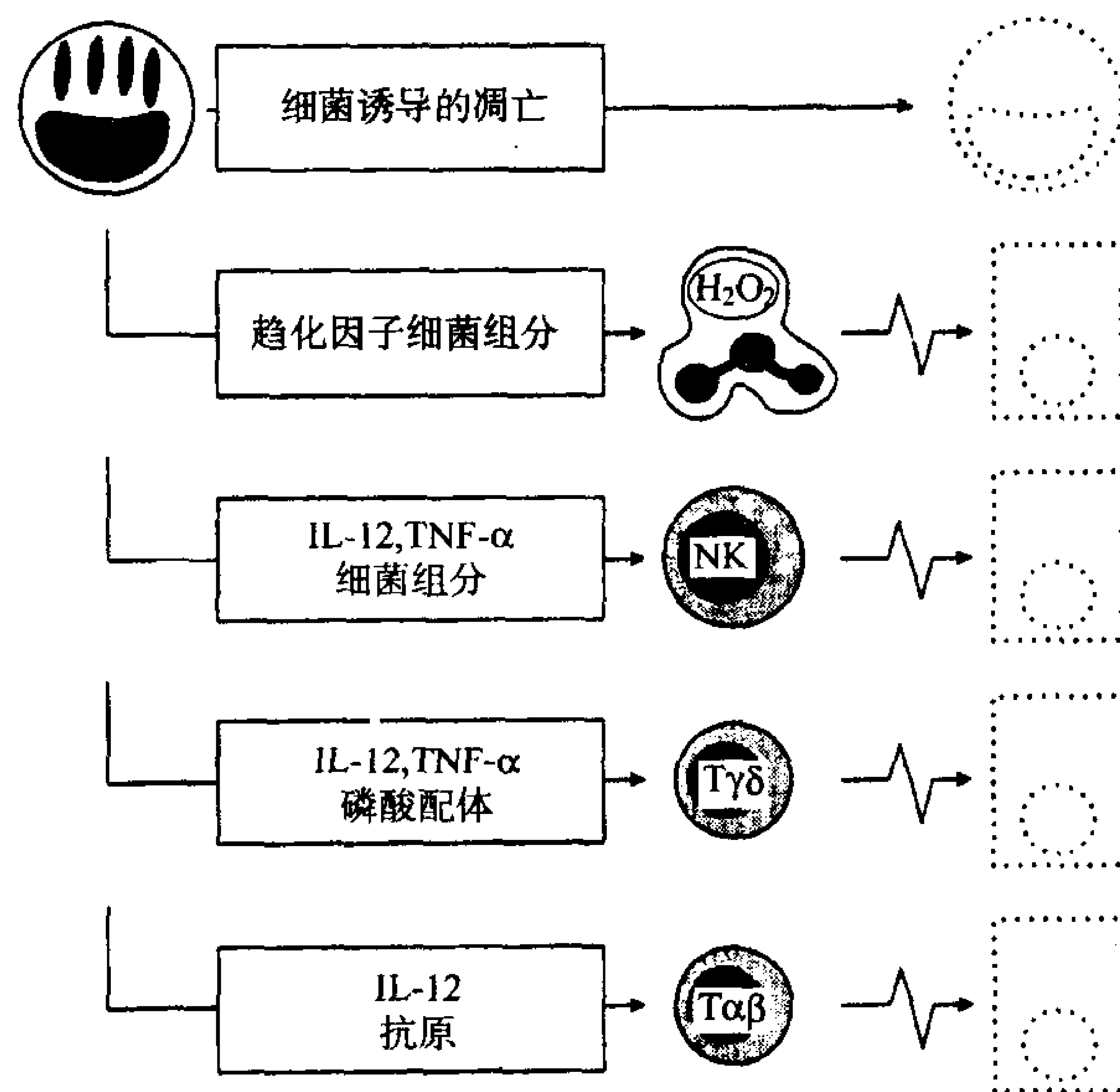


图 40.9 细菌感染中的细胞死亡。

1357

综上所述,这些研究结果提示在胞内菌感染中细胞破坏机制的参与。一方面,吞噬细胞的杀伤作用可直接削弱胞内病原体的生长;但另一方面,非专职吞噬细胞的死亡,可通过影响生理器官的功能而致病。另外,MP 溶解也具有潜在危害,因为它能够促进微生物播散。许多组织 MP(如肺泡巨噬细胞、库普弗细胞)不足以消灭胞内病原体。而且,微生物组分能妨碍巨噬细胞的功能发挥,从而可使 MP 进一步失活。对这些 MP 的破坏,则能使细菌从 MP 内释放出来,从而促进细菌播散。但另一方面,细胞溶解也有助于对细菌的完全消灭。细胞溶解促使细菌从无能力的宿主细胞(非专职吞噬细胞或失活的 MP)中释放出来后,能促进其被更强有力的效应机制杀伤。例如,细菌从无能力的细胞中释放出来后,能立刻被血液中的单核细胞捕获,从而使其能被更有效地杀伤[211]。

肉芽肿性病变

“理想化的”肉芽肿

胞内菌与宿主防御之间的相互作用是一个以肉芽肿性病变为中心的局部事件,肉芽肿形成了抗菌保护

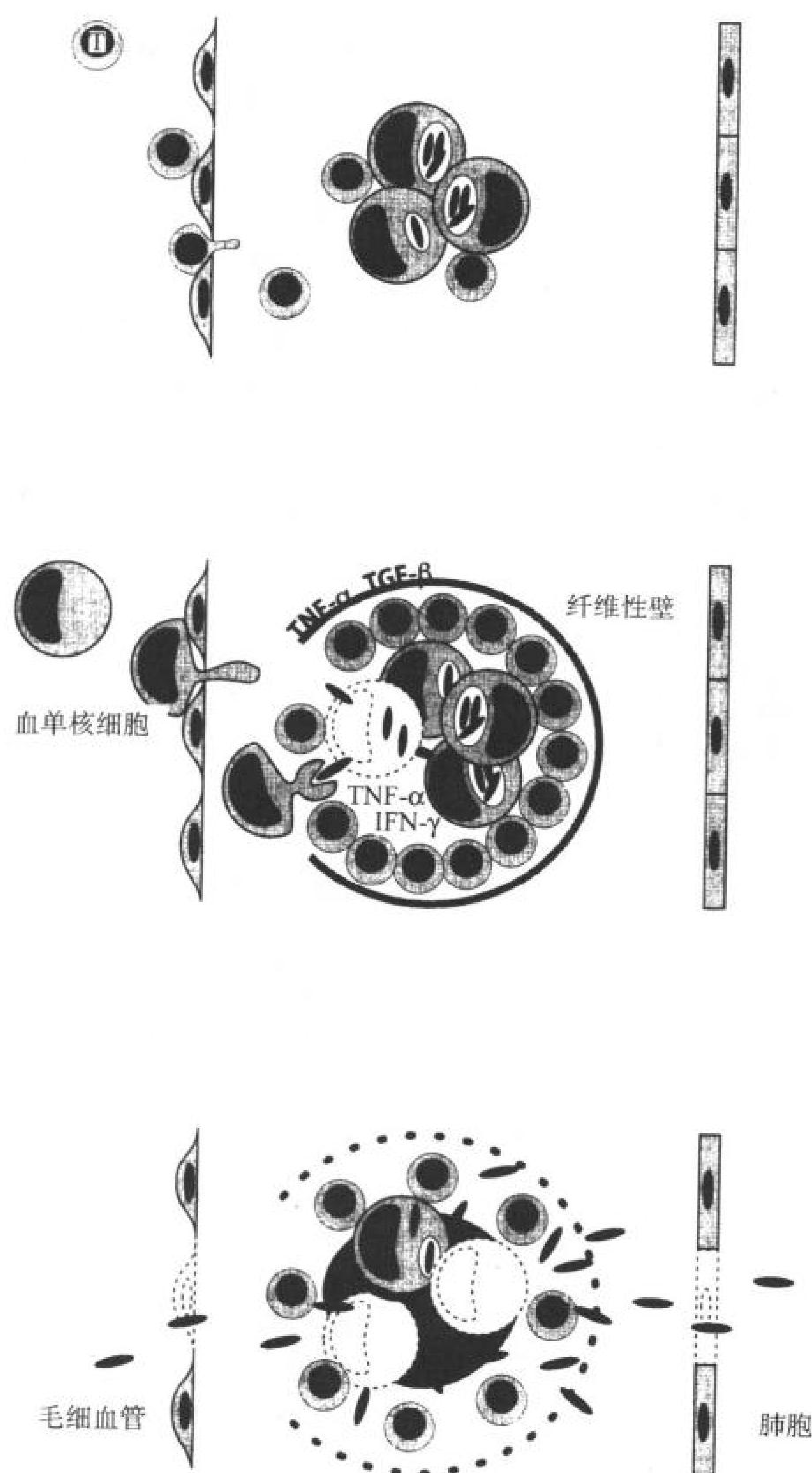


图 40.10 "理想化的"肉芽肿中细胞间的相互作用。

作用的中心[397,398]。不能形成肉芽肿或形成的肉芽肿分解,常导致疾病恶化,引起致死性结果。但同时,扩大的肉芽肿会损害组织的生理功能,因此也是致病的主要因素。"理想化的"肉芽肿应该是由多种不同表型的淋巴细胞以及不同成熟阶段和分化阶段的 MP 组成的一种具有良好结构的病变(图 40.10)。组成肉芽肿的细胞包括多核巨细胞、上皮样细胞、新近移入的单核细胞以及成熟的 MP[398],其中散布有多量的 CD4 T 细胞,其外主要以 CD8 T 淋巴细胞围绕[330,394,399]。微生物被限制于肉芽肿 MP 中。肉芽肿中心区域细胞的坏死,则导致形成干酪样的、但仍紧密的中心。最后,病变以纤维化、钙化包裹。下面,将首先描述"理想化的"肉芽肿的形成;随后,将讨论不同类型的肉芽肿性病变。

白细胞外渗

在肉芽肿形成的早期,先是 PNG、接着是血液中的单核细胞被细菌组分[含 *N*-f-met 的肽(如甲酰甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酰(f-Met-Leu-Phe))或含非甲基化 CpG 基序的寡核苷酸]、补体成分(5a)及细胞因子介导的促炎信号诱导外渗(图 40.11)。感染 MP 产生许多促炎细胞因子(如 IL-1、IL-6、TNF-α)以及各种趋化因子,它们能刺激局部内皮细胞和血液中的吞噬细胞[286,400~403]。在肺部,由感觉神经元细胞产生的 P 物质(一种神经肽)和巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)可进一步促进该炎性过程[404,404a]。原发病灶周围发炎的内皮表达黏附分子的水平增高,从而促进炎性吞噬细胞的外渗(图 40.11)[400,405~408]。外渗由白细胞和内皮细胞上黏附分子的相互作用介导[400,408]。这些黏附分子包括选择素、整合素及免疫球蛋白超家族成员(图 40.11)。

L 选择素表达于白细胞上,而 P 选择素和 E 选择素表达于内皮细胞上。选择素为外源凝集素,与相应细胞类型上的糖类配体相结合。整合素为异二聚体,表达于多种细胞上,包括白细胞和内皮细胞。白细胞上至少有 6 种不同的整合素介导与内皮细胞的结合,尤其是 LFA-1、Mac-1 和 VLA-4。ICAM 是免疫球蛋白超家族的成员,包括 ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、ICAM-1 及 PECAM-1。ICAM-1 可在白细胞和内皮细胞上被强烈诱导表达。内皮细胞可组成型表达 ICAM-2、VCAM-1 及 PECAM-1,而静息白细胞表面具有 ICAM-3 和 PECAM-1。ICAM-1 与整合素 LFA-1 及 Mac1 相互作用;ICAM-2 及 ICAM-3 与 LFA-1 相互作用;VCAM-1 与 VLA-4 相互作用;PECAM-1 参与同嗜性(homophilic)相互作用。

当炎症部位的血管直径突然变大时,白细胞与内皮细胞之间的接触即开始[400]。活化内皮细胞和白细胞上调其表面黏附分子的表达,从而促进白细胞与血管内皮间的结合。于是就开动了黏附事件的级联过程。选择素介导的相互作用使白细胞沿着血管壁滚动。接着,整合素与免疫球蛋白超家族分子的相互作用导致白细胞紧紧黏附至内皮细胞。一旦白细胞紧紧黏附至内皮,即发生向炎性病灶的移行。P和E选择

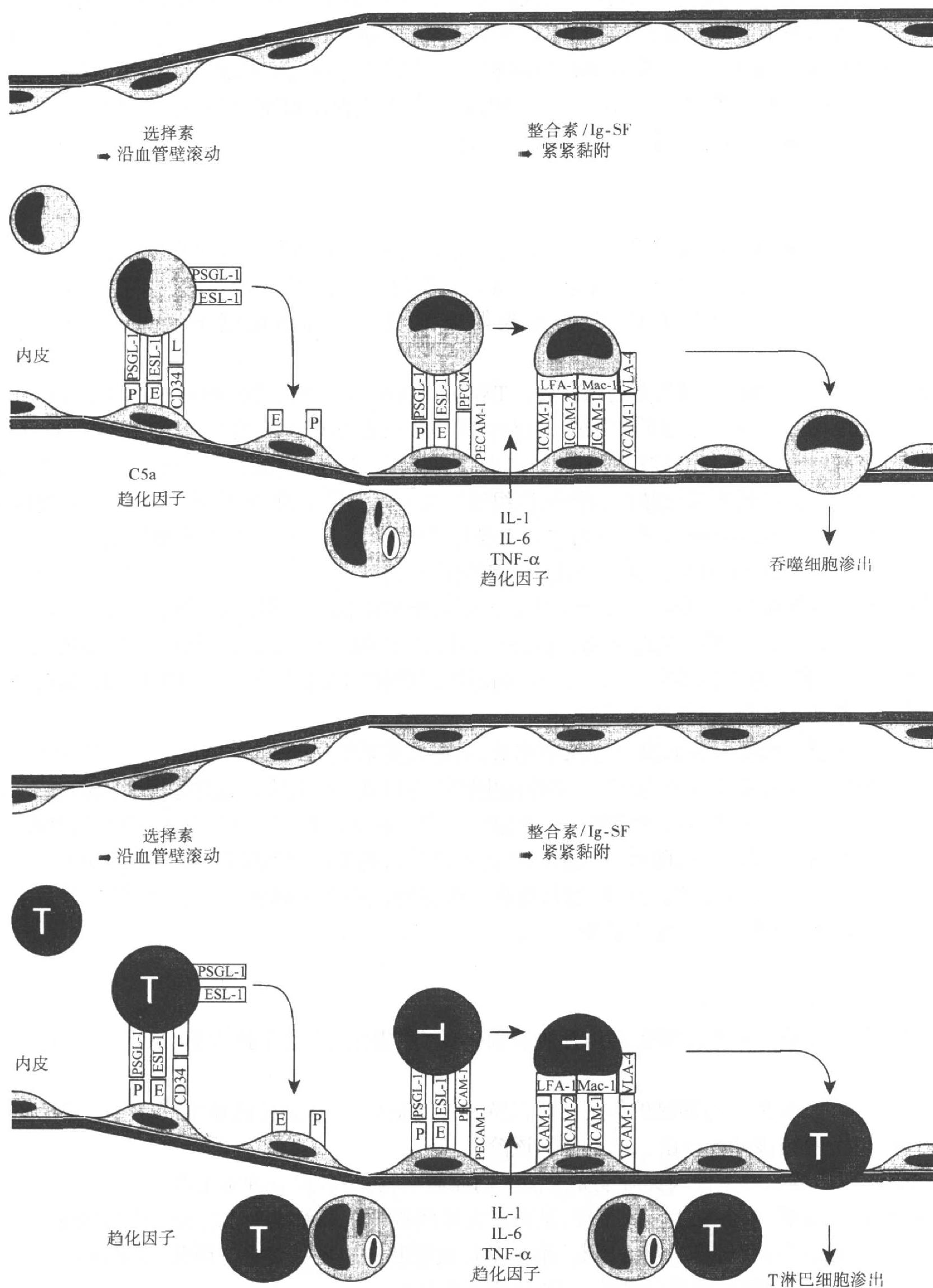


图 40.11　吞噬细胞和 T 淋巴细胞从血液汇集至细菌生长部位。选择素和它们的受体：E，E 选择素；P，P 选择素；L，L 选择素；ESL-1，E 选择素配体；PSGL-1，P 选择素配体。整合素：LFA-1、Mac-1、VLA-4。免疫球蛋白超家族分子：ICAM-1、ICAM-2、VCAM-1、PECAM-1。

素表达上调主要促进 PNG 外渗,而 L 选择素组成型表达于几乎所有白细胞。活化 T 细胞和记忆 T 细胞以及炎性吞噬细胞表达更高水平的整合素(如 LFA-1 和 VLA-4),而活化内皮细胞显示有免疫球蛋白分子的高表达。ICAM-1 和 VCAM-1 表达上调主要对单核细胞和 T 细胞移行至炎性病灶起重要作用。简言之,首先是选择素的作用使白细胞沿着血管壁滚动,紧接着白细胞紧紧黏附至内皮细胞,而后白细胞外渗,从而导致白细胞在微生物定居部位聚集,这为肉芽肿形成奠定了基础。

肉芽肿形成

炎性 PNG 和单核细胞可限制细菌繁殖,但常常不能消灭病原菌。同时,这些吞噬细胞释放蛋白水解酶,从而造成组织损伤[87,189,191]。因此,早期病变通常是渗出性的。最后,特异性 T 淋巴细胞在引流淋巴结被活化。经过炎性病变的再循环 T 淋巴细胞,则被促炎细胞因子和趋化因子通过前面所述的机制募集[286,400,405,408]。

逐渐地,就形成了以 MP 浸润为主的肉芽肿。TNF 和 IFN-γ 似乎对肉芽肿的形成具有重要作用。在肉芽肿形成的各个阶段,αβT 细胞是主要的 T 细胞,但在初期也发现有显著比例的 γδ T 细胞[271]。这些 γδ T 细胞显然对于形成一种紧密的、有良好结构的肉芽肿具有重要作用。因为,若缺乏这些 γδ T 细胞,则会形成结构松散的、甚至脓肿样病变(代表对化脓菌的特征性组织反应)[265,267,270]。此外,已从麻风病人的皮肤病变中分离出 1 类 CD1 分子限制性 DNαβT 细胞,表明它们也参与了该组织反应[242]。T 淋巴细胞通过与感染 MP 之间抗原特异性的相互作用,产生 IFN-γ,从而活化巨噬细胞的抗菌功能。

肉芽肿通过限制细菌繁殖、限制病原菌于病灶内而处于抗菌保护作用的最前线,可通过以下方式实现:①活化 MP 能抑制细菌生长;②通过纤维化、钙化促进对病原菌的包裹;③坏死导致氮和氧的供应减少。

但是,病原微生物常常不能被完全消灭,一些病原体以替代方式幸存下来。微生物的持续存在与抗菌防御之间可形成一种动态平衡,并能持续长时间。

巨噬细胞活化强烈依赖 IFN-γ,其在小鼠中充足,但在人类系统中还需要 TNF 和 1,25-二羟维生素 D3 的支持。纤维化和坏死主要由 TNF 引起[285]。多种微生物组分可使 MP 失活。在这些因素的影响下,移入的血单核细胞成熟至上皮样细胞和多核巨细胞。对于隐藏于肉芽肿 MP 中的细菌的消灭,则是通过破坏这些 MP 而使得藏于其中的细菌释放出来,随后释放出的细菌可被移入的单核细胞摄取,从而促进对它们的消灭。若释放于缺乏氮、氧的中央坏死部位,则可限制其生存。肉芽肿性病变可损害组织功能,但它对宿主的损害通常能保持一定的限度,使感染不一定引起临床疾病。

结核病

1360

能有效控制结核分枝杆菌的增生性肉芽肿与前述的“理想化的”肉芽肿最相似。该病变可向五个方向发展[7,187,397]。

① 微生物的持续存在与机体局部保护作用之间保持一种动态平衡,从而使机体持续存在稳定的免疫力而不发病。90%以上的结核分枝杆菌感染者处于该阶段。

② 在少数病例,所形成的增生性肉芽肿能完全消灭病原微生物,最后肉芽肿也消散。

③ 若免疫应答过于强烈,则会发生坏死反应,从而扩大组织损伤。与纤维发生有关的细胞因子(包括 TNF 和 TGF)的大量分泌,可导致肺部纤维化[285]。细菌常仍被限制在坏死病变中。因此,临床疾病的发生局限于感染器官(典型的如肺部),疾病呈良性状态,通常无传染性。

④ 如果持久发生细胞破坏,则肉芽肿变为渗出性的,接着发生液化。在液化的细胞碎屑中,结核分枝杆菌以一种不受控制的方式生长,大量组织损伤将显著损害感染器官。在这些细胞碎屑里,有高达 10^9 数量的结核杆菌出现。在不完全化学治疗下,则会产生多重耐药性结核杆菌。细菌通过血循环播散可促进对次级器官的感染,溃破入支气管肺泡系统则可促进向外界环境传播。过多的 TNF 释放入血循环可引起恶病质[283]。此时,疾病呈恶化状态,并具高度传染性。

⑤ 对于T细胞免疫力不足或缺陷的病例，则肉芽肿很快崩解，细菌被播散。而对于严重免疫缺陷病例(如AIDS患者或新生儿)，则根本不能形成肉芽肿，感染直接进展为播散性的、通常致死的粟粒性结核。

实验性利斯特氏菌病

在实验性利斯特氏菌病，病变的发展停留于炎性吞噬细胞和特异性T细胞浸润阶段。因单核细胞增多性利斯特氏菌很快被消灭，所以不形成具有高度结构的肉芽肿[409~411]。实际上，对单核细胞增多性利斯特氏菌的消灭不一定需要形成病变。另一方面，PNG、MP及T细胞的浸润可导致对肝细胞的破坏，从而损害肝功能。因此，在实验性利斯特氏菌病，病变具有强烈的病理学成分[392]。

麻风病

结核样型麻风病变与结核病变很相似[28,86,330,394,412]。而对于瘤型麻风，则是抑制性机制支配了肉芽肿的命运(见后文)。瘤型麻风病变以大量麻风分枝杆菌和失活的MP(如泡沫状巨噬细胞)以及少量抑制性T淋巴细胞($CD8^+$、$CD28^-$)的出现为特征。有证据显示在瘤型麻风病变中可见Th2样活性(见后文)。

迟发型超敏反应

给已免疫个体再次注入相同的可溶性胞内菌抗原，则在注射局部会出现皮肤反应。该反应以单核细胞浸润为特征，在再次抗原刺激后24~72小时发生，即是迟发的。1890年德国学者郭霍首次描述了对细菌抗原的DTH反应[180]。他指出给感染了结核杆菌的豚鼠注入可溶性的结核分枝杆菌培养滤液(他称作结核菌素，tuberculin)，则在注射局部会出现特异性的炎性反应。在20世纪30年代，F. Seibert[22]通过除去大部分碳水化合物、富集蛋白质和肽制备了纯蛋白衍生物(purified protein derivative ，PPD)。PPD现仍被广泛使用。

现已清楚，对胞内菌抗原的DTH反应主要是由$CD4^+$ T细胞介导的。因为可溶性蛋白质抗原通常不能进入MHC Ⅰa类分子途径，所以传统的CD8T细胞在DTH反应中所起的作用不大。而γδ T细胞可能具有辅助作用[271]。现仍不清楚这些γδ T细胞是对特异性抗原发生应答还是被炎性刺激物非特异性活化。DTH反应虽然如同肉芽肿性病变一样，主要以MP浸润为主、并依赖T淋巴细胞，但它是一个短暂的应答，只持续几天，直到蛋白质抗原降解。因此，DTH反应引起的病理学损伤通常是最小的。但若给活动性结核病人皮肤注射大剂量抗原，则会引起显著的坏死反应，导致严重的组织损伤。

胞内菌感染中的特异性和非特异性无应答

在慢性细菌感染期间，偶可见免疫应答减弱。免疫应答减弱在麻风病中最显著，其中瘤型麻风就是以免疫无应答性(immunologic unresponsiveness)为其特征。因为无应答性对麻风病的病程很重要，所以重点放在该病上[28,412]。但无应答也可发生于其他细菌感染，特别是在严重的活动性结核病。尽管在麻风病中，免疫无应答现象是不容置疑的，但其根本的机制仍不清楚。

缺乏迟发型超敏反应

结核病和麻风病患者缺乏DTH反应就是一个很好的例子[413~418]。这些患者的体外T细胞增殖反应以及IL-2和IFN-γ的产生常常都是减低的[414~419]。在化学治疗前，可有50%的结核病患者缺乏DTH[420]。另外，一部分BCG接种者不出现PPD^+反应。这些特异性无应答现象被认为是保护作用不充分的反映，而且被认为是预后不好的征兆。但在某些个体以及某些实验动物模型，尽管无DTH反应，却已观察到对胞内菌有效的保护作用。这说明DTH反应的有无并不能预示是否有保护作用。在保护作用最强时，DTH反应通常缺乏或 1361

减低。关于 DTH 和获得性抵抗力之间的分离现象至少有三种解释。

① 可溶性抗原引起的 DTH 反应主要是 CD4T 细胞起作用；而对大多数胞内菌的获得性抵抗力，则还包括 CD8T 淋巴细胞及一些非传统 T 细胞的作用。因此，CD4T 细胞应答减弱对 DTH 的影响将比对抵抗力的影响更大。

② PPD 未包括完所有来自结核分枝杆菌的抗原，因此并不能完全反映对该病原菌的免疫力。

③ 在再次活化期间，T 淋巴细胞可能被限制于肉芽肿中。这有利而不是有害，因为它反映 T 细胞在抗菌防御部位聚集，而不是在外周无关部位。

特异性无应答

对麻风分枝杆菌特异性的无应答常与界线类偏瘤型麻风相关[28,421,422]。这些患者的病变处仍有显著数量的 T 淋巴细胞(主要是 CD8 表型)，但也含有大量的麻风分枝杆菌及缺乏活化迹象的巨噬细胞[330,394,399]。仅对于麻风分枝杆菌抗原，才不发生 DTH 反应以及体外 T 细胞增殖和 IL-2、IFN-γ 分泌；对于其他抗原，甚至与之密切相关的 PPD，都能诱导 DTH 反应以及体外 T 细胞增殖和 IL-2、IFN-γ 分泌。随着对麻风分枝杆菌抗原的生物化学分离，瘤型麻风病患者中针对某些蛋白质的 T 细胞应答已被揭示。这些研究结果表明麻风分枝杆菌中某些独特的、特异性抗原与抑制作用有关。

在瘤型麻风病变处直接给予 PPD、或用 BCG 以及某些其他的分枝杆菌进行治疗性接种，可缓解病情，使其向结核样型转变[423~425]。已报道在病变处局部给予 IL-2 和 IFN-γ，也可获得同样有益的效果[394,423,426]。尽管对特异性无应答已作了大量研究，但仍不能完全解释清楚其机制。但是，因为特异性无应答可通过免疫干涉逆转，所以特异性无应答的产生不可能是由于麻风分枝杆菌特异性的 T 细胞清除(deletion)，而应该是由活化机制引起的。

非特异性无应答

在重症粟粒性结核患者和瘤型麻风患者的体内及体外试验中，均可见 T 细胞和(或)巨噬细胞非特异性的无应答[414,416,418,427]。非特异性无应答患者不仅对相关的试验抗原(如麻风菌素为瘤型麻风患者的相关抗原)不产生 DTH 反应，对于无关抗原{如 PPD、组织胞质菌素或接触性致敏物[如苦基氯(picryl chloride)]}也不产生 DTH 反应。同样地，来自这些患者的 T 细胞对于各种细菌抗原，都不发生增殖反应，也不产生 IL-2 和 IFN-γ[419,428~430]。尽管在一些病例，加入外源性 IL-2，可恢复 IFN-γ 的产生，但通常非特异性无应答性不能逆转[428]。

T 细胞和巨噬细胞水平的非特异性无应答主要是由微生物组分直接的抑制作用引起的。麻风分枝杆菌的几种组分(包括酚糖脂、LAM 及硫酸脑苷脂)与非特异性无应答有关[101,430~433]。已证明酚糖脂能清除 ROI，从而阻碍 MP 的抗微生物功能[134,136]。而且，这些麻风分枝杆菌组分以及其他一些分枝杆菌组分能导致 MP 分泌抑制 T 细胞活化的因子，包括 IFN-γ、RNI 及前列腺素。MP 和 T 细胞对各种抗原的非特异性无应答其实很少发生，仅在瘤型麻风和重症粟粒性结核才发生。它实质上是不可逆转的，且预后极其不好。瘤型麻风患者的病变以大量抗酸杆菌载量、T 细胞数目显著减少及少量缺乏活化迹象的巨噬细胞为特征。

与特异性无应答有关的机制

尽管对特异性无应答的机制还不完全清楚，但目前最好的解释可能是 T 细胞无反应性(anergy)。该机制的内容包括：①从 Th1 向 Th2 极化转变；②欠缺协同刺激细胞因子信号；③欠缺协同刺激分子信号。

通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)对结核样型和瘤型麻风病变进行比较分析，结果表明：结核样型麻风病变处有大量 Th1 细胞因子 mRNA，而在瘤型麻风病变处有高水平的 Th2 细胞因子 mRNA[311~313,412](见前文)。瘤型麻风病变以 IL-10 高表达和 IL-12 低表达为特征，而结核样型麻风病变则相反。这些研究结果提示 Th2 样细胞因子在瘤型麻风的发生和(或)持久存在中的作用。CD8T 细胞似乎是人

麻风病中 IL-4 的主要来源，在体外 CD8T 细胞对 CD4Th1 细胞的抑制作用可通过抗 IL-4 抗体的中和作用而逆转[28,312,412,434]。在前文已讨论过 B7/CD28/CTLA-4 和 CD40/CD40L 系统在 Th1/Th2 极化中的潜在作用[371~374,380]。虽然对于它们在胞内菌感染无应答中作用的直接证据还未得到，但感染胞内菌的细胞表面 CD40 和 B7 分子的表达很可能有差别[252]。从瘤型麻风病变中分离出的 CD8T 细胞缺乏 CD28 分子，提示这些细胞的 B7/CD28 协同刺激作用是减弱的。已发现这些 $CD8^+$ $CD28^-$ T 细胞经麻风分枝杆菌特异性活化后，在体外能抑制 Th 细胞应答[28,394,399,412,422]。

在此须再次强调：除瘤型麻风外，胞内菌感染中很少出现无应答，因胞内菌是 Th1 型细胞因子强有力的刺激物。因此，关于在某些患者中麻风分枝杆菌如何智胜免疫系统而发展为瘤型，则仍是我们了解该疾病的中心问题。尽管麻风分枝杆菌含有丰富的脂聚糖（是强有力的 IL-12 刺激物），但感染麻风分枝杆菌的单核细胞似乎更倾向于分泌 IL-10[311]。IL-10 和 IL-12 之间的早期不平衡到什么程度才促成向瘤型麻风极化还有待研究。最有可能的是，无应答性不是由单一细胞决定的，而是由多因素引起的、可变的，可从抗原特异性无应答变为抗原非特异性无应答。抗原特异性无应答是短暂的，在适宜的免疫干涉下能逆转；而抗原非特异性无应答与 T 细胞数目的下降及全部巨噬细胞的无活性有关。

抗胞内菌的遗传控制

抗胞内菌是受遗传控制的，遗传因素在具有多种临床类型的慢性传染病（如结核和麻风）中尤为重要。 *1362*
遗传因素的重要性在可怕的 Luebeck 灾难中最为明显。在 1927 年，有 251 名婴儿被误将活的结核分枝杆菌当作 BCG 进行接种。观察至第 6 年末时，6 名（2%）仍在患病中，129 名（51%）患结核但已恢复，77 名（31%）已死亡，还有 39 名（16%）始终未出现结核病的临床症状[435]。

在 20 世纪 40 年代，Lurie 研究了兔子对结核病的天然抵抗力。经选择性近交，成功地建立了对结核分枝杆菌易感性显著不同的兔子品系[181]。同样地，也建立了对几种胞内菌易感性不同的同类（congenic）小鼠品系[436]。

至少宿主-病原体关系的三个水平可作为遗传控制的潜在靶子：

① 遗传因素决定感染能否建立，但对此目前尚缺乏令人信服的证据。

② 遗传因素控制感染向疾病转变，亦即分“易感”（susceptible）和“抵抗”（resistant）两类个体。这在小鼠中已得到充分证实，推测在人类亦很可能如此。

③ 遗传因素控制疾病的严重程度和（或）疾病的类型。普遍认为 MHC Ⅱ 类分子影响麻风病向结核样型抑或瘤型发展。有人提出与 Th1/Th2 平衡失调有关（见前文）。

Nramp1 基因控制先天抗菌力

研究发现，小鼠 1 号染色体上有一显性常染色体基因，与抗牛分枝杆菌 BCG、鼠麻风分枝杆菌、鸟-胞内分枝杆菌有关[436~440]。该基因被称为 *Bcg*，与鼠抗肠沙门氏菌的基因 *Ity* 及抗杜氏利什曼原虫的基因 *Lsh* 相同[438,441]。而鼠抗其他胞内菌（最显著的如结核分枝杆菌）显然不受 *Bcg*/*Ity* 基因控制[442~444]。原位克隆可导致对其全长 cDNA 序列的鉴定。该基因被重新命名为 *Nramp1*（natural resistance-associated macrophage protein，天然抵抗力相关性巨噬细胞蛋白）[445,446]。该基因属于一基因家族，该家族也包含鼠 15 号染色体上的 *Nramp2*。与之相应的人类 *Nramp1*、*Nramp2* 已被鉴定出分别位于染色体 2q、12q 上[447]。人 *Nramp1* 基因产物与鼠 *Nramp1* 基因产物之间有 85% 的相同率和 92% 的相似率。关于 *Nramp1* 在控制人类传染病中的作用至今一无所知，对于 *Nramp1* 是否作为麻风病的易感性基因座还存在争论[448~451]。而近来大多数资料则提示 *Nramp1* 与对结核病的易感性相关[451a]。

Nramp1 功能的重要性可用转染巨噬细胞系和基因破坏（gene-disruption）突变小鼠证实[452,453]。*Bcgs* 和 *Bcgr* 小鼠品系易感性不同是由于在 *Narmp1* 基因产物 169 位点，非保守的甘氨酸被天冬氨酸替换。而若把 169 位点为甘氨酸的 *Nramp1* 等位基因转入易感小鼠，则可重建对牛分枝杆菌 BCG 感染的抵抗力。

用同类小鼠品系和 *Nramp 1* 基因缺失突变小鼠来研究 *Narmp1* 基因,可更深入认识其机制。感染后第 1 周,*Bcgr* 和 *Bcgs* 两种小鼠品系之间的差异最明显;一旦 T 细胞参与后,差异渐小。经 IFN-γ 刺激和(或)感染后,*Bcgr* 鼠的巨噬细胞较之 *Bcgs* 鼠能产生更高水平的 ROI 和 RNI 以及促炎细胞因子和一些趋化因子。而且,它们还表达更高水平的 MHC Ⅱ 类分子,表明它们向 CD4T 细胞呈递抗原的能力更强大。实际上,*Bcgr* 小鼠的 CD4T 细胞应答似乎是增高的。而 *Bcgs* 小鼠的 B 细胞应答高于 *Bcgr* 小鼠。

Nramp 1 基因仅限于在专职吞噬细胞中表达,而 *Nramp 2* 基因产物可在各种类型的细胞中发现。Nramp 1 多肽是一种含有多个磷酸化位点的整合型膜蛋白。它出现在晚期内体中,而不是巨噬细胞表面[453,454]。因为 Nramp 1 多肽具有转运分子的特征,因此推测它可能参与吞噬体内与微生物生长抑制有关的分子的转运。有人提出 Nramp 1 多肽参与了离子(尤其是铁)转运至含病原体的吞噬体[454a,454b]。

主要组织相容性复合体控制疾病的严重程度和类型

由寄生虫疟原虫属引起的人类疟疾是 MHC 分子影响疾病严重程度的最好例子。而且,这些研究强调了抗感染的自然选择对 MHC 多态性的深刻影响[455~457]。对不同人群进行遗传学分离分析,也表明人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)类型与结核病和麻风病的严重程度有连锁关系[451,458~463]。有力的证据提示 HLA 能影响麻风病向结核样型抑或瘤型发展[464,465]。虽然现已在某些群体中观察到与 MHC Ⅰ 类分子有一定的连锁关系,但 MHC Ⅱ 类分子的控制似乎更重要。最初,人们发现 HLA-DR2 和 HLA-DQ1 与瘤型麻风病的发病率增加相联系,而 HLA-DR3 代表一种与结核样型麻风病相连锁的标志。但以群体为基础的相关研究提示,HLA-DR2 与对结核样型麻风病的易感性相关联[466]。随着来自不同群体的更多资料的获得,日益清楚地表明 HLA-DR 与不同群体所发生的疾病类型不同相关联。更精细的分子类型提示对结核样型麻风病的易感性与 HLA-DR2 中 13 或 70~71 位点精氨酸的出现相关联[451,466]。这些残基可参与与肽的结合。因此,对独特的麻风分枝杆菌肽的选择可影响对麻风病的易感性。在结核病,表明 HLA-DR2 和 HLA-DQ1 与肺结核呈正相关的证据已找到[462,467]。

1363

小鼠利斯特氏菌病和军团菌病的遗传控制

小鼠对某些胞内菌(如单核细胞增多性利斯特氏菌和嗜肺军团菌)感染的抵抗力并不受 *Nramp1* 基因的影响。A/J 小鼠对利斯特氏菌病的易感性最显著,发现其与补体成分 C5 缺陷有关[468~470]。其原因是 C5 裂解产生过敏毒素 C5a,而 C5a 在吸引炎性吞噬细胞至炎症部位中起主要作用。如前文所述,专职吞噬细胞早期汇集至利斯特氏菌生长部位是抵抗力的一种决定性因素。在 C5 充足的同类 A/J 小鼠品系,尽管炎症反应仍不完善,但能够完全重建对利斯特氏菌的抵抗力。该研究结果提示轻度的炎症反应就足以纠正对单核细胞增多性利斯特氏菌的易感性,而局部的 MP 活化则不太重要。C5 受体缺陷的基因缺失突变小鼠患上了加重的绿脓假单孢菌肺炎[471]。用这些小鼠突变体进行研究,将明确 C5a 在利斯特氏菌病中的作用特性。

虽然与对单核细胞增多性利斯特氏菌和嗜肺军团菌的抵抗力有关的基因产物显然不同,但来自 A/J 小鼠的 MP 较来自大多数其他近交系小鼠的 MP,对嗜肺军团菌更加易感[472]。已鉴定出与对嗜肺军团菌的易感性有关的基因位于 13 号染色体,称作 *Lgn1*[473~475]。

对牛分枝杆菌 BCG、结核分枝杆菌、单核细胞增多性利斯特氏菌及嗜肺军团菌的天然抵抗力的遗传控制不同进一步强调了由胞内菌引起的疾病有不同的类型。除了以上所说的遗传因素,其他几种基因也与抗胞内菌的控制有关[476]。

结论和展望

希望本章的读者不仅熟悉抗胞内菌免疫的主要机制,也要认识到该系统的高度复杂性。对胞内菌感染的了解不仅需要免疫学知识,还需要感染因子的分子生物学知识以及靶细胞的生物学知识。体外分析仅能

对抗菌免疫的有关问题作不完全的回答，还必须有体内实验的补充。

尽管有高度的复杂性，但是这些涉及多学科的研究成果也将有回报。首先，对免疫系统在细菌感染中作用的了解将为回答基础免疫学的有关问题提供线索。对免疫系统为对付可变的"活抗原"（能在与宿主共存期间发展）而表现出的非凡的可塑性和适应性的机制的了解，将使人们对免疫调节和免疫系统的进化有更深入的认识。第二，应用也将同样得益于这些研究工作。随着化学治疗在对细菌感染的控制中越来越显不足，辅助的免疫治疗手段就显得更加重要。对于接种及免疫治疗的合理策略将得益于对胞内菌感染中免疫机制的更深入了解。读者可能也发现了，这实际上又把我们带回到了免疫学的根源：即免疫学一开始就是作为干预细菌感染的一种方法。

致谢

感谢德国科学基金（SFB 322 和 Project Ka 573/3-1/2）、BMBF 联合科研项目"分枝杆菌的感染"、多学科临床研究中心及德国麻风病救济协会给予的财力上的支持。感谢 Max-Planck 学院的同事在感染生物学上给予的帮助，感谢 R. Mahmoudi 女士优秀的秘书工作以及 K. Miksits 博士（柏林感染医学院）在计算机制图上给予的帮助。

（王 晴 译）

参 考 文 献

1. Hahn H, Kaufmann SHE. The role of cell mediated immunity in bacterial infections. *Rev Infect Dis* 1981;3:1221–1250.
2. Moulder JW. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol Rev* 1985;49:298–337.
3. Reynolds HY. Immunologic system in the respiratory tract. *Physiol Rev* 1991; 71:1117–1133.
4. Brandtzaeg P, Sollid LM, Thrane PS, et al. Lymphoepithelial interactions in the mucosal immune system. *Gut* 1988;29:1116–1130.
5. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl J-P. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* 1996;14:275–300.
6. Lipscomb MF, Bice DE, Lyons CR, Schuyler MR, Wilkes D. The regulation of pulmonary immunity. *Adv Immunol* 1995;59:369–455.
7. Schlossberg D. *Tuberculosis*. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 1988.
8. Mackaness GB. Cellular resistance to infection. *J Exp Med* 1962;116:381–406.
9. Eisenstein BI, Engleberg NC. Genetics and molecular pathogenesis of *Legionella pneumophila*, an intracellular parasite of macrophages. *Mol Biol Med* 1989;6:409–424.
10. Finlay BB, Falkow S. Salmonella as an intracellular parasite. *Mol Microbiol* 1989;3:1833–1841.
11. Hastings RC. *Leprosy*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.
12. Smith LD, Ficht TA. Pathogenesis of Brucella. *Crit Rev Microbiol* 1990;17: 209–230.
13. Sandström G. The tularaemia vaccine. *J Chem Tech Biotechnol* 1994;59: 315–320.
14. Southwick FS, Purich DL. Intracellular pathogenesis of listeriosis. *N Engl J Med* 1996;334:770–776.
15. Jones BD, Falkow S. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence. *Annu Rev Immunol* 1996;14:533–562.
16. Hackstadt T. The biology of rickettsiae. *Infect Agents Dis* 1996;5:127–143.
17. Moulder JW. Interaction of Chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev* 1991;55:143–190.
18. Ward ME. The immunobiology and immunopathology of chlamydial infections. *APMIS* 1995;103:769–796.
19. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 1994;58:686–699.
20. Jackson LA, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Curr Opin Infect Dis* 1996;9:89–93.
21. Bloom BR, Murray CJL. Tuberculosis: commentary on reemergent killer. *Science* 1992;257:1055–1064.
22. Kaufmann SHE, Young DB. Vaccination against tuberculosis and leprosy. *Immunobiology* 1992;184:208–229.
23. Bloom BR. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1994.
24. Kaufmann SHE, Andersen P. Immunity to mycobacteria with emphasis on tuberculosis: implications for rational design of an effective tuberculosis vaccine. *Chem Immunol* 1998;70:21–59.
25. Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995;346:1339–1345 [erratum in *Lancet* 1996;347:340].
26. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994; 271:698–702.
27. Kaufmann SHE. Immunology of leprosy: new facts, future perspectives. *Microb Pathog* 1986;1:107–114.
28. Bloom BR, Modlin RL, Salgame P. Stigma variations: observations on suppressor T cells and leprosy. *Annu Rev Immunol* 1992;10:453–488.
29. Cossart P, Mengaud J. *Listeria monocytogenes*. A model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol Biol Med* 1989;6:463–474.
30. Portnoy DA, Chakraborty T, Goebel W, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* 1992;60:1263–1267.
31. Mengaud J, Chenevert J, Geoffroy C, Gaillard J-L, Cossart P. Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes: listeriolysin O* is homologous to streptolysin O and pneumolysin. *Infect Immun* 1987;55:3225–3227.
32. Portnoy DA, Jacks PS, Hinrichs DJ. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* 1988;167:1459–1471.
33. Camilli A, Goldfine H, Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* 1991; 173:751–754.
34. Geoffroy C, Raveneau J, Beretti J-L, et al. Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 1991;59:2382–2388.
35. Leimeister-Wächter M, Domann E, Chakraborty T. Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 1991;5: 361–366.
36. Domann E, Wehland J, Rohde M, et al. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J* 1992;11:1981–1990.
37. Domann E, Leimeister-Wachter M, Goebel W, Chakraborty T. Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect Immun* 1991;59:65–72.
38. Kocks C, Gouin E, Tabouret M, Berche P, Ohayon H, Cossart P. *L.monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* 1992;68:521–531.
39. Gaillard J-L, Berche P, Frehel C, Gouin E, Cossart P. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 1991;65:1127–1141.
40. Kuhn M, Goebel W. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun* 1989;57:55–61.

41. Leimeister-Wächter M, Haffner C, Domann E, Goebel W, Chakraborty T. Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8336–8340.
42. Kaufmann SHE. Listeriosis: new findings—current concern. *Microb Pathog* 1988;5:225–231.
43. Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the *scid* mouse. *Immunol Rev* 1991;124:5–24.
44. Le Minor L. Typing of Salmonella species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:214–218.
45. Richter-Dahlfors AA, Finlay BB. *Salmonella* interactions with host cells. In: Kaufmann SHE, ed. *Host response to intracellular pathogens*. Austin, TX: R.G. Landes Company, 1997;251–270.
46. Mäkelä PH, Hormaeche CE. Immunity to *Salmonella*. In: Kaufmann SHE, ed. *Host response to intracellular pathogens*. Austin, TX: R.G. Landes Company, 1997;143–166.
47. Isberg RR. Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science* 1991;252:934–938.
48. Hoepelman AIM, Tuomanen EI. Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins. *Infect Immun* 1992;60:1729–1733.
49. Finlay BB, Cossart P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 1997;276:718–725.
50. Bliska JB, Galán JE, Falkow S. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 1993;73:903–920.
51. Galán JE, Bliska JB. Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells. *Annu Rev Cell Biol* 1996;12:221–256.
52. Finlay BB. Interactions between *Salmonella typhimurium*, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), and host epithelial cells. *Adv Dent Res* 1995;9:31–36.
53. Sansonetti P, Phalipon A. Shigellosis: from molecular pathogenesis of infection to protective immunity and vaccine development. *Res Immunol* 1996;147:595–612.
54. Swanson JA, Baer SC. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol* 1995;5:89–92.
55. Isberg RR, Van Nhieu GT. The mechanism of phagocytic uptake promoted by invasin-integrin interaction. *Trends Cell Biol* 1995;5:120–124.
56. Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege R, Cossart P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 1996;84:923–932.
57. Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin-α2 chain. *Cell* 1997;88:811–821.
58. Galán JE, Pace J, Hayman MJ. Involvement of the epidermal growth factor receptor in the invasion of cultured mammalian cells by *Salmonella typhimurium*. *Nature* 1992;357:588–589.
59. Chen L-M, Hobbie S, Galán JE. Requirement of CDC42 for Salmonella-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science* 1996;274:2115–2118.
60. Janeway CA. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992;13:11–16.
61. Stahl PD. The mannose receptor and other macrophage lectins. *Curr Opin Immunol* 1992;4:49–52.
62. Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995;13:437–457.
63. Lynn WA, Golenbock DT. Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol Today* 1992;13:271–276.
64. Wright SD. CD14 and innate recognition of bacteria. *J Immunol* 1995;155:6–8.
65. Ofek I, Sharon N. Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infect Immun* 1988;56:539–547.
66. Schlesinger LS. Role of mononuclear phagocytes in *M tuberculosis* pathogenesis. *J Invest Med* 1996;44:312–323.
67. Pearson AM. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:20–28.
68. Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 1994;63:601–637.
69. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997;386:292–296.
69a. Haworth R, Platt N, Keshav S, et al. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J Exp Med* 1997;186:1431–1439.
70. Brown EJ. Complement receptors and phagocytosis. *Curr Opin Immunol* 1991; 3:76–83.
71. Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors. *Annu Rev Biochem* 1988;57: 375–413.
72. Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* 1988;6:251–281.
73. Daëron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 1997;15:203–234.
74. Elsbach P, Weiss J. A reevaluation of the roles of the O_2-dependent and O_2-independent microbicidal systems of phagocytes. *Rev Infect Dis* 1983;5:843–853.
75. Nathan CF. Macrophage microbicidal mechanisms. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983;77:620–630.
76. Horwitz MA. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* 1984;36:27–33.
77. Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *L. pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med* 1987;166:1377–1389.
78. Schlesinger LS, Horwitz MA. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1031–1038.
79. Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3'. *J Immunol* 1990;144:2771–2780.
79a. Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* 1997;277:1091–1093.
80. Kaufmann SHE, Reddehase MJ. Infection of phagocytic cells. *Curr Opin Immunol* 1989;2:43–49.
80a. Cywes C, Godenir NL, Hoppe HC, et al. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to human complement receptor type 3 expressed in Chinese hamster ovary cells. *Infect Immun* 1996;64:5373–5383.
81. Wyrick PB, Brownridge EA. Growth of *Chlamydia psittaci* in macrophages. *Infect Immun* 1978;19:1054–1060.
82. Abou-Zeid C, Ratliff TL, Wiker HG, Harboe M, Bennedsen J, Rook GAW. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1988;56:3046–3051.
83. Borremans M, de Wit L, Volckaert G, et al. Cloning, sequence determination and expression of a 32-kilodalton protein gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1989;57:3123–3130.
84. Hynes RO. *Fibronectins*. New York: Springer-Verlag, 1990.
85. Yamada KM. Adhesive recognition sequences. *J Biol Chem* 1991;266: 12809–12912.
85a. Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 1997;276:1420–1422.
85b. Menozzi FD, Rouse JH, Alavi M, et al. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. *J Exp Med* 1996;184:993–1001.
85c. Downing JF, Pasula R, Wright JR, Twigg HL, Martin WJ. Surfactant protein a promotes attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to alveolar macrophages during infection with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4848–4852.
86. Kaplan G, Cohn ZA. Leprosy and cell-mediated immunity. *Curr Opin Immunol* 1991;3:91–96.
87. North RJ. The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression of cell-mediated immunity to infection. *J Exp Med* 1970;132: 521–524.
88. Racz P, Tenner K, Mero E. Experimental Listeria enteritis. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental listeria infection. *Lab Invest* 1972;26:694–700.
89. Russell DG. Mycobacterium and leishmania: stowaways in the endosomal network. *Trends Cell Biol* 1995;5:125–128.
90. Clemens DL. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Trends Microbiol* 1996;4:113–118.
91. Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1996;12: 575–625.
92. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, et al. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994;263:678–681.
93. Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol* 1984;2:283–318.
94. Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME. Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* 1991;64:229–230.
95. Selsted ME, Ouellette AJ. Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells. *Trends Cell Biol* 1995;5:114–119.
96. Fields PI, Groisman EA, Heffron F. A Salmonella locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* 1989;243:1059–1062.
97. Small PL, Ramakrishnan L, Falkow S. Remodeling schemes of intracellular pathogens. *Science* 1994;263:637–639.
98. Berón W, Alvarez-Dominguez C, Mayorga L, Stahl PD. Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell Biol* 1995;5:100–104.
99. Goren MB, D'Arcy Hart P, Young MR, Armstrong JA. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:2510–2514.
100. Pabst MJ, Gross JM, Brozna JP, Goren MB. Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1988;140:634–640.
101. Sibley LD, Hunter SW, Brennan PJ, Krahenbuhl JL. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect Immun* 1988;56:1232–1236.
102. Zhang L, Goren MB, Holzer TJ, Andersen BR. Effect of *Mycobacterium tuberculosis*-derived sulfolipid I on human phagocytic cells. *Infect Immun* 1988;56: 2876–83.
103. Armstrong JA, D'Arcy Hart P. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phago-

somes. *J Exp Med* 1971;134:713–740.
104. Russell DG, Dant J, Sturgill-Koszycki S. *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *J Immunol* 1996;156:4764–4773.
105. Gordon AH, D'Arcy Hart P, Young MR. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 1980;286:79–80.
105a.Lammas DA, Stober C, Harvey CJ, Kendrick N, Panchalingam S, Kumararatne DS. ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity* 1997;7:433–444.
105b.Molloy A, Laochumroonvorapong P, Kaplan G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular Bacillus Calmette-Guérin. *J Exp Med* 1994;180:1499–1509.
106. Hasan Z, Schlax C, Kuhn L, et al. Isolation and characterization of the mycobacterial phagosome: segregation from the endosomal/lysosomal pathway. *Mol Microbiol* 1997;24:545–553.
107. Heinzen RA, Scidmore MA, Rockey DD, Hackstadt T. Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1996;64:796–809.
108. Garcia-del Portillo F, Finlay BB. Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol* 1995;129:81–97.
109. Hackstadt T, Scidmore MA, Rockey DD. Lipid metabolism in *Chlamydia trachomatis*-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4877–4881.
110. Swanson MS, Isberg RR. Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun* 1995;63:3609–3620.
111. Berger KH, Merriam JJ, Isberg RR. Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila* dotA gene. *Mol Microbiol* 1994;14:809–822.
112. Alford CE, King TEJ, Campbell PA. Role of transferrin, transferrin receptors, and iron in macrophage listericidal activity. *J Exp Med* 1991;174:459–466.
113. Byrd TF, Horwitz MA. Interferon gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. *J Clin Invest* 1989; 83:1457–1465.
114. Payne SM, Lawlor KM. Molecular studies on iron acquisition by non-*Escherichia coli* species. In: Iglewski BH, Clark VL, eds. *Molecular basis of bacterial pathogenesis.* San Diego: Academic Press, 1990;225–248.
115. Payne SM. Iron acquisition in microbial pathogenesis. *Trends Microbiol* 1993; 1:66–69.
116. Cornelissen CN, Sparling PF. Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol Microbiol* 1994;14:843–850.
117. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1275:161–203.
118. Gobin J, Moore CH, Reeve JR Jr, Wong DK, Gibson BW, Horwitz MA. Iron acquisition by *Mycobacterium tuberculosis:* isolation and characterization of a family of iron-binding exochelins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5189–5193.
119. Gobin J, Horwitz MA. Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. *J Exp Med* 1996;183:1527–1532.
120. Byrne GL, Lehmann LK, Landry GJ. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect Immun* 1986;53:347–351.
121. Pfefferkorn ER. Interferon blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in cultured fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:908–912.
122. Flesch IEA, Kaufmann SHE. Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by interferon-γ activated bone marrow macrophages. *Infect Immun* 1988;56:1464–1469.
123. Marletta MA. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *TIBS* 1989;14:488–492.
124. Nathan CF, Hibbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991;3:65–70.
125. Miller RA, Britigan BE. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:1–18.
126. MacMicking J, Xie Q, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:323–350.
127. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 1992;175:1111–1122.
128. Denis M. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cell Immunol* 1991;132:150–157.
129. Flesch IEA, Kaufmann SHE. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun* 1991;59:3213–3218.
130. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 1995;81:641–650.
131. Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn J, Bloom BR. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun* 1995;63:736–740.
132. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5243–5248.
133. Denis M. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium:* killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J Leukoc Biol* 1991;49:380–387.
134. Munoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-α and IFN-γ through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett* 1992;33: 35–40.
135. Padgett EL, Bruett SB. Evaluation of nitrite production by human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Comm* 1992;186:775–781.
136. Sherman MP, Loro ML, Wong VZ, Tashkin DP. Cytokine- and *Pneumocystis carinii*-induced L-arginine oxidation by murine and human pulmonary alveolar macrophages. *J Protozool* 1991;38:234S–236S.
137. Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, et al. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc RII/CD23 surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 7804–7808.
138. Nicholson S, Bonecini-Almeida M da G, Lapa e Silva JR, et al. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* 1996;183:2293–2302.
139. Chan J, Fujiwara T, Brennan P, et al. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2453–2457.
140. Neill MA, Klebanoff SJ. The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. *J Exp Med* 1988;167:30–42.
141. Storz G, Tartaglia LA, Farr SB, Ames BN. Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends Genet* 1990;6:363–368.
142. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5189–5193.
143. De Groote MA, Granger D, Xu Y, Campbell G, Prince R, Fang FC. Genetic and redox determinants of nitric oxide cytotoxicity in a *Salmonella typhimurium* model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6399–6403.
144. De Groote MA, Testerman T, Xu Y, Stauffer G, Fang FC. Homocysteine antagonism of nitric oxide-related cytostasis in *Salmonella typhimurium. Science* 1996;272:414–417.
145. Myrvik QN, Leake ES, Wright MJ. Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis.* A correlate of virulence. *Am Rev Respir Dis* 1984;129:322–328.
146. McDonough KA, Kress Y, Bloom BR. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun* 1993;61: 2763–2773.
147. Leake ES, Myrvik QN, Wright MJ. Phagosomal membranes of *Mycobacterium bovis* BCG-immune alveolar macrophages are resistant to disruption by *Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun* 1984;45:443–446.
148. Mor N. Intracellular location of *Mycobacterium leprae* in macrophages of normal and immune-deficient mice and effect of rifampin. *Infect Immun* 1983;42: 802–811.
149. Winkler HH. *Rickettsia prowazekii*, ribosomes and slow growth. *Trends Microbiol* 1995;3:196–198.
150. Portnoy DA, Schreiber RD, Connelly P, Tilney LG. Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. *J Exp Med* 1989;170:2141–2146.
151. Lepay DA, Nathan CF, Steinman RM, Murray HW, Cohn ZA. Murine Kupffer cells. Mononuclear phagocytes deficient in the generation of reactive oxygen intermediates. *J Exp Med* 1985;161:1079–1096.
152. Tilney LG, Connelly PS, Portnoy DA. Actin filament nucleation by the bacterial pathogen, *Listeria monocytogenes. J Cell Biol* 1990;111:2979–2988.
153. Sanders MC, Theriot JA. Tails from the hall of infection: actin-based motility of pathogens. *Trends Microbiol* 1996;4:211–213.
154. Lasa I, Cossart P. Actin-based bacterial motility: towards a definition of the minimal requirements. *Trends Cell Biol* 1996;6:109–114.
155. Welch MD, Iwamatsu A, Mitchison TJ. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes. Nature* 1997; 385:265–269.
156. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3–15.
157. Zychlinsky A. Programmed cell death in infectious diseases. *Trends Microbiol* 1993;1:114–117.
158. Chen Y, Zychlinsky A. Apoptosis induced by bacterial pathogens. *Microb Pathog* 1994;17:203–212.
159. Monack DM, Raupach B, Hromockyj AE, Falkow S. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9833–9838.
160. Rogers HW, Callery MP, Deck B, Unanue ER. *Listeria monocytogenes* induces

apoptosis of infected hepatocytes. *J Immunol* 1996;156:679–684.

161. Guzman CA, Domann E, Rohde M, et al. Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 1996;20:119–126.
162. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, et al. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 1997;65:298–304.
163. Zychlinsky A, Sansonetti PJ. Apoptosis as a proinflammatory event: what can we learn from bacteria-induced cell death? *Trends Microbiol* 1997;5:201–204.
164. Barsig J, Kaufmann SHE. The mechanism of cell death in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages is distinct from apoptosis. *Infect Immun* 1997;65:4075–4081.
165. Hermant D, Menard R, Arricau N, Parsot C, Popoff MY. Functional conservation of the Salmonella and Shigella effectors of entry into epithelial cells. *Mol Microbiol* 1995;17:781–789.
166. Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 1992;358:167–169.
167. Chen Y, Smith MR, Thirumalai K, Zychlinsky A. A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. *EMBO J* 1996;15:3853–3860.
168. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev* 1989;53:210–230.
169. Gross R, Aricò B, Rappuoli R. Families of bacterial signal-transducing proteins. *Mol Microbiol* 1989;3:1661–1667.
170. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:136–169.
171. Leimeister-Wächter M, Domann E, Chakraborty T. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J Bacteriol* 1992;174: 947–952.
172. Craig EA, Gross CA. Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem Sci* 1991;16:135–140.
173. Kaufmann SHE. Heat shock proteins and pathogenesis of bacterial infections. *Springer Semin Immunopathol* 1991;13:25–36.
174. Kaufmann SHE. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 1990;11:129–136.
175. Schoel B, Kaufmann SHE. The unique role of hsp in infections. In: van Eden W, Young D, eds. *Stress proteins in medicine.* New York: Marcel Dekker Inc, 1996:27–51.
176. Buchmeier NA, Heffron F. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science* 1990;248:730–732.
177. Johnson K, Charles I, Dougan G, et al. The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. *Mol Microbiol* 1991;5:401–407.
178. Morgan RW, Christman MF, Jacobson FS, Storz G, Ames BN. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8059–8063.
179. Metchnikoff E. *Immunity to infectious diseases.* London: Cambridge University Press, 1905.
180. Koch R. Weitere Mitteilungen über ein Heilmittel gegen Tuberkulose. *Dtsch Med Wochenschr* 1890;16:1029–1032.
181. Lurie MB. *Resistance to tuberculosis.* Cambridge, MA: Harvard University Press, 1964.
182. Mackaness GB, Blanden RV. Cellular immunity. *Prog Allergy* 1967;11:89–140.
183. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 1966;153:80–82.
184. Cohn ZA. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. *J Immunol* 1978;121:813–816.
185. David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966;56:72–77.
186. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 1983;158:670–689.
187. Kaufmann SHE. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* 1993;11:129–163.
188. Haslett C, Savill JS, Meagher L. The neutrophil. *Curr Opin Immunol* 1989;2: 10–18.
189. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365–376.
190. Conlan JW. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium,* and *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1997;65:630–635.
191. Conlan JW, North RJ. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J Exp Med* 1991; 174:741–744.
192. Rogers HW, Unanue ER. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect Immun* 1993;61:5090–5096.
193. Conlan JW, North RJ. Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J Exp Med* 1994;179:259–268.
194. Emmerling P, Finger H, Bockemühl J. *Listeria monocytogenes* infection in nude mice. *Infect Immun* 1974;12:437–439.
195. von Behring E. E. v. *Behring's gesammelte Abhandlungen.* Bonn: A. Marcus & E. Webers Verlag, 1915.
196. Janeway CA. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:645–674.
197. Kaufmann SHE. The roles of conventional and unconventional T cells in antibacterial immunity. *ASM News* 1997;63:251–255.
198. Kaufmann SHE. Immunity to intracellular bacteria and protozoa. *Immunologist* 1995;3:221–225.
199. Cheers C, Sandrin MS. Restriction in adoptive transfer of resistance to *Listeria monocytogenes*. *Cell Immunol* 1983;7:199–205.
200. Zinkernagel RM. Restriction by H-2 gene complex of transfer of cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes. Nature* 1974;251:230–233.
201. Kaufmann SHE, Hug E, Väth U, Müller I. Effective protection against *Listeria monocytogenes* and delayed-type hypersensitivity to listerial antigens depend on cooperation between specific L3T4$^+$ and Lyt2$^+$ T cells. *Infect Immun* 1985; 48:263–266.
202. Kaufmann SHE, Simon MM, Hahn H. Specific Lyt 123 T cells are involved in protection against *Listeria monocytogenes* and in delayed-type hypersensitivity to listerial antigens. *J Exp Med* 1979;150:1033–1038.
203. Lukacs K, Kurlander R. Lyt-2$^+$ T cell-mediated protection against listeriosis. Protection correlates with phagocyte depletion but not with IFN-γ production. *J Immunol* 1989;142:2879–2886.
204. Lukacs K, Kurlander RJ. MHC-unrestricted transfer of antilisterial immunity by freshly isolated immune CD8 spleen cells. *J Immunol* 1989;143:3731–3736.
205. Kaufmann SHE, Hug E, DeLibero G. *Listeria monocytogenes*-reactive T lymphocyte clones with cytolytic activity against infected target cells. *J Exp Med* 1986;164:363–368.
206. Kaufmann SHE. Effective antibacterial protection induced by *Listeria monocytogenes*-specific T cell clone and its lymphokines. *Infect Immun* 1983;39: 1265–1270.
207. Kaufmann SHE, Hahn H. Biological functions of T cell lines with specificity for the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* in vitro und in vivo. *J Exp Med* 1982;155:1754–1765.
208. Ladel CH, Flesch IEA, Arnoldi J, Kaufmann SHE. Studies with MHC deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I and MHC II dependent T cell responses in *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 1994;153:3116–3122.
209. Reimann J, Kaufmann SHE. Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. *Curr Opin Immunol* 1997;9:462–469.
210. Harding CV. Alternate pathways of MHC-I antigen processing. In: Kaufmann SHE, ed. *Host response to intracellular pathogens.* Austin, TX: Landes Company, 1997:37–46.
211. Kaufmann SHE. CD8$^-$ T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunol Today* 1988;9:168–174.
212. Xu S, Cooper A, Sturgill-Koszycki S, et al. Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *J Immunol* 1994;153:2568–2576.
213. Clemens DL, Horwitz MA. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 1995;181:257–270.
214. Bouwer HGA, Nelson CS, Gibbins BL, Portnoy DA, Hinrichs DJ. Listeriolysin O is a target of the immune response to *Listeria monocytogenes. J Exp Med* 1992;175:1467–1471.
215. Brunt LM, Portnoy DA, Unanue ER. Presentation of *Listeria monocytogenes* to CD8$^+$ T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth. *J Immunol* 1990;145:3540–3546.
216. Harty JT, Bevan MJ. CD8$^+$ T cells specific for a single nonamer epitope of *Listeria monocytogenes* are protective in vivo. *J Exp Med* 1992;175:1531–1538.
217. DeLibero G, Flesch I, Kaufmann SHE. Mycobacteria reactive Lyt2$^+$ T cell lines. *Eur J Immunol* 1988;18:59–66.
218. Pope M, Kotlarski I. Detection of *Salmonella*-specific L3T4$^+$ and Lyt-2$^+$ T cells which can proliferate *in vitro* and mediate delayed-type hypersensitivity reactivity. *Immunology* 1994;81:183–191.
219. Pope M, Kotlarski I, Doherty K. Induction of Lyt-2$^+$ cytotoxic T lymphocytes following primary and secondary *Salmonella* infection. *Immunology* 1994;81: 177–182.
220. Mazzaccaro RJ, Gedde M, Jensen ER, et al. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11786–11791.
221. Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 1993;361:359–362.
222. Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 1995;267: 243–246.
223. Harding CV, Song R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* 1994; 153:4925–4933.
224. Jondal M, Schirmbeck R, Reimann J. MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 1996;5:295–302.
225. Watts C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 1997;15:821–850.
226. York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major

histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996;14:369–396.

227. Ladel CH, Daugelat S, Kaufmann SHE. Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guerin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. *Eur J Immunol* 1995;25:377–384.
228. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:12013–12017.
229. Müller I, Cobbold SP, Waldmann H, Kaufmann SHE. Impaired resistance against *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective in-vivo depletion of L3T4⁻ and Lyt2⁺ T cells. *Infect Immun* 1987;55:2037–2041.
230. Kaufmann SHE, Rodewald HR, Hug E, De Libero G. Cloned *Listeria monocytogenes* specific non-MHC-restricted Lyt2⁺ T cells with cytolytic and protective activity. *J Immunol* 1988;140:3173–3179.
231. DeLibero G, Kaufmann SHE. Antigen-specific Lyt2⁺ cytolytic T lymphocytes from mice infected with the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 1986;137:2688–2694.
232. Pamer EG, Wang C-R, Flaherty L, Fischer Lindahl K, Bevan MJ. H-2M3 presents a *Listeria monocytogenes* peptide to cytotoxic T lymphocytes. *Cell* 1992;70:215–223.
233. Kurlander RJ, Shawar SM, Brown ML, Rich RR. Specialized role for a murine class I-b MHC molecule in prokaryotic host defenses. *Science* 1992;257:678–679.
234. Lindahl KF, Byers DE, Dabhi VM, et al. H2-M3, a full-service class Ib histocompatibility antigen. *Annu Rev Immunol* 1997;15:851–879.
235. Wang C-R, Castano AR, Peterson PA, Slaughter C, Fischer Lindahl K, Deisenhofer J. Nonclassical binding of formylated peptide in crystal structure of the MHC class Ib molecule H2-M3. *Cell* 1995;82:655–664.
236. Gulden PH, Fischer P III, Sherman NE, et al. A *Listeria monocytogenes* pentapeptide is presented to cytolytic T lymphocytes by the H2-M3 MHC class Ib molecule. *Immunity* 1996;5:73–79.
237. Lenz LL, Dere B, Bevan MJ. Identification of an H2-M3-restricted listeria epitope: implications for antigen presentation by M3. *Immunity* 1996;5:63–72.
238. Lenz LL, Bevan MJ. H2-M3 restricted presentation of *Listeria monocytogenes* antigens. *Immunol Rev* 1996;151:107–121.
239. Szalay G, Ladel CH, Kaufmann SHE. Stimulation of protective CD8⁺ T lymphocytes by vaccination with nonliving bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:12389–12392.
240. Porcelli SA. The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. *Adv Immunol* 1995;59:1–98.
241. Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted αβ⁺ T cells. *Nature* 1994;372:691–694.
242. Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, et al. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 1995;269:227–230.
243. Beckman EM, Melian AM, Behar SM, et al. CD1c restricts responses of mycobacteria-specific T cells: evidence for antigen presentation by a second member of the human CD1 family. *J Immunol* 1996;157:2803.
244. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:535–562.
245. Castano AR, Tangri S, Miller JEW, et al. Peptide binding and presentation by mouse CD1. *Science* 1995;269:223–226.
246. Prigozy TI, Sieling PA, Clemens D, et al. The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity* 1997;6:187–197.
247. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 1995;64:29–63.
248. Smiley ST, Kaplan MH, Grusby MJ. Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. *Science* 1997;275:977–979.
249. Mendiratta SK, Martin WD, Hong S, Boesteanu A, Joyce S, Van Kaer L. CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 1997;6:469–477.
250. Chen YH, Chiu NM, Mandal M, Wang N, Wang CR. Impaired NK1⁺ T cell development and early IL-4 production in CD1⁻ deficient mice. *Immunity* 1997;6:459–467.
251. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1⁺ T lymphocytes. *Science* 1995;268:863–865.
252. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9:4–9.
252a. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V_aNKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997;278:1626–1629.
253. Yoshimoto T, Paul WE. CD4^{pos}, NK1.1^{pos} T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med* 1994;179:1285–1295.
254. Kaufmann SHE. γ/δ and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2272–2279.
255. DeLibero G, Casorati G, Giachino C, et al. Selection by two powerful antigens may account for the presence of the major population of human peripheral γ/δ T cells. *J Exp Med* 1991;173:1311–1322.
256. Kabelitz D, Bender A, Prospero T, Wesselborg S, Janssen O, Pechhold K. The primary response of human γ/δ⁺ T cells to *Mycobacterium tuberculosis* is restricted to Vγ9-bearing cells. *J Exp Med* 1991;173:1331–1338.
257. Kabelitz D, Bender A, Schondelmaier S, Schoel B, Kaufmann SHE. A large fraction of human peripheral blood γ/δ⁺ T cells is activated by *Mycobacterium tuberculosis* but not by its 65-kD heat shock protein. *J Exp Med* 1990;171:667–679.
258. Pfeffer K, Schoel B, Gulle H, Kaufmann SHE, Wagner H. Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of γ/δ T cells are stimulated by protease-resistant ligands. *Eur J Immunol* 1990;20:1175–1179.
259. Schoel B, Zügel U, Ruppert T, Kaufmann SHE. Elongated peptides, not the predicted nonapeptide stimulate a major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte clone with specificity for a bacterial heat shock protein. *Eur J Immunol* 1994;24:3161–3169.
260. Constant P, Davodeau F, Peyrat M-A, et al. Stimulation of human γδ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 1994;264:267–270.
261. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, et al. Nonpeptide ligands for human γδ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8175–8179.
262. Tanaka Y, Morita CT, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human γδ T cells. *Nature* 1995;375:155–158.
263. Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF, et al. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human γδ T cells. *Immunity* 1995;3:495–508.
264. Chien Y-H, Jores R, Crowley MP. Recognition by γ/δ T cells. *Annu Rev Immunol* 1996;14:511–532.
265. Mombaerts P, Arnoldi J, Russ F, Tonegawa S, Kaufmann SHE. Different roles of α/β and γ/δ T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature* 1993;365:53–56.
266. Hiromatsu K, Yoshikai Y, Matsuzaki G, et al. A protective role of γ/δ T cells in primary infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *J Exp Med* 1992;175:49–56.
267. Fu Y-X, Roark CE, Kelly K, et al. Immune protection and control of inflammatory tissue necrosis by γδ T cells. *J Immunol* 1994;153:3101–3115.
268. Skeen MJ, Ziegler HK. Induction of murine peritoneal γ/δ T cells and their role in resistance to bacterial infection. *J Exp Med* 1993;178:971–984.
269. Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kaufmann SHE. Protective role of γ/δ T cells and α/β T cells in tuberculosis. *Eur J Immunol* 1995;25:2877.
270. D'Souza CD, Cooper AM, Frank AA, Mazzaccaro RJ, Bloom BR, Orme IM. An anti-inflammatory role for γδ T lymphocytes in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1997;158:1217–1221.
271. Modlin RL, Pirmez C, Hofmann FM, et al. Lymphocytes bearing antigen-specific γ/δ T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* 1989;339:544–548.
272. Sim G-K. Intraepithelial lymphocytes and the immune system. *Adv Immunol* 1995;58:297–343.
273. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787–793.
274. Liu C-C, Young LHY, Young JDE. Mechanisms of disease. Lymphocyte-mediated cytolysis and disease. *N Engl J Med* 1996;335:1651–1659.
275. Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* 1996;14:207–232.
276. Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Hengartner H, Zinkernagel RM. CD8⁺ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur J Immunol* 1994;24:3068–3072.
277. Kaufmann SHE. Antibacterial vaccines: impact of antigen handling and immune response. *J Mol Med* 1997;75:360–363.
278. Hess J, Gentschev I, Miko D, et al. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant Salmonella vaccine induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1458–1463.
279. Kaufmann SHE, Emoto M, Szalay G, Barsig J, Flesch IEA. Interleukin 4 and listeriosis. *Immunol Rev* 1997;158:95–105.
280. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996;272:50–54.
281. Unanue ER. Macrophages, NK cells and neutrophils in the cytokine loop of Listeria resistance. *Res Immunol* 1996;147:499–504.
282. Dinarello CA. Role of interleukin-1 in infectious diseases. *Immunol Rev* 1992;127:119–146.
283. Tracey KJ, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor and other cytokines in infectious disease. *Curr Opin Immunol* 1989;1:454–461.
284. Van Snick J. Interleukin-6: An overview. *Annu Rev Immunol* 1990;8:253–278.
285. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992;10:411–452.
286. Ward PA, Marks RM. The acute inflammatory reaction. *Curr Opin Immunol* 1989;2:5–9.
287. Taga T, Kishimoto T. GP130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 1997;15:797–819.
288. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997;15:675–705.
289. Vaddi K, Keller M, Newton RC. *The chemokine factsbook.* San Diego: Academic Press, 1997.
290. Schluger NW, Rom WN. Early responses in infection: chemokines as mediators

of inflammation. *Curr Opin Immunol* 1997;9:504–508.
291. Premack BA, Schall TJ. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med* 1996;2:1174–1178.
291a. Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in M macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med* 1997; 186:1757–1762.
292. Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today* 1996;2:198–204.
293. Rutledge BJ, Rayburn H, Rosenberg R, et al. High level monocyte chemoattractant protein-1 expression in transgenic mice increases their susceptibility to intracellular pathogens. *J Immunol* 1995;155:4838–4843.
294. Kopf M, Baumann H, Freer G, et al. Impaired immune and acute phase responses in interleukin-6 deficient mice. *Nature* 1994;368:339–341.
295. Dalrymple SA, Lucian LA, Slattery R, et al. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. *Infect Immun* 1995;63:2262–2268.
296. Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kopf M, Kaufmann SHE. Lethal tuberculosis in interleukin-6 deficient mutant mice. *Infect Immun* 1997;65: 4843–4849.
297. Pfeffer K, Matsuyama T, Kündig TM, et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 1993;73:457–467.
298. Rothe J, Lesslauer W, Lötscher H, et al. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes. Nature* 1993;364:798–802.
299. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, et al. Tumor necrosis factor-α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 1995;2:561–572.
300. Kaplan G, Freedman VH. The role of cytokines in the immune response to tuberculosis. *Res Immunol* 1997;147:565–571.
301. Tramontana JM, Utaipat U, Molloy A, et al. Thalidomide treatment reduces tumor necrosis factor alpha production and enhances weight gain in patients with pulmonary tuberculosis. *Mol Med* 1995;1:384–397.
302. Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, et al. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J Infect Dis* 1993;168:408–414.
303. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon-γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 1993;178:2249–2254.
304. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon-γ gene-disrupted mice. *J Exp Med* 1993; 178:2243–2247.
305. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, et al. Interferon-γ-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. *N Engl J Med* 1996;335: 1956–1961.
306. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, et al. A mutation in the interferon-γ-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996;335: 1941–1949.
307. Maeda J, Ueki N, Ohkawa T, et al. Local production and localization of transforming growth factor-beta in tuberculous pleurisy. *Clin Exp Immunol* 1993;92: 32–38.
308. Hirsch CS, Hussain R, Toossi Z, Dawood G, Shahid F, Ellner JJ. Cross-modulation by transforming growth factor beta in human tuberculosis: suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon gamma production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3193–3198.
309. Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun* 1996;64:1351–1356.
310. Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ. Enhanced production of TGF-β by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-β in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immunol* 1995;154: 465–473.
311. Libraty DH, Airan LE, Uyemura K, et al. Interferon-γ differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. *J Clin Invest* 1997;99: 336–341.
312. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991;254:277–279.
313. Sieling PA, Wang X-H, Gately MK, et al. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J Immunol* 1994;153:3639–3647.
314. Kaufmann SHE, Flesch I. The role of T cell-macrophage interactions in tuberculosis. *Springer Semin Immunopathol* 1988:10:337–358.
315. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997;15:749–795.
316. Murray HW. Interferon-gamma and host antimicrobial defense: current and future clinical applications. *Am J Med* 1994;97:459–467.
317. Denis M, Gregg EO. Studies on cytokine activation of listericidal activity in murine macrophages. *Can J Microbiol* 1990;36:671–675.
318. Flesch I, Kaufmann SHE. Mycobacterial growth inhibition by interferon-γ-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis. J Immunol* 1987;138:4408–4413.
319. Flesch IEA, Hess JH, Kaufmann SHE. Growth inhibition of *Mycobacterium bovis* by IFN-γ stimulated macrophages: regulation by endogenous tumor necrosis factor-α and interleukin 10. *Int Immunol* 1994;6:693–700.
320. Hess J, Ladel C, Miko D, Kaufmann SH. *Salmonella typhimurium* aroA⁻ infection in gene-targeted immunodeficient mice. Major role of CD4⁺ TCR-αβ cells and IFN-γ in bacterial clearance independent of intracellular location. *J Immunol* 1996;156:3321–3326.
321. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-γ genes. *Science* 1993;259:1739–1742.
322. Kamijo R, Shapiro D, Le J, Huang S, Aguet M, Vilcek J. Generation of nitric oxide and induction of major histocompatibility complex class II antigen in macrophages from mice lacking the interferon-γ receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6626–6630.
323. Crowle AJ, Ross EJ, May MH. Inhibition by 1,25(OH)$_2$-vitamin D3 of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infect Immun* 1987;55:2945–2950.
324. Denis M. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. *Clin Exp Immunol* 1991;84:200–206.
325. Douvas GS, Looker DL, Vatter AE, Crowle AJ. Gamma interferon activates human macrophages to become tumoricidal and leishmanicidal but enhances replication of macrophage-associated mycobacteria. *Infect Immun* 1985;50: 1–8.
326. Rook GAW, Taverne J, Leveton C, Steele J. The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumor necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology* 1987;62:229–234.
327. Rigby WFC. The immunobiology of vitamin D. *Immunol Today* 1988;9:33–63.
328. Holland SM, Eisenstein EM, Kuhns DB, et al. Treatment of refractory disseminated nontuberculous mycobacterial infection with interferon gamma. A preliminary report. *N Engl J Med* 1994;330:1348–1355.
329. Raad I, Hachem R, Leeds N, Sawaya R, Salem Z, Atweh S. Use of adjunctive treatment with interferon-gamma in an immunocompromised patient who had refractory multidrug-resistant tuberculosis of the brain. *Clin Infect Dis* 1996;22:572–574.
330. Nathan CF, Kaplan G, Levis WR, et al. Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon-γ in patients with lepromatous leprosy. *N Engl J Med* 1986;316:6–15.
331. Holland SM. Therapy of mycobacterial infections. *Res Immunol* 1996;147: 572–581.
332. Kaufmann SHE, Hahn H, Berger R, Kirchner H. Interferon-γ production by *Listeria monocytogenes*-specific T cells active in antibacterial immunity. *Eur J Immunol* 1983;13:265–268.
333. Nakane A, Numata A, Asano M, Kohanawa M, Chen Y, Minagawa T. Evidence that endogenous gamma interferon is produced early in *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 1990;58:2386–2388.
334. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:251–276.
335. Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *J Leukoc Biol* 1996;59:505–511.
336. Magram J, Connaughton SE, Warrier RR, et al. IL-12-deficient mice are defective in IFN-γ production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 1996;4: 471–481.
337. Zhang M, Gately MK, Wang E, et al. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest* 1994;93:1733–1739.
338. Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor α are costimulators of interferon-γ production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3725–3729.
339. Flesch IEA, Hess JH, Huang S, et al. Early interleukin-12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon-γ and tumor necrosis factor-α. *J Exp Med* 1995;181:1615–1622.
340. Hayes MP, Wang J, Norcross MA. Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood* 1995;86:646–650.
341. Ma X, Chow JM, Gri G, et al. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med* 1996;183:147–157.
342. Tripp CS, Gately MK, Hakimi J, Ling P, Unanue ER. Neutralization of IL-12 decreases resistance to *Listeria* in SCID and C.B-17 mice. *J Immunol* 1994;152: 1883–1887.
343. Cooper AM, Roberts AD, Rhoades ER, Callahan JE, Getzy DM, Orme IM. The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 1995;85:423–432.
344. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Sypek J, Wolf S, Bloom BR. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 1995;155:2515–2524.
344a. Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis. J Exp Med* 1997;186:39–45.
345. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995;378:88–91.
346. Frucht DM, Holland SM. Defective monocyte costimulation for IFN-gamma production in familial disseminated *Mycobacterium avium* complex infection:

abnormal IL-12 regulation. *J Immunol* 1996;157:411–416.
347. Flesch IEA, Kaufmann SHE. Role of macrophages and α/β T lymphocytes in early interleukin-10 production during *Listeria monocytogenes* infection. *Int Immunol* 1994;6:463–468.
348. Dai WJ, Kohler G, Brombacher F. Both innate and acquired immunity to *Listeria monocytogenes* infection are increased in IL-10-deficient mice. *J Immunol* 1997;158:2259–2267.
349. Orme IM, Roberts AD, Griffin JP, Abrams JS. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 1993;151:518–525.
350. Surcel H-M, Troye-Blomberg M, Paulie S, Andersson G, Moreno C, Pasvol G. Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunology* 1994; 81:171–176.
351. Hirsch CS, Ellner JJ, Blinkhorn R, Toossi Z. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor β. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3926–3931.
352. Toossi Z, Ellner JJ. Mechanisms of anergy in tuberculosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;215:221–238.
353. Kaufmann SHE. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol Today* 1995;16:338–342.
354. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4$^+$ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994;12:635–673.
355. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994;12:227–257.
356. Daugelat S, Kaufmann SHE. Role of Th1 and Th2 cells in bacterial infections. In: Romagnani S, ed. *Th1 and Th2 Cells in health and disease.* Basel: Karger, 1996:66–97.
357. Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, et al. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:505–534.
358. Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, et al. Preferential expression of CD30 by human CD4$^+$ T cells producing Th2-type cytokines. *FASEB J* 1995;9:81–86.
359. Munk ME, Kern P, Kaufmann SHE. Human CD30$^-$ cells are induced by *Mycobacterium tuberculosis* and present in tuberculosis lesions. *Int Immunol* 1997;9:713–720.
360. Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, et al. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 1997;185: 825–831.
361. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12Rβ2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997;185:817–824.
362. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major. Annu Rev Immunol* 1995;13:151–177.
363. Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997;275:77–79.
364. Aoki I, Kinzer C, Shirai A, Paul WE, Klinman DM. IgE receptor-positive non-B/non-T cells dominate the production of interleukin 4 and interleukin 6 in immunized mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2534–2538.
365. Cleveland MG, Gorham JD, Murphy TL, Tuomanen E, Murphy KM. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. *Infect Immun* 1996;64:1906–1912.
366. Yoshida A, Koide Y. Arabinofuranosyl-terminated and mannosylated lipoarabinomannans from *Mycobacterium tuberculosis* induce different levels of interleukin-12 expression in murine macrophages. *Infect Immun* 1997;65: 1953–1955.
367. Oswald IP, Dozois CM, Petit J-F, Lemaire G. Interleukin-12 synthesis is a required step in trehalose dimycolate-induced activation of mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1997;65:1364–1369.
368. Hsieh C-S, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4$^+$ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993;260:547–549.
369. Emoto M, Emoto Y, Kaufmann SHE. Bacille Calmette Guérin and interleukin-12 (IL-12) down-modulate IL-4-producing CD4$^+$ NK1$^+$ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1997;27:183–188.
369a. Chen H, Paul WE. Cultured NK1.1$^+$ CD4$^+$ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-γ upon activation by anti-CD3 or CD1. *J Immunol* 1997;159: 2240–2249.
370. Szalay G, Ladel C, Blum C, Kaufmann SHE. IL-4 neutralization or TNF-α treatment ameliorates disease by a bacterial Th1 pathogen in IFN-γ receptor deficient mice. *J Immunol* 1996;157:4746–4750.
371. Grewal IS, Flavell RA. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4$^+$ T-cell responses. *Immunol Today* 1996;17:410–414.
372. Bluestone JA. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity* 1995;2:555–559.
373. Noelle RJ. CD40 and its ligand in host defense. *Immunity* 1996;4:415–419.
374. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4$^+$ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997;15:297–322.
375. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233–258.
376. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 1994;12:881–922.
377. Soong L, Xu JC, Grewal IS, et al. Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity* 1996;4:263–273.
378. Campbell KA, Ovendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG, Maliszewski CR. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major. Immunity* 1996;4:283–289.
379. Kamanaka M, Yu P, Yasui T, et al. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. *Immunity* 1996; 4:275–281.
380. Grewal IS, Borrow P, Pamer EG, Oldstone MBA, Flavell RA. The CD40/CD154 system in anti-infective host defense. *Curr Opin Immunol* 1997;9:491–497.
381. Holmberg LA, Ault KA. Characterization of *Listeria monocytogenes*-induced murine natural killer cells. *Immunol Res* 1986;5:50–60.
382. Blanchard DK, Michelini-Norris MB, Friedman H, Djeu JY. Lysis of mycobacteria-infected monocytes by IL-2-activated killer cells: role of LFA-1. *Cell Immunol* 1989;119:402–411.
383. Blanchard DK, Stewart WEII, Klein TW, Friedman H, Djeu JY. Cytolytic activity of human peripheral blood leukocytes against *Legionella pneumophila*-infected monocytes: characterization of the effector cell and augmentation by interleukin 2. *J Immunol* 1987;139:551–556.
384. Carl M, Dasch GA. Characterization of human cytotoxic lymphocytes against cells infected with typhus group Rickettsiae: evidence for lymphokine activation of effectors. *J Immunol* 1986;136:2654–2661.
385. Rollwagen FM, Dasch GA, Jerrells TR. Mechanisms of immunity to Rickettsial infection: characterization of a cytotoxic effector cell. *J Immunol* 1986;136: 1418–1421.
386. Munk ME, Gatrill A, Kaufmann SHE. Antigen-specific target cell lysis and interleukin-2 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-activated γ/δ T cells. *J Immunol* 1990;145:2434–2439.
387. Stenger S, Uyemura K, Cho S, et al. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 1997;276:1684–1687.
388. Kumararatne DS, Pithie AS, Drysdale P, et al. Specific lysis of mycobacterial antigen-bearing macrophages by class II MHC-restricted polyclonal T cell lines in healthy donors or patients with tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1990;80: 314–323.
389. Mustafa AS, Godal T. BCG induced CD4$^+$ cytotoxic T cells from BCG vaccinated healthy subjects: relation between cytotoxicity and suppression in vitro. *Clin Exp Immunol* 1987;69:255–262.
390. Rees ADM, Scoging A, Mehlert A, Young DB, Ivanyi J. Specificity of proliferative response of human CD8 clones to mycobacterial antigens. *Eur J Immunol* 1988;18:1881–1887.
391. Turner J, Dockrell HM. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8$^+$ T cells *in vitro. Immunology* 1996;87:339–342.
392. Sasaki T, Mieno M, Udono H, et al. Roles of CD4$^+$ and CD8$^+$ cells, and the effect of administration of recombinant murine interferon-γ in listerial infection. *J Exp Med* 1990;171:1141.
393. Cooper CL, Mueller C, Sinchaisri TA, et al. Analysis of naturally occurring delayed type hypersensitivity reactions in leprosy by in situ hybridization. *J Exp Med* 1989;169:1565–1581.
394. Mehra V, Modlin RL. T lymphocytes in leprosy lesions. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989;155:97–109.
395. Laochumroonvorapong P, Wang J, Liu C-C, et al. Perforin, a cytotoxic molecule which mediates cell necrosis, is not required for the early control of mycobacterial infection in mice. *Infect Immun* 1997;65:127–132.
396. Cooper AM, D'Souza C, Frank AA, Orme IM. The course of *Mycobacterium tuberculosis* infection in the lungs of mice lacking expression of either perforin- or granzyme-mediated cytolytic mechanisms. *Infect Immun* 1997;65:1317–1320.
396a. Blanchard DK, Wei S, Duan C, Pericle F, Diaz JI, Djeu JY. Role of extracellular adenosine triphosphate in the cytotoxic T-lymphocyte-mediated lysis of antigen presenting cells. *Blood* 1995;85:3173–3182.
397. Dannenberg AM Jr. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today* 1991;12:228–233.
398. Warren KS. A functional classification of granulomatous inflammation. *Ann NY Acad Sci* 1976;278:7–18.
399. Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SMM, et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 1213–1217.
400. Salmi M, Jalkanen S. How do lymphocytes know where to go: current concepts and enigmas of lymphocyte homing. *Adv Immunol* 1997;64:139–218.
401. Barnes PF, Fong S-J, Brennan PJ, Twomey PE, Mazumder A, Modlin RL. Local production of tumor necrosis factor and IFN-γ in tuberculous pleuritis. *J Immunol* 1990;145:149–154.
402. Friedland JS, Remick DG, Shattock R, Griffin GE. Secretion of interleukin-8 following phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocyte cell lines. *Eur J Immunol* 1992;22:1373–1378.
403. Ogawa T, Uchida H, Kusumoto Y, Mori Y, Yamamura Y, Hamada S. Increase in tumor necrosis factor alpha- and *interleukin-6-secreting cells in peripheral*

blood mononuclear cells from subjects infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1991;59:3021–3025.

404. Colten HR, Krause JE. Pulmonary inflammation—a balancing act. *N Engl J Med* 1997;336:1094–1096.

404a. Donnelly SC, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critial role in inflammatory disease. *Mol Med Today* 1997;3:502–507.

405. Dustin ML, Springer TA. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu Rev Immunol* 1991;9:27–66.

406. Lasky LA. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 1992;258:964–969.

407. McEver RP. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr Opin Cell* Biol 1992; 4:840–849.

408. Imhof BA, Dunon D. Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol* 1995; 58:345–416.

409. Mielke MEA, Rosen H, Brocke S, Peters C, Hahn H. Protective immunity and granuloma formation are mediated by two distinct tumor necrosis factor alpha- and gamma-interferon-dependent T cell-phagocyte interactions in murine listeriosis: dissociation on the basis of phagocyte adhesion mechanisms. *Infect Immun* 1992;60:1875–1882.

410. Mielke MEA, Niedobitek G, Stein H, Hahn H. Acquired resistance to *Listeria monocytogenes* is mediated by Lyt-2⁻ T cells independently of the influx of monocytes into granulomatous lesions. *J Exp Med* 1989;170:589–594.

411. Mielke MEA, Ehlers S, Hahn H. T-cell subsets in delayed-type hypersensitivity, protectin, and granuloma formation in primary and secondary Listeria infection in mice: superior role of Lyt-2⁻ cells in acquired immunity. *Infect Immun* 1988; 56:1920–1925.

412. Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol* 1994; 102:828–832.

413. Gaylord H, Brennan PJ. Leprosy and the leprosy bacillus: recent developments in characterization of antigens in immunology of the disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:645–675.

414. Godal T, Myrvang B, Fröland SS, Shao J, Melaku G. Evidence that the mechanism of immunological tolerance ("central failure") is operative in the lack of host resistance in lepromatous leprosy. *Scand J Immunol* 1972;1:311–321.

415. Myrvang B, Godal T, Ridley DS, Froland SS, Song YK. Immune responsiveness of *Mycobacterium leprae* and other mycobacterial antigens throughout the clinical and histopathological spectrum of leprosy. *Clin Exp Immunol* 1973;14: 541–553.

416. Rees RJW. The significance of the lepromin reaction in man. *Prog Allergy* 1964;8:224–258.

417. Turk JL, Waters MFR. Cell-mediated immunity in patients with leprosy. *Lancet* 1969;ii:243–246.

418. Waldorf DS, Sheagren JN, Trautman JR, Block JB. Impaired delayed hypersensitivity in patients with lepromatous leprosy. *Lancet* 1966;ii:733–776.

419. Horwitz MA, Levis WR, Cohn ZA. Defective production of monocyte activating lymphokines in lepromatous leprosy. *J Exp Med* 1984;159:666–678.

420. Maes HH, Causse JE, Maes RF. Mycobacterial infections: are the observed enigmas and paradoxes explained by immunosuppression and immunodeficiency? *Med Hypotheses* 1996;46:163–171.

421. Bloom BR, Mehra V. Immunological unresponsiveness in leprosy. *Immunol Rev* 1984;80:5–28.

422. Modlin RL, Brenner MB, Krangel MS, Duby AD, Bloom BR. T-cell receptors of human suppressor cells. *Nature* 1987;329:541–545.

423. Kaplan G, Sampaio EP, Walsh GP, et al. Influence of *Mycobacterium leprae* and its soluble products on the cutaneous responsiveness of leprosy patients to antigen and recombinant interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6269–6273.

424. Kaplan G, Sheftel G, Job CK, Mathur NK, Nath I, Cohn ZA. Efficacy of a cell-mediated reaction to the purified protein derivative of tuberculin in the disposal of *Mycobacterium leprae* from human skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 5210–5214.

425. Kaplan G, Laal S, Sheftel G, et al. The nature and kinetics of a delayed immune response to purified protein derivative of tuberculin in the skin of lepromatous leprosy patients. *J Exp Med* 1988;168:1811–1824.

426. Kaplan G, Kiessling R, Teklemariam S, et al. The reconstitution of cell-mediated immunity in the cutaneous lesions of lepromatous leprosy by recombinant interleukin 2. *J Exp Med* 1989;169:893–907.

427. Bullock WJ. Studies of immune mechanisms in leprosy. I. Depression of delayed allergic response to skin test antigens. *N Engl J Med* 1968;278:298.

428. Haregewoin A, Mustafa AS, Helle I, Waters MFR, Leiker DL, Godal T. Reversal by interleukin-2 of the T cell unresponsiveness of lepromatous leprosy to *Mycobacterium leprae*. *Immunol Rev* 1984;80:77–86.

429. Kaplan G, Weinstein DE, Steinman RM, et al. An analysis of in vitro T cell responsiveness in lepromatous leprosy. *J Exp Med* 1985;162:917–929.

430. Nogueira N, Kaplan G, Levy E, Sarno E, Kushner P. Defective γ-interferon production in leprosy. Reversal with antigen and interleukin 2. *J Exp Med* 1983; 158:2165–2170.

431. Ellner JJ, Daniel TM. Immunosuppression by mycobacterial arabinomannan. *Clin Exp Immunol* 1979;35:250–257.

432. Hunter SW, Gaylord H, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharides of the tubercle and leprosy bacilli. *J Biol Chem* 1986;261:12345–12351.

433. Prasad HK, Mishra RS, Nath I. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* induces general suppression of *in vitro* concanavalin A responses unrelated to leprosy type. *J Exp Med* 1987;165:239–244.

434. Salgame PR, Abrams JS, Clayberger C, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991;254: 279–282.

435. Reiter H, Ed. Die Säuglingstuberkulose in Lübeck. Berlin: Julius Springer, 1935.

436. Schurr E, Malo D, Radzioch D, et al. Genetic control of innate resistance to mycobacterial infections. *Immunol Today* 1991;12:A42–A45.

437. Schurr E, Buschman E, Malo D, Gros P, Skamene E. Immunogenetics of mycobacterial infections: mouse-human homologies. *J Infect Dis* 1990;161:634–639.

438. Skamene E, Pietrangeli CE. Genetics of the immune response to infectious pathogens. *Curr Opin Immunol* 1991;3:511–517.

439. Malo D, Skamene E. Genetic control of host resistance to infection. *Trends Genet* 1994;10:365–371.

440. Buschman E, Schurr E, Skamene E. Constitutional resistance to mycobacterial infection: role of genetic factors in resistance to infection. In: Verduin CM, Watson DA, van Dijk H, Verhoef J, eds. *Constitutional resistance to infection*. Austin, TX: R.G. Landes Company, 1995:55–81.

441. Plant J, Glynn AA. Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Infect Dis* 1976;133:72–78.

442. Nikonenko BV, Apt AS, Mezhlumova MB, Avdienko VG, Yeremeev VV, Moroz AM. Influence of the mouse Bcg, Tbc-1 and xid genes on resistance and immune responses to tuberculosis infection and efficacy of bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination. *Clin Exp Immunol* 1996;104:37–43.

443. Medina E, North RJ. Evidence inconsistent with a role for the Bcg gene (Nramp1) in resistance of mice to infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1996;183:1045–1051.

444. Medina E, Rogerson BJ, North RJ. The *Nramp1* antimicrobial resistance gene segregates independently of resistance to virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* 1996;88:479–481.

445. Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for BCG. *Cell* 1993;73: 469–485.

446. Cellier M, Govoni G, Vidal S, et al. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med* 1994;180:1741–1752.

447. Blackwell JM, Barton CH, White JK, et al. Genomic organization and sequence of the human NRAMP gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism. *Mol Med* 1995;1:194–205.

448. Abel L, Vu DL, Oberti J, et al. Complex segregation analysis of leprosy in southern Vietnam. *Genet Epidemiol* 1995;12:63–82.

449. Shaw MA, Atkinson S, Dockrell H, et al. An RFLP map for 2q33-q37 from multicase mycobacterial and leishmanial disease families: no evidence for an Lsh/Ity/Bcg gene homologue influencing susceptibility to leprosy. *Ann Hum Genet* 1993;57:251–271.

450. Levee G, Liu J, Gicquel B, Chanteau S, Schurr E. Genetic control of susceptibility to leprosy in French Polynesia: no evidence for linkage with markers on telomeric human chromosome 2. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1994;62:499–511.

451. Abel L, Dessein AJ. The impact of host genetics on susceptibility to human infectious diseases. *Curr Opin Immunol* 1997;9:509–516.

451a. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KPWJ, Whittle HC, Hill AVS. Variations in the *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Eng J Med* 1998;338:640–644.

452. Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, et al. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J Exp Med* 1995;182:655–666.

453. Govoni G, Vidal S, Gauthier S, Skamene E, Malo D, Gros P. The *Bcg/Ity/Lsh* locus: genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the $Nramp1^{Gly169}$ allele. *Infect Immun* 1996;64:2923–2929.

454. Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the *Nramp1* protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* 1997;185:717–730.

454a. Atkinson GP, Blackwell JM, Barton HC. Nramp1 locus encodes a 65 kDa interferon-γ-inducible protein in murine macrophages. *Biochem J* 1997;325: 779–786.

454b. Gunshin H, Mackenzie B, v Berger U, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997;388:482–488.

455. Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, et al. Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 1991;352: 595–600.

456. Hill AV, Elvin J, Willis AC, et al. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 1992;360:434–439.

457. Hill AVS. MHC polymorphism and susceptibility to intracellular infections in humans. In: Kaufmann SHE, ed. *Host response to intracellular pathogens*. Austin, TX: R.G. Landes Company, 1997:47–60.

458. Mehra NK. Role of HLA-linked factors in governing susceptibility to leprosy and tuberculosis. *Trop Med Parasitol* 1990;41:352–354.

459. Pitchappan RM. Genetics of tuberculosis susceptibility. *Trop Med Parasitol*

1990;41:355–356.
460. van Eden W, DeVries RRP. HLA and leprosy: re-evaluation. *Lepr Rev* 1984;55: 89–104.
461. Kaslow RA, Shaw S. The role of histocompatibility antigens (HLA) in infection. *Epidemiol Rev* 1981;3:90–114.
462. Bothamley GH, Beck JS, Schreuder GM, et al. Association of tuberculosis and *M. tuberculosis*-specific antibody levels with HLA. *J Infect Dis* 1989;159: 549–555.
463. Todd JR, West BC, McDonald JC. Human leukocyte antigen and leprosy: study in northern Louisiana and review. *Rev Infect Dis* 1990;12:63–74.
464. van Eden W, Gonzalez NM, de Vries RR, Convit J, van Rood JJ. HLA-linked control of predisposition to lepromatous leprosy. *J Infect Dis* 1985;151:9–14.
465. Ottenhoff TH, de Vries RR. HLA class II immune response and suppression genes in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1987;55:521–534.
466. Zerva L, Cizman B, Mehra NK, et al. Arginine at positions 13 or 70-71 in pocket 4 of HLA-DRB1 alleles is associated with susceptibility to tuberculoid leprosy. *J Exp Med* 1996;183:829–836.
467. Rajalingam R, Mehra NK, Jain RC, Myneedu VP, Pande JN. Polymerase chain reaction—based sequence-specific oligonucleotide hybridization analysis of HLA class II antigens in pulmonary tuberculosis: relevance to chemotherapy and disease severity. *J Infect Dis* 1996;173:669–676.
468. Cheers C, McKenzie IFC, Pavlov H, Waid C, York J. Resistance and susceptibility of mice in bacterial infection: course of listeriosis in resistant or susceptible mice. *Infect Immun* 1978;19:763–777.
469. Stevenson MM, Kongshavn PAL, Skamene E. Genetic linkage of resistance to *Listeria monocytogenes* with macrophage inflammatory responses. *J Immunol* 1981;127:402–407.
470. Gervais F, Desforges C, Skamene E. The C5-sufficient A/J congenic mouse strain. Inflammatory response and resistance to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 1989;142:2057–2060.
471. Höpken UE, Lu B, Gerard NP, Gerard C. The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection. *Nature* 1996;383:86–89.
472. Yoshida S, Goto Y, Mizuguchi Y, Nomoto K, Skamene E. Genetic control of natural resistance in mouse macrophages regulating intracellular Legionella pneumophila multiplication in vitro. *Infect Immun* 1991;59:428–432.
473. Dietrich WF, Damron DM, Isberg RR, Lander ES, Swanson MS. *Lgn1*, a gene that determines susceptibility to *Legionella pneumophila*, maps to mouse chromosome 13. *Genomics* 1995;26:443–450.
474. Beckers M-C, Ernst E, Diez E, et al. High-resolution linkage map of mouse chromosome 13 in the vicinity of the host resistance locus *Lgn1*.*Genomics* 1997;39:254–263.
475. Scharf JM, Damron D, Frisella A, et al. The mouse region syntenic for human spinal muscular atrophy lies within the *Lgn1* critical interval and contains multiple copies of *Naip* exon 5. *Genomics* 1996;38:405–417.
476. Biozzi G, Mouton D, Stiffel C, Bouthillier Y. Macrophage in regulation of immunoresponsiveness. *Adv Immunol* 1984;36:189–234.

第41章　抗胞外菌免疫

Moon H. Nahm, Micheal A. Apicella, and David E. Briles[①]

1373　引起人类疾病的病原菌多种多样。根据感染的发病机制及导致的免疫应答,可将病原菌分为两类:引起胞内感染的胞内菌和引起胞外感染的胞外菌。大多数胞内菌被吞噬后,可干扰吞噬体与溶酶体的融合或逃离吞噬体进入胞浆,因而存活下来。机体对胞内菌的防御,主要通过细胞免疫完成(第40章)。与此相反,由于胞外菌具有可最大程度降低抗体、补体调理作用及裂解效应的表面,因此可逃避吞噬作用并在宿主中存活下来。尽管胞外菌具有进入、通过细胞的能力,可以从体内的一个环境迁移到另一个环境,但胞外菌一旦被吞噬细胞捕获就被杀死。宿主对胞外菌的防御主要通过补体和特异性的抗体完成。表41.1列举了许多重要的胞外菌及其引起的疾病和主要致病因子。本章描述了胞外菌的表面结构,举例说明了这些细菌是怎样感染宿主并导致疾病。同时也讨论了天然免疫和特异性免疫在宿主防御胞外菌中的重要性。

革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的表面结构

同胞内菌一样,根据革兰氏染色,胞外菌也分为革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌。细菌表面结构分为3层:细胞质膜、细胞壁和外层。图41.1A、B为肺炎球菌和脑膜炎球菌的表面结构。尽管下面要详细描述这3层结构,但这只是为了讨论的方便,实际上这几层结构并非完全分开。锚合在细胞质膜或细胞壁的分子可以进入或穿过其他层。因此,在细胞壁和外层结构上除了肽聚糖和荚膜多糖(capsular polysaccharide ,PS)外还有其他分子。应当注意的是,荚膜、O抗原和细胞壁这些屏障在结构上并不相邻,而具有一定的间隙以便分泌产物、营养物质以及免疫因子如抗体、补体的通过(图41.1)。

① M.H.Nahm: Departments of Pediatrics, Pathology, and Internal Medicine, University of Rochester, Rochester, New York 1462 – 8777. M.A. Apicelle: Department of Microbiology, University of Iowa, Iowa City, Iowa 52242. D.E. Briles: Department of Microbiology, University of Alabama, Birmingham, Alabama 35294.

表 41.1　常见胞外菌及其引起的疾病

1374

种　类	疾　病	重要的致病结构和分子	引起宿主感染的关键因素
淋球菌	尿道炎，子宫颈炎，输卵管炎，子宫内膜炎，前列腺炎，关节炎，直肠炎，咽炎	脂多糖，菌毛，肽聚糖，Opa 蛋白，未鉴定的黏附素和透明质酸酶	生活时相和抗原性改变，抗原分子模拟人抗原
脑膜炎奈瑟菌	脑膜炎，脑膜炎球菌血症，关节炎，肺炎，携带者	荚膜多糖，脂多糖，菌毛，膜蛋白，未鉴定的黏附素和透明质酸酶	生活时相和抗原性改变，抗原分子模拟人抗原
B 型流感杆菌	脑膜炎，脓毒症，关节炎，会厌炎，携带者	荚膜多糖，脂多糖，菌毛，肽聚糖	体内无症状定居，生活时相和抗原性改变，抗原分子模拟人抗原
未分型流感杆菌	中耳炎，支气管炎，肺炎，新生儿败血症，子宫内膜炎，携带者	脂多糖，菌毛，黏连性原纤维，肽聚糖	生活时相和抗原性改变，抗原分子模拟人抗原
杜克雷嗜血杆菌	生殖器溃疡	脂多糖（?），黏附性原纤维，红细胞溶解素	抗原分子模拟人抗原
百日咳博德特氏菌	儿童百日咳，成人慢性咳嗽综合征	百日咳毒素 百日咳杆菌黏附素，丝状红细胞凝集素菌毛，纤毛毒素	毒素表达的协调性调节
铜绿假单胞菌	对受损个体的感染，肺炎，脓毒血症	脂多糖，蛋白水解酶，脂肪酶，卵磷脂酶，外毒素 A，弹性蛋白酶	容量相对较大的基因组，对环境的改变有较强的适应力（碱基有 6 兆）
大肠杆菌	泌尿道感染，败血症，旅行者腹泻，痢疾，脑膜炎，溶血性尿毒性综合征	荚膜多糖，脂多糖，菌毛，毒素	脂多糖及荚膜抗原性的不均一性
霍乱弧菌	腹泻	霍乱毒素，菌毛	霍乱毒素引起严重腹泻和呕吐
缠绕杆菌属	消化性溃疡	脲酶，鞭毛	在低 pH 值环境生活，没有与之竞争的细菌或可有效的逃避免疫监视
梅毒螺旋体	局部生殖器溃疡，播散性感染，三期梅毒	内部鞭毛，稀有外膜蛋白	暴露的抗原性部位有限
肺炎球菌	肺炎，中耳炎，脑膜炎，鼻窦炎	荚膜多糖，PspA，肺炎球菌溶血素，神经酰胺酶，PsaA，透明质酸酶，胞壁酸	有症状的定居，不断进行遗传转化产生新的基因型
金黄色葡萄球菌	脓疱病，毛囊炎，疖，蜂窝组织炎，创伤感染，中毒性休克，骨髓炎，心内膜炎，菌血症，肺炎，食物中毒	组织降解酶，α 毒素和其他膜损伤毒素，表皮溶解毒素，肠毒素，荚膜	抵抗脱水，无症状定居，致病因子表达的调节
化脓性链球菌	急性咽炎，猩红热，坏死性筋膜炎，链球菌毒性休克，风湿热，肾小球肾炎	透明质酸荚膜，M 蛋白，链球菌性高热外毒素，链球菌溶血素 O，链球菌溶血素 S	抗原性分子模仿人抗原，M 蛋白的高度多样性，噬菌体相关的毒性特性
无乳链球菌	菌血症，肺炎，中耳炎，其他局部感染	荚膜，β 溶血素，透明质酸酶	无症状定居，在分娩过程中传播给婴儿
白喉棒状杆菌	白喉	白喉毒素	毒性基因含有温和噬菌体，其表达受铁浓度的调节
破伤风梭菌	破伤风	破伤风毒素（影响中枢神经系统）	土壤中厌氧芽孢杆菌的机会性感染
产气荚膜梭菌	气性坏疽，厌氧性蜂窝组织炎，子宫内膜炎，食物中毒	10 种以上外毒素	伤口感染

除了柔膜细菌（包括支原体），这两类病原菌都有细胞壁。细胞壁包在细胞质膜外，由肽聚糖组成，肽聚糖是氨基糖（*N*-乙酰葡糖氨和胞壁酸组成）和氨基酸高度交联形成的多聚体。肽聚糖的聚合作用由酶催化，这些酶大部分是青霉素结合蛋白。与革兰氏阴性菌相比，革兰氏阳性菌的细胞壁较厚（20～30 nm，革兰氏阴性菌为 2～4 nm），因此革兰氏染色为阳性。细胞壁可在极端环境中保护细菌（特别是在不同的渗透压中）。革兰氏阳性菌的细胞壁可以保护细菌抵抗补体介导的裂解。

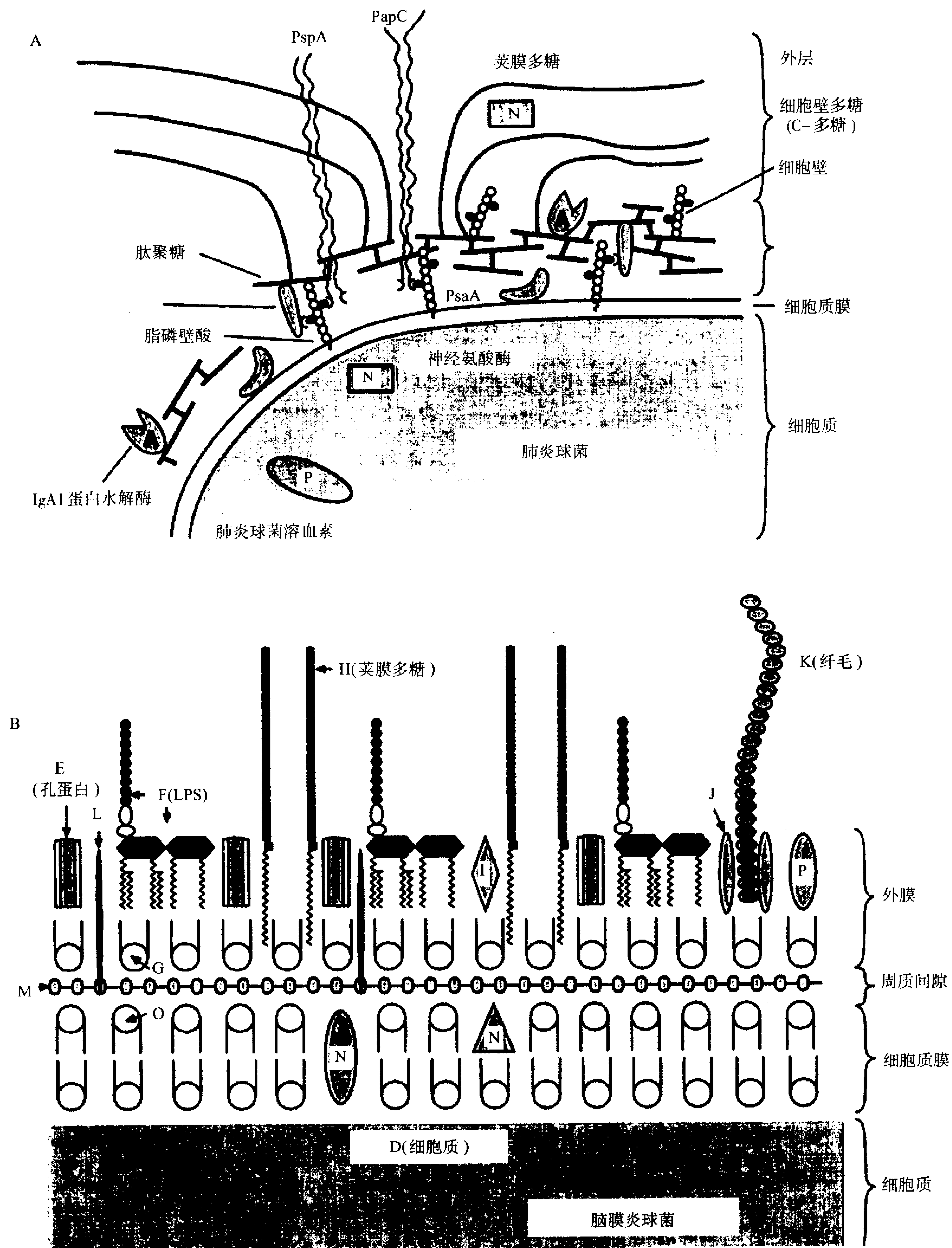


图 41.1 革兰氏阳性菌 (A) 和革兰氏阴性菌 (B) 图示。D,细胞质；E,孔蛋白；F, LPS；G,膜磷脂；H,荚膜多糖；I 和 P, 外膜蛋白;J, 纤毛通道；K, 纤毛;L, 肽聚糖相关蛋白；M, 肽聚糖；N, 细胞膜蛋白质;O, 膜磷脂。通常将肺炎球菌的细胞壁多糖称为 C-多糖。

除了肽聚糖外,许多细菌的细胞壁上有多糖。这些细胞壁多糖常常延伸到荚膜区域。不同革兰氏阳性菌细胞壁多糖不同,可用于链球菌的分类(如 A、B、C 组等)[1,2]。肺炎球菌的细胞壁多糖是胞壁酸(称为 C-多糖,见图 41.1A)。肺炎球菌不同菌株的 C-多糖相同[3,4]。也时常发现革兰氏阳性菌的脂磷壁酸同细胞质膜连接并穿过细胞壁[5]。在肺炎球菌中,脂磷壁酸(也称为 F 抗原)的多糖结构和细胞壁胞壁酸非常相似,只是同细胞表面连接方式不同[6]。

革兰氏阳性菌的细胞壁和外层有许多细胞表面蛋白质,这些蛋白质有许多功能,包括黏附,对宿主底物的酶活性,运输营养物质及干扰补体沉积。例如,肺炎球菌的 PspA[7,8]、PspC[7]、PsaA[9]、自溶菌素[10]、IgA 1 蛋白酶[11,12]及对其性能了解不多的蛋白质如 C3 蛋白水解酶[13]和 HSP72[14]。C3 蛋白水解酶可以使血清中的天然 C3 失活。PspA 可以干扰补体固定[7],并在(细菌的)定居中发挥作用[15]. 在小鼠中, PspA、自溶菌素、HSP72 和 PsaA 都可诱发保护性的免疫应答[9,14,16~18]。肺炎球菌、许多其他胞外菌包括奈瑟氏菌属和嗜血杆菌都可以产生水解 IgA1(人分泌型 IgA 的最普遍的形式)的蛋白水解酶[11,12]。化脓性链球菌 M 蛋白高度变化并具有菌株特异性,该蛋白可以干扰补体活化。

在肺炎球菌中,许多位于细胞壁和外层的蛋白质有氯化胆碱的结合部位,这些蛋白质通过该部位附着于胞壁酸和脂磷壁酸的磷酸胆碱残基[7,19]。在其他革兰氏阳性菌如 A 型链球菌、葡萄球菌中,大多数表面蛋白都有一个 LPXTGX 的肽基序,该序列位于一个称为终止-转移序列的疏水性伸张之前。在葡萄球菌中,LPX-TGX 序列在苏氨酸的羧基处被分开 ,并与细菌细胞壁上的 5 个甘氨酸组成的交联桥的自由氨基共价连接[20,21],因此蛋白质得以附着于细胞壁。这样的一些蛋白质是开发蛋白质疫苗的候选者[22]。

革兰氏阴性菌的细胞壁比革兰氏阳性菌薄。革兰氏阴性菌与革兰氏阳性菌的另一个主要区别在于革兰氏阴性菌有外膜。外膜由不对称的双层组成:内部小叶主要由磷脂组成,外部小叶由 LPS 的类脂 A 组成。除了包围于细胞外,外膜包含有蛋白质、酶、透明质酸酶、黏附素和毒素,这些蛋白质在细菌的发病机制中具有重要作用,并且是宿主细胞,噬菌体和细菌结合作用中识别的靶分子。尽管外膜是许多分子的选择性屏障,但外膜对离子的通透性比细胞质膜高,并且不易因渗透压的改变而破裂。在细胞壁和外膜之间的空间称为胞质周围间隙,此处聚集了多种水解酶以及可结合并逆浓度梯度运输底物的蛋白质。这一间隙中也含有来自细胞质膜的寡糖,这些寡糖用于调节细胞内的渗透压。

革兰氏阴性菌的外膜有脂多糖(endotoxin,也称为内毒素)。LPS 是一个兼性分子,由 4 个不同的区域组成:类脂 A、内核、外核和 O 抗原。类脂 A 由焦磷酸键联结的氨基葡萄糖聚二糖链以及与其通过酰胺键和酯键连接的饱和脂肪酸(12~16 碳)。类脂 A 是大多数革兰氏阴性菌的主要毒性成分,也是外部小叶的主要脂类成分,类脂 A 的酰基部分深入到磷脂内部小叶。LPS 的碳水化合物部分通过革兰氏阴性菌特有的分子酮基脱氧辛酸与类脂 A 连接。这一分子同 3 个庚糖组成了 LPS 的内核。外核由 7~10 个单糖单位组成,在不同种类的革兰氏阴性菌中,这些单糖单位的排列相对保守[23]。

在大多数革兰氏阴性菌中,LPS 的外核同 O 抗原连接,碳水化合物的四聚体或六聚体形成的重复序列组成 O 抗原。O 抗原在细菌周围形成一个亲水性屏障,可以防止补体沉积于细胞表面。O 抗原的长度不同,抗原性多种多样,由此形成了血清型特异性。大肠杆菌、克雷伯氏菌属和沙门氏菌的 O 抗原有 30 多个由 4~6 个糖分子组成的重复单位[23]。奈瑟氏球菌属、流感杆菌、杜克雷嗜血杆菌的 LPS 没有 O 抗原,碳水化合物区域的分子质量小于 7 kDa。这些病原体的 LPS 称为 脂-低聚糖(lipo-oligosaccharides, LOS),以便与其他具有长链碳水化合物的 LPS 区别[24]。

除了 LPS 外,外膜还有许多蛋白质,大肠杆菌或奈瑟氏球菌属在其外膜有 20~30 种不同的蛋白质,而梅毒螺旋体的外膜几乎没有蛋白质。外膜的主要蛋白质为孔蛋白,该蛋白质可以促进亲水小分子通过外膜。孔蛋白是一个同源三聚体,形成一个穿过外部小叶、由不连续微孔组成的通道。大部分孔蛋白没有选择性,但也有一些孔蛋白是特定代谢物传送系统的组成部分(例如大肠杆菌的 LamB 孔蛋白,介导麦芽糖的运输[23])。选择性孔蛋白的表达取决于环境中是否有底物的存在。外部小叶的一些孔蛋白是移动疏水化合物(例如四环素)泵系统的组成成分,或者形成专供菌毛延伸到细胞膜外的出口[23,25]。

革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的外层主要由多糖组成。肺炎球菌的荚膜多糖(capsular,PS)同细胞壁共价连接。在革兰氏阴性菌中,外层主要由 LPS 和 荚膜多糖组成。在脑膜炎球菌中,荚膜多糖通过酰基链锚合于外部小叶。胞外菌的外层发育良好并有许多特征使细菌逃避宿主的免疫系统。首先,外层有降低胞外菌同真核细胞(包括吞噬细胞)表面附着的特性。一般说来,荚膜多糖使细菌具有亲水性并带有负电荷,类似富含唾液酸的真核细胞。大多数荚膜多糖提供了至少可以部分抵抗替代途径中补体固定的负电荷表面,因为它们具有促进 C3b 降解的能力[26]。第二,由于一些荚膜多糖和 LPS 同一些宿主抗原相似,因此,将抗体的产生降低到最少,下文中将详细描述这一特性。这一特点也有助于减少细菌同宿主间的相互作用。第三,外层作为细菌大部分表面成分的物理性面具,最大程度地减少了被抗体和补体识别的表位数目。尽管荚膜多孔,但在荚膜表面下抗体的结合及补体的固定不足以启动调理素介导的吞噬作用及血液对其的清除作用[27]。最后,一些蛋白质通过干扰补体沉积,进一步增强外层的保护作用。

1377

即使在同一种细菌中,多糖和蛋白质也常常表现出遗传多样性。有时,一个等位基因编码的抗原诱导的抗体,同其他等位基因编码的抗原只有微弱的交叉反应或根本不反应,这一多态性使细菌逃避前一次感染诱导的抗原特异性免疫。例如,肺炎球菌有 90 种血清型截然不同的荚膜多糖[28],其中有 20 种以上的血清型之间无交叉反应并可以引起人类疾病[29]。因此,许多入侵的肺炎球菌可以逃避抗其他血清型肺炎球菌抗体对其的识别。同样,酿脓链球菌的 M 蛋白至少有 100 个不同的血清型[30]。抗某一血清型 M 蛋白的抗体对表达其他血清型 M 蛋白的菌株无保护作用[31]。免疫球蛋白 (lg)A1 蛋白水解酶和肺炎球菌的 PspA 也有不同的血清型。与抗 M 抗体不同,PspA 的抗体通常与其他血清型的 PspA 有交叉反应,至少有微弱的交叉反应[18,32]。

表面抗原的多态性通过不同的遗传机制实现。M 蛋白的变异是由 N 末端序列的不同造成[33]。肺炎球菌合成荚膜多糖的基因以基因盒的形式存在,可以在不同菌株间进行基因互换[34,34a]。在奈瑟氏球菌属中,编码表面菌毛的基因可以快速重排[35]。淋球菌的脂-低聚糖可被宿主的酶和底物修饰,可能与增强细菌在宿主中的存活率有关[36]。此外,细菌有适应不同宿主环境的遗传机制。胞外菌(包括奈瑟氏菌属、流感杆菌、B 群链球菌和肺炎球菌) 可以进行自发的可逆的时相变化以修饰其细胞表面,从而适应不同宿主环境[37~41]。在对外界刺激的应答中,细菌可调节不同毒性成分的表达[42],这样细菌就可迅速适应由体外或黏膜到体内环境的变化。由于遗传上的适应性,细菌具有不同的表面特性、运输系统和代谢途径,因此单个生物体可以成功地逃避宿主免疫系统并在宿主体内外不同的环境中生存。

细菌对宿主的侵袭

在角质化的皮肤和黏膜表面,有非免疫的防御机制以调节细菌生长并最大程度地降低细菌对宿主的入侵。健康的皮肤是抵抗大多数胞外菌和胞内菌有效的物理屏障。角质化的完全分化的皮肤上皮组织提供了一个不渗透的表面。此外,皮肤的腺体分泌溶菌酶、有毒的脂类、氢离子可抑制细菌生长,对毛囊、毛孔具有保护作用[43]。有时,这种保护作用对一些胞外菌如酿脓链球菌或葡萄球菌无效,因而引起了蜂窝组织炎和脓肿。更为常见的情况是,在完整皮肤有物理损伤如擦伤、烧伤或其他创伤时,细菌得以通过皮肤侵入机体。例如,表皮葡萄球菌是皮肤上的一个共生菌群,可以通过皮肤穿刺部位的导管,扩散进入机体甚至可以导致菌血症,也可以在假肢、人工心脏上形成细菌赘生物。这些细菌之所以能够引起疾病,是由于可以合成黏液,黏液有利于细菌的黏附,抗吞噬及阻碍抗菌素进入[44]。

和皮肤不同,黏膜上皮组织湿润,营养丰富,非角质化。许多黏膜区域,例如胃肠道、鼻咽、上呼吸道及阴道有细菌定居。在这些部位发现的细菌要么是无害的正常菌群,要么无症状定居在黏膜组织。定居是指有机体长期存在于黏膜表面,从几天到几个月但不引起症状。感染是指细菌存在时有症状,并使疾病恶化。然而在黏膜部位的许多潜在病原菌通常并不引起症状。胞外菌如肺炎球菌、脑膜炎球菌、流感杆菌和金黄色葡萄球菌常常被带入健康人鼻咽部位。例如在非流行期,大约 5% ~10%的 人携带脑膜炎球菌,这些菌没有

荚膜。在流行期，30% ~60%的人携带脑膜炎球菌，这些菌大部分有荚膜，并同引起流行病的细菌属于同一种荚膜类型[46]。B 族链球菌是革兰氏阳性菌，无症状定居在回肠、结肠和女性的生殖道，在分娩过程中可以传递给胎儿并引起致命的菌血症和败血症[47]。淋球菌在女性生殖道经常是无症状的，然而有时可以引起症状并与疾病的恶化有关[48,49]。许多细菌同时存在时可限制某一种细菌的过度增殖。例如，用许多抗生素后，打破了正常菌群的平衡，艰难梭菌选择性的增殖可发展成为假膜性结肠炎[50]。

为了生存并在血液和黏膜环境中定居，胞外菌可以产生有利于生存和增殖的分子，这些分子称为致病因子或毒素。一类致病因子可以使细菌获得必需的营养。由于黏液和血液中有铁结合蛋白如乳铁蛋白和转铁蛋白，黏液和血液中的铁离子浓度低，脑膜炎球菌、淋球菌和流感杆菌有复杂的表面运输系统，这一系统可将铁结合蛋白如转铁蛋白、乳铁蛋白和血红蛋白运输到细胞内，因此可成功地与宿主竞争这一代谢产物[51~54]。大肠杆菌和沙门氏菌获得铁的机制不同。它们分泌低分子质量的铁螯合剂称为载铁体，该分子将细菌周围环境的宿主蛋白质中的铁离子移走。铁-载铁体复合物被细菌吸收后，载铁体随后降解，铁被释放从而被细菌利用[55,56]。

1378

在某些情况下，细菌的致病因子可以抵消宿主的防御能力。来自肺炎球菌的肺炎球菌溶血素是肺炎球菌生长过程中释放的细胞质蛋白，可能与细菌的自溶作用有关。该蛋白通过消耗肺炎球菌附近的补体，干扰吞噬细胞的功能发挥生物学效应[57]。该蛋白的存在也削弱了宿主对肺炎球菌保护性应答[58]。用肺炎球菌溶血素免疫可以增强小鼠对肺炎球菌的抵抗力[57]。酿脓链球菌和 B 族链球菌可产生 C5a 肽酶，该酶可以抑制宿主巨噬细胞向感染部位的趋化作用[59,60]。一些细菌也产生 C3 蛋白水解酶[61]或 IgA1 蛋白水解酶[11,12,62]。

另一类重要致病因子与细菌同宿主细胞的黏附有关。黏附机制是开发疫苗的潜在目标。这里描述了多种不同的黏附机制。肺炎球菌与宿主细胞的黏附是通过宿主分子 *N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖 1-3 半乳糖、*N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖 1-4 半乳糖以及血小板激活因子受体（PAF 受体）介导的[63,64]。此外，细菌由不透明相到透明相的转变及宿主肺和血管内皮细胞的活化可加强肺炎球菌同宿主细胞的黏附[64]。菌毛在细菌的黏附过程中发挥重要的作用。细菌可表达特异性黏附分子，选择性地结合宿主抗原。大肠杆菌的 Pap 菌毛可同尿道上皮细胞表面红细胞糖苷脂的 Gal α 4Gal 单位结合[65]。霍乱弧菌的菌毛同肠上皮细胞黏附，因而可有效地运输毒素[66,67]。百日咳博德特氏菌有 3 个黏附因子：丝状红细胞凝集素、百日咳菌黏附素和菌毛（有毛缘的），这些黏附因子使细菌黏附于气管和支气管的有纤毛的呼吸道上皮细胞，因而避开了黏液的清除作用[68,69]。

淋球菌黏附、侵入尿道上皮细胞的机制与众不同[70]。最初的黏附由菌毛完成[71]。通过一个独特的遗传重组系统，淋球菌菌毛抗原以很高的速度变异，一个有机体可以同时表达具有不同抗原性的菌毛。据估计，在一个细菌中可能有 100 000 多个菌毛抗原突变体[72]。此外，淋球菌表达一种被称为 Opa 的外膜蛋白，该蛋白可以同人上皮细胞表面的蛋白多糖结合[41]。这一结合导致细菌同上皮细胞膜的融合，使细菌内在化并进入细胞的空泡。

编码 Opa 蛋白的基因在其可读框内有一连串的 CTCTT。CTCTT 之间的重组改变了 CTCTT 的重复次数[73]。重复次数决定着移码基因的可读框及最终表达的完整蛋白。由于滑动链错配，Opa 蛋白可以很快的速率突变。一个细菌可以在表面表达许多 Opa 蛋白的突变体。当与上皮细胞表面接触时，脑膜炎球菌停止合成荚膜多糖，促进细菌进入上皮细胞[74]。荚膜多糖具有亲水性，带有负电荷，可阻止细菌进入黏膜上皮细胞。一旦进入黏膜下层的上皮细胞，细菌就重新开始合成荚膜。

细菌通过适应环境刺激的变化对致病因子的表达进行精密的调节。在适应环境刺激时，葡萄球菌表达荚膜的数量也不同[75,76]。研究得最多的是百日咳菌博德特氏菌中的 BvgAS 二组件调节系统[77]。这一系统调节黏附素、毒素和其他致病因子的表达。这一系统受外部信号包括 Mg^{2+}、温度和尼克酸浓度的控制。BvgS 和 BvgA 与这一调节系统有关。BvgS 是感受器，该激酶在受到环境刺激时可以使自身磷酸化。BvgA 被 BvgS 磷酸化后，BvgA 与 bvg 调节启动子中一个 70bp 的共有重复序列之间的作用也发生改变，由此启动致病

因子基因的转录[77]。二组件调节系统常用于调节毒力相关基因的表达[78]。

致病性胞外菌可以在黏膜定居,不会对机体造成损伤。但在抵抗力较弱的局部组织,细菌也可以形成感染性病灶。例如,肺炎球菌和 b 型流感杆菌(Hib)经常被带到鼻咽腔,这些细菌可以感染充满液体的腔,例如肺和中耳。从鼻咽部吸入的细菌进入肺以后并没有致病作用,然而,当肺部堵塞(吸入食物)、上皮细胞损伤(如吸烟)或病毒感染(RSV 或流感病毒)时感染的机会增加[2,79]。病毒感染可以诱导宿主表达一些黏附肺炎球菌的分子,也导致宿主纤毛作用的降低[2,80]。细菌可以产生一些分子修饰宿主细胞表面从而使上呼吸道通过黏液排除细菌的能力减弱。

一些革兰氏阳性菌可以产生透明质酸酶和神经酰胺酶[81~83],这 2 种酶可以修饰细胞表面,透明质酸酶能分解细胞间质,使病菌易在组织中扩散。机体可有效的将葡萄球菌和酿脓链球菌从血液中清除,但由于皮肤或黏膜受损,可能造成一过性的菌血症。这些循环中的细菌只在极个别的情况下成为感染灶,如组织损伤时血液流动被中断而引起的蜂窝组织炎[84]。

在某些情况下,致病因子对宿主毒性很大,几乎是引起机体损伤的全部原因。例如,白喉毒素由感染部位(咽、喉)被带到全身并阻断多种细胞的蛋白质合成[85]。霍乱毒素阻断肠道对钠的吸收并引起严重的腹泻,如果治疗不及时,就会由于脱水导致死亡。破伤风毒素引起中枢神经系统麻痹。金葡菌产生 5 种引起膜损伤的肠毒素。金葡菌肠毒素 A 是其中的一种,是金葡菌食物中毒的主要原因,并在侵入性感染中发挥重要作用[87]。大肠杆菌的一些菌株产生 vero 毒素,该毒素可以损伤肾脏的微血管并引起溶血性尿毒性综合征[88,89]。在许多情况下,如果体内的中和抗体可以保护宿主防御毒素的损伤,使宿主得以存活,那么,引起感染的细菌就容易被机体清除。例如,注射疫苗后机体产生抗破伤风毒素和白喉毒素的抗体可有效保护机体,即使该抗体并不针对病原菌的表面抗原。

宿主的非特异性防御应答

1379

宿主利用多层次防御机制,预防高度适应环境的细菌引起的感染,这些防御机制包括机械屏障以及巨噬细胞、补体固定、溶菌酶和细胞因子介导的局部炎症。此外,特异性抗体(见特异性宿主防御应答)和 T 细胞介导的细胞免疫也可保护宿主。尽管特异性免疫可以提供有效的保护作用,但在病原体侵入后几天或几星期以后才可以产生。因此,在感染早期,主要由非特异性免疫防御细菌。SCID 小鼠缺乏特异性免疫,只有非特异性免疫,正常情况即使体内有非致病菌存在,也可以存活,由此证明了非特异性免疫的重要性[90],本节描述了几种非特异性宿主防御机制。

黏膜防御应答

尽管黏膜富含细菌生长所需的营养物,但由于机械清洁作用,限制了细菌在黏膜部位的增殖。在胃肠道,正常的蠕动力、黏液的分泌、胆汁的清洁作用限制了细菌的数目。纤毛运动可将附着于黏液的细菌从下呼吸道沿支气管树排出体外。上皮和组织的正常结构对细菌的清除是必需的。当这一机制被吸烟、病毒感染(如流感)或细菌感染(百日咳)阻断时,机体对正常定居在上呼吸道的细菌敏感性显著增加。老年人下呼吸道感染率增加,主要是由于黏膜纤毛摆动功能缺失及吸入较多的来自上呼吸道的含有细菌的分泌物[91,92]。黏液流动可以清除细菌,此外黏液含有多种抗菌产物如溶菌酶、乳铁蛋白、乳过氧化物酶和黏蛋白(第 27 章)[93]。体液(如乳汁、唾液和眼泪)含有乳铁蛋白,乳铁蛋白可以结合铁并降低可利用铁的水平(特别是在低 pH 值区域)[94]。溶菌酶可断开肽聚糖中 *N*-乙酰氨基葡萄糖和 *N*-乙酰胞壁酸之间的 1-4 糖苷键,破坏肽聚糖的支架,引起细菌裂解。黏蛋白捕获微生物并促进它们的清除。黏液中的 IgA 可封闭微生物的黏附位点,使毒素失活从而抑制细菌定居。小肠隐窝的 *Paneth* 细胞通过产生溶菌酶和 *cryptdins* 参与黏膜防御[95]。

局部应答(急性炎症)

细菌侵入机体后,许多细菌产物启动局部炎症(第 32 章)。启动炎症的细菌产物有肽聚糖、LPS、甲酰-甲

硫氨酰肽（如 f-met-leu-phe）、脂磷壁酸、外毒素、脂蛋白和糖脂[96]。LPS 同单核细胞和巨噬细胞上的 CD 14 结合(第 32 章)。一些外毒素，如金黄色葡萄球菌肠毒素 B，使大量 T 细胞活化并释放细胞因子。甲酰-甲硫氨酰肽是中性粒细胞趋化因子。细菌 DNA 富含可以刺激淋巴细胞[97]和巨噬细胞[98]的基序。细菌的许多成分(如肽聚糖)非特异地启动补体替代激活途径，并增强炎症过程的活化[99]。

在细菌入侵后感染的起始阶段，许多位于黏膜和皮肤的细胞(如角质细胞)可以产生重要的抗感染分子。最近一些研究表明，肥大细胞是一类重要的常住宿主细胞。沿着支气管树或皮肤表皮分布有丰富的肥大细胞，一般认为肥大细胞储存组胺和 5-羟色胺[100]，并含有预先形成的肿瘤坏死因子(TNF-α)，也是多种细胞因子的主要来源细胞，鼻腔产生 IL-4 和 IL-6 的细胞中，90%是肥大细胞[101]。当暴露于各种细菌产物(如 LPS)，肥大细胞可释放细胞因子，这些细胞因子可将中性粒细胞募集到炎症部位。如果肥大细胞缺失，就会增加动物腹膜或肺部对细菌感染的敏感性。肥大细胞的缺失可通过补充 TNF-α 得到部分补偿[102,103]。

炎症过程触发多种细胞释放许多细胞因子。释放的细胞因子又可激活其他细胞，从而启动细胞因子释放的级联放大反应。在急性炎症中产生的细胞因子可分为两类：促炎细胞因子(如 IL-1、TNF-α)和抗炎细胞因子（如 IL-4）(第 32 章)。炎症过程中产生的分子可以诱导 CD62E、细胞内黏附分子（ICAM）、血管细胞黏附分子(VCAM)以及选择素、整合素的表达(第 32 章)。这些分子的表达促进中性粒细胞向炎症部位的迁移[104,105]。在持续感染中，巨噬细胞也聚集于感染部位(第 39 章)。到达感染部位后，中性粒细胞和巨噬细胞被细菌产物(如 LPS)和细胞因子活化。当识别细菌的某一分子如凝集素、多糖、肽(RGD 序列)后，中性粒细胞和巨噬细胞可以迅速吞噬并杀死细菌(第 30 章关于吞噬作用的详细描述)[106]。CR3 和 Fc 受体识别细菌表面的宿主调理素后也可以发生吞噬作用。

系统应答

一旦细菌进入体循环，就在淋巴结、脾和肝中被清除。脾功能缺乏(如镰刀状红细胞和脾切除)的人容易患肺炎球菌引起的败血症[107,108]。血液中的交叉反应性抗体[109]、非特异性补体替代途径和补体固定可以促进血液中细菌的清除。细菌释放的多种炎症细胞产物进入体循环并触发许多系统性变化如发烧、白细胞在感染部位的聚集。

细胞因子(如 IL-6，IL-1)和糖皮质激素刺激肝细胞产生许多称为急性期反应物的分子，如凝固因子、血清淀粉样蛋白、C 反应蛋白和胶原凝集素[110]，从而启动了急性期应答。胶原凝集素有 C 型凝集素基序和胶原样基序，它们可以同细菌表面结合，通过补体经典激活途径活化补体并发挥调理作用。例如，甘露糖结合蛋白是胶原凝集素，与细胞表面糖蛋白的甘露糖和 *N*-乙酰葡糖胺结合。携带一个甘露糖结合蛋白等位基因突变的个体感染发病率增加[111,112]。

1380

对感染的全身应答之一是降低血清铁的浓度[94]。转铁蛋白浓度的增加和组织中铁的储存增加可以降低血液中铁的浓度。中性粒细胞分泌乳铁蛋白，因此炎症部位铁浓度降低。降低铁浓度是防御细菌的一个重要的措施。此外，适当减少铁的摄入[113]或使用铁的络合剂[114]也有助于防御胞外菌引起的感染。

宿主特异性防御应答

Bruton 无丙种球蛋白血症患者的血清中缺乏抗体但 T 细胞数目正常。这些患者主要对胞外菌感染易感，注射丙种球蛋白可以成功治疗该病[115]。这一临床观察结果说明抗体在防御胞外菌感染中的重要作用。抗肺炎球菌荚膜多糖抗体提供的被动免疫力可有效治疗肺炎球菌感染，进一步证明抗体的保护作用。抗体可同细菌的各种表面成分或致病因子反应，因此，抗体可用于预防特定的细菌感染。许多靶抗原是毒素，包括破伤风毒素和白喉毒素。抗体通过阻止毒素同宿主细胞受体结合或增加毒素清除速率中和毒素。抗 LPS 抗体可以保护机体抵抗革兰氏阴性菌感染以及 LPS 诱导的休克[116]。尽管抗类脂 A 的抗体也有一些保护作用，但明显弱于抗 O 抗原抗体的保护作用[117]。另一类靶抗原是许多胞外菌的荚膜多糖。抗荚膜多糖抗体

中和了荚膜对宿主免疫的屏蔽效应。其他保护性抗体可以与不同的致病因子反应。例如,抗大肠杆菌黏附素的抗体可以预防大肠杆菌的实验性感染[118],抗 M 蛋白抗体可中和 M 蛋白对补体作用的干扰,对酿脓链球菌感染也具有保护作用。

在这些靶抗原中,荚膜多糖的免疫原性比蛋白抗原弱,因此荚膜多糖经常可以逃避宿主免疫系统[119]。由于表面多糖的这一特点使其成为细菌逃避免疫系统的防护物。幼儿直到 2 岁以后才对多糖抗原产生抗体[29],他们对荚膜细菌引起的感染特别敏感[120]。多糖抗原刺激 B 细胞时几乎没有辅助性 T 细胞的参与[121,122]、不形成生发中心[123,124],几乎不诱导免疫记忆[125],并容易使 B 细胞耐受[125,126]。多糖抗原一般只诱导寡克隆抗体,即使在遗传上没有关系的人群中,抗体 V 区也只由为数不多的 V 基因编码[127~132]。此外,抗多糖抗体几乎没有体细胞突变[132,133],亲和性较低[134,135]。由于荚膜多糖有重复表位,即使是低亲和力抗体,也可有效地固定补体、发挥调理作用并导致细菌溶解。

抗某一多糖的抗体经常同结构类似的多糖有交叉反应[136~138]。当宿主首次暴露于某种细菌时,这种交叉反应有时可发挥保护作用。成人有一定量的抗 b 型流感杆菌多糖(Hib-PS)的抗体,即使不免疫,也对流感杆菌引起的感染有一定抵抗力[120]。尽管亚临床感染可以产生一些抗体,但人体主要的免疫前(而不是免疫后)抗 Hib-PS 抗体同大肠杆菌 K100 有交叉反应, 大肠杆菌 K100 的多糖荚膜是 Hib-PS 的一个同种多聚体[139]。大肠杆菌 K100 在大鼠实验性定植后,可以保护大鼠抵抗 Hib 感染[140]。大约 1% 的人 IgG 同碳水化合物表位结合(galα1→3gal)[141], 这一抗体可在体外杀死锥虫属和利什曼原虫[142]。同 LPS 核心成分结合的交叉反应性抗体不能阻止淋球菌对尿道的感染,但可以保护非免疫病人抵抗淋球菌菌血症的播散[109]。正常血清中的抗体可以同肺炎球菌、流感病毒和班氏吴策虫(组织线虫动物)的磷酸胆碱表位反应[143~145]。这些抗体可以降低小鼠对肺炎球菌感染的敏感性[146,147]。正常肠道菌群可能作为抗原性物质,刺激机体产生多种交叉反应性抗多糖抗体。大肠杆菌 K100 在任何时候都占肠道菌群的 1%[148]。抗(gal α 1→3gal)抗体可同正常粪标本中分离的许多细菌结合。有趣的是,在小鸡和家兔中,抗体 V 区基因库谱发育似乎需要微生物在肠道的定居[149]。

补体结合性抗体通过溶菌作用和调理作用保护宿主。溶菌途径在抵抗革兰氏阴性菌感染中发挥重要作用,C5-C9 缺陷患者对脑膜炎球菌引起的感染敏感[150]。在体外革兰氏阳性菌不会发生溶菌[99]。尽管当革兰氏阳性菌表面带有抗体和补体片段时不被裂解,但细菌表面的抗体和补体片段可被 CD16b 和 CR3 (CD11b/CD18)识别,并诱导吞噬作用和对细菌的细胞内的杀伤作用。抗体和补体介导的调理作用在体内发挥重要作用,因为补体缺乏或血丙种球蛋白缺乏的个体对许多胞外菌引起的感染敏感[115,150]。表面抗原的表位必须暴露于细菌表面才可进行有效的调理作用。对脑膜炎球菌孔蛋白有效的抗体识别这一分子的表面 *loop*[151]。在大多数肺炎球菌中,荚膜多糖通常被包埋在多糖荚膜下面。尽管抗荚膜多糖抗体可以固定补体[27],但不能有效地抵抗肺炎球菌感染[152]。27 型肺炎球菌的荚膜含有荚膜多糖表位,因此抗荚膜多糖抗体具有保护作用[153]。

1381 抗体介导的调理作用和溶菌作用依赖 Fc 段同补体结合的特性,比较不同免疫球蛋白的同种型发现:在感染早期出现的 IgM 可以非常有效地固定补体并具有调理作用,因此,IgM 在感染早期发挥重要作用。研究发现特异性 IgM 抗体在黏附红细胞、固定补体、裂解红细胞以及补体介导的细菌裂解中,比 IgG 抗体更有效[154,155]。然而,在预防肺炎球菌对小鼠的感染[156,157]以及在体外对 b 型流感杆菌的调理作用[158],IgG 抗体比 IgM 抗体更有效。此外,IgG 的一些亚类在抵抗特定的病毒[159]和真菌感染[160]时,比其他亚类的抗体更有效。这些结果提示,理想的调理作用不仅需要补体受体,也需要 IgG 的 Fc 受体。在没有炎症时,IgM 抗体主要在血管内,而 IgG 可以进入血管外空间。然而,炎症使炎症部位的血管通透性增加,抗体的所有同种型都可以进入感染部位。由于 IgG 有较长的半寿期、较高的亲和性并且在感染前就已存在于血管外空间,因此 IgG 抗体可以更有效地中和毒素[161]。

IgG 亚类固定补体以及结合 Fc 受体的能力不同[162,163]。研究发现 4 个亚类中的一种对病毒[159]和真菌感染[160]提供了最有效的保护。抗细菌多糖的抗体大部分只限于某一 IgG 亚类 (人为 IgG2,小鼠为 IgG3),为此

进行了许多关于抗多糖抗体不同同种型保护作用的研究。小鼠 IgG3(不是其他 IgG 亚类)通过其 Fc 区域相互结合[164]，同其他具有同样亲和力的同型抗体相比,这一特性使低亲和力的抗多糖的抗体(IgG3)可有效结合抗原。

尽管上述现象在理论上解释了小鼠 IgG3 的优势,但人 IgG2 抗体却没有凝集的特点。IgG3 凝集的重要性并不清楚。因为在抵抗肺炎球菌感染时,并没有观察到抗多糖抗体 IgG3 的同种型比其他同种型更有效[165]。与预期相反,许多研究发现,人 IgG1 抗体的调理作用和溶菌作用比 IgG2 稍强一些[163,166~168]。然而这两种亚类都不是必需的,因为缺乏 IgG1 或 IgG2 亚类基因的个体是健康的[169]。此外,人 IgG2 同 CD16、CD32 和 CD64 结合比 IgG1 或 IgG3 弱[170],在某一特定 CD32 等位基因纯合子的个体中,通过中性粒细胞的调理作用效果不理想[168]。所有这些观察结果都有力地证明了,人 IgG2 (或小鼠 IgG3)亚类在抵抗细菌的防御反应中并不具有独特优势。

尽管有研究提示,IgA 有调理[171,171a]、固定补体[172]、促进脑膜炎球菌裂解[173]的作用,但体外研究中发现,IgA 并不固定补体[174]甚至抑制 IgG 介导的依赖补体的杀伤作用[175,176]。虽然如此,正常定居或感染黏膜区域的细菌可以分泌 IgA1 蛋白水解酶，IgA 抗体至少在一些情况下提供保护作用[177]。这些发现提示,IgA 可能在复杂的黏膜防御中发挥重要作用(第 27 章)。IgA 可能具有聚集细菌并加快细菌从黏膜排出的作用。内吞的 IgA 可阻断病毒通过上皮细胞,可能也阻止入侵的细菌通过黏膜上皮细胞[178]。然而,由于 IgA 基因缺陷而造成 IgA 缺陷的人或小鼠相对是健康的,用流感病毒进行实验性感染,IgA 缺陷小鼠具有正常的保护性免疫。在 IgA 缺陷个体中,IgM 可能发挥分泌型抗体的作用[179]。

在妊娠晚期,IgG (而不是 IgM 和 IgA)抗体可以通过胎盘进入胎儿体内。来自母体的抗体在新生儿抵抗胞外菌感染中发挥重要作用。患 Bruton 无丙种球蛋白血症的新生儿在出生后 6~9 个月是正常的,直到来自母体的抗体被用尽。在 IgG 亚类中，脐带血中 IgG1 浓度比母亲血中的浓度高 1.8 倍,而 IgG2 的浓度在这两个部位是相等的[180]。最近的研究提示,IgG 抗体通过 FcRn 的主动运输进入胎盘。FcRn 在结构上同 MHC Ⅰ分子类似[181],与细胞内代谢中抗体分子的解救有关[182]。

疫苗开发

由于荚膜多糖可以增加细菌毒力,开发预防胞外菌的疫苗主要集中于诱导针对荚膜多糖的免疫。将荚膜多糖同蛋白质分子连接,可增强荚膜多糖的免疫原性,在青少年中,联合疫苗诱导机体产生抗 Hib-PS 抗体,消除了 Hib 引起的脑膜炎[183]及 Hib 在口咽中的定居[184]。目前使用的肺炎球菌疫苗可以通过结合疫苗的方法改进,该结合疫苗含有 23 个最常见的荚膜类型。尽管这一方法可能会成功,但新型肺炎球菌结合疫苗由 23 种荚膜多糖同蛋白质的连接物组成。这可能会使肺炎球菌结合疫苗非常复杂,价格相对昂贵。

最近的研究提示细菌致病因子可作为靶抗原。抗 PspA、肺炎球菌溶血素或 PsaA 的抗体可预防动物模型中肺炎球菌引起的败血症。用这些抗原制备的疫苗可取代昂贵的肺炎球菌结合疫苗,该研究目前正在进行。此外,用于制备疫苗的靶抗原还包括细菌黏附分子[118,185]、补体裂解酶、IgA1 蛋白水解酶和铁运输系统[52~54]。

尽管这些抗原是疫苗开发中极具潜力的候选者,但成功开发疫苗是一个复杂过程。靶抗原必须暴露于细胞表面或者是体内可被抗体抑制的致病因子。理想的抗原不仅诱导保护性应答、只有有限的多态性而且诱导的抗体同宿主抗原无交叉反应。酿脓链球菌的 M 蛋白具有保护性表位[22]，但 M 蛋白有 100 多个血清型,利用一些 M 蛋白免疫,产生的抗体同宿主有交叉反应。

有害的宿主应答

1382

炎症反应不可避免地引起一些组织损伤，在一些细菌感染性疾病如肺炎、脑膜炎中,这一损伤具有重要的病理生理和临床意义。例如,在脑膜炎动物模型中,神经系统病变主要是由细菌产物(主要是细胞壁)相关

的炎症引起。用抗生素治疗,可以消灭细菌但并不能防止神经系统的病变。相反,如果抗生素同类固醇同时使用,神经系统损伤的数量显著减少[186]。

非特异性有害应答

在系统水平不受控制的炎症可引起脓毒性休克。一些因子如革兰氏阳性菌的外毒素(葡萄球菌肠毒素B)或 LPS 可引起脓毒性休克。葡萄球菌外毒素 B 同宿主特定的 MHC Ⅱ类分子结合,刺激大量的辅助性 T 细胞释放细胞因子。这样的毒素称为超抗原,因为它们可刺激表达特定 VβTCR 家族的所有 T 细胞(第 10 章)。当革兰氏阴性菌的 LPS 同 CD14 结合后,刺激巨噬细胞或单核细胞分泌炎性细胞因子从而启动脓毒性休克(第 32 章)。除细胞因子外,细菌产物也刺激宿主细胞并导致其他炎性介质如花生四烯酸代谢产物的释放、补体活化及凝血级联反应的发生。过量释放的介质引起血管系统萎陷,最终造成多器官功能衰竭。在基因缺陷的转基因小鼠中,证实了在脓毒性休克发病机制中的几个关键的分子,如 TNF-α 及其受体 (TNFRI)、IL-1 转化酶和 ICAM-I[187]。这一研究也证实了 CD14 在 LPS 诱导的脓毒血症中的关键作用,在超抗原诱导的脓毒性休克中必须有 T 细胞上的共刺激分子 CD28 的存在[187]。

尽管炎症在发病率和死亡率中起重要作用,但炎症却是机体抵抗细菌感染的重要措施。Lps^d 小鼠尽管对 LPS 刺激不应答,完全抵抗 LPS 引起的脓毒性休克,但与 LPS 应答正常小鼠相比,更容易被革兰氏阴性菌感染[188,189]。也许宿主进化到利用细菌的这一共同组分作为宿主应答的激发剂,因而 LPS 是毒性产物。

特异性有害应答

许多细菌抗原的表位同宿主抗原有交叉反应性,因此,炎症过程可以诱导与宿主组织交叉反应的抗体。B 群脑膜炎球菌的荚膜多糖模拟了表达于中枢神经系统的表位[190],例如 *N*- 乙酰神经氨酸,胚胎神经细胞黏附分子的一个表位(N-CAM)[191]。用免疫组化的方法证实,脑膜炎球菌、淋球菌、流感杆菌,杜克雷嗜血杆菌、空肠弯曲杆菌和幽门螺杆菌的一些 LPS 表位,分别与人血型抗原如拟红细胞糖苷脂抗原、pk 和 Lewis X 结构相似或相同[192]。流行病学研究发现,空肠弯曲杆菌感染与自身免疫病的发病有关[193]。在动物实验模型中发现,用肺炎球菌免疫后可诱导抗 C-PS 抗体的产生,该抗体可以同肾小球反应并引起蛋白尿[194]。进一步的研究发现,产生同自体抗原交叉反应性抗体的 B 细胞可通过正常的凋亡而被清除[195]。

尽管上述交叉反应性抗原同自身免疫的相关性尚不清楚,但酿脓链球菌感染与风湿热和肾小球肾炎有关。用一个 M 蛋白的单克隆抗体可将酿脓链球菌分为两类[196],Ⅰ类菌株感染可引起风湿热[196],可以通过 M 蛋白基因与编码相关表面蛋白基因的连接方式,区别酿脓链球菌的Ⅰ类和Ⅱ菌株[196,197]。Ⅰ类酿脓链球菌的 M 蛋白具有与心肌球蛋白、原肌球蛋白、房肽素、层粘连蛋白和角蛋白有高度交叉反应性的表位[198~200]。一种抗体分子可以同所有这些蛋白分子结合,因为这些蛋白的主要部分为卷曲螺旋 α 螺旋[200]。这种 M 蛋白的多反应性抗体可直接损伤心肌细胞和内皮细胞[201]。除了抗体,在风湿性心脏瓣膜也有 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞[202],并有针对 M 蛋白和心肌蛋白的 T 细胞增殖[203]。这些结果提示,在 M 蛋白和肌球蛋白之间有交叉反应性的 T 细胞可能也与风湿热的发病机制有关。

除了 M 蛋白,酿脓链球菌的 A 型多糖也有与肌球蛋白交叉反应的表位。抗 A 型多糖的抗体也与 M 蛋白及其他 α 螺旋分子结合[200,204,205]。这一抗体对心肌和内皮有细胞毒作用。有趣的是,与心肌有交叉反应的抗 A 型多糖抗体的 V 区和只结合 A 型多糖抗体的 V 区,由同一胚系 V 基因编码[206]。

展望

尽管体液免疫在防御胞外菌中发挥主要作用,但随着研究的深入,也可能会发现 T 细胞在防御胞外菌中的一些作用。例如,目前正在研究针对百日咳的 T 细胞免疫,因为,到目前为止,百日咳疫苗诱导的免疫保护同抗体水平没有较好的相关性。一些细菌(如流感杆菌)具有与脂类相连的荚膜多糖[207],这些荚膜多糖可

被T细胞直接识别[208]。最后，一些胞外菌实际可以在人细胞中长期生存(见下，奈瑟氏菌属的故事)。

最近，两种新技术的发展将极大的促进对胞外菌免疫应答的研究。其一，许多细菌基因组的测序工作已完成，由此可以得到致病因子的信息。其二，可以利用缺乏特定基因的转基因小鼠。例如，缺少细胞因子或特定细胞群的小鼠。用这些小鼠可进行一些关键性的实验，以确定宿主对感染的应答中，免疫系统某一特征性改变的意义。这些新技术将有助于了解多层次免疫防御机制是如何保护机体和对抗胞外菌的。

奈瑟氏球菌属的故事

奈瑟氏球菌属是典型的胞外菌，但越来越多的证据表明这些细菌可以在宿主细胞内存活。Stephens及其同事证实，采用人腺体样外植块进行实验性感染，脑膜炎球菌可以进入人黏膜上皮细胞[209]。利用输卵管模型，淋球菌也以类似脑膜炎球菌的方式进入无纤毛的黏膜细胞[210]。在侵入宿主时，脑膜炎球菌表达低水平的C-PS[74]，淋球菌除了使细菌周围病灶的肌动蛋白聚合外，还使皮质的肌动蛋白聚集。一旦侵入细胞，这两种细菌都进入空泡，此时细菌可以生存并增殖。Magdalene So及其同事发现，IgA1蛋白水解酶可裂解LAMP 1，对脑膜炎球菌在空泡内的生存起保护作用[74]。LAMP1是晚期核内体和溶酶体膜的糖蛋白，在维持这些腔隙的稳定中具有一定的作用[211]。空泡被转移到黏膜上皮细胞基底表面[212]。有机体从基侧表面离开空泡和上皮细胞[212]。研究发现，男性尿道炎患者的渗出液中，尿道上皮细胞中有淋球菌的侵入[70]。淋球菌在细胞内的生存不仅仅局限于输卵管细胞。

杀菌的抗荚膜抗体是预防奈瑟菌属感染的关键因素[213~215]。当脑膜炎流行病发生时，Artenstein、Goldschlich和Goldschneider对新泽西州Fort Dix军事训练中心的新兵进行了调查。为了获得第一手资料，他们到达基地后，收集了15 000多个新兵的血液标本。在新兵训练过程中，定期采集所有新兵的鼻咽标本进行培养。最后，在一个营中鉴定了5例由血清型C型脑膜炎球菌引起的感染。在流行病爆发前获得的鼻咽培养物显示，53例有C型脑膜炎球菌的定居，其中13人缺乏杀菌的抗体但在鼻咽部有该菌株的定居。在这13人中，5例患系统性脑膜炎感染。因此，在脑膜炎流行时，如果一个个体的鼻咽部有引起流行病的菌株，但体内缺少杀菌抗体，患严重感染的危险度大约为30%~40%。这些研究证实了杀菌抗体在预防严重脑膜炎疾病中的重要性，推动了4价脑膜炎荚膜多糖疫苗的开发和应用，该疫苗在军队新兵中使用后，有效地预防了传染病的流行，从1973年开始，训练中心就再也没有该病的发生。

(周燕春 译)

参 考 文 献

1. M. The streptococcal cell wall. *Harvey Lect* 1971;65:73.
2. Gray BM. Streptococcal infection. In: Brachman PE, ed. Bacterial infection, 3rd ed. New York: Plenum Publishing, 1997.
3. Tomasz A. Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science* 1967;57:694–697.
4. Brundish DE, Baddiley J. Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem J* 1968;110:573–582.
5. Fischer W. Teichoic acid and lipoglycans. *New Compr Biochem* 1994;27: 199–215.
6. Fisher W, Behr T, Hartmann R, Peter-Katalinic J, Egge H. Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* have identical chain structures. A reinvestigation of teichoic acid (C-polysaccharide). *Eur J Biochem* 1993;215: 851–857.
7. Briles DE, Hollingshead SK, Swiatlo E, al. PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb Drug Resist* 1997;3:401–408.
8. Briles DE, Tart RC, Wu HY, Ralph BA, Russell MW, McDaniel LS. Systemic and mucosal protective immunity to pneumococcal surface protein A. *N Y Acad Sci* 1996;797:118–126.
9. Talkington DF, Brown BG, Tharpe JA, Koening A, Russell H. Protection of mice against fatal pneumococcal challenge by immunization with pneumococcal surface adhesion A (PsaA). *Microb Pathog* 1996;21:17–22.
10. Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M, et al. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumoniae and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J Infect Dis* 1995;172:119–123.
11. Wani JH, Gilbert JV, Plaut AG, Weiser JN. Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1996;64:3967–3974.
12. Poulsen K, Reinholdt J, Kilian M. Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* immunoglobulin A1 protease gene and its translation product. *Infect Immun* 1996;64:3957–3966.
13. Nandiwada LS, Hostetter MK, Dunny GM. Genetic analysis of a C3 degrading proteinase in *Streptococcus pneumoniae* [Abstract B-134]. ASM meeting, New Orleans, 1996:177.
14. Hamel J, Martin D, Brodeur BB. Heat shock response of Streptococcus pneumoniae: identification of immunoreactive stress proteins. *Microb Pathog* 1997; 23:11–21.
15. Wu HY, Nahm MH, Guo Y, Russell M, Briles DE. Intranasal immunization of mice with PspA (pneumococcal surface protein A) can prevent intranasal carriage and infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1997;175:893–846.
16. Hamel J, Rioux CR, Martin D, Brodeur BR. Protection from experimental *Streptococcus pneumoniae* infection by vaccination with recombinant HSP70 antigens [Abstract]. ASM meeting, Miami FL. 1997;43.
17. Lock RA, Hansman D, Paton JC. Comparative efficacy of autolysin and pneumolysin as immunogens protecting mice against infection by *Streptococcus*

pneumoniae. Microb Pathog 1992;12:137–143.
18. Tart RC, McDaniel LS, Ralph BA, Briles DE. Truncated Streptococcus pneumoniae PspA molecules elicit cross-protective immunity against pneumococcal challenge in mice. *J Infect Dis* 1996;173:380–386.
19. Briese T, Hakenbeck R. Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. *Eur J Biochem* 1985;146:417–427.
20. Schneewind O, Fowler A, Faull KF. Structure of cell wall anchor of cell surface proteins in *Staphylococcus aureus. Science* 1995;268:103–106.
21. Fischetti VA, Pancholi V, Schneewind O. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from Gram-positive cocci. *Mol Microbiol* 1990;4:1603–1605.
22. Dale JB, Chiang EY, Lederer JW. Recombinant tetravalent group A streptococcal M protein vaccine. *J Immunol* 1993;151:2188–2194.
23. Nikaido H. Outer membrane. In: Neidhardt FC, ed. Escherichia coli *and* Salmonella: *cellular and molecular biology.* Washington, DC: ASM Press, 1996:29–47.
24. Preston A, Mandrell RE, Gibson BW, Apicella MA. The lipooligosaccharides of pathogenic Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 1996;22:139–180.
25. Jap BK, Walian PJ. Structure and function of porins. *Physiol Rev* 1996;76: 1073–1088.
26. Kazatchkine MD, Fearon DT, Austen KF. Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta 1H for cell-bound C3b. *J Immunol* 1979;122:75–81.
27. Brown EJ, Hosea SW, Hammer CH, Burch CG. A quantitative analysis of the interactions of antipneumococcal antibody and complement in experimental pneumococcal bacteremia. *J Clin Invest* 1982;69:85–98.
28. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae. J Clin Microbiol* 1995;33:2759–2762.
29. Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, et al. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J Infect Dis* 1983;148:1136–1159.
30. Fischetti VA. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:286–314.
31. Lancefield RC. Current knowledge of the type specific M antigens of group A streptococci. *J Immunol* 1962;89:307–313.
32. Crain MJ, Waltman WD II, Turner JS, et al. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae. Infect Immun* 1990;58: 3293–3299.
33. Fischetti VA, Bessen DE, Schneewind O, Hruby DE. Protection against streptococcal pharyngeal colonization with vaccines composed of M protein conserved regions. *Adv Exp Med Biol* 1991;303:159–167.
34. Dillard JP, Vandersea MW, Yother J. Characterization of the cassette containing genes for type 3 capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae. J Exp Med* 1995;181:973–983.
34a. Coffey TJ, Enright MC, Daniels M, et al. Recombinatorial exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae. Molecular Microbiol* 1998;27: 73–83.
35. Zhang QY, DeRyckere D, Lauer P, Koomey M. Gene conversion *in Neisseria gonorrhoeae:* evidence for its role in pilus antigenic variation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5366–5370.
36. Mandrell RE, Apicella MA. Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modifications of LOS. *Immunobiology* 1993;187: 382–402.
37. Gray BM, Pritchard DG. Phase variation in the pathogenesis of group B streptococcal infections. *Zentralbl Bakt* 1992;22(suppl):452–454.
38. Jonsson AB, Nyberg G, Normark S. Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in pili C, a novel gene for pilus assembly. *EMBO J* 1991;10: 477–488.
39. Weiser JN, Markiewicz A, Tuomanen EI, Wani JH. Relationship between phase variation in colony morphology, intrastrain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae. Infect Immun* 1996; 64:2240–2245.
40. Weiser JN. Relationship between colony morphology and the life cycle of Haemophilus influenzae: the contribution of lipopolysaccharide phase variation to pathogenesis. *J Infect Dis* 1993;168:672–680.
41. Bos MP, Grunert F, Belland RJ. Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Opa variants of *Neisseria gonorrhoeae. Infect Immun* 1997;65:2353–2361.
42. Mekalanos JJ. Environmental signals controlling expression of virulence gene determinants in bacteria. *J Bacteriol* 1992;174:1–7.
43. Salyers AA, Whitt DD. *Bacterial pathogenesis, a molecular approach.* Washington, DC: ASM Press, 1994.
44. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Infect Dis* 1994; 19:231–245.
45. Caugant DA, Hoiby EA, Magnus P, et al. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol* 1994;32: 323–330.
46. Kuhns DM, Nelson CT, Feldman HA, et al. The prophylactic value of sulfadiazine in the control of meningococcic meningitis. *Am J Hygiene* 1948;47177–47186.
47. Zangwill KM, Schuchat A, Wenger JD. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. *MMWR* 1992;41:25–32.
48. Rein MF. Epidemiology of gonococcal infections. In: Roberts RB, ed. *The gonococcus.* New York: John Wiley and Sons, 1977:1–31.
49. Handsfield HH, Lipman TO, Harnisch JP, Tronca E, Holmes KK. Asymptomatic gonorrhea in men: diagnosis, natural course, prelavence, and significance. *N Engl J Med* 1974;290:117–123.
50. Bartlett JG, Chang TW, Taylor NS, Onderdonk AB. Colitis induced by *Clostridium difficile. Rev Infect Dis* 1979;1:370–378.
51. Stojiljkovic I, Srinivasan N. *Neisseria meningitidis* tonB, exbB and exbD genes: ton-dependent utilization of protein-bound iron in *Neisseriae. J Bacteriol* 1997; 179:805–812.
52. Lewis LA, Gray E, Wang YP, Roe BA, Dyer DW. Molecular characterization of hpuAB, the haemoglobin-haptoglobin-utilization operon of *Neisseria meningitidis. Mol Microbiol* 1997;23:737–749.
53. Pettersson A, Poolman JT, van der Ley P, Tommassen J. Response of *Neisseria meningitidis* to iron limitation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1997;71:129–136.
54. Thomas CE, Sparling PF. Isolation and analysis of a fur mutant of *Neisseria gonorrhoeae. J Bacteriol* 1996;178:4224–4232.
55. Earhart CF. Uptake and metabolism of iron and molybdenum. In: Neidhardt FC, ed. Escherichia coli *and* Salmonella: *cellular and molecular biology.* Washington, DC: ASM Press, 1996:1075–1090.
56. Neilands JB. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 1995;270:26723–26726.
57. Paton JS. The contribution of pneumolysin to the pathogenecity of *Streptococcus pneumoniae. Trends Microbiol* 1996;4:103–106.
58. Benton KA, Everson MP, Briles DE. A pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae* causes chronic bacteremia rather than acute sepsis in mice. *Infect Immun* 1995;63:448–455.
59. Ji Y, Carlson B, Kondugunta A, Cleary PP. Intranasal immunization with C5a peptidase prevents nasopharyngeal colonization of mice by the group A *Streptococcus. Infect Immun* 1997;65:2080–2087.
60. Bohnsack JF, Widjaja K, Ghazizadeh S, et al. A role for C5 and C5a-ase in the acute neutrophile response to group B streptococcal infections. *J Infect Dis* 1997;175:847–855.
61. Angel CS, Ruzek M, Hostetter MK. Degradation of C3 by *Streptococcus pneumoniae. J Infect Dis* 1994;170:600–608.
62. Kilian M, Mestecky J, Kulhavy R, Tomana M, Butler WT. IgA1 proteases from *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis,* and *Streptococcus sanguis:* comparative immunochemical studies. *J Immunol* 1980;124:2596–2596.
63. Andersson B, Dahmen J, Frejd T, Leffler H, Magnusson G, Norri G, et al. Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J Exp Med* 1983;158: 559–570.
64. Cundell DR, Weiser JN, Shen J, Young A, Tuomanen EI. Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae. Infect Immun* 1995;63:757–761.
65. Striker R, Nilsson U, Stonecipher A, Magnusson G, Hultgren SJ. Structural requirements for the glycolipid receptor of human uropathogenic *Escherichia coli. Mol Microbiol* 1995;16:1021–1029.
66. Sengupta TK, Sengupta DK, Ghose AC. A 20-kDa pilus protein with haemagglutination and intestinal adherence properties expressed by a clinical isolate of a non-01 *Vibrio cholerae. FEMS Microbiol Lett* 1993;112:237–242.
67. Chiang SL, Taylor RK, Koomey M, Mekalanos JJ. Single amino acid substitutions in the N-terminus of *Vibrio cholerae* TcpA affect colonization, autoagglutination, and serum resistance. *Mol Microbiol* 1995;17:1133–1142.
68. Brennan MJ, Shahin RD. Pertussis antigens that abrogate bacterial adherence and elicit immunity. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:S145–S149
69. Geuijen CA, Willems RJ, Bongaerts M, Top J, Gielen H, Mooi FR. Role of the *Bordetella pertussis*; minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect Immun* 1997;65:4222–4228.
70. Apicella MA, Ketterer M, Lee FKN, Zhou D, Rice PA, Blake MS. The pathogenesis of gonococcal urethritis in men: confocal and immunoelectron microscopic analysis of urethral exudates from men infected with *Neisseria gonorrhoeae. J Infect Dis* 1996;173:636–646.
71. Swanson J, Kraus SJ, Gotschlich EC. Studies on gonococcus infection. I. Pili and zone of adhesion: their relation to gonococcal growth patterns. *J Exp Med* 1997; 134:886–906.
72. Seifert HS. Questions about gonococcal pilus phase- and antigenic variation. *Mol Microbiol* 1997;2:433–440.
73. Stern A, Meyer TF. Common mechanisms controlling phase and antigenic variation in pathogenic *Neisseria. Mol Microbiol* 1987;1:5–12.
74. Hammerschmidt SMA, Sillmann H, Muhlenhoff M, Borrow R, Fox A, van Putten J, et al. Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (siaD): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol* 1996;20:1211–1220.
75. Dassy B, Hogan T, Foster TJ, Fournier JM. Involvement of the accessory gene regulator (agr) in expression of type-5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus. J Gen Microbiol 1993;139:1301–1306.*

76. Lee JC, Takeda S, Livolsi PJ, Paoletti LC. Effects of in vitro and in vivo growth conditions on expression of type-8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1993;61:1853–1858.
77. Uhl MA, Miller JF. Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS siganl transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1163–1167.
78. Hoch JA, Silhavy TJ. *Two-component signal transduction*. Washington, DC: ASM Press, 1995.
79. Musher DM. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis* 1992;14:801–809.
80. Tuomanen EI. The biology of pneumococcal infection. *Pediatr Res* 1997;42:253–258.
81. Berry AM, Lock RA, Paton JC. Cloning and characterization of nanB, a second *Streptococcus pnuemoniae* neuraminidase gene, and purification of the NanB enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1996;178:4854–4860.
82. Berry AM, Lock RA, Thomas SM, Rajan DP, Hansman D, Paton J. Cloning and nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1994;62:1101–1108.
83. Lin B, Hollingshead SK, Coligan JE, Egan ML, Baker JR, Pritchard DG. Cloning and expression of the gene for group B streptococcal hyaluronate lyase. *J Biol Chem* 1994;269:30113–30116.
84. Swartz MN. Skin and soft tissue infections. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practice of infectious diseases*, 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:909–929.
85. MacGregor RR. *Corynebacterium diphtheriae*. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Principles and practice of infectious diseases*, 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:1865–1872.
86. Salyers AA, Whitt DD. *Bacterial pathogenesis*. Washington, DC: ASM Press, 1994.
87. Barg NL, Harris T. Toxin-mediated syndromes. In: Crossely KB, ed. *The staphylococci*. New York: Churchill Livingstone, 1997:527–543.
88. Noel JM, Boedeker EC. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: a family of emerging pathogens. *Dig Dis* 1997;15:67–91.
89. Lingwood CA. Verotoxin-binding in human renal sections. *Nephron* 1994;66:21–28.
90. Bancroft GJ, Kelly JP. Macrophage activation and innate resistance to infection in SCID mice. *Immunobiology* 1994;191:424–431.
91. Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practice of infectious diseases*, 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:1811–1826.
92. Donowitz GR, Mandell GL. Acute pneumonia. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practices of infectious diseases*, 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:619–637.
93. Pruitt KM, Rahemtulla F, Mansson-Rahemtulla B. Innate humoral factors. In: Ogra PL, ed. *Handbook of mucosal immunology*. New York: Academic Press, 1994:53–70.
94. Weinberg ED. Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. *Physiol Rev* 1984;64:65–101.
95. Eisenhauer PB, Harwig SS, Lehrer RI. Cryptdins: antimicrobial defensins of the murine small intestine. *Infect Immun* 1992;60:3556–3565.
96. Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev* 1996;60:316–341.
97. Klinman DM, Yi A-K, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2879–2883.
98. Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, et al. Bacterial DNA causes septic shock. *Nature* 1997;386:336–337.
99. Frank MM, Fries LF. The role of complement in defense against bacterial disease. *Baillieres Clin Immunol Allergy* 1988;2:335–361.
100. Galli SJ. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* 1993;328:257–265.
101. Bradding P, Feather IH, Wilson S, et al. Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation. *J Immunol* 1993;151:3853–3865.
102. Malaviya R, Ross EA, MacGregor JI, et al. Mast cell phagocytosis of fimH-expressing enterobacteria. *J Immunol* 1994;152:1907–1914.
103. Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 1996;381:21–22.
104. Ming WJ, Bersani L, Mantovani A. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1987;138:1469–1474.
105. Sayers TJ, Wiltrout TA, Bull CA, Denn AC, Pilaro AM, Lokesh B. Effect of cytokines on polymorphonuclear neutrophil infiltration in the mouse. Prostaglandin- and leukotriene-independent induction of infiltration by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1988;141:1670–1677.
106. Ofek I, Goldhar J, Keisari Y, Sharon N. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Ann Rev Microbiol* 1995;49:239–276.
107. Styrt B. Infection associated with asplenia: risks, mechanisms, and prevention. *Am J Med* 1990;88:33N–42N.
108. Van Wyck DB, Witte MH, Witte CL. Synergism between the spleen and serum complement in experimental pneumococcemia. *J Infect Dis* 1982;145:514–519.
109. Apicella MA, Westerink MAJ, Morse SA, Schneider H, Rice PA, Griffiss JM. Bactericidal antibody response of normal human serum to the lipooligosaccharide of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis* 1997;153:520–526.
110. Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 1994;15:81–88.
111. Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996;17:532–540.
112. Lau YL, Chan SY, Turner MW, Fong J, Karlberg J. Mannose-binding protein in preterm infants: developmental profile and clinical significance. *Clin Exp Immunol* 1995;102:649–654.
113. Weinberg ED, Weinberg GA. The role of iron in infection. *Curr Opin Infect Dis* 1997;8:164–169.
114. Jones RL, Peterson CM, Grady RW, Kumbaraci T, Cerami A, Graziano JH. Effects of iron chelators and iron overload on *Salmonella* infection. *Nature* 1977;267:63–65.
115. Lederman HM, Winkelstein JA. X-linked agammaglobulinemia: an analysis of 96 patients. *Medicine* 1985;64:145–156.
116. Singh SP, Williams YU, Benjamin WH, Klebba PE, Boyd D. Immunoprotection by monoclonal antibodies to the porins and lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *Microb Pathog* 1996;21:249–263.
117. Hoffman WD, Pollack M, Banks SM, et al. Distinct functional activities in canine septic shock of monoclonal antibodies specific for the O-polysaccharide and core regions of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Infect Dis* 1994;169:553–561.
118. Langermann S, Palaszynski S, Barnhart M, et al. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* 1997;276:533–534.
119. Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell-independent antigens type 2. *Ann Rev Immunol* 1995;13:655–692.
120. Fothergill LD, Wright J. Influenzal meningitis: the regulation of age incidence to the bactericidal power of blood against the causal organism. *J Immunol* 1933;24:273–284.
121. Herzenberg LA, Stall AM, Lalor PA, Sidman C, Moore WA, Parks DR. The LY-1 B cell lineage. *Immunol Rev* 1986;93:81–102.
122. Humphrey JH, Parrott DMV, East J. Studies of globulin and antibody production in mice thymectomized at birth. *Immunology* 1964;7:419–439.
123. Weissman IL, Gutman GA, Friedberg SH, Jerabek L. Lymphoid tissue architecture. III. Germinal centers, T cells, and thymus-dependent vs thymus-independent antigens. *Adv Exp Med Biol* 1976;66:229–237.
124. Davies AJS, Carter RL, Leuchars E, Wallis V, Dietrich FM. The morphology of immune reactions in normal, thymectomized and reconstituted mice. III. Response to bacterial antigens: salmonellar flagellar antigen and pneumococcal polysaccharide. *Immunology* 1970;19:945–957.
125. Baker PJ, Stashak PW, Amsbaugh DF, Prescott B. Characterization of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide at the cellular level. I. Dose-response studies and the effect of prior immunization on the magnitude of the antibody response. *Immunology* 1971;20:469–480.
126. Klaus GGB, Humphrey JH. The immunological properties of haptens coupled to thymus-independent carrier molecules. I. The characteristics of the immune response to dinitrophenol-lysine-substituted pneumococcal polysaccharide (SIII) and levan. *Eur J Immunol* 1974;4:370–377.
127. Crews S, Griffin J, Huang H, Calame K, Hood L. A single V_H gene segment encodes the immune response to phosphorylcholine: somatic mutation is correlated with the class of the antibody. *Cell* 1981;25:59–66.
128. Carroll WL, Adderson EE, Lucas AH, et al. Molecular basis of antibody diversity. In: Ellis RW, Granoff DM, eds. *Development and clinical uses of* Haemophilus *b conjugate vaccines*, 1st ed. New York: Marcel Dekker, 1994:207–229.
129. Claflin JL, Hudak S, Maddalena A. Anti-phosphocholine hybridoma antibodies. I. Direct evidence for three distinct families of antibodies in the murine response. *J Exp Med* 1981;153:352–364.
130. Briles DE, Davie JM. Clonal dominance. I. Restricted nature of the IgM antibody response to group A streptococcal carbohydrate in mice. *J Exp Med* 1975;141:1291–1307.
131. Insel RA, Kittelberger A, Anderson P. Isoelectric focusing of human antibody to the *Haemophilus influenzae* b capsular polysaccharide: restricted and identical spectrotypes in adults. *J Immunol* 1985;135:2810–2816.
132. Scott MG, Crimmins DL, McCourt DW, et al. Clonal characterization of the human IgG antibody repertoire to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide. III. A single VKII gene and one of several JK genes are joined by an invariant arginine to form the most common L chain V region. *J Immunol* 1989;143:4110–4116.
133. Gearhart PJ, Johnson ND, Douglas R, Hood L. IgG antibodies to phosphorylcholine exhibit more diversity than their IgM counterparts. *Nature* 1981;291:29–34.
134. Sharon J, Kabat EA, Morrison S. Association constants of hybridoma antibodies specific for alpha (1-6) linked dextran determined by affinity electrophoresis. *Mol Immunol* 1982;19:389–397.

135. Hetherington SV. The intrinsic affinity constant (K) of anticapsular antibody to oligosaccharides of *Haemophilus influenzae* type b. *J Immunol* 1988;140: 3966–3970.
136. Heidelberger M, Rebers PA. Immunochemistry of the pneumococcal types II, V, and VI. The relation of type VI to type II and other correlations between chemical constitution and precipitation in antisera to type VI. *J Bacteriol* 1960:80:145–153.
137. MacPherson CFC, Heidelberger M, Alexander HE, Leidy G. The specific polysaccharides of types A,B,C,D, and F *Haemophilus influenzae*. *J Immunol* 1946; 52:207–219.
138. Heidelberger M, Bernheimer AW. Cross-reactions of polysaccharides of fungi, molds, and yeasts in anti-pneumococcal and other antisera. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:5247–5249.
139. Lucas AH, Langley RJ, Granoff DM, Nahm MH, Kitamura MY, Scott MG. An idiotypic marker associated with a germ-line encoded kappa light chain variable region that predominates the vaccine-induced human antibody response to the *Haemophilus influenzae* b polysaccharide. *J Clin Invest* 1991;88:1811–1818.
140. Moxon ER, Anderson P. Meningitis caused by *Haemophilus influenzae* in infant rats: protective immunity and antibody priming by gastrointestinal colonization with *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1979;140:471–478.
141. Galili U, Mandrell RE, Hamadeh RM, Shohet SB, Griffiss JM. Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect Immun* 1988;56:1730–1737.
142. Avila JL, Rojas M, Galili U. Immunogenic Gal-alpha-1-3Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic American *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J Immunol* 1989;142:2828–2834.
143. Lal RB, Paranjape RS, Briles DE, Nutman TB, Ottesen EA. Circulating parasite antigen(s) in lymphatic filariasis: use of monoclonal antibodies to phosphocholine for immunodiagnosis. *J Immunol* 1987;138:3454–3460.
144. Briles DE, Nahm M, Schroer K, et al. Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med* 1981;153:694–705.
145. Weiser JN, Shchepetov M, Chong ST. Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1997;65:943–950.
146. Tsukada M, Spicer SS. Heterogeneity of macrophages evidenced by variability in their glycoconjugates. *J Leukoc Biol* 1988;43:455–467.
147. Hashimoto S, Ogata T. Blood vascular organization of the human appendix: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Tohoku J Exp Med* 1988; 154:271–283.
148. Ginsburg CM, McCracken Jr. GH, Schneerson R, Robbins JB, Parke JC Jr. Association between cross-reacting *Escherichia coli* K100 and disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* 1978;22:339–342.
149. Knight KL, Crane MA. Generating the antibody repertoire in rabbit. *Adv Immunol* 1994;56:179–218.
150. Winkelstein JA. The complement system. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, eds. *Infectious diseases*, 1st ed. Philadelphia: WB Saunders, 1992:37–43.
151. Van der Lay P, Heckels JE, Virji M, Hoogerhout P, Poolman JT. Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* spp. *Infect Immun* 1991;59: 2963–2971.
152. Nielsen SV, Sorensen UBS, Henrichsen J. Antibodies against pneumococcal C-polysaccharide are not protective. *Microb Pathog* 1993;14:299–305.
153. Briles DE, Forman C, Horowitz JC, et al. Antipneumococcal effects of C-reactive protein and monoclonal antibodies to pneumococcal cell wall and capsular antigens. *Infect Immun* 1989;57:1457–1464.
154. Cooper NR. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol* 1985;37:151–216.
155. Mostov KE. Transepithelial transport of immunoglobulins. *Ann Rev Immunol* 1997;12:63–84.
156. McDaniel LS, Benjamin WH, Forman C, Briles DE. Blood clearance by antiphosphocholine antibodies as a mechanism of protection in experimental pneumococcal bacteremia. *J Immunol* 1984;133:3308–3312.
157. Briles DE, Claflin JL, Schroer K, Forman C. Mouse IgG3 antibodies are highly protective against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* 1981;294: 88–90.
158. Schreiber JR, Barrus V, Cates KL, Siber GR. Functional characterization of human IgG, IgM, and IgA antibody directed to the capsule of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1986;153:8–16.
159. Schlesinger JJ, Foltzer M, Chapman S. The Fc portion of antibody to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against YF encephalitis in mice. *Virology* 1993;192:132–141.
160. Yuan R, Casadevall A, Spira G, Scharff MD. Isotype switching from IgG3 to IgG1 converts a nonprotective murine antibody to Cryptococcus neoformans into a protective antibody. *J Immunol* 1995;154:1810–1816.
161. Possee RD, Schild GC, Dimmock NJ. Studies on the mechanism of neutralization of influenza virus by antibody: evidence that neutralizing antibody inactivates influenza virus by inhibiting virion transcriptase activity. *J Gen Virol* 1997; 58:373–386.
162. Jefferis R, Pound J, Lund J, Goodall M. Effector mechanisms activated by human IgG subclass antibodies: clinical and molecular aspects. *Ann Biol Clin* 1994;52: 57–65.
163. Burton DR, Woof JM. Human antibody effector function. *Adv Immunol* 1992;51: 1–84.
164. Cooper LJ, Shikhman AR, Glass DD, Kangisser D, Cunningham MW, Greenspan NS. Role of heavy chain constant domains in antibody–antigen interaction. Apparent specificity differences among streptococcal IgG antibodies expressing identical variable domains. *J Immunol* 1993;150:2231–2242.
165. Briles DE, Forman C, Hudak S, Claflin JL. The effects of subclass on the ability of anti-phosphocholine antibodies to protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Cell Immunol* 1984;1:305–309.
166. Amir J, Scott MG, Nahm MH, Granoff DM. Bactericidal and opsonic activity of IgG1 and IgG2 anticapsular antibodies to *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1990;162:163–171.
167. Weinberg GA, Granoff DM, Nahm MH, Shackelford PG. Functional activity of different IgG subclass antibodies against type b capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae*. *J Immunol* 1986;136:4232–4236.
168. Bredius RGM, de Vries CEE, Troelstra A, et al. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* type b opsonized with polyclonal human IgG1 and IgG2 antibodies. *J Immunol* 1993;151:1463–1472.
169. Lefranc M, Lefranc G, Rabbitts TH. Inherited deletion of immunoglobulin heavy chain constant region genes in normal human individuals. *Nature* 1982;300: 760–762.
170. Ravetch JV, Kinet J. Fc Receptors. *Ann Rev Immunol* 1991;9:457–492.
171. Gorter A, Hiemstra PS, Leijh PCJ, et al. IgA- and secretory IgA-opsonized *S. aureus* induce a respiratory burst and phagocytosis by polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 1987;61:303–309.
172. Hiemstra PS, Gorter A, Stuurman ME, van Es LA, Daha MR. Activation of alternative pathway of complement by human serum IgA. *Eur J Immunol* 1987;17: 321–326.
173. Jarvis GA, Griffiss JM. Human IgA1 initiates complement-mediated killing of *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* 1989;143:1703–1709.
174. Imai H, Chen RJ, Wyatt RJ, Rifai A. Lack of complement activation by human IgA immune complexes. *Clin Exp Immunol* 1988;73:479–483.
175. Jarvis GA, Griffiss JM. Human IgA1 blockade of IgG-initiated lysis of Neisseria meningitidis is a function of antigen-binding fragment binding to the polysaccharide capsule. *J Immunol* 1991;147:1962–1967.
176. Griffiss JM, Bertram MA. Immunoepidemiology of menigococcal disease in military recruits. II. Blocking of serum bactericidal activity by circulating IgA early in the course of invasive disease. *J Infect Dis* 1977;136:733–739.
177. Michetti P, Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ, Neutra MR. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1992;60:1786–1792.
178. Lamm ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Ann Rev Microbiol* 1997;51:311–340.
179. Brandtzaeg P, Fjellanger I, Gjeruldsen ST. Immunoglobulin M: local synthesis and selective secretion in patients with immunoglobulin A deficiency. *Science* 1968;160:789–791.
180. Einhorn MS, Granoff DM, Nahm MH, Quinn A, Shackelford PG. Concentrations of antibodies in paired maternal and infant sera: relationship to IgG subclass. *J Pediatr* 1987;111:783–788.
181. Leach JL, Sedmak DD, Osborne JM, Rahill B, Lairmore MD, Anderson CL. Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal–fetal antibody transport. *J Immunol* 1996;157:3317–3322.
182. Ravetch JV, Margulies DH. New tricks for old molecules. *Nature* 1997;372: 323–324.
183. Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, et al. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* Type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *JAMA* 1993;269:221–226.
184. Takala AK, Eskola J, Leinonen M, et al. Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1991;164:982–986.
185. Briles DE, Swiatlo E, Edwards K. Vaccine strategies for *Streptococcus pneumoniae*. In: Stevens DL, ed. *Streptococci*. New York: Oxford University Press, 1999.
186. Bhatt SM, Cabellos C, Nadol JB Jr, et al. The impact of dexamethasone on hearing loss in experimental pneumococcal meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:93–96.
187. Gutierrez-Ramos JC, Bluethmann H. Molecules and mechanisms operating in septic shock: lessons from knockout mice. *Immunol Today* 1997;18:329–334.
188. O'Brien AD, Rosenstreich DL, Scher I, Campbell GH, MacDermott RP, Formal SB. Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the Lps gene. *J Immunol* 1980;124:20–24.
189. Hagberg L, Briles DE, Eden CS. Evidence for separate genetic defects in C3H/HeJ and C3HeB/FeJ mice, that affect susceptibility to Gram-negative infections. *J Immunol* 1985;134:4118–4122.
190. Finne J, Leinonen M, Makela PH. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* 1983;2:355–357.
191. Rougon G, Dubois C, Buckley N, Magnani JL, Zollinger W. A monoclonal antibody against meningoccus group B polysaccharides distinguishes embryonic from adult N-CAM. *J Cell Biol* 1986;103:2429–2437.
192. Moran AP, Prendergast MM, Appelmelk BJ. Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997;16:105–115.
193. Rees JH, Soudain SE, Gregson NA, Hughes RA. *Campylobacter jejuni* infection

and Guillain-Barré syndrome. *N Engl J Med* 1995;333:1374–1379.

194. Limpanasithikul W, Ray S, Diamond B. Cross-reactive antibodies have both protective and pathogenic potential. *J Immunol* 1995;155:967–973.
195. Ray SK, Putterman C, Diamond B. Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: a paradigm for autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2019–2024.
196. Bessen D, Jones KF, Fischetti VA. Evidence for two distinct classes of streptococcal M protein and their relationship to rheumatic fever. *J Exp Med* 1989;169: 269–283.
197. Hollingshead SK, Bessen DE. Evolution of the emm gene family: virulence gene clusters in group A streptococci. *Dev Biol Stand* 1995;85:163–169.
198. Cunningham MW, McCormack JM, Fenderson PG, Ho M-K, Beachey EH, Dale JB. Human and murine antibodies cross-reactive with streptococcal M protein and myosin recognize the sequence gln-lys-ser-lys-gln in M protein. *J Immunol* 1989;143:2677–2683.
199. Cunningham MW, Antone SM, Gulizia JM, McManus BA, Gauntt CJ. Alpha-helical coiled-coil molecules: a role in autoimmunity against the heart. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;68:118–123.
200. Cunningham MW. Streptococci and rheumatic fever. In: Friedman H, Rose NR, Bendinelli M, eds. *Microorganisms and autoimmune disease.* New York: Plenum, 1996:13–66.
201. Cunningham MW, Antone SM, Gulizia JM, McManus BM, Fischetti VA, Gauntt CJ. Cytotoxic and viral neutralizing antibodies crossreact with streptococcal M protein, enteroviruses and human cardiac myosin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1320–1324.
202. Chow LH, Yuling Y, Linder J, McManus BM. Phenotype analysis of infiltrating cells in human myocarditis. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:1357–1362.
203. Guilherme L, Chuna-Neto E, Coelho V, et al. Human heart-infiltrating T cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation* 1995;92:415–446.
204. Shikhman AR, Greenspan NS, Cunningham MW. A subset of mouse monoclonal antibodies cross-reactive with cytoskeletal proteins and group A streptococcal M proteins recognizes N-acetyl-β-D-glucosamine. *J Immunol* 1993;151: 3902–3913.
205. Shikhman AR, Cunningham MW. Immunological mimicry between N-acetyl-β-d-glucosamine and cytokeratin peptides. *J Immunol* 1994;152:4375–4387.
206. Quinn A, Adderson EE, Shackelford PG, Carroll WL, Cunningham MW. Autoantibody germline gene segment encodes VH and VL regions of a human anti-streptococcal Mab recognizing streptococcal M protein and human cardiac myosin epitopes. *J Immunol* 1994;154:4203–4212.
207. Kuo JS-C, Doelling VW, Graveline JF, McCoy DW. Evidence for covalent attachment of phospholipid to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Bacteriol* 1985;163:769–773.
208. Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, et al. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 1995;269:227–230.
209. Stephens DS, Hoffman LH, McGee ZA. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis* 1983;148:369–376.
210. Melly MA, McGee ZA, Rosenthal RS. Ability of monomeric peptidoglycan fragments from *Neisseria gonorrhoeae* to damage human fallopian-tube mucosa. *J Infect Dis* 1984;149:378–386.
211. Lin L, Ayala P, Larson J, et al. The *Neisseria* type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. *Mol Microbiol* 1997;24:1083–1094.
212. Stephens DS, Whitney AM, Melly MA, Hoffman LH, Farley MM, Frasch CE. Analysis of damage to human ciliated nasopharyngeal epithelium by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 1986;51:579–585.
213. Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state. *J Exp Med* 1969;129:1385–1395.
214. Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *J Exp Med* 1969;129:1367–1384.
215. Gotschlich EC, Liu TY, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. 3. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. *J Exp Med* 1969;129:1349–1365.

第42章 疫 苗

G.J.V. Nossal[①]

历史回顾

疫苗的分类

佐剂和黏膜免疫原则

细菌疫苗

病毒疫苗

针对寄生虫的疫苗

针对肿瘤的疫苗

生育控制疫苗

在自身免疫及变态反应中的阴性疫苗

疫苗的不良反应

前景

致谢

参考文献

1387 疫苗是医学史上最为经济的大众健康手段,事实上,一些疫苗已经有效地降低了疾病的流行,将一些重要的疾病问题控制在公众满意的水平。奇怪的是,在过去的40年中只有少量的免疫学理论有助于疫苗的发展。在Pasteur介绍狂犬病疫苗后的一段时期,免疫学被清楚地视为医学微生物学的一部分,但是当意识到除微生物外,细胞和小的有机分子也具有抗原功能时,免疫学便被分离出来,独立发展。自20世纪50年代开始,移植免疫和自身免疫的研究取得了飞速的进展,同时对于复杂多变的抗体的兴趣与日俱增,使学术性免疫理论知识远离传统研究。因此,诸如小儿麻痹症和肝炎疫苗的重大成功就是来自于其他原理;那些参加

① G.J.V. Nossal: Department of Pathology, The University of Melbourne, Parkville, Victoria 3052, Australia.

到国际免疫学会日益增多的组织和参予本书编写前三版编写的编缉们，对免疫接种的兴趣并不浓厚。在过去10年中，这种情形已经发生了改变。很难一言蔽之。HIV 和艾兹病的泛滥所造成的影响也许是一个主要因素。同样 WHO 推进疫苗研究和发展的努力也起到重要作用。也许最为重要的是免疫理论的关注点逐渐转移到调节和指导免疫应答的规律上来，科学家们认识到，这些研究极大地帮助了设计合理有效的疫苗和免疫佐剂。部分原因是在许多顶尖免疫学家中，这种兴趣的重新苏醒；部分原因是因为一半或者说主要的疫苗生产商重新恢复了疫苗研究。我们已经看到新的更为完善的疫苗出现，还有许多正随之而来。这种情况带来两个巨大的挑战：即如何使新的疫苗不会由于注射次数过多而为人们带来不便；如何使这些疫苗得到公平合理的利益分布，包括那些发展中国家的公民。

1388

本章试图总结疫苗的基本原理，包括阐述某些变异的病原体阻止免疫反应的复杂机制。主要关注的是传染病。然而广义上讲，在许多方面疫苗方案非常重要，例如肿瘤和生育控制。进而由于抗原可以导致免疫，也能导致耐受，故可能存在合适的免疫抗原可以控制自身免疫反应、变态反应和移植排斥。虽然粗略，但支持“阴性疫苗”的机制仍被讨论。

与大多数的临床医学一样，疫苗学也是科学实践和实际经验的统一。在某些方面，如佐剂的研究更依赖于后者。目前我们更了解何种免疫反应能够控制特定的传染病，故疫苗和佐剂应当被改进，以使它们可以更好地引导淋巴细胞朝着最为合理的方向发展。在目前的经验水平上，细胞因子在引导过程中发挥了极大的作用；故一直研究是否能在实践中使用这些细胞因子或编码它们的基因。细胞因子是采用新的合理的方法来提高免疫原性方案中的一例。

本章并不是对目前或将来的疫苗的进行总结，有一些已发表的优秀文章可完成此使命[1~3]。更准确地说：所提及的这些疫苗例子是为了说明那些导致保护效应的复杂过程和能获得的巨大公众利益。必须引用大量疾病的事实也说明这个领域前景广阔且富有希望。

历史回顾

在有历史记录的早期文明中，诸如埃及、印度、希腊、中国都有对传染病的记载，但要对此做出精确判断仍是一个问题。有理由相信有关《圣经》中提到的“麻风病”就是诸如牛皮癣之类的皮肤病。关于天花及其根除所做的重要工作[4]，Fenneral 曾这样总结道：“关于麻风病的正确无误的定义是在公元四世纪时中国出现”。尽管如此，是古希腊人首先了解到免疫的特性以及其终生持续性，immunity 一词是在记录14世纪的一场大瘟疫的相关资料中首先使用的。由于对疾病发生源及流行病学方面知识的缺乏，当时难以对这些概念加以正确的运用。

一个例外是人痘接种预防天花的实践。这种可怕的疾病导致20%～30%的患者死亡，幸存者将终生留下瘢痕。在公元10世纪早期，天花病变的脓液或愈合疮的死痂被给予易感者，使他们获得免疫。印度在皮肤接种人痘，而中国则在鼻子。因为尚不完全清楚的理由，人痘接种和自然感染相比很少导致严重的疾病。在人痘接种部位常出现严重的损害、一些星形的水泡，常伴有温和的发疹和全身反应症状。然而，其死亡率只有1%～2%，较常天然感染的瘢痕少得多。但也存在其他的重要限制，如和接种个体的接触可引发完全天然的感染。尽管如此，在18世纪早期威严如伦敦皇族均在争论这个问题。就给予免疫力而言，毫无疑问人痘接种是有效的。但整个医疗效果还是值得怀疑。

将人痘接种引入英国当归功于 Mary Montagu 女士，虽然其促进工作的重要性曾被争论[5]。作为君士坦丁堡大使的妻子，当地普遍的接种给她留下深刻的印象，她6岁的儿子也在1718年接种了人痘。返回伦敦后，由于他们在1721年可怕的天花流行中存活，引起皇家医师学院几个重要成员的兴趣。学院主席 Hans Sloane 爵士经过在几个重犯身上的试验变成支持者，安排两名王子接受人痘接种。尽管有几个成功的例子，人痘接种并没有在英国或欧洲广泛实践，然而人痘接种失败的例子却被牢记在这个疫苗时期。

琴纳时代

在18世纪60至70年代,几个医师注意到挤奶女工很少有痘疮。她们常接触牛乳头,导致手上感染,引起脓疮。这种牛的相关疾病和人类天花类似。随后发现挤奶女工不会被天花感染。在琴纳Jenner成功的同时,几个人宣称因为这一系列观察已经给他们小孩接种了牛痘。这或许有可能,但Edward Jenner不仅首先发表这个结果,而且最早用实践验证这种方法对天花的免疫力。Sarah Nelmes从她感染牛痘的手上提供了少量液体,Jenner在1796年5月14日将此物质接种在James Phipps的手臂。正如Jenner所描述:"尽管假性天花接种小孩的手臂出现类似的脓疱,然而除此之外它几乎不可觉察,我不能说服自己相信病人正在被天花感染。无论如何接种几个月后,可证实他是安全的[7]。"

5年后采用天花感染进一步证实了这种免疫力的持久性。琴纳未能使其工作被《皇家学报》(Transactions of The Royal Society)收录[5],只是私人印刷了他的结果[6]。很快在实践中所谓的种痘传播开来。它传遍欧洲、美国乃至于全世界。在19世纪早几年几个欧洲国家强制种痘,结果天花的死亡率显著下降。例如,瑞典在1800年每百万人口有5126人死于天花,1821年就下降了100倍[4]。在英国1853年种痘变为义务性。在19世纪的后50年痘苗的来源从人转变成从牛获取,并且再次接种也变得普遍。在1896年,英国举行了盛大的庆祝活动,以纪念James Phipps实验,其安全的痘苗接种取得巨大成功。防御天花的过程是如此引人注目,使其获得一个单独章节来描述的殊荣。通过在世界许多地方雕像和纪念碑,格洛斯特郡一个普通的开业医师被世人所认识。在伦敦Kensington花园,1996年他的雕像成为二百周年盛大庆典的焦点。雕像下面镌刻有"对人类做出贡献的乡村医生"。但谁能预测80多年过后,免疫学才迎来另一次飞速发展呢?

1389

巴斯德时代:行动和结果

Jenner没有提出一个成形的理论解释疫苗接种如何提供对天花的免疫力。两位建立传染性疾病感染病因学的伟大巨人Louis Pasteur(巴斯德,1822~1895)和Robert Koch(柯赫,1842~1910)揭开了更好理解特异性免疫的序幕。Pasteur[8]破除了细菌的自然发生学说,作为他竞争者和辩论对手的柯赫明确叙述了其著名的并已被证实的推论:如何确定一个因子是引起某种疾病的原因。Pasteur做了重要的观察,发现细菌在人工培养基上生长会丢失其毒性。例如,引起家禽霍乱的出血败血性Pasteur菌,当其在体外培养条件下被削弱后将不能再致病。注射这种削弱处理的细菌可保护处于有毒环境的新生小鸡[9]。这一想法非常迅速地在一系列真实情况下测试。1881年,经削弱的炭疽疫苗第一次被使用,到1882年,有85 000只山羊被免疫[10]。Pasteur选用了vaccine作为这一免疫制剂的名称,以纪念Edward Jenner和他使用的牛痘疫苗。虽然Pasteur不知道狂犬病是由病毒引起的而不是由细菌,也不知道它必需在家免脊髓中被削弱而不是通过培养。但是他在小Jacob Meister身上用的狂犬免疫法却取得了很好的效果并被广泛流传开。世界各地的头衔及荣誉向Pasteur飞来,也使他能够建立一个经费完全来源于慈善捐助的巴斯德研究院。该研究院于1888年建于巴黎,它是人类历史上第一个完全投入生物医学研究的研究院,因而具有重大的历史意义。

随之而来的其他活减毒细菌疫苗是几个衰退的霍乱疫苗(例如Ferran和Halfcine研究的疫苗[11])和一种非常有趣的Koch结核杆菌的变体。Calmette和Guerin[12]从牛身上开始分离肺结核杆菌。经过历时长达13年的213次传代培养后,他们大胆地在新生儿上做了口服试验。因此,卡介苗(bacille Calmette-Guerin,BCG)诞生了。很快它就由口服改为皮内注射,并在新生儿抵御粟粒性肺结核(TB)和结核性脑膜炎上有非常明确的效果,虽然它对成人的TB有防御作用,但是否真是TB的终结者还有很多争论。

最初认为只有活的微生物才能引起免疫。然而被灭活的霍乱、伤寒、鼠疫全细菌疫苗早在1896年就被报道,并且通过20世纪初的许多次试验证明其有效,至少是部分有效。另一个前进的里程碑是认识到某些确定疾病是由有关细菌分泌的强力外毒素引起的,如百喉和破伤风。Von Behring和Kitasato[13]于1890年发现抗体,使用来源于马的百喉毒素抗体,主动免疫治疗百喉取得一定的成功。这一结果最终获得诺贝尔医学奖。在获取抗毒素时培养上清常混有粗制毒素,最初的主动免疫治疗百喉或破伤风时使用的是包含毒素和

抗毒素混合物。直到认识到毒素可通过甲醛变性中和后,仍具有诱导保护性的免疫原性,才得到满意和一致的结果。这种被称为类毒素的东西是一种很好的疫苗[14],并从 1930 年起逐步引入工业化国家,将传染病的影响降到一个很低的程度。

在免疫学第一个黄金时代(即 1880 ~ 1910)伴随着某种程度的骄傲。有一段时间所有认为需要克服的传染病都被拿去分离病原体,建立 Koch 原则的试验,减毒或灭活病原体,然后免疫。然而从最早的实验(如 Pasteur 的狂犬病实验)开始,就存在争论。Levine[11] 记载了一些由疫苗引起的历史性灾难,它清楚地记录了一些早期疫苗制剂既不够安全又不能够保护使用者。这一时期生产机构和经销机构都没有得到发展,许多临床实验的设计也偏离了需求。虽然疫苗取得了特别的成功,但在这一黄金时期并未被充分认识。有许多专家对疫苗保留看法,同时从社会反映来看约 1/4 的人持明显的反对态度。作者生于 1931 年,显然在那时受过教育的父母一点也不相信免疫能带来好处。

病毒革命:索尔克疫苗和沙宾疫苗

1930 年,建立病毒在鸡胚尿囊绒毛膜上生长的工作,导致制备两种有用的疫苗,即抗黄热病(一种非常有效的减毒活疫苗)和流感(一种低成功率的灭活疫苗)。无论如何,抗病毒疫苗的革命是随着组织培养的发展而开始的,Enders 和他的同事们[15] 成功地培养了脊髓灰质炎病毒,很快发展了索尔克疫苗。

现在已很难想像 1955 年以前围绕在脊髓灰质炎下的恐惧。当时这种病在自然界中广泛传播,并随着季节消长,从未消失。在高发病率的年月,母亲们甚至不敢让他们的孩子到电影院或游泳池去。因为小儿麻痹症是非常恐怖的。例如在美国,每年有 20 000 或更多脊髓灰质炎引起的小儿麻痹症。索尔可疫苗(灭活的脊髓灰质炎疫苗)诞生于 1955 年,在 1955 ~ 1961 年期间,接种了 3 亿支剂量的疫苗,使这种病的发病率下降了数十倍。曾发生了一个著名的 Cutter 事件,由于生产技术上的失误生产了两批没有被甲醛充分灭活的疫苗,导致了 149 例小儿麻痹症,这一不幸事件推动了口服减毒活脊髓灰质炎疫苗(Sabin)的发展,并于 1961 年首次生产成功。1965 年在美国,这种疫苗已基本上替代了索尔可疫苗,并且很快传到除荷兰、冰岛、瑞典外的许多国家。由于是口服,所以使用非常方便;含有很少的病毒,故非常便宜。但有讽刺意味的是非常少病毒返祖具有神经毒性,特别是 3 型脊髓灰质炎病毒(估计约 270 万个剂量的口服脊髓灰质炎疫苗中有 1 例发生急性弛缓性麻痹),促使美国卫生当局推荐使用最初的注射脊髓灰质炎疫苗来减小危险。后来 Jonas Salk (索尔克)不知疲倦地和这种返祖现象作斗争,他和 Albert Sabin(沙宾)的这种敌对关系甚至成为一个传奇。

1390

根除小儿麻痹的伟大进展将在以后讨论,但小儿麻痹的免疫疗法毫无疑问地取得了巨大成功,也铺平了其他通过组织培养来获取减毒病毒疫苗的道路。Enders 培养出麻疹疫苗的 *Edmondston* 菌株最早产生于 1963 年,当时有一点“热”。作者年幼的儿子出生于 1964 年,被推荐使用这种疫苗,但是同时给药的丙种球蛋白中含有抗麻疹抗体!这一问题通过从 *Enders* 菌株衍生更加减毒的 *Moraten* 和 *Schwartz* 菌株而得到解决。紧跟着这种优秀的麻疹疫苗是:1967 年研制出了流行性腮腺炎疫苗;1968 年研制出了减毒活风疹疫苗。Hilleman[16] 记载了麻疹-流行性腮腺炎-风疹三联疫苗这一长期梦想的实现,它于 1969 年完成并于 1971 年拿到许可证。现在工业化国家正在用麻疹-流行性腮腺炎-风疹-水痘四联疫苗来根除这 4 种疾病。在一些欧洲国家已经没有了麻疹、流行性腮腺炎、风疹的传播。

天花的根除

20 世纪 60 年代中期,社会上对疫苗还存在很大的怀疑,脊髓灰质炎疫苗的成功改变了公众的观点。但无论这些疫苗有多么成功,仍没有一个把疾病从地球上根除的例子。有趣的是,Edward Jenner 曾经推测天花可能根除。尽管在一些国家取得了很好的效果,但在 WHO 出现以前,全球根除计划没有被作为一个议题讨论。因为欧洲实际上已于 1953 年达到了这一要求,北美和中美也在 1951 年达到,全球根除似乎是可行的。在亚洲的许多国家这一过程也进行得很好,但是到 20 世纪 60 年代,天花仍是非洲和大多数印度次大陆国家的主要疾病。

1959 年 5 月第十二届世界卫生联合会作了过于性急的一个决定。全球根除天花被作为 WHO 的一个新目标。而当时还有 9.77 亿人生活在天花流行区。1959 年的提案过于乐观地估计时间是 4 ~ 5 年。这项工作在 1959 ~ 1966 年间收效甚微,直到 1967 年 1 月 1 日 WHO 经过努力做出一项意义重大的预算分配。这项计划在 1967 年花费 1.8 亿美元为 2 亿人接种疫苗(包括各国本地的花费)。1966 年 D. A. Henderson 医师被指定为 WHO 天花根除小组组长,Isao Arita 医师是他的医学主管。他们制定了 10 年的根除计划,平均每年有 700万美元的外部预算(还要加上各国的本地经费),这个小组开始向他们雄心勃勃的计划发起冲击,主要的挑战是:疫苗的需求和质量控制、疾病的监测、数据的收集、大规模疫苗接种运动所需的培训计划、要求 WHO 自己拥有的考察实验室和一些类似的实际问题。1971 年美国和英国停止了他们的天花疫苗常规接种程序,使全球根除天花向前迈进了一大步。但非洲和印度次大陆仍存在一些问题,1973 年人们加强了对这一区域的工作。1975 年在亚洲实现了根除天花病毒,现今埃塞俄比亚成为惟一真正存在问题的区域。埃塞俄比亚和索马里之间爆发战争,天花病在索马里重新出现。马上进行了大规模的应急处理,最后一例自然发生的天花是在索马里的莫卡(Merca),发生于 1977 年 10 月 26 日。

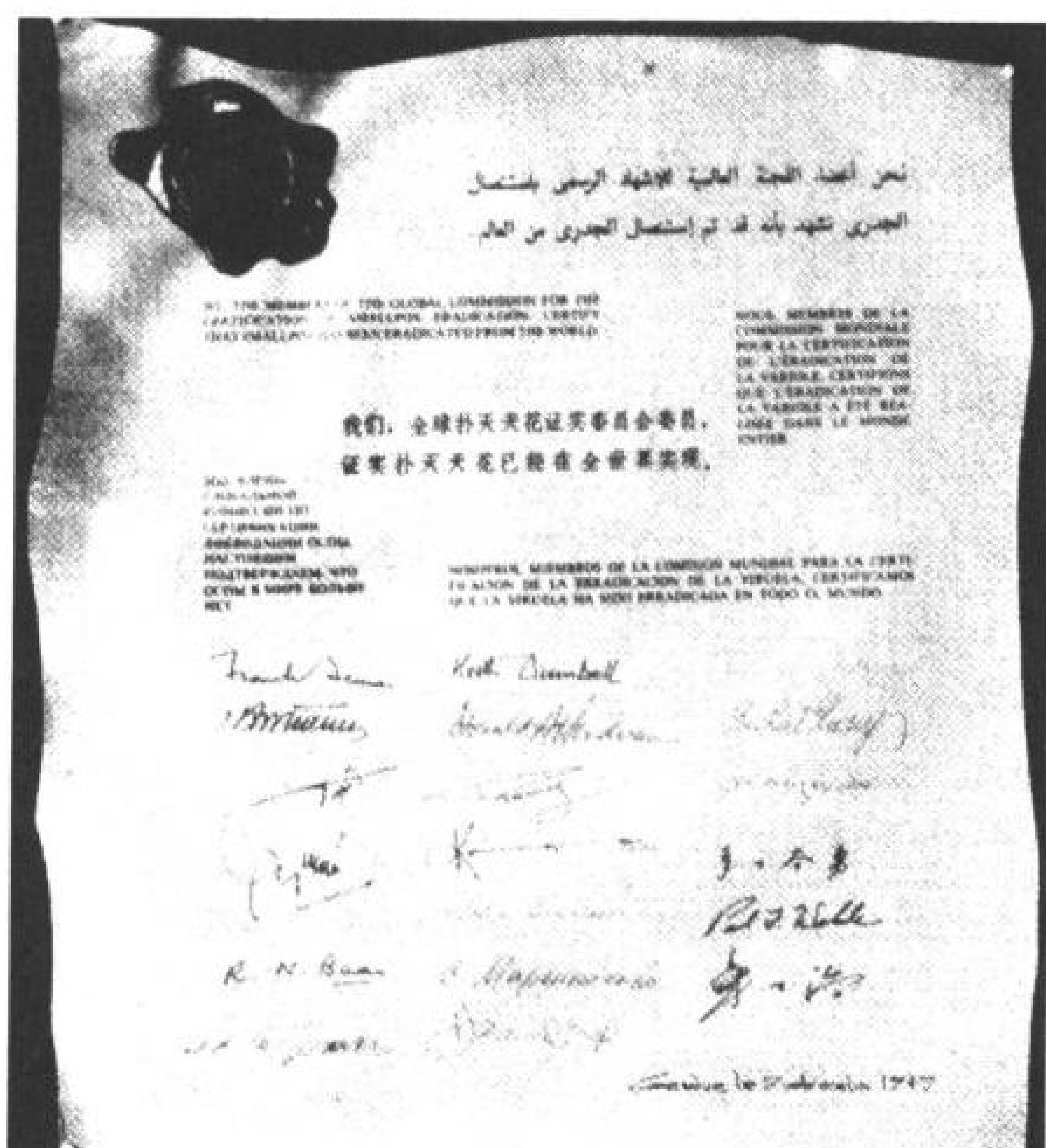

我们，全球扑灭天花证实委员会委员，
证实扑灭天花已经在全世界实现。

图 42.1　全球根除天花的官方羊皮纸证明(世界卫生组织许可印刷)。

1391

证明天花已经根除不是一件容易的事。全球的天花证实委员会特别留意了一些敏感的国家。1979 年 12 月 9 日,全球天花证实委员会证明天花已经根除(图 42.1)。然而不幸的是,在伯明翰 1978 年又出现了天花,一个医学摄影师死于这种疾病,很显然她是从医学院地下楼的天花实验室中感染的。这更加显示出天花病毒储存在实验室的危险性。天花实验室主管 49 岁的 H.S. Bedson 教授也自杀死了。到本文写作时,美国和俄罗斯还存有天花病毒没有被销毁。然而在天花被发现 4000 多年后,在一种有效的疫苗被使用 181 年后,根除这种天然疾病必须视为人类历史上一个光辉的成就。在工业国家和发展中国家扑灭天花共用了 11 年时间及 30 亿美元。这与每年用于天花的耗费(1967 年,全球花费 135 亿美元)形成鲜明对比。

分子时代的黎明:乙肝

乙肝疫苗从几方面代表了一个分水岭。在从某一点来说,脑膜炎双球菌的类毒素和多糖疫苗是分子和亚基疫苗,而乙肝病毒表面抗原(HBsAg)的应用代表了作为疫苗的单一蛋白质的新纯度水平。它也是运用重组 DNA 技术制造的第一个疫苗。它还是第一个可自组成 22nm 病毒样颗粒的蛋白例子,这种聚合强劲地增加了免疫原性。另外它也是第一次以一种昂贵的、针对一些特殊高风险人群的"专卖"疫苗形式引入市场,这些特殊人群主要包括医师、护士和血库工作者等,但随后变成对发展中国家具有重大意义的一种便宜的大众健康工具。全球有 2.5 亿乙肝携带者,其中 20% ~ 25% 发展成慢性肝病,再以一定比例发展成原发性肝癌,所以乙肝疫苗是历史上第一种抗癌疫苗。此疫苗的相关抗原最先被视作代表一种蛋白多态性(澳大利亚抗原)[17],随后才被视作一种病毒成分[18],从这个意义上讲它也是独一无二的。

乙肝疫苗的巨大成功减少了社会对重组 DNA 产品的害怕,并确实开创了一个新的时代,在此时代,基因工程方法变为疫苗研究和发展的基础。希望类似 Blumberg 发现澳大利亚抗原与发展第一代血源疫苗的 18 年断层不会再次出现。事实上,从克隆 HBsAg 基因到酵母来源疫苗的时间间隔就短得多,并且从那以后,表达系统已得到巨大发展。

免疫接种扩展计划

运用近期发展情况来结束这个历史总结是恰当的。WHO打算将什么疾病如根除天花样消灭？在1974年即将结束时，WHO决定将从天花中获得的经验用于攻击另外可被疫苗预防的疾病。Ralph H. Hendersen博士（与扑灭天花中有名的D.A.Henderson无关）被任命为免疫扩展计划（Expanded Program on Immunization，EPI）的主管，该计划目的是使全世界每年出生的1.2亿儿童预防6种疾病：白喉、百日咳、破伤风、麻疹、脊髓灰质炎和结核。该计划执行3年，当天花被彻底根除时，它已获得一些引人注目的成就（图42.2～图42.4）。

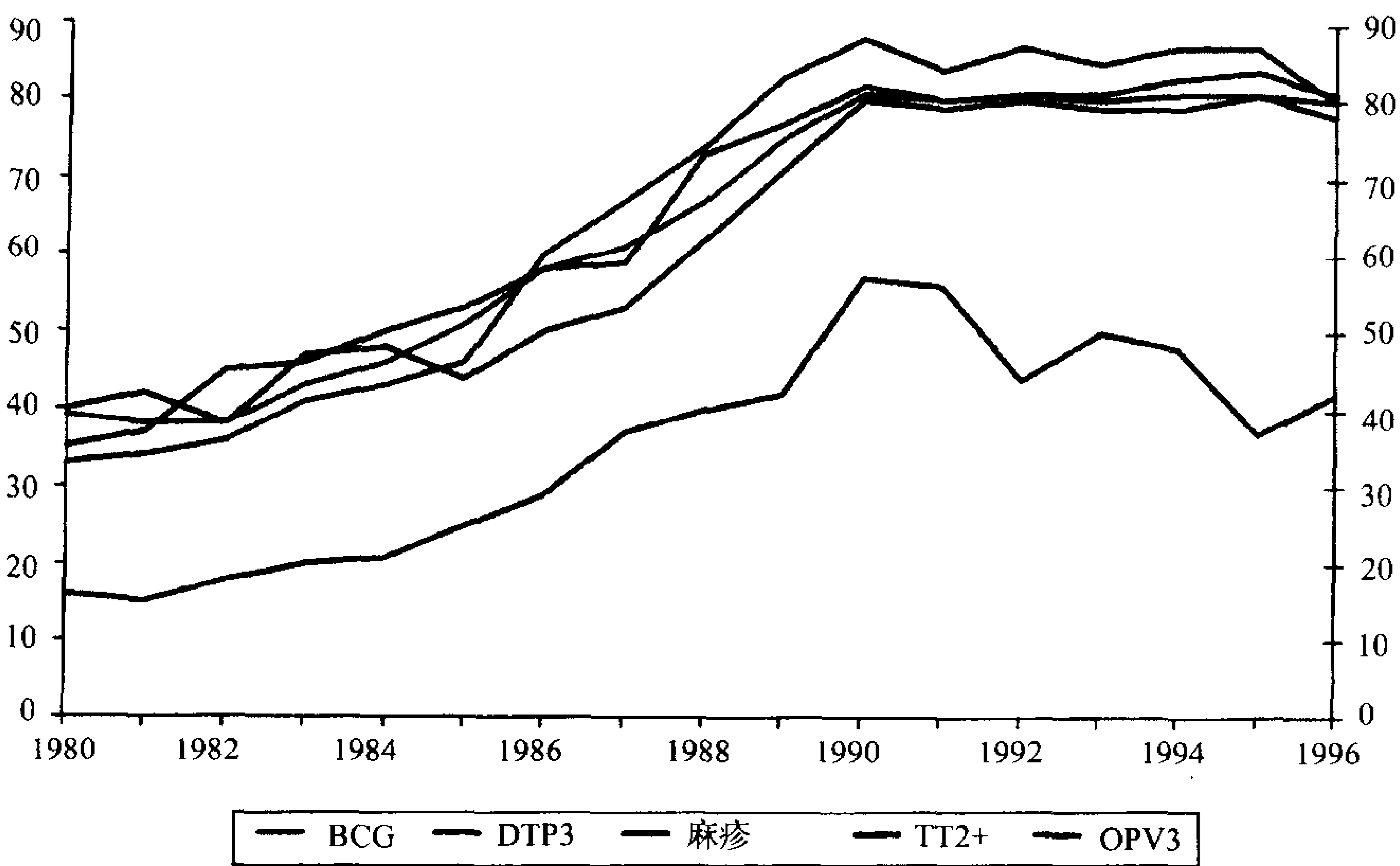


图42.2 世界卫生组织免疫扩展计划的免疫情况：图示1980～1996年孕妇给予如下疫苗的免疫接种情况（卡介苗、3次白喉、麻疹疫苗接种、3次口服脊髓灰质炎疫苗和2次破伤风类毒素接种）。其中1996年的轻微下降主要因为有些地区未提供完全的资料。注意平台期基本位于80%。破伤风类毒素接种情况仍低于期望值。（引自WHO。）

由于疫苗使用范围的扩大，疾病的报告例数已下降。在1988年，世界健康协会给EPI另一项挑战：在2000年前消灭脊髓灰质炎。1991年乙肝被加入预防疾病名单中，希望在1995年携带率达8%的国家引入免疫接种计划，到1997年希望所有国家引入此计划。黄热病同样成为一些国家的目标。由于一些原因也将覆盖寄生虫病的疫苗，其截止期限尚未完全确定，但已获得确实的进展。寄生虫病的部分也将在疫苗界引起更令人兴奋的结构变化。 *1392*

在Jenner发现疫苗的200年后，在Pasteur逝世的100年后，这个世界正在进行他们最后的传奇。但下面的章节将显示有更多的事需要我们去做。

疫苗的分类

疫苗的目的是激起免疫反应，但不使人遭受实际感染的危险。一个理想的疫苗将引起与天然感染相同程度的免疫或更好。由于大部分疫苗都达不到这一标准，通常需要不止一次地给予疫苗，以使免疫记忆发生作用，即在再次接触某抗原时产生更强反应。疫苗可引起各种免疫反应，包括抗体形成、Th1和Th2型$CD4^+$ T细胞反应和$CD8^+$ T细胞反应，但实际的疫苗发展计划多依靠疫苗引起抗体形成的能力。但如果设定更具野心的目标，以及引导免疫反应走入特定途径的能力提高，这种情况可能会有所改变。

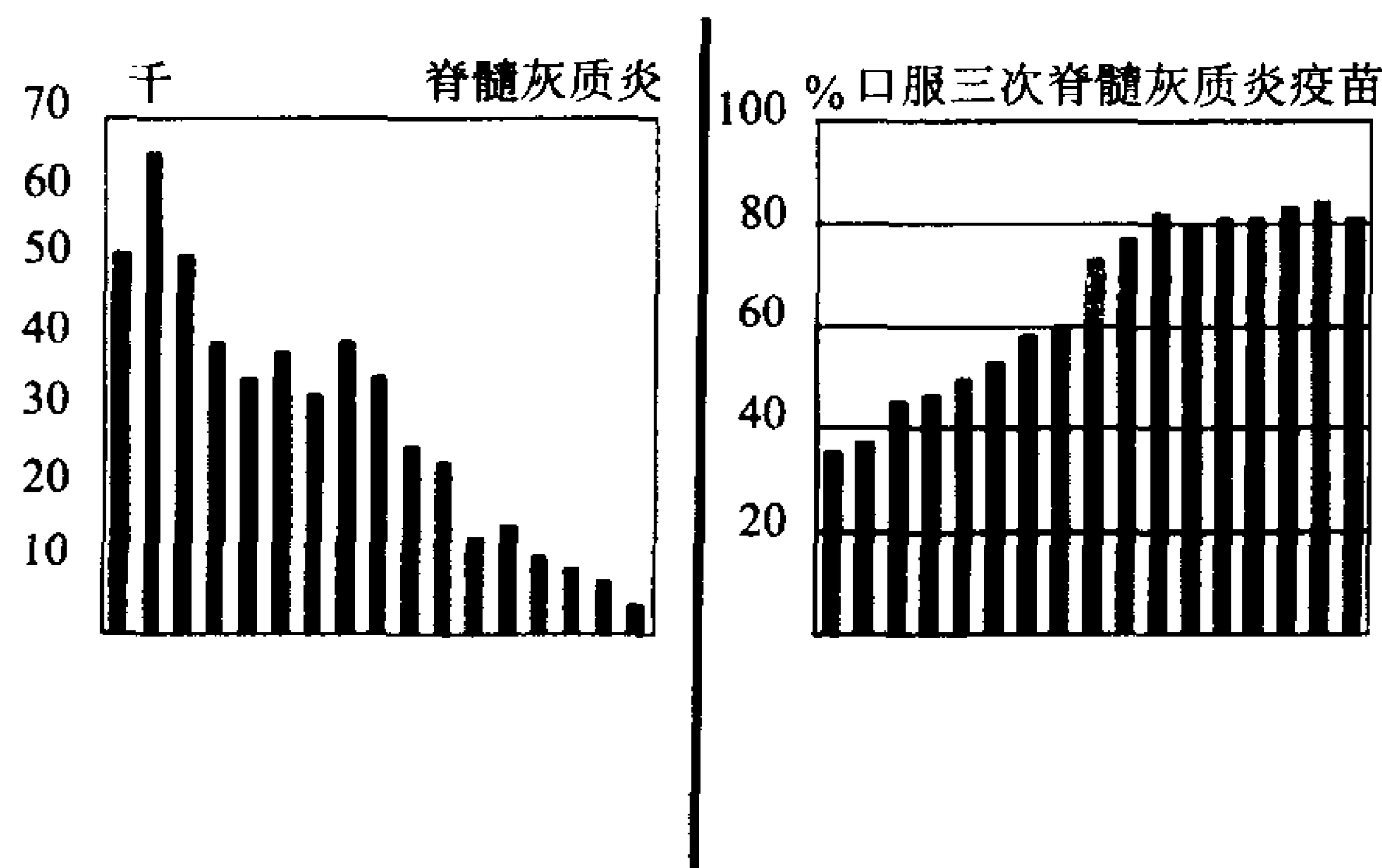


图 42.3　全球免疫计划导致脊髓灰质炎病例的下降。近 10 年的显著下降主要由于两个原因,一个是婴儿免疫计划,世界范围婴儿免疫水平稳定在 80%以上,另一个是由于许多国家开始实行国家免疫日(NID)。(引自 WHO。)

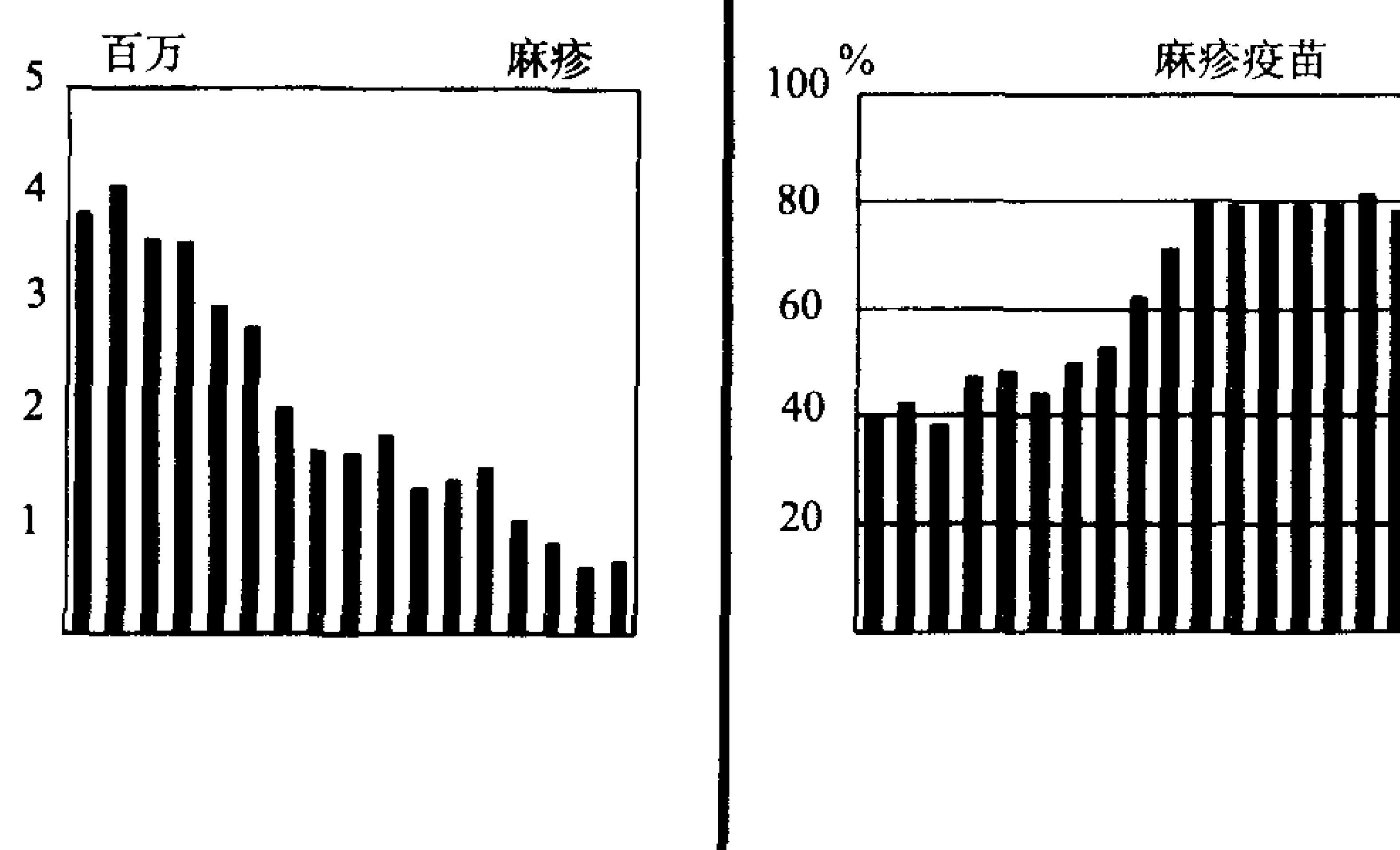


图 42.4　全球免疫计划导致麻疹病例的下降。在过去 3、4 年的下降是由于一些国家发起运动,致力于中断疾病的传播。(引自 WHO。)

疫苗最早被设计为防止感染,尽管第一批疫苗中的狂犬病疫苗是在感染发生后使用。现在治疗性疫苗上的研究日渐增多,即在感染发生后的疫苗作用。这些疫苗被设计来增加那些疾病中未充分诱导的免疫反应,尤其是在慢性和复发性疾病中。

很明显,微生物拥有成千上万的对宿主动物或人而言是外源的分子,那就是抗原性所在。这些分子的大部分免疫反应在预防感染上毫无用处。因此越来越重视鉴定、纯化,并且通常分子克隆这些激发宿主保护性反应的抗原。对于更复杂的病原体,如寄生虫,并不能马上发现哪种抗原是有效的,还必须进行相关免疫力的查寻工作。辨认出正确抗原还不是事情的终结,因为很多纯的、可溶性蛋白的免疫原性非常低。事实上,还需要平衡整个微生物的太高免疫原性与降低反应性、产生更为优秀的分子疫苗。这需要一例例地仔细分析,尽管在最近疫苗研究中这种平衡表现出偏向后者,如流感嗜血杆菌 B(*Haemophilus influenzae B*, Hib)和无细胞百日咳(acellular pertussis)。

除感染性疾病外疫苗在其他方面也有潜在的应用。在下面的章节将讨论:抗肿瘤疫苗、生育控制疫苗及降低免疫反应性疫苗(如在自身免疫性疾病或变态反应中)。表 42.1 总结了疫苗的分类,并列举一些获准生产或试验中的疫苗。

减毒活疫苗

从 Jenner 的天花疫苗起,减毒的活疫苗就在疫苗学占据一个特殊地位。很多这一类的病毒疫苗有超过 90%的效力,其保护作用通常延续多年。这也许不值得惊奇,因为病原体在宿主复制产生一个抗原刺激,抗原数量、性质和位置均与天然感染相似。这种突出的优势同时也是潜在的劣势所在,由于相关疾病的"迷你版本"对部分患者是危险的(如一般的牛痘或 BCG 能在免疫缺陷或免疫抑制的儿童中传播)。在一些疫苗

中,突变引起毒力缺失的机制并不清楚。此外,如同我们在脊髓灰质炎中所注意到的,突变可能恢复毒力。基于对决定毒力的分子基础的理解,近期研究着重于更合理地进行减毒,应用相关基因工程技术改良疫苗,使其恢复毒力变为不可能。

表 42.1 疫苗的分类

疫苗类型	疾病举例		
	病毒	细菌	寄生虫(均为 x)
减毒的活生物体	脊髓灰质炎,腮腺炎,风疹,水痘,黄热病,轮状病毒感染(x),登革热(x),甲型肝炎(x)	结核病,伤寒,霍乱(x),志贺氏细菌性痢疾(x),麻风(x)	
灭活生物体	脊髓灰质炎,流感,狂犬病,日本 B 型脑炎,甲型肝炎	百日咳,伤寒,霍乱,麻风(x),螺旋杆菌病(x)	疟疾(x)
抗毒素		白喉,破伤风,志贺氏细菌性痢疾(x),肠毒性大肠杆菌病(x)	
亚单位疫苗(包括肽疫苗)	乙肝,二型单纯疱疹(x),流感(x),人乳头状瘤病毒(x),HIV(x),狂犬病(x)	B 型流感嗜血杆菌感染,百日咳,幽门螺感染杆菌感染(x),脑膜炎球菌感染,肺炎球菌感染,伤寒	疟疾(x),血吸虫病(x),利什曼病(x)
载体疫苗	HIV(x),麻疹(x),狂犬病(x)	伤寒(x),霍乱(x),结核病(x),志贺氏细菌性痢疾(x)	疟疾(x)
核酸疫苗	HIV(x),流感(x),二型单纯疱疹(x),狂犬病(x),乙肝(x),丙肝(x),丁肝(x),乳头状瘤病毒感染(x),HTLV1(x),巨细胞病毒感染(x),圣路易脑炎病毒感染(x)	伤寒(x),结核病菌(x)	疟疾(x),血吸虫病(x),利什曼病(x)

(x) 表示实验性结果。

对减毒活疫苗的成功还需重新认识,它提出了一些问题。例如,在很多国家,麻疹疫苗仅给一次,任何地方都没给予超过 2 次。这能与感染一次麻疹产生同样长的免疫性吗?我们不清楚,在某疾病被彻底消灭前,我们必须保持一定的警觉,是否应该在成年人中进行加强免疫。这还不是减毒活疫苗或任何其他疫苗的当务之急,但它已成为现在许多争论的话题。

包含灭活微生物的疫苗

由于存在非复制性抗原,加强免疫是必须的。其包含一些高效、安全的疫苗,如索尔克可注射脊髓灰质炎疫苗(IPV)或甲肝疫苗。其他则是一些低效、短持续期的疫苗,如灭活后可注射的霍乱疫苗,几乎全部均已放弃。还有一些部分有效的疫苗,但需要提高其保护率和免疫的持续期,这包括了传统的灭活流感和伤寒疫苗。这些疫苗大多数最终将被新种类(主要是载体疫苗和亚单位疫苗)的疫苗替换。

1393

抗毒素

当疾病的病理变化主要是由于强有力的外毒素或肠毒素引起时,抗毒素疫苗具有很大的意义。在一些情况下,外毒素是细菌破坏组织提供丰富生成基质的工具。如破伤风、白喉和气性坏疽就是这种情况。这样相关的类毒素能成为很好的疫苗。一般来说,肠毒素的类毒素很少成功。然而,最近获得肠毒素型 *E. coli.* 的热稳定性肠毒素(LT)的遗传改造去毒衍生物,很有希望可成为旅行者的腹泻疫苗。它是通过点突变灭活 LT 毒素 A 亚单位的二磷酸腺苷核糖转移酶活性而获得的。霍乱毒性(CT)对应的突变可能产生更为重要的疫苗。

正如 Rappuoli 所指出[22],我们当前的白喉和破伤风疫苗含有很多不纯成分,而且将毒素变为类毒素的甲醛处理过程也导致培养基的牛源多肽交联,从而最后产生不必要的抗原。一个突变的非毒性纯分子作为一种新疫苗在科学上引起了反响,如 CRM197。CRM197 可与白喉毒素交叉反应,它在 52 位由甘氨酸替换了谷氨酸,从而导致毒素失活。尽管科学上是诱人的,但没有太多的经济压力改变尚使用良好的疫苗。毫无疑问,如果非细胞百日咳的组分 DPT 继续克服其缺乏反应性缺陷,有可能无不良反应的 D 和 T 组分获得商业

使用,这样正在进行的研究是令人鼓舞的。

亚单位疫苗,包括肽疫苗

重组的 DNA 时代带来大量的纯抗原分子,能在动物模型测试它们激发宿主保护性免疫的能力。某些亚单位疫苗,如 Hib 和非细胞百日咳,来自非常优秀的研究,我们将单独描述它们(参看病毒和细菌疫苗)。一些亚单位,如 HBsAg,在低剂量具有高度免疫原性,而另外一些的免疫强度令人失望,要求较铝盐更强的佐剂。另外亚单位疫苗较过去的疫苗昂贵。这是其在发展中国家使用的重要障碍,但是这种情况并非一种永远的状态。新一代疫苗是广泛、昂贵研究的结果,花费必需回报。而且它们也没有 EPI 计划 6 种传统疫苗的巨大销售市场。毫无疑问,大规模的生产技术将降低价格,同样也将增加专利保护期限的竞争。

肽疫苗通常由合成而不是遗传工程获得。其虽然具有狂热的拥护者,但并没有真正开始使用。最为有趣的相关研究是 HIV 和疟疾。由于鉴定了一些肿瘤相关的 T 细胞表位,肽疫苗将来可能用于肿瘤疫苗。相关内容将在下面章节中介绍。

载体疫苗

Bernard Moss 和 Enzo Paoletti 将重要抗原以不干扰复制的方式引入牛痘病毒,并且能在宿主细胞表达[23~25],从而独立揭开了疫苗学的重要一页。这种策略中无害的微生物成为抗原基因的载体,现在这种"特洛伊马"策略已扩展到无数个方向。在试验中使用的其他重要载体有牛痘病毒的变体、禽痘病毒、腺病毒、脊髓灰质炎病毒、疱疹病毒、沙门氏菌、志贺氏菌、BCG 细菌等等。这个策略的特点是组合两种疫苗的优势:减毒活疫苗强有力的免疫原性和合理亚单位疫苗的科学准确度。而且牛痘病毒或其他载体具有庞大的基因组,易于插入相当数量的抗原基因,一次可覆盖几种疾病。它也可以同时构建一个或多个细胞因子基因,这样可增强免疫反应或者改变免疫反应方向。

这个策略第一次介绍后已经过了 15 年,但是市场上尚未相关的疫苗。至今临床研究都是相当有限。对使用没有修饰牛痘疫苗的保留意见是可以理解的,特别是在这个 HIV 流行的时代,它对 T 细胞系统缺陷患者是危险的。这个保留意见可能被包含白细胞介素-2 (interleukin -2, IL-2)构建克服,因为试验显示它能阻碍由牛痘导致的无胸腺小鼠死亡[26]。已经获得了大量缺乏有毒基因的牛痘病毒株,正在临床试验中。不复制的病毒载体也值得考虑[27],如在人类的金丝雀痘病毒。当在试验性 HIV 和疟疾的早期临床试验中反应较差时这个领域自然放慢下来。但临床前试验数据中,20 种病原至少有 15 种可获得疾病保护,这些压倒多数结果建议进一步的研究将最终成功。值得注意的是这种方法很好诱导 T 细胞免疫,包括细胞毒性 T 细胞反应。

细菌载体的试验还没有获得如此进展,但是一些例子我们将在肠道和胞内病原体中提到。

核酸疫苗

没有什么试验疫苗像核酸疫苗的出现那样令人吃惊,像它一样发展迅速。核酸疫苗也称之为 DNA 疫苗或裸 DNA 疫苗。两个序曲为实际的发现提供了条件。Wolff 等人[28]在使用一个编码报告基因的质粒 DNA 时,发现在没有常规转染试剂的帮助下,注射盐溶液中的 DNA 可导致注射动物合成报告基因。这个来自试验对照组的令人吃惊结果原本是含有脂质的 DNA 试验组的期望结果。在各种注射部位的尝试中,肌内注射最好。在注射部位肌管的转染数是 1% ~ 5%。第二个序曲是与 DNA 传递系统有关,Agrecetus 最初由一个农业公司发展,用于转染植物细胞。Acell 基因传递系统也称之为基因枪,它包括一个氦气压力驱动装置,可将包裹 DNA 的细小金颗粒传送到组织的浅表层。例如这种 DNA 包裹的微注射物可以传送到小鼠的皮肤,导致相关抗原的合成[29]。这两种方法出现不久,即用于在小鼠活化免疫应答。采用基因枪方法诱导了人生长激素和人 α1 抗胰蛋白酶的抗体,首先证实 DNA 免疫是有效的[30]。然后延长编码蛋白在血清中的持续时间提示可能持续性的抗原刺激。第一次的宿主保护性免疫反应来自肌内注射[31]。小鼠被注射编码 A 型流感核心蛋白的质粒。诱发了抗体和 MHC I 类分子限制性的 CTL 反应。然后给予 A 型流感(PR/8),100%治疗小

1394

鼠存活,而100%的对照小鼠在第9天死亡[32]。几乎同时,Fynan等[33]使用基因枪和编码相关红血球凝集素抗原的DNA,也使小鼠获得针对一种致病性流感病毒(PR/8)的保护。随着这两个激动人心的结果,这个领域开始飞速发展。4年后,Donnelly等[34]能回顾大范围的临床前研究,这些研究显示能产生针对各种病毒、细菌、寄生虫和各种肿瘤模型的体液和细胞保护性反应。而且这种方法在很多物种可行,包括灵长类。

什么是核酸疫苗的主要特点呢?这与活疫苗的关键不同之处是编码抗原的DNA不会在人或动物体内复制。质粒一般在 *E. coli* 中生长。它们的复制原点不适合哺乳细胞。在核酸疫苗包含一个能在哺乳细胞高效表达的强启动子元件是十分重要的,例如人巨细胞病毒的中早期启动子[35]。同时构建也需同时含有一个合适的mRNA转录终止序列。肌内注射后,DNA进入胞浆,然后到达肌细胞核,但并不整合到基因组。作为基因枪方法的靶细胞,肌细胞和DC细胞均没有高速的分裂增殖现象,它们与质粒也没有高度的同源,故同源重组可能性较小。随机插入还是有可能,但是至今为止,尚未发现不良反应。事实上还没有关于这个问题的定量数据,但是似乎不可能在肌细胞中表达太久。在基因枪中,沉积在表皮的金颗粒很快进入朗格汉斯细胞,然后它们将进入局部淋巴结。在肌内注射中,现在清楚知道并非肌细胞本身诱导免疫应答。这是由Fu等人巧妙的试验证实的。在父或母系骨髓移植到F1代的嵌合小鼠,其肌细胞拥有父母两种MHC单体型,但其专职APC细胞,如DC(来源于骨髓),只有一种父或母系单体型。重建后的嵌合小鼠,被注射编码流感病毒核蛋白的质粒DNA,以便产生CTL应答。根据MHC限制性原则,由于这些小鼠含有F1的胸腺表皮细胞,它们外周的T细胞虽然是父或母系的单体型,但应该能识别位于父和母系两种单体型的抗原。然而离体测试时,它们清楚地仅限制于供体的MHC等位基因型。如果在体肌细胞创造CTL反应,就不应是这种情况。此外,在更多的嵌合体中,使用一种NP基因转染的成肌细胞系进行移植研究。使用精心选择的细胞株,可以看到,H-2不相容的成肌细胞能诱导CTL反应,但这些反应不是成肌细胞供体的MHC单体型限制的,而是骨髓供体的。这清楚地显示出,成肌细胞作为抗原来源,以一种允许MHC I类途径处理的方式转移到APC。这个明显异于双途径原则的例外是一个交叉激活的例子。这种交叉激活已在其他系统被提到。DNA疫苗产生CTL应答已成为许多研究的普通特征。

1395

核酸疫苗的潜在优越性是巨大的。使用纯分子的亚基疫苗会遇到错误折叠和抗原糖基化的阻碍,这将成为难以克服的难题及增加疫苗的成本。而DNA疫苗极大地防止了这种现象。一旦一个精确的DNA疫苗被生成,它将是稳定的,大量的变异可能性很小,并且易于质量监控。就实际生产程序而言,核酸疫苗相对便宜。可以通过连接一种多种质粒的混合物[38]或者构建复杂的质粒来实现多价疫苗,尽管这还没有尝试。从理论上说,抗原合成的稳定性将减少对加强剂量注射的需要,但是实际上,几乎所有的临床前工作都包含了一个DNA剂量的数目。然而试验显示,一个很好的活化CTL应答可以用非常少量(有时是毫微克级)的DNA来达到。

对发表的结果进行仔细审阅,正如预料,不同抗原或不同物种存在各种DNA疫苗效价的变化。最初小鼠和流感抗原的结合成为一种特别合适的方案,可引起高而稳定的抗体水平和强CTL反应。一些早期使用HIV衣壳蛋白基因的研究效果较差。例如,Robinson小组发现,衣壳蛋白抗体的滴度中等,但在加强注射后下降[39]。这促进了DNA和蛋白联合免疫的研究。通常认为,一个有效的AIDS疫苗应该既能导致强中和抗体也能引起强CTL反应,从而消灭HIV感染的细胞。Letvin等人[40]的研究指出,恒河猴能在DNA免疫反应后产生有力和稳定的HIV1衣壳蛋白特异性的CTL反应,但中和抗体水平却让人失望。但是在DNA准备时加入HIV衣壳蛋白,则构成一种最有效的加强免疫刺激,将导致高水平的中和抗体。在少量的猴身上DNA活化/DNA加蛋白加强免疫后,可保护这些猴子不被HIV1猿免疫缺陷病毒(SIV)的嵌合病毒感染,显然,对蛋白质和DNA的共同需要使得免疫方案复杂化并将大大地增加花费。

很明显,像核酸疫苗这些新事物将对调节机构产生相当大的问题。除了诱变致癌的可能性外,推测的危害还包括对DNA的自动免疫,或作为免疫调节结果之一的对抗原表达细胞的破坏。后者将直接损害或导致胞内抗原的释放,它将激活自身免疫。事实上,诱导自身组织的自身免疫是非常困难的,常需要使用强佐剂如福氏完全佐剂时才能产生。另外一个渐受重视的反对意见是,持续长时间的小剂量抗原的刺激可能导致

免疫耐受,从而导致受体对抗原的无反应。这种情况至今尚未在任何情况下出现。

在足够的警惕下,临床试验已被允许进行。在写这本书的时候,作者已注意到3条临床途径已开始了:2个与HIV疫苗相关,1个与流感疫苗相关。当然,已有很多尚未公开的研究。这些都还没有被报道,但在本书付印的时候,它们可能会出现在公众面前。虑及此领域的年轻,进展已是相当惊人的。但是在DNA摄取、优化在体基因表达水平和调节应答结果方面尚未引起注意。一个特别令人鼓舞的例外是用IL-12和HIV抗原联接于单个质粒中,它在一个大鼠模型中,明显地增加了抗原特异性CTL反应而且将免疫力变向Th1[41]。此领域的前景让人兴奋。同时,一些非正式的资料透露出,在人身上的反应要比在鼠身上弱很多。这可能主要是一种剂量效应。很明显,更多的大量研究需要进行以使梦想成真。

可食用的疫苗

食用疫苗的主意来源于Arntzen和同事[42]关于在转基因植物上表达抗原蛋白的试验。在第一个例子中,HBsAg基因被注入烟草植物细胞,这些细胞产生抗原具有免疫原性。*E. coli*.耐热的肠毒素被工程引入土豆,可在每个土豆中积累到1mg。Norwalk病毒的衣壳抗原在相似处理后,用5g样本喂给小鼠,将产生血清型和分泌型抗体。当前,正致力于香蕉的基因工程学。长远的希望是多亚基疫苗、包括口服佐剂、可食、便宜,从而能被第三世界国家所接受。

佐剂和黏膜免疫原则

在单纯蛋白质的致免疫能力上存在着让人惊讶的差异。有些如外源血清蛋白在单纯、溶解状态下只有非常少的免疫原性。但是高度提纯的细菌鞭毛蛋白,不需任何佐剂地注射后,其致免疫的数量级是皮克级[43]。对这种矛盾的系统研究相对较少。像能活化旁路途径或存在天然中和抗体的因素,可能通过C3或Fc受体介导吞噬起到一定作用。在APC存在大量清除受体,可帮助摄入附着其上的分子和颗粒。"外源化的程度"(即不被自我耐受的表位多样性)同样发挥着作用。不管细节是怎样的,抗原必须同APC联系起来才能发挥致免疫作用。给药的途径是一个决定性因素,以可溶的、分离的抗原静脉注射将导致免疫耐受,而皮下注射允许与APC发挥充分地作用而引起免疫。早在1926年,Glenny等人注意到明矾沉淀白喉毒素,产生一种微粒抗原能相当大地增强免疫性。

1396

免疫系统主要进化(至少主要)的目的是对付微生物,人们很早就认识到微生物作为免疫原有一些优势。它们的微粒特性和外源程度起了作用,此外,更重要的是,它们还具有那些非特异地增强免疫反应的分子。灭活的结核菌就具有这些优势,当把它与具有吸附缓释作用的矿物油混合后,就产生出一种强的有毒的完全弗氏佐剂[45]。从Freund起,人们就在寻找能细菌来源的增强免疫反应的分子,它必须安全和没有不良反应。即使在Freund时代,人们已认识到佐剂的确切组成能指导免疫反应。完全弗氏佐剂既能促进抗体形成也能促进对它所含抗原的DTH反应,而缺乏分枝杆菌的非完全弗氏佐剂,只能促使抗体的形成。

佐剂是指那些具有增强抗原免疫反应的物质和配方。有相当数量的佐剂被允许用于动物身上,而铝盐是当前惟一允许用于人的佐剂,其仅被注册为每种特定疫苗组成的一部分。为什么是这样呢?有两个主要原因。首先,去除毒性后仍保持免疫原性非常困难。其次,该研究的领域有些混乱,没有像分子或细胞免疫一样的学术热情支持,缺乏在研究成果上发现的进步机制。总的来说,每个有兴趣于此领域的商业公司都走着自己的路,集团间少有合作。正是这些原因导致疫苗学向前发展缓慢。

表42.2 一些促进抗原免疫原性的因素

抗原微粒化
聚合物与抗原聚合反应
乳化和佐剂配方
抗原的微型包囊
细菌和细菌产物
其他化学佐剂
细胞因子
靶向APC的物质

对佐剂进行分类是困难的,因为实际上大部分疫苗使用了几个不同的原理。表42.2示佐剂应用的

几个不同原理。很明显标题间存在重叠。

抗原微粒化

如前所述,明矾的沉淀作用很早就被引入疫苗学,被用在白喉、破伤风、乙肝及其他疫苗中。通过运用氢氧化铝或磷酸铝,抗原被结合到一个不溶的、凝胶样沉淀剂上,或者通过相互电作用形成凝胶。组成粒子直径为 0.1 ~ 1μm。明矾沉淀后的抗原能引起好的抗体形成,包括 IgE,但只引起极少的 DTH 或 $CD8^+$ T 细胞介导的细胞毒作用。差不多同时,低免疫原性蛋白在温热聚合后能增加免疫原性的现象也被记载。现在颗粒形式就更为复杂。

一个非常有用的特性是自组。例如,鞭毛蛋白易于自组成多聚体,这种多聚体拥有鞭毛的多种物理特性。HBsAg 自组成病毒样粒子。这不仅增强它自身的免疫性,同样对其他与其相连的抗原也产生作用。

脂质体、病毒样体和免疫刺激复合物(immunostaining complexes, ISCOM)是另一种微粒体作为佐剂的例子。我们将从 ISCOM 开始描述,因为当前一个主要的努力是使其成为一个商业使用的概念。

ISCOM 包含一些亚微米粒子,它们是在用皂素处理病毒制剂时形成的。这样 ISCOM 事实上由胆固醇、皂素、磷脂和病毒衣壳蛋白所组成。Morein 研究组[46]发现 ISCOM 呈笼型结构,其他蛋白可与之交联,从而使其成为一种通用佐剂。在缺乏病毒蛋白的参与下,ISCOM 形成一种中空的、球形的、带负电的、平均大小 40nm 的粒子。这些 ISCOM 或 ISCOM 基质微粒可被用作一种载体,甚至用于多肽疫苗[47]。皂素是使得 ISCOM 成功的重要因素,它组成了这种复合物重量的 60% ~ 70%。皂素是植物提取物,从南美皂树(*Quillaia saponaria*)提出的皂素,在非特异性地刺激免疫反应上非常有效[48]。一种半纯成分 Quil A 已被主要地用于 ISCOM。但是 Quil A 进一步纯化可至少分为 22 种成分,其中一种,QS21 是作用最强的[49]。胆固醇在 ISCOM 中也具有同等的重要性,它是惟一的与皂素反应的脂类,从而产生洞穴样结构,少量的磷酸如磷酯酰胆碱或磷脂酰乙醇胺对 ISCOM 的生成也是同样必不可少的。连在 ISCOM 中的抗原主要是那些具有疏水跨膜区的抗原。这些两极性分子在皂化剂去除后将融入脂质—皂素结构。非两极性分子(卵白蛋白、多肽)可以用酸处理后实现与 ISCOM 的连接,但这只是交联而不是插入该结构。大量关于怎样实现真正的交联试验正在进行中[48]。但尚未设计出让人满意方法,保证亲水性蛋白高水平的插入。

ISCOM 不仅促进抗体形成,也有利于 DTH 和 CTL 应答。和脂质体一样,一些 ISCOM 直接进入 APC,而不经过形成内吞途径。因此它们可获得 I 类分子限制的抗原呈递。因为免疫力中这个分支的有效性,ISCOM 已在多种实验动物模型中发挥作用,包括抗病毒疫苗、抗细菌疫苗及抗寄生虫疫苗。已有一种兽用的以 ISCOM 为基础的疫苗用于马流感,澳大利亚 CSL 已开始一种 ISCOM-人流感疫苗的一期临床工作。

脂质体含有 ISCOM 的部分特性。Alving 小组发现与霍乱、疟疾抗原一起使用脂质体,可获得了良好的佐剂效果。他们在猕猴 SIV 的试验中使用衣壳蛋白肽和脂质体也获得相当有希望的结果[50]。这种脂质体包含二肉豆蔻酰磷酯酰胆碱、二肉豆蔻酰磷酯酰甘油、胆固醇和单磷脂酰 A。在一些实验中,脂质体是经明矾吸收的。脂质体对 DT、破伤风和各种肝炎疫苗同样起佐剂作用[51,52]。脂质体可为各种大小的粒子,从直径约 20nm 到超过 10μm。通常脂质体最适于与其他一些佐剂组合。

1397

病毒样体是一种病毒来源的跨膜蛋白的聚合体 (如流感病毒的红细胞凝集素),而蛋白酶体(proteosome)是一个细菌膜蛋白的类似聚合体。它们可形成 60 ~ 100nm 囊泡或膜囊泡碎片,周围的免疫原可以结合到这些结构,除非加入一种适当的促进剂,它们不能诱导细胞介导的免疫反应。微型包裹体代表的一种特有的颗粒,将在下面讨论。

聚合物与抗原聚合反应

有其他方法可影响抗原的聚合作用,如与聚合物结合。非离子共聚合物通常作为乳化佐剂的添加物,如能被抗原结合的聚丙烯和聚氧乙烯的聚合物。它们已经被 Syntex 和 Rili 化学公司用作组成复杂佐剂配方的成分。这些配方可诱导产生良好的 Th1 反应。

甘露糖聚合物(如甘露聚糖)或β1-3葡萄糖聚合物(如葡聚糖)也以相同的方使用[53,54]。通过在一种α氨基已酸臂将多肽结合到甘露糖上是可能的,并且由此可以产生一个良好的抗体反应[55]。甘露糖也能增强脂多糖(LPS)的佐剂效应[56]。部分作用可能是由于刺激了有甘露糖结合受体的巨噬细胞。Mckenzie研究组的系列研究证实,抗原结合甘露糖的途径可能非常重要,以前曾经显示蛋白质与甘露糖结合可以激发良好的细胞介导免疫应答[57]。Apostoulopoulos等人[58]通过对小鼠的研究,声称如果抗原与甘露糖的交联是在氧化条件下进行,连接的聚合产物可选择性地激活Th1细胞反应,伴随有良好的DTH与显著的CTL产生,并且T细胞分泌大量干扰素(IFN-γ),但是低的抗体效价。当反应在还原条件下进行,结果相反,该聚合物将选择性激活Th2反应,伴随有IL-4及良好的IgG1抗体产生,但是低的CTL产生。显然这种前者的制备方案作用一种肿瘤疫菌将被证实非常有优势,研究组目前正采用Mul-1作为一个肿瘤相关抗原来进行测试。

Jackson研究组报道了一种通用的方法用于多肽聚合物的聚合,它将产生高抗原性的制剂[59]。基本的原理就是在固相合成多肽,N端残基丙烯化,切割后,得到的多肽通过自由基诱导的聚合作用下聚合。使用的多肽可以是相同的,也可不同。多个B和T细胞抗原决定簇可以被结合在最终的结构中。这种方法已经得到多种来源肽的验证,这些肽包括流感病毒、疟原虫、破伤风毒素和各种模式蛋白。

三棕榈酰-S-甘油胱氨酸(Pam3Cys)来源于 *E. coli*.的脂蛋白,具有很强的佐剂效应。它能与多肽共价结合,形成一种"内在"佐剂[60]。Pam3Cys也被Tam研究小组使用,他们提出多抗原肽(MAP)的概念,MAP是以赖氨酸为核心的分支寡聚物。在多肽聚合中还有许多变化。由于更多的疾病保护性T细胞表位被鉴定,这个活跃领域将会特别重要。

促进抗原的缓慢释放

储蓄抗原是Freund佐剂有效的一个重要理由。因此乳剂和乳化制剂已经成为佐剂研究的中心。对流感疫苗不完全Freund佐剂的广泛临床试验很早就开始了,但仍未达成共识[62]。这些油包水乳剂由表面活性剂(如:在矿物油或鲨烯等其他油连续相的甘露醇单油酸盐)稳定的微滴状的水组成,显然水溶性的免疫刺激剂能与这些水滴相混合。另一种方法是利用水包油乳剂。其中Chiroh的MF59制剂[63]已经开展了广泛的工作。在这种佐剂中,油滴由能代谢的鲨烯组成,直径为150nm,乳化剂是仔细选择的Tween 80和Span 85混合物和化学免疫调节剂,如胞壁酰二肽衍生物、胞壁酰三肽-磷脂酰乙醇胺(MTP-PE),这些免疫调节物可根据需要加入或者不加[64]。已同时存在小量的聚三梨酯80和脱水山梨醇三油酸酯。这些抗原不会稳固地与油滴结合,可是佐剂能以某种方式显著帮助抗原在淋巴结聚集。MF59很好促进抗体形成和刺激Th1细胞。它有时可以诱导CTL应答。由Chiron发起,MF59现在已被用于8000例HIV、HSV、CMV和HBV疫苗的临床应用。在没有MTP-PE存在时,它令人吃惊的安全和极小反应原性,加入MTP-PE将增加其反应原性,但即使在HIV血清阳性患者的治疗性疫苗试验中似乎也未构成问题。

SAF-1是Syntex公司的水包油佐剂[65],由Pluronic L121、鲨烯、Tween80组成,加入了适当浓度的免疫调节剂。SAF乳剂和抗原溶液被温和的混匀2~3min。这种佐剂在至少11个物种,成功诱导了至少10种抗原的抗体。

抗原的微型包囊

这个想法结合了几个合理的佐剂原理。能生物降解的微胶囊是一种颗粒。它们能包裹免疫刺激分子和抗原,它们延长抗原的吸收,作为一个长期贮存地。最佳之处在于它提供了注射后不同化学成分产生的微粒在不同时间脉冲样释放不同抗原的希望。影响释放时间的参数包括微粒大小和聚合物的成分。一种理想的制剂是能模拟一个初次剂量与两次加强免疫剂量的微粒混合物。

几个实验室分享了通过包裹控制释放疫苗的荣誉。生物降解的微胶囊包裹抗原的想法由Chang提出,由Langer付诸实践。当前最流行的材料是多丙交酯-co-乙交酯聚合物(PLG),其首先被O'Hagan等人[68]和Eldridge等人[69]使用。这个材料是一个令人愉快的选择,因为PLG作为可生物降解的缝合材料已应用多年。

在此背景下，它显示了自身的安全性和非反应原性，PLG 可通过水解降解。降解所需时间决定于链的长度和丙交脂、乙交酯在聚合物中的比例。WHO 已经发起关于 PLG 的大量的工作，希望能提供一种"一次注射"的形式，第一个例子是将这首先用于解决发展中国家新生儿破伤风的问题。因为在育龄妇女的婴儿免疫率很低，WHO 计划着眼于采用破伤风毒素(TT)免疫妊娠妇女，由此新生儿可通过从胎盘透过的抗体获得保护。然而，困难在于说服这些妇女做 3 次可能需花上数小时的前往她们当地的保健中心。一旦完善用于该目的的控制性释放方法，它将可以用在像乙肝病毒或 Hib 的其他疫苗上。

在这些努力过程中遇到的许多挫折的问题正被一个个的逐渐解决[71~73]。其中最重要的一个是在制造过程中和在体内阶段，微粒中抗原的稳定性问题。此外虽然在 PLG 中丙交脂与乙交酯的比例影响降解率，但实践发现，两种不同组成胶囊的混合物并不导致抗原释放的高峰，而是在一段时期的持续释放。这样似乎产生了一个令人满意的抗体反应[74,75]。现在清楚了，在临床前研究中，一次注射微胶囊包裹的抗原能导致比注射两次明矾吸附抗原更高、更持久的抗体形成。

澳大利亚 CSL 的 COX 研究小组采用单剂量，两种实验性流感成分的疫苗开展了一次注射方法的试验[76]。有一种是立即释放成分，它包括通过喷雾干燥的抗原，有或没有佐剂，以及一种稳定剂(如海藻糖)。而延迟释放成分由包裹在 PLG 基质中的抗原组成，它的制备方法是：流感病毒 A/PR8 病毒的水溶液，ISCOM 和海藻糖在氯化次甲基中乳化进入 PLG 溶液，产生的油包水乳剂也喷雾干燥。使用前两种成分再混合，悬浮于 0.1% Tween 80 缓冲液中。如此的配方显著优于液体准备的单次注射，事实上其效率类似于分开的两次注射。

氰茎丙烯酸酯是另一种形式的生物降解聚合物，例如，poly(buty1-2-ayaneacrylate)已被用作口服免疫佐剂[77]。

PLG 和其他微粒广泛用于疫苗黏膜给药的研究。非常小的微粒(纳米颗粒)可能更为合适。通过包被肠溶性聚合物可以克服胃内消化，包裹能增加肠道吸收的物质也是需要的。经呼吸道药(如经管腔内免疫或喷雾药)对呼吸系统原体是一种很好的方法。直肠、阴道给药也是可能的。在黏膜免疫系统的各种组分间存在交叉作用，即使是实践最多的口服给药，所以这需要在初期实验上更为充分探索研究。

生物降解微粒可以诱导 T 细胞免疫反应，包括 $CD8^+$ CTL 及抗体的形成。例如，在 PLG 微粒中的 HIV 包被蛋白在小鼠诱导 HIV 特异性 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞反应[78]。同样使用结核分枝杆菌抗原亚单位的微粒即使不和不完全弗氏佐剂共同作用，也可促进 Th1 型 $CD4^+$ T 细胞反应[79]。

细菌和细菌产物

在实验性免疫学中，除灭活的结核分枝杆菌外的各种细菌均曾被用作佐剂。很清楚如果一种灭活的细菌制品本身具有高度抗原性，这种粉状佐剂可促进和它一起注射抗原的免疫反应。同时也会对这个反应起到指导作用。更活的百日咳杆菌有机体作为纯化的蛋白质抗原是一个强的 Th2 抗体形成促进剂，小棒状杆菌是一个更好的 Th1 促进剂。而对于寄生虫，如果希望引出强烈的 I gE 反应，巴西日本圆线虫已得到长期的应用。

回顾大量关于提取细菌产物，寻找免疫增强剂的文献超出了本章的范围。多肽和脂质成分二者都很重要。从 Lederer 研究小组早期的工作[80]，*N*-acetyl-muramyl-*L*-analyl-*D*-异谷酰胺或胞壁酰二肽(MDP)已被用作细胞介导的免疫反应和抗体诱导促进剂。Chedid 等人[81]建议采用低致热原性、低毒性、合成的 MDP(莫拉丁酯)，然而 Allison 和 Bycns 更喜欢用苏氨酰基 MDP[82]，如前面所述 Chian 研究组，则采用 MTP-PE。脂质佐剂是革兰氏阴性菌(如大肠杆菌，沙门氏菌和假单胞菌)内毒素的成分之一。这些内毒素分子是强有力的佐剂，但毒性太大。Lipid A 结构已经化学改造，而成为一种低毒但保留了激活能力的佐剂。这一系列研究中单磷脂酰 Lipid A (MPL)是一种最佳产物[83]。肠毒素作为佐剂将在下面予以讨论。

其他化学佐剂

许多化学药品时不时被用作免疫增强剂[84]，它们包括多聚核甘酸 poly-I:C 和 poly-A:U。维生素 D3、硫

化葡聚糖、胰岛素、菊粉、DDA (dimethyl dioctadecyl ammonium bromide)、阿夫立定(avridine)与甘露糖相似的多糖聚合物、*trehalose dimycolate*。以上也仅列举了一小部分。所有这些要真正走向市场,将极大的依赖于制药公司。生物工程公司正推出2个非常有意思的新化学佐剂,它们是 *polyphosphazines*(最初作为低释放促进剂)和一种利什曼原虫蛋白-LeIF。

细胞因子

细胞因子对免疫反应的影响需要从三个水平考虑。第一,细胞因子可以刺激激活 APCs,促使它们分化;第二,细胞因子可以帮助淋巴细胞的活化、增殖;第三,细胞因子可以调节免疫反应,例如,影响抗原是否引起更多 Th1 或 Th2 型 $CD4^+$ T 细胞反应或影响不同型抗体的形成。尽管对该领域有着巨大的兴趣,现仍没有进行大量的临床探索。当然,这些细胞因子也是昂贵且能具有相当毒性的。在载体疫苗中使用细胞因子基因不失为另一种可选方法。

1399

IL-2 是第一个研究其佐剂潜能的细胞因子。在一种疫苗模型中,证实 IL-2 可以增强猴[85]和先天无胸腺裸鼠的免疫反应[26],但对有胸腺小鼠不起作用。一些有限的临床试验提示,IL-2 可以增强人对流感病毒的抗体反应。在麻风结节病注射 IL-2 也有一定的作用,使其回复到接近瘤型麻风的状态。但同时 IL-2 大剂量时具有很大的毒性。

IL-4 是一个非常有意思的细胞因子,在免疫系统中有多种作用。如果在一个 T 细胞反应中 IL-4 很早出现,将会转向 Th2 反应方向,使之产生更多 IL-4,形成一个正反馈[86,87],同时,Th1 T 细胞的生长受抑(如 LFN-γ 产生显著受抑)。早期大量 IL-4 的来源尚有争论,其中 $CD4^+$ T 细胞,$NKI-1^+$、T 细胞,嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞均有可能。IL-10 具有一定程度的相似作用。相反 IL-12 具有与之相对的效应。细菌可以直接感染巨噬细胞,导致产生 IL-12。细菌产物也可以刺激巨噬细胞产生 IL-12。如果不存在 IL-4,或被 IL-4 抗体中和,IL-12 可以促使 Th1 型 T 细胞发展,导致高水平的 IFN-γ 和细胞介导免疫。因而迟至此时 Th2 细胞分泌的 IL-4和 IL-12(由巨噬细胞和 DCs 产生)的相对水平决定免疫反应的 Th2/Th1 平衡。

IL-4 对 B 细胞有着重要影响,这包括参与从静息状态的早期活化,和从 IgM 占主要地位到合成 IgG1 和 IgE 亚型的类型转换。一大类其他细胞因子可以促使 B 细胞向不同的方向发展。如转化生长因子 β(TGF-β)与 IgA 方向转变有关[91],IFN-γ 则与 IgG2a 方向的转变有关。

IL-6 是浆细胞终末分化、抗体形成的强有力刺激因子。IL-6 可以刺激 IL-4 的产生,可能还在引起 Th2 反应的早期 IL4 大量释放中起着一定作用。由于 IL-6 自身毒性太大,而几乎没有考虑将其作为一种佐剂。

IL10 因为可以减轻 Th1 型炎症反应而成为一种具有治疗潜能的细胞因子。它也可以下调 TNF-α 和 IL1 的产生。现在 IL-10 关注的焦点是其治疗自身免疫疾病的可能性,而未考虑将其作为一种佐剂。

粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和细胞相关的 FLT-3 配体是 DC 的刺激物,它们佐剂潜能将在肿瘤疫苗的章节予以讨论。总而言之 FLT-3 配基与蛋白质抗原同时给予时,可显著增强 T 细胞反应和血浆抗体产生(B. Pulendran, 私人联系)。

Schijns 等人的工作就是一个关于与疫苗一起给药时外源细胞因子效应的例子[92]。在给予灭活狂犬病毒疫苗的小鼠,他们研究了 TNF-α、IL1-α、IL-2 和 IFN-γ 对免疫反应的影响效果。虽然所有这些细胞因子增加了病毒特异性的 IgG 反应,但是 TNF-α 和 IL-1α 并不增加中和病毒的抗体,仅仅最低限度地引起针对病毒感染的防御,但是 IL-2 和 IFN-γ 增加中和的抗体水平,允许更低水平的抗原诱导保护小鼠。联合应用 IFN-γ 和 IL-2 具有协同作用。这些特殊的研究者对细胞因子在预防接种中的作用持乐观态度。

显然,细胞因子作为辅剂的研究还处在一个非常早的探索阶段。在实践应用中,似乎现行佐剂刺激某些细胞因子或细胞因子群形成比细胞因子自身更为实用。不过细胞因子基因将会在更复杂的载体或 DNA 疫苗中找到一席之地。

抗原的靶向分子

上面讨论的许多策略依赖于将抗原有效呈递给 APC。APC 的 C3 和 Fc 受体是关键因素。Fearon 研究组

的一个实验证明了这一点。通过重组 DNA 技术准备的鸡蛋溶菌酶(HEL)或与 1、2 或 3 个拷贝 C3d 融合的 HEL,然后均免疫小鼠。众所周知,C3d 与 CR2 受体结合。不加任何佐剂,将不同剂量的 HEL 和 3 种抗原注入小鼠体内,发现 HEL-C3d1 抑制 T 细胞依赖的 IgG1 抗体反应,但不持久,所以这种构建在研究中被删去。不低于 500pmolHEL 能诱导抗体的形成,但是 5fmol 的 HEL-C3d3 和 500fmol 的 HEL-C3d2 诱导出一个初次反应。以 ELISA 滴度表示,HEL-C3d2 和 HEL-C3d3 的免疫原性较 HEL 分别强 1000 倍和 10 000 倍。在这一方面,与 C3d 结合较与弗氏完全佐剂结合的作用强 100 倍。当小鼠追加在不完全弗氏佐剂中 50pmol 的 HEL 时,这些相对的差异仍大至存在。因此,靶向 APCs(包括滤泡状树突细胞)在增加初次抗体反应和免疫记忆有着同样的作用。在现实疫苗中靶向的可行性研究为早期临床前应用探索提供了保证。

在下面探讨的黏膜模型中,这些靶向分子与抗原共价结合的方法得到确认。Sun 等人[94]将极少量的抗原与一个已知的强有力的黏膜佐剂—CT 的亚单位(CTB)共价连接。单剂量口服给予交联物,通过测定 DTH 诱导和抗体的形成,显示该结合物显著的抑制未免疫小鼠的系统免疫反应能力。这种制剂的作用较未结合抗原高达 500 倍。甚至已进行过免疫的小鼠通过喂饲 CTB 抗原也能达到耐受。该项技术成果不仅可用于纯化的蛋白质,而且可用于自身抗原[95]、异型抗原和半抗原。这样它将可能在自身免疫性疾病,移植排异反应和变态反应中使用。

黏膜表面佐剂

胃肠道、呼吸道、泌尿生殖道的黏膜总表面积估计有 400 m^2[296],黏膜免疫系统的总淋巴细胞数量远大于淋巴和脾。黏膜免疫系统包括淋巴组织组成的器官(如扁桃体、腺样体、派尔集合淋巴结和阑尾)和单个淋巴滤泡。这些地方包括生发中心结构,含有 Mϕ 和 DC,摄取抗原,能产生 T 和 B 细胞应答。在形成的抗体中有很高比例的 IgA,在上皮和固有层具有广泛淋巴细胞与浆细胞的浸润。可认为它们代表效应细胞,在这些场所没有免疫诱导作用。

1400

在黏膜免疫中,2 种抗原捕获细胞非常重要。它们是上皮内的树突细胞和 M 细胞。在复层和假复层上皮,这些 DC 充当与皮肤朗格汉斯细胞有相同的作用,并延伸到上皮表面。例如,在气管上皮,每平方毫米有超过 700 个这样的细胞,形成一个几乎相互接触的网络[97]。就像朗格汉斯细胞那样,这些 DC 将抗原带到淋巴结,诱发免疫反应[98]。M 细胞是黏膜免疫系统所独有的,它们存在于像肠道集合淋巴结这样的组织器官表面,它们的工作就是从黏膜摄取抗原,将之通过上皮特殊通道运送到黏膜淋巴组织[99]。M 细胞活化摄取大分子抗原和颗粒抗原,如细菌[100],实质上充当了一个将抗原运送到淋巴结 APC 细胞的通道。M 细胞膜包含有 CT 结合的糖脂 GM1 和各种其他具有选择性结合活性的糖链结构。细菌和病毒也能利用 M 细胞的这种能力将它们高效地带入黏膜,造成黏膜的感染。这可能也包括性传播的 HIV 病毒。

黏膜免疫系统的淋巴细胞转运模式不同于传统的免疫系统[102]。黏膜相关细胞有明显的趋向回到黏膜组织,但不一定回到相同的黏膜。因此可能通过免疫某个黏膜表面而保护另一个不相关部位的黏膜,尽管这些系统还是存在一定的区域化。

通过黏膜表面刺激免疫反应,导致局部产生 IgA 和一系统的 B 和 T 细胞反应仍存在以下困难:绝大多数非复制抗原仅在大剂量或多次给予时才产生免疫反应,而且这些反应持续时间短。和系统感染相比,即使黏膜的自然感染导致的免疫反应时间也相对较短。这些使得黏膜佐剂的研究特别重要。

黏膜佐剂包括许多可增强黏膜淋巴组织对抗原摄取的物质和措施。例如,细菌能使大量的 DC 聚集在气管上皮,这些 DC 对诱导免疫反应十分关键[104]。同样地,病毒也可将 DC 带到上皮,并能刺激其随后向淋巴结移行[105]。新生儿呼吸道不成熟 DC 对这类信号的低反应性,可能增加呼吸道感染的易感性[106]。在更多成人体内,微生物固有的免疫原性建议:工程表达抗原的细菌或病毒可能可以提供足够的佐剂效应,即使免疫反应的持续期短。

我们前面已经简短介绍第二个重要的策略。使用颗粒抗原,如脂质体和可生物降解的 PLG 微球。这方面的一些变化包括吸附或连接抗原的物质,如 polyphosphazene、多聚藻酸盐或其他赋形剂。

第三种策略是使用具有免疫刺激因子特性的植物凝集素样分子。CT 是在发展中最为有效的黏膜佐剂[107,108]。E. coli. 的 LT 也具有这种作用[109]。破伤风毒素的 C 片段在某种程度上有相同的作用[110]。不管是将抗原与佐剂交联在一起，还是简单地将二者同时给药均有效。如前所示，化学交联能增强其作用，也可以通过基因工程融合而成。

CTB 作为一种黏膜辅剂被强烈推荐，但在某些例子中，这个特性可能和混有少量的 CT 有关[94]。此外 CTB 也可作为一种有效的耐受原。这是否有点自相矛盾？实际不是这样，因为口服给予 CTB 加抗原诱导了强大的黏膜免疫反应，但是同时存在一个系统免疫耐受。在肠道内有许多的"Th0"细胞，产生 IFN-γ 和 IL-4。无论何种机制，同时口服灭活完整霍乱杆菌疫苗和重组 CTB 的保护效果是十分确切的[112]。一个可能是 CTB 和 CT 之间在免疫诱导方面确实存在协同效应[113]。

显然，CT 和 LT 的毒性限制它们作为佐剂的应用。Rappuoli 研究组发展了一种巧妙的方法，采用基因改造方法改造 CT 和 LT，得到的衍生物仍能聚合成完整毒素，但却极大的减少了其毒性。这些突变体不仅可当作黏膜免疫原，而且可作为与抗原同时给药的佐剂。通过相同的单一氨基酸替代突变，获得了 CT 和 LT 的衍生物，称之为 CTK63 和 LTK63。这个替代突变接近 NAD 结合沟。有趣的是，虽然两者诱导血浆抗体和促进小鼠鼻腔和肺灌洗液中的 IgA 形成，但 LTK63 作用较 CTK63 更好，仅稍微弱于 CT。产生这些不同之处的原因目前还不清楚。实际上关于毒素介导的免疫反应机制的了解还很减少。同时给予的抗原显然很重要；对于注射抗原存在一个免疫原性的分级[114]。佐剂和 M 细胞结合的能力明显也是必需的。

读者现在可能会认为免疫佐剂领域过于丰富，很难总结、归纳出规律。似乎经验性的研究可能将会继续在一段时间内占据优势。这可能比一个阳性的结论更好。我们前面所讨论的联合原理看来是今后的道路。基于恶性疟环孢子（*P. falciparum circumsporozoite*，CSP）的疟疾疫苗已有许多令人失望的临床研究。仅在结合 3 个不同原理的免疫佐剂联合使用时，疫苗保护了 7 个被蚊子叮咬志愿者中的 6 个。研究选择的是融合在 HBsAg 的 CSP 第 207 到 395 氨基酸的抗原。构建此抗原对应的 DNA 分子，将其和编码 HBsAg 的 DNA 同时转染酵母细胞，导致具有 CSP 特异性免疫原性的自聚合的病毒体样颗粒。第二种策略是将其形成水包油乳剂，第三是加入 2 个强有力的免疫刺激剂：MPL 和 Qs21。所有包括的组分都是保护性免疫必不可少的。在经过超过 10 年的挫折后取得的突破性进展，为这个非常重要的领域注入了新的希望。

细菌疫苗

下面 3 节将要讨论一些特定的疫苗，这并不意味着是主要疫苗的广泛列表。相反这样选择只是揭示最近一些研究成果和将来所面临的挑战。

白喉和无细胞百日咳

1401

历史上，白喉-百日咳-破伤风三联疫苗（DPT）已被广泛接受，因为可能有 2% 的人群是严重的带菌者。考虑到它在第三世界的重要性和已经存在的与它配套的卫生系统，DPT 已被看作是添加其他疫苗的平台，如 HBV、Hib 和可注射的脊髓灰质炎疫苗。不同国家 DPT 的初次免疫安排遵循不同的时间表，例如，有的在 2、3、4 个月的婴儿，有的在 2、4、6 个月，而发展中国家则是在 6、10、14 周大时。现普遍认同在 6 个月以内给予 3 个剂量。在加强免疫的给药时间不同的国家也有不同（如 18 个月或在 3～5 岁时只给予 DT）。在学龄阶段，一般建议再给予一次 TT 加低剂量的 DT，实际上，如果一个人存在一个很深的伤口或是去一个流行区或疫区还需要一次额外的追加给药。对于破伤风，5 次给药被认为能获得终生的免疫，但在以后的章节中我们将会看到，这种做法并不正确。从前苏联国家最近的一次白喉大流行中有许多成人患者，这些数据显示，最初的免疫是不够的和（或）免疫力随时间而减弱。在英国，20～29 岁献血者中的 25% 和 50～59 岁中的 53% 被发现体内白喉毒素的抗体是不够的。对成人的再次免疫相对地缺乏重视。但是对于老年人进行更多主动免疫的一项运动已经开始。

我们已经提到通过基因改造去除白喉毒素和破伤风毒素的毒性是可能的，但是却几乎没有什么压力促使对传统的有一定毒性的疫苗进行改造。然而百日咳情况并非如此，它有可能成为反应原和导致更严重不良反应的名声，就像是在讨论疫苗的不良反应章节中一样。灭活百日咳杆菌菌体具有刺激性，在很大比重的新生儿可造成局部反应和发热。

由于这些原因，存在不使用灭活细菌，而是细菌的一种纯化亚单位疫苗的压力。事实上，无细胞百日咳疫苗从 1981 年始已在日本常规应用[116]。在美国和欧洲复苏的兴趣导致试验了不少于 13 种的无细胞百日咳疫苗[117]。其关键抗原是百日咳毒素(PT)[118]，其他重要的保护性抗原是丝状红血球凝集素[119]和百日咳杆菌黏附素。在意大利进行了一个典型广泛的无细胞百日咳疫苗临床研究，其免疫率较低(40%)。在这个试验中来自 Smith、Kline Beecham 和 Chiron Biocine 的 2 种无细胞疫苗与 Connaught 实验室的全细胞疫苗进行了比较。这项双盲、随机对照的研究包括了 1992～1993 年这 1 年间登记的 14751 个新生儿[120]。有 62 个公众医疗中心参与，平均随纺了 17 组。百日咳感染通过细菌培养和定量血清学检测确定。不幸的是，Connaught 疫苗的作用很不典型，仅有 36%的接种儿获得保护。2 个无细胞疫苗的作用相当，保护率为 84%。2 种无细胞疫苗的局部和系统不良反应显著减少，和无百日咳成分的 DT 疫苗相似。

两种疫苗主要的不同是：在 Smith 和 kline Beecham 的疫苗，PT 通过化学处理去除毒性，而在 Chiron Biocine 疫苗中包含的是突变的、无毒性的 PT 形式，它是通过基因工程去除毒性的，即在 PT 酶活性部位的 2 个点突变——第 9 个精氨酸变为赖氨酸，第 12 位的谷氨酸变为甘氨酸。这种疫苗可以诱导产生比化学性灭活的 PT 疫苗更高的抗 PT 反应。继续双盲观察数年，显示 Chinn Biocine 组更低的百日咳发病例数[121]。Rappuoli 的简要综述[122]给出将这种新疫苗引入市场曾完成的工作。疫苗的项目开始于 1984 年；1985 年克隆和测序 PT 基因；鉴定去除毒性所需氨基酸改造发生在 1987 年；1988 年克隆出丝状红血球凝集素；1989 年构建产生无毒性 PT 的百日咳 B 菌株；1989 年进行Ⅰ期临床实验，1990 年进行Ⅱ期临床实验；1992 年开始Ⅲ期临床实验，1995 年结束，1996 年取得世界性的产品许可证并在全世界范围内应用。引进一个新的、改进的疫苗的过程是坚持不懈的勇者的事业！

Klein 对 9 个不同研究中的 6 个不同无细胞疫苗进行分析[123]。所有这些无细胞疫苗较全细胞疫苗在保护作用方面统计学上并没有显著差异。在这些研究中有 3 个研究显示无细胞疫苗的保护效应较全细胞疫苗低 10%(84%对 93%，89%对 98%，85%对 96%)，但是这些差异在统计学上并无意义。可预期这些疫苗中的几个很快的获得许可证，可在美国得到广泛应用。其中的一些已经在欧洲和其他一些地方开始供应。

此时，不同的公司在研制包含 2～5 种无细胞成分的疫苗，其中之一是仍未提及的纤毛抗原 2 和 3。现在来说，包含更多抗原比 2 种抗原的保护作用高的结论还不太早。另一个问题是这些新疫苗的保护作用能持续多久还不清楚。现今还没有什么理由强迫发展中国家改用这些昂贵的疫苗。

腹泻性疾病疫苗：伤寒、霍乱、志贺氏菌

研究更好的口服腹泻性疾病活疫苗已有很长时间，但现在主要成功即将来临。主要的挑战将是需要一个可以接受的价格，将这些有效的疫苗提供给最需要它们的人。

伤寒疫苗

伤寒热每年导致 60 万人死亡。一个真正有效的伤寒疫苗将成为人们保持健康的强有力的工具。减毒的伤寒杆菌(*S. typhi*)可用作一种活的口服疫苗。现在，通过突变从野生型伤寒杆菌诱生的 T21a 菌株已在大部分国家获准登记。这种疫苗要求给 3～4 次药。在许多市场，其正与一种单剂量、胃肠外给药的疫苗竞争，这种疫苗包含来源这种微生物包膜的 Vi 多糖抗原。在南非的一项研究中，显示 Vi 抗原的免疫原性和保护作用在给药后可存在 3 年[125]。疫苗的效力估计在 55%(95%可信范围为：30%～70%)，伴随持续的显著升高的抗体水平。如果这种结果没有低估，更强免疫原性且更能耐受的疫苗正在研制中。早在 1981 年，Hoiseth 和 Stoker[126]已证实芳香剂依赖的沙门氏菌，无毒然而是有效的免疫原如鼠伤寒沙门氏菌(*S.*

1402 *typhimurium*)。精确的缺失突变是可以操控的，例如，在 aroC 和 aroD 基因的缺失致使细菌的营养依赖于底物——氨基苯甲酸和 2,3-二羟基苯甲酸盐，在人体组织这 2 种成分的浓度很低。这种突变和其他类似的处理已成为广泛研究的课题，这不仅是为了创造一种疫苗，而且可作为其他抗原基因的潜在性载体。

CVD908 是伤寒杆菌菌株的一个减毒株，曾是早期临床研究的对象[127]。给予 5×10^7 个细菌的剂量后，可使血浆中抗 O 抗体的效价显著升高，同时可诱导肠道 IgA 形成[128]。然而它可诱导一个无症状的，有时限的疫苗血症。来源 Stocker A 修饰菌株的 CVD908 *htrA* 和其分享许多特征。CVD908 *htrA* 是 Chatfield 等人在鼠伤寒沙门氏菌小鼠模型的基础上通过缺失突变获得的，其缺乏特别的丝氨酸蛋白酶[129]。这个减毒株不会造成疫苗血症，但具有相同的免疫原性，因此作为伤寒疫苗的候选者特别有前途。

CVD908 和 CVD908 htrA 两者都能用作其他抗原的活载体。例如，产肠毒素的大肠杆菌的重要抗原已被成功地插入[110]，其他获得成功的还包括运送破伤风、白喉、血吸虫和疟原虫抗原。此外，口服 CVD908 可以诱导包括 $CD8^+$ CTL 的细胞免疫反应[130]。这个菌株将被证实为一种可口服，具有多用途的载体。

霍乱疫苗

市场上还没有令人满意的霍乱疫苗。然而霍乱疫苗的研究已经取得很大进步。不需花多大代价，一个合理的、令人满意的答案即将出现。例如，Trach[131] 等报道了一种口服的、灭活的全细胞霍乱弧菌疫苗，是 Inaba 和 Ogawa 菌株 2 个剂量的混合物，已在越南 134 453 个人中试用。这种疫苗在河内附近生产，非常便宜(10 美分/剂)。在免疫后接近 8 个月的一次流行中，证实了它的保护作用达 66%。尽管研究方案中存在一些非公认的因素，但这个结果还是有希望的。

对由 CTB 和全细胞混合组成的瑞典疫苗的广泛研究工作已经完成。在一项孟加拉的大规模临床研究中，共对 62 285 个儿童和成年女性给药 3 次，进行 5 年的随访，显示该疫苗的有效率为 49%，但有趣的是服用不含 CTB 的全细胞疫苗具有相同的效果[132]。这个结果不同于第一个 6 月的记录，在此期间，复合疫苗作用要更好一些。仅仅在 5 年中的前 3 年保护作用是明显的，而在前 2 年保护作用比第 3 年好。霍乱疫苗 01 型的保护作用在前 6 个月是 85%，复合疫苗前 3 年是 60%。当这项研究刚刚开始，一种不同的霍乱在印度的马德里出现，这种血清型为 0139 型霍乱弧菌迅速在印度、孟加拉和邻近的国家传播，甚至到达马来西亚、泰国和中国。甲醛灭活的 0139 型弧菌被加入到现存的 01 型疫苗中，在大多数志愿者体内诱发了对抗两株细菌的肠道和全身免疫反应[133]。这些结果提示，发展一种二联疫苗是相对简单可行的。

也有一些活的、口服的减毒霍乱疫苗经过了临床试验，CVD103-HgR 是一种活的口服霍乱疫苗菌株，是通过 DNA 重组方法从经典的 Inaba 菌株构建得来，其 CT 的 A 亚单位被删除。在北美志愿者的试验中，显示它是安全的并具有免疫原性[134]。实验性感染表明它具有显著的保护作用[135]。在 1993 年，一项设有安慰剂对照的大规模随机化单次口服疫苗研究工作在雅加达的北部开始。接近 6.7 万个年龄在 2~42 岁间的研究对象被纳入试验。计划监测至少 3 年，结果尚在热切地等待之中。一种减毒的 0139 号口服活疫苗，被称作 CD112，已被制成，它能对野生型 0139 霍乱弧菌的感染起到良好的保护作用[136]。

Pearson 和其同事通过删除整个毒性区构建了一个新系列的口服减毒霍乱疫苗[137]。这种疫苗不仅删除了 CT 基因，而且其他相关的毒性因子也被删除，它们包括编码带闭合毒素(zona occludence toxin, Zot)、辅霍乱肠毒素(auxiliary cholera enterotoxin, Ace)和核心编码菌毛(core-encoded pilus, Cep)的基因。某些促进重组的序列也被删除，以防止菌株恢复 CT 基因。此外，发现运动能力缺陷的变种减少其诱导的机体不良反应。在志愿者的试验中，针对 01 号霍乱弧菌的 Peru15 和针对 0139 号霍乱弧菌的 Bengal15 疫苗显示作为一种单次口服的疫苗有一定前景。

志贺氏菌疫苗

志贺氏菌或细菌性痢疾是世界上导致腹泻性疾病的主要原因之一。每年有数百万的病例发生，而每年有 60~80 万死亡人数与该病有关。最主要的病原是福氏痢疾杆菌、宋内氏痢疾杆菌和志贺氏痢疾杆菌，每

一种又存在不同的血清型。但在每个病例中,确切的血清型才是最重要的(如福氏痢疾杆菌就是 2a 血清型)。这种疾病是一个比霍乱更严重的公众健康问题,因为它的死亡率高达 10%。事实上,痢疾杆菌是一种细胞内寄生虫,它可侵犯结肠和直肠黏膜。侵入 M 细胞和其他 APC 细胞,淋巴集合区可被快速地破坏。一次感染可诱发全身和黏膜的体液免疫反应,而其中这种微生物的内毒素(LPS)非常重要,因为它的抗体可以防御细菌感染[139]。因此,许多寻找有效疫苗的重点放在 LPS O 抗原,最近则致力于发展一种口服减毒活疫苗。在研究所和工业公司,现在至少有 5 种尝试正在进行中。一种宋内氏痢疾杆菌交联疫菌在士兵中作用良好。一种去除毒力的福氏痢疾杆菌变异菌株具有营养缺陷型突变,在志愿者试验中显示特别的前景[140]。这种疫苗一个吸引人的特点是:口服给药只需 10^3 ~ 10^4 个单位就可诱发一个良好的局部免疫反应,以对抗 LPS。另一个有趣的菌株是从志贺氏痢疾杆菌 1 型得来的 SC599,它是通过 3 个删除突变来降低其毒力[141]。

另一个有希望的减毒活菌株是 CVD1203,它来源于野生型福氏痢疾杆菌 2a,同时含有营养缺陷型(*aro* A deletion)和毒性丢失型(*vir* G deletion)删除突变。这种细菌能侵入肠上皮细胞,但是几乎不复制,且不能扩散到邻近细胞,在一个豚鼠模型中,这种疫苗具有免疫原性和保护作用[142]。这个菌株也被用作传送大肠杆菌肠毒素抗原的载体[143]。但是,在人体它诱导的不良反应过于强烈[144]。进一步的突变株 CVD105 已被获得,它引入一个可影响鸟嘌呤核苷酸合成途径的突变。这降低了它的不良反应原性,而在鼠和豚鼠体内仍有良好的免疫原性[145],现在它仍未进入临床研究。将来的挑战是制备一个完美的至少是三联的疫苗。

螺杆菌疫苗

螺杆菌(*Helicobacter pylori*)已被证实是慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌和淋巴瘤的致病因子之一[146,147]。它是一种分布广泛的微生物,但只有 10% 的感染人群发展成为消化性溃疡病。现在还不清楚为什么大部人的感染是无症状的;菌株的不同可能是原因之一。使用抗生素可以消除感染,特别是采用奥美抗唑(一种离子泵抑制剂)、甲硝唑和阿莫西林的三联治疗。这也是一种费力的、昂贵的疗法;疫苗可能代表另一种吸引人的选择,尤其是当抗生素耐药时正在逐步增加。它可被考虑成是人们广泛使用的预防性疫苗,或者是清除已感染人群病原体的治疗性疫苗。

很明显,为进一步获得疫苗的知识,需要一种螺杆菌的动物模型。Lee 等人[148]在猫体内分离出一种胃螺杆菌,这种细菌(*H. felis*)可在鼠胃内扩增,造成胃炎[149],甚至是淋巴瘤。通过这种模型,很快发现超声破碎后的 *H. felis* 是一种有效的保护性疫苗,在小鼠口服致病螺杆菌后,这种疫苗的保护作用达 96%[150]。一个更重要的进展是将临床新鲜分离的螺杆菌在 SPF 级小鼠的胃内连续生长 2 周[151]。这样就得到了一种由临床Ⅰ型分离的螺杆菌发展而来的菌株,它造成与人相似的胃病理性变化。而临床Ⅱ型分离的螺杆菌发展而来的另一菌株则仅造成轻的浸润性炎症,并没有侵蚀性损害。分离的Ⅰ型和Ⅱ型螺杆菌的不同在于:前者表达一种可破坏上皮细胞的空泡状细胞毒素 (vacuolating cytotoxin, VacA)和一种功能未知的细胞毒相关抗原(CagA),而Ⅱ型菌株缺乏这些物质的表达。

这些观察自然地使人想到亚单位疫苗的可能。由于在动物模型中,螺杆菌尿素酶发挥很好的保护作用,从而成为第一个临床研究的抗原。第一步的研究结果并不令人满意,虽然带菌量有所下降。在Ⅰ型菌株表达的抗原显然具有更大的意义,故在螺杆菌小鼠模型,正在评估 CagA 和 VacA 作为口服免疫原的可能性。在这个试验同时加一种黏膜佐剂,即经基因方法去除毒性的大肠杆菌热不稳定肠毒素(LTK63)。VacA 试验的早期结果鼓舞人心,同样 CagA 和尿素酶单独与佐剂合用也获得类似结果[151]。VacA 和尿素酶联合与 LTK63 合用可能更好些。

治疗的效果如何呢? Doidge 等人[152]采用口服给予超声的螺杆菌和黏膜辅剂 CT,达到根除小鼠感染的螺杆菌效果。同样地,Corthesy-Theulaz 等人[153]成功地将螺杆菌尿素酶 B 亚单位用于小鼠的口服治疗。这些对临床治疗性疫苗研究的早期开展给予了极大的鼓舞。可能 Th1 T 细胞要对大部分胃的炎症损害负责任,使这个平衡朝着增加 Th2 细胞比例的方向变化可能是有益的。这些强调了适合人类使用的一种安全、有效辅剂的重要。螺旋杆菌中的 Sydney 菌株即将被用于临床研究中[154]。

针对有荚膜微生物的疫苗

B型流感嗜血杆菌、脑膜炎球菌、肺炎球菌

传统上针对上述有荚膜微生物的疫苗来源于纯化的包装多糖抗原。这些疫苗存在2个主要的缺点[3]。作为天然的多糖抗原，它们不会引发T细胞相关的免疫反应。这就意味着产生的抗体以IgM为主，不发生亲和力成熟，最重要的是婴儿对它不产生免疫反应。因为B型流感嗜血杆菌(Hib)脑膜炎的发病高峰在10～11个月大的婴儿，而这个疫苗对<18～24个月的婴儿没有作用。

Anderson[155]和Rodrigues等人[156]几乎同时研制了第一代基于PRP(polyribosylribitol phosphate)荚膜的Hib疫苗。Peltala等人进行了一项包括130 178名芬兰儿童的广泛临床研究。在<18个月的儿童没有显示出保护作用，甚至在给予一个加强剂量后也是一样。但在18个月～5岁大的儿童，即使单次给药也能对侵袭性Hib疾病有良好的保护作用。

这些疫苗的第二个问题是：在每一种病原体，都有多个血清型。Hib就有从a～f的6个血清型，都能对人致病。但幸运的是可侵入的致病株99%是b型。另一方面，肺炎球菌有84种荚膜型。虽然其中的8～10个亚型就造成70%的严重感染，但现在的多糖疫苗包含不少于23个血清型的成分。它覆盖了90%的严重感染。奈瑟氏菌属的脑膜炎球菌有5个主要不同抗原的亚群，其中以A、B、C3型最为重要。B型菌株是工业国家中2/3的脑膜炎病例的致病菌。A型菌株引起脑膜炎的流行，特别是在非洲撒哈拉周边的脑膜炎流行区，现在提供针对A和C型脑膜炎球菌的荚膜多糖疫苗。

开创多糖疫苗的研究组取得一个突破成就，即为我们提供非常有效的Hib交联疫苗[158,159]。这个设计利用了如下原则：Hib的PRP多糖抗原交联到蛋白质载体，诱发T细胞依赖的免疫应答，和针对多糖抗原的非T细胞依赖免疫应答相比，在人体这种免疫应答成熟得更早。不同的公司采用不同长度的多糖和不同的载体。如小、中、大分子质量多糖，用或者不用连接臂和DT、白喉毒素变异体CRM197、TT或B型脑膜炎球菌外膜复合物相交联。Mäkelä等再次在芬兰开展一项临床试验(1986～1987年)[160]，疫苗的有效率达83%，而且也消除口咽部携带细菌。采用一种改进疫苗的临床试验(1988～1990年)显示更高、更持久的抗体水平和更好的效果。从1990年起，采用这种预防接种的国家不断增加，由于人群免疫、兽群免疫的进行，病原携带率的降低，使侵袭性Hib疾病的发生急剧下降[161]。在1991年，美国脑膜炎的发病率下降了82%[162]。在许多国家，流感嗜血杆菌性脑膜炎已完全不再发现。现在考虑最终消失这种病原体也许并非为时过早。特别令人鼓舞的是复合疫苗在发展中国家取得良好效果。Mullholland等人在冈比亚进行了一项双盲随机研究，有42 848个婴儿在2、3、4个月时被给予DPT或DPT加Hib多糖抗原与破伤风蛋白的交联物(PRP-T)。在3年期间对Hib脑膜炎、Hib肺炎和其他5种形式的Hib侵袭性疾病进行统计。对于接受了3次给药的儿童(83%)，这种疫苗预防所有Hib侵袭性疾病的有效率是95%；预防Hib肺炎有效率100%；而脑膜炎为92%。更何况在所有放射学确证的肺炎中，有21.1%并非由Hib引起。如果考虑到在发展中国家，急性呼吸性疾病是主要的婴儿杀手之一，上述结果可被认为是一个重要的进展。Hib交联疫苗将可能成为第9个在所有儿童中推荐使用的疫苗。一些发展中拉丁美洲国家已经开始推广它。

还存在问题是未分型的和非B型的流感嗜血杆菌。Thomas的研究组克隆了被称为D15的外膜蛋白[164]，它可能是一种有前途的疫苗候选者。在36种流感嗜血杆菌不溶于Sarcosyl的外膜蛋白中均存在这种成分。在大鼠幼儿模型中，亲和纯化D15的抗体具有保护作用。这个7789氨基酸85kDa大小的分子在所有Hib血清型间具有98%的保守。在序列数据库中还没有发现同源的蛋白[165]。这种蛋白还能充当一种“通用”的复发中耳炎疫苗的候选者。

显然，Hib疫苗制备的原则同样可用于创造肺炎链球菌和脑炎球菌交联疫苗。一种肺炎链球菌多糖—CKM197疫苗可在儿童体内诱发良好的T细胞依赖免疫应答[166]，而且HIV感染的儿童可以忍受，虽然他们的抗体反应要低些[167]。一种7价疫苗可以覆盖70%的病例，而11价的可达82%。几个公司正致力于9价

或 11 价交联疫苗的制备。在 A 型和 C 型脑膜炎球菌交联疫苗的工作也取得了良好的进展。在古巴生产一种基于外膜蛋白的 B 型脑膜炎球菌疫苗,4 岁以上儿童和成人有 74%的有效率,但在更小的婴儿有效率则偏低。

细胞内病原体,尤其是结核杆菌和麻风杆菌

利用清除细胞系统成功地在胞内存活的细菌对疫苗的研制者提出了特殊的挑战。这些微生物包括结核分枝杆菌(*M. tiberculosis*)、麻风分枝杆菌(*M. leprae*)和单核细胞增多性利斯特氏菌(*L. monocytoyenes*)。对于这些病原体,强有力的 T 细胞反应是免疫保护的关键,包括 Th1 型 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ CTL,以及 γ/δT 细胞和 NK 细胞。在动物模型,这些细胞都显示具有至关重要的作用。根据对人们健康影响的重要性,我们将主要讨论结核杆菌。

结核杆菌可能是世界上惟一最具传染性的疾病杀手。约有 20 亿人是带菌者,他们中不到 10%将会发展成为活动性结核。然而每年仍然有 8 百万左右的新发病例,每年有 3 百万人死于该菌引起的疾病。现在存在两个主要威胁,一个是 HIV 和 TB 的合并感染,在感染数周内将发生死亡;另一个是对一种或多种抗菌剂耐药的结核分枝杆菌株的流行逐渐增加。例如在美国,13%TB 新发病例至少对一种一线药物耐受,3%同时对异烟肼和利福霉素两种最重要的药物耐受。

卡介苗(BCG)始于 1921 年,作为应用最广的 EPI 疫苗,被全世界近 90%的儿童使用。在不同的研究中,它对儿童结核(如结核性脑膜炎和粟粒状结核)的保护有效率在 50% ~ 80%,它对防治成人肺结核的作用尚在争议中,在早些时候欧洲所得到的结果较好,与之相对的是在发展中国家所得到的结果较低,其中包括在印度一个完全阴性的大规模试验。一个可能的原因是发展中国家存在分枝杆菌的交叉反应,这可能导致没有接种 BCG 时已经产生了一定免疫能力。

在这个领域中并不缺乏好的主意。有三个方面的研究值得重视:DNA 疫苗、亚单位疫苗、经基因工程改造的分枝杆菌(包括 BCG 和结核分枝杆菌)。现在这个领域正通过巨大的努力获得结核分枝杆菌的完整基因全序列,这将和其他研究一起提供可能候选抗原的概图。

现在作为亚单位疫苗,已经有相当数量的可靠候选者。几个实验室正关注结核分枝杆菌在培养基中分泌的抗原物质的潜在价值。在动物模型中,分泌抗原的混合物能产生保护性免疫。高分辨率的分离技术已鉴定了不少有效的单个分泌抗原,其中最为有效的是 ESAT-6[171,172]。这个抗原仅在有毒力的分枝杆菌株中表达,而在牛结核杆菌减毒处理成 BCG 时消失。采用结核病变区域或局部淋巴结提取的 T 细胞,可确定这个抗原是一个显性的 T 细胞靶抗原。在小鼠和豚鼠模型,ESAT-6 被证实是一种有效的疫苗。

另一个重要的抗原是抗原 85,它实际上是 3 个相关蛋白(Ag85A、B 和 C)的复合物。这些 30 ~ 32kDa 的分子是所有分枝杆菌都分泌的[175]。活动性结核病患者不产生强烈的抗 Ag85 的 T 细胞反应,但是健康的结核菌素阳性个体可以产生。在豚鼠模型,纯化的 Ag85 与辅剂共用具有保护作用。另一个候选的抗原是 HSP60[174],它与其他种类的分子伴侣 HSP65 同源,在注射后或免疫后可被 T 细胞识别。但其作为一种候选疫苗可能遇到障碍,因为它与人 HSP65 存在交叉反应,可能造成自身免疫反应(至少在理论上)。许多其他分泌蛋白也在关注之列,如 Hsp70,PRA,35kDa 的富含脯氨酸抗原和 MPT83[175,176]。

一种编码 Ag85A 的 DNA 疫苗在小鼠使用,以抵抗静脉内给予活的 BCG 或雾化吸入结核分枝杆菌[177]。在这两种情况,获得的保护作用与 BCG 相同。这种疫苗诱发了抗 Ag85A 的体液(主要是 IgG1 和 IgG2a)和细胞介导(主要是 Th1 和 CTL)免疫应答。除了这些鼓舞人心的结果,DNA 疫苗方法也有助于确定其他保护性抗原。表达 HSP65 的质粒 DNA 获得长时间的保护,这可能是由于诱导了 $CD8^+$ CD44 高记忆性 CTL 记忆克隆。

1405

通过遗传工程将结核杆菌候选抗原的基因引入 BCG,从而可获得一种工程化的活疫苗。另外还可构建含免疫共刺激细胞因子的 BCG 变种。另一个开始尝试的方法是使用去除毒力相关基因的活结核杆菌作为疫苗。这个方法还在早期阶段。通过环境获得的分枝杆菌交叉免疫有可能抑制这种疫苗的复制,从而限制

它的效果。

麻风分枝杆菌和结核分枝杆菌有许多相似之处。有些证据显示 BCG 作为麻风杆菌疫苗也部分有效。Convit 最先研究灭活的犰狳来源的麻风分枝杆菌和活的 BCG 组成的疫苗。这种疫苗的部分保护效果也不能排除 BCG 组分的作用。一种非典型分枝杆菌(*Mycobacterium w*)是另一个疫苗候选者。M. w.是一种易于培养、快速生长的分枝杆菌,它类似 Runyon 的第四组细菌,但不相同。

一期临床试验显示能很好忍受高压灭活完整细菌的接种。在印度 Uttar Pradesh 州的 41.4 万居民正进行大规模的区域实验。虽然完整解释这个免疫预防实验结果尚需时日,但现在一个免疫预防实验的早期结果已经被报道[178]。93 个多杆菌麻风病患者开始接受 10^9 个灭活细菌皮内注射,随后以 3 个月间期 7 次追加 5×10^8 个灭活细菌。107 个患者作为对照。所有 200 个患者均接受标准的多药治疗。这个实验是随机、双盲的,安慰剂是高压消毒的微粉化淀粉。疫苗组患者显著更快、更完全地清除细菌,加速损害的临床愈合,并具有更高的麻风菌素转阴率。根据 Ramu 评分,临床好转是显著的。同时也存在一定的不良反应,但并不增加神经炎或畸形的发生率。作者建议将这种治疗作为化学治疗的辅助方案。

链球菌 A 疫苗

令人惊讶的是在发现青霉素近 60 年后的今天,风湿热与风湿性心脏病在许多发展中国家仍然很普遍,流行率达 2%。链球菌化脓性感染会引起急性或慢性血管球性肾炎与中耳炎。其中一个较好的候选疫苗是 M 蛋白,在不同株系 M 蛋白之间存在较大的差别。在这个蛋白质 C 端有一段由 20 个氨基酸组成的保守序列,由于这段序列很少暴露在链球菌的表面,因此其免疫原性较低。这段多肽的特异性抗体在调理作用实验和杀菌实验有效,显示其可成为构建链球菌疫苗的基础[179],特别是在儿童早期。因为在链球菌 A 的感染高发区,存在与年龄相关的渐进地增加细菌特异性抗体。与其相平行也将获得针对 M 蛋白这个特定多肽的抗体。进一步研究确定一个仅由 12 个氨基酸构成的表位是特异性调理作用的靶序列。运用小肽可减少疫苗多肽是链球菌和心肌分享表位的危险性,这种危险性使它引起而不是避免自身免疫并发症[180]。事实上,在肌浆蛋白、原肌球蛋白或角蛋白存在的情况下,用这种肽免疫的小鼠分离出的 T 细胞并不发生增殖,表明其并不引起有害的效应。

病毒疫苗

病毒疫苗已被证明特别有效,也是当前许多疾病根除策略的基础,如很有希望很快根除的脊髓灰白质炎和麻疹,以及正在进行中的腮腺炎、风疹、水痘。这个主题的某些方面前面已经涉及,还有一些将在肿瘤疫苗和下面章节中探讨。在这里既不能也没必要非常详细地讨论各种病毒疫苗的改良研究与进展。而希望突出病毒疫苗研究中的复杂性、挑战性及挫折,以从这些经验中总结出一些教训。

甲型、乙型与丙型肝炎

这 3 种病毒包含了疫苗学家感兴趣的已解决或未解决的问题。Hilleman[181]收集文献推测,早在公元前 5 世纪已经发现了传染性黄疸。但直到 19 世纪 50 年代才明白传染性肝炎与类似的血清黄疸的区别,并在 19 世纪 60 年代得到进一步证实[182]。由于甲型、乙型肝炎病毒的分离以及可判定其最近感染的血清学实验,使其他型的经食道和经血液传染的肝炎被相继发现,其中最重要的肠道传染的是戊型肝炎,最重要的不经肠道传染的是丙型肝炎[183,184]。

甲型肝炎属于这类疾病中的一种,这类疾病也包括感染性单核细胞增多症,其在幼儿时期无症状,而在青春期或成年期就变得严重,其很少引起爆发性肝炎,尽管会引起数月的疾病,但通常不太严重。在发达国家,这种疾病的发病率不高,但在许多发展中国家,这种疾病较为普遍。对于旅行者,免疫接种是最好的办法,并且主动免疫很大程度上代替了 γ 球蛋白的被动免疫。

这种病毒最初证明较难生长，早期研究主要依赖使用电子显微方法对粪便提取物进行鉴定[185]。最后发现这种病毒可在小型长尾猴肝细胞和人肝细胞瘤细胞系中生长[186]，随后发现一些细胞也被成功感染。由于病毒在 LLC-MK2 细胞中的生长和检验疫苗的小型长尾猴模型的存在，产生了福尔马林灭活的完整病毒疫苗[187]，然而因为病毒的生长涉及恶性细胞，这种疫苗在当时不能为人们所接收。最后两个研究小组在人双倍体肺纤维细胞获得病毒生长成功，从而导致出现 Smith、Kline Beecham 和 Merck Sharp、Dohme 研制的疫苗。然而因为病毒产生的量并不巨大，甲型肝炎免疫非常昂贵，因此对于第三世界一种减毒活疫苗将更为有益。现已有几种候选疫苗存在，其中一种已在中国进行了广泛试验且非常有效[188]，但尚未使其完全通过审批。

乙型肝炎携带者在不同国家的比例有所不同，从少于 0.1% ~ 15% 左右。急性发病通常较轻微或无关紧要，但 20% ~ 25% 的携带者将发展成为慢性肝病，并且部分将发展成癌症。乙型肝炎疫苗在前文已经作了简要的描述。这种病毒不能在培养组织中生长，这里有两种不同来源的疫苗，从慢性携带者病毒中分离出的乙型肝炎表面抗原（HBsAg）和在酵母[20]或中国仓鼠卵巢细胞中表达的乙型肝炎表面抗原（HBsAg）[189]。这种从携带者获得的疫苗非常价廉物美、安全，已在发展中国家被广泛采用。现在重组疫苗已变得非常价廉，如果需求量非常充足，估计每一剂量约 0.5 美元，这种情况下，人源疫苗将有可能被取代。两类疫苗几乎同等有效；不同研究产生保护性抗体的应答率在 85% ~ 95% 左右。保护可在比通常认为的抗体水平更低的情况下获得，这也许是因为 $CD8^+$ T 细胞的效应。值得注意的一个问题是，某些人被免疫后会变为“逃逸突变体”的携带者，即使在针对天然病毒的高水平抗体存在的情况下，突变体也持续存在[190]。最常见的变化是在抗体直接接触的 α 环区，出现精氨酸替换甘氨酸的突变。然而还不能确信这种变异会使病毒改变为低传染性，M.H. Kane 指出（个人通信），还没有“逃逸突变体”从一个人传染到另一个人的证据。因此没有必要担心当前疫苗的单效价。推测如果“逃逸突变体”是一个问题，而不同血清型数目有限的话，这些变种应该可以包含在一个重组疫苗中。

1406

丙型肝炎是第一个被确定的非甲非乙型肝炎病毒，其既不能在培养组织中生长，也不能通过电子显微方法显现。丙型肝炎传播方式与乙型肝炎相似，但丙型肝炎是一类更为严重的疾病，近 80% 的感染者会转变为慢性携带者，并且大部分将发展成为慢性肝病。而且相当部分的感染者将发展成为肝癌，在日本有近 2% 的携带者，丙型肝炎与乙型肝炎相比是一个更为普遍的引起肝癌的诱因。

因为分离这种病毒的困难，Choo 等人对该病毒的克隆被认为是巨大的成功，特别是由此发展了有益于献血样品筛选的抗体检验方法[192]。然而，发展一种抗丙型肝炎病毒的疫苗面临着许多困难。丙肝病毒是一种快速变异的 RNA 病毒，具有编码约 3000 个氨基酸残基的单一开放可读框。它包括 2 个公认的包膜蛋白 E1 和 E2，是根据其他黄病毒的类似成分确定的，可能由蛋白裂解而产生。通过对不同地区患者的丙肝病毒进行基因分析研究，表明其存在很大程度上的结构差异性（由此推测其存在抗原多样性）[193]。而且因为只有黑猩猩这一种动物模型，使得实验筛选疫苗非常困难。这也使得难以对中和抗体进行分析和量化，尽管知道慢性携带者的血清可以保护黑猩猩免受感染[194]。一种能代替中和分析的分析方法已被建立[195]，那就是结合中和分析（neutralization of binding，NOB）。在 HeLa 或 CHO 细胞可表达 HCV 重组包膜抗原 E2，并且能与一种能允许低水平 HCV 复制的 MOLT-4 细胞株高亲和力结合。结合的程度可有效地用流式细胞分析技术评估，以检测 E2 抗原。也能分析未知血清抑制这种结合的能力。用 E1 和 E2 免疫的黑猩猩显示不同程度的保护作用，并且发现保护的程度与 NOB 滴度有关。分析结果还显示在完全不同种群间结合的交互中和作用，这说明有可能结合（在此可推测为中和）至少部分不依赖 E2 抗原的突变。也发现高滴度的 NOB 抗体与患者体内 HCV 感染的清除有关。在 34 个急性丙肝患者中，29 人发展成为慢性肝炎，但是其中 7 个逐渐好转。其中 6 人 NOB 抗体的高血清滴度的持续存在，这与病毒清除和临床症状的消失相一致，然而继续保持慢性感染的患者只有较低或检测不出的 NOB 抗体滴度[196]。这与用 ELISA 实验检测 HCV 结构蛋白十分不同，ELISA 实验显示不存在这种相关性。T 淋巴细胞应答，特别是对核心抗原的应答对 HCV 初期感染非常关键[197]。这种相关性将有助于更进一步探索针对该重要病原体的疫苗研制。

轮状病毒疫苗

轮状病毒是幼儿腹泻的重要原因。在发达国家，这是腹泻引起住院治疗的主要原因，但是静脉输液和电解质置换通常使幼儿好转。在发展中国家，轮状病毒是引起大约每年 870 000 人死亡的重要原因[1]。实际上所有孩子在 5 岁以前都曾感染过轮状病毒，因此接种疫苗显然应在更小的时候。通过长时间研究，有效的轮状病毒疫苗将最终实现。

有 7 种血清型轮状病毒，但只有 3 种(A,B 和 C)与腹泻有关，其中 A 型在小儿最为重要。现正处在最终开发阶段的两种疫苗都是"重组合" 疫苗(其中一种将要获得许可证)。它们是口服减毒活疫苗，一种是以恒河猴轮状病毒株为基础，另一种则是以牛轮状病毒为基础构建的。它们是通过插入编码人轮状病毒的衣壳蛋白基因改造而成。在美国，进行了两组四价疫苗的多中心试验，每组试验均包含超过 1000 个 1 ~ 6 个月的婴儿，这种疫苗产生了 57%保护性应答，其中 87%是针对较为严重病情。目前建议每次口服相当于脊髓灰质炎 3 倍剂量的疫苗。人们急切地期待着在委内瑞拉大范围的试验结果，以明确该疫苗在不发达国家是否有效。毫无疑问，这种"琴纳"式疫苗将有其用武之地[198]。

其他方法也在尝试中。包括杆状病毒表达的亚单位抗原，它们可自我组装成病毒样颗粒，在家兔具有高免疫原性；制备包含衣壳蛋白 VP2、VP4、VP6 和 VP7，或仅包括 VP2、VP6 和 VP7 的疫苗对同型病毒的感染具有保护性[199]。这类疫苗能跟随或领先于减毒活疫苗。而另一种减毒活疫苗研究正在进行之中，其目标是从婴儿无症状感染的病毒中分离出的轮状病毒 RV3。这个疫苗株在 AGMK 细胞株中生长，对于婴儿、幼儿和成人即使一次剂量达 10^5 个病毒颗粒也是安全的，进一步的临床试验正在计划之中。疫苗微包囊，包括活的、灭活的病毒或 DNA 疫苗也是研究目标。轮状病毒的 VP4 和 VP7 基因也被插入重组沙氏脊髓灰质炎病毒 3[200]或牛痘病毒。由于没有研究表明琴纳式疫苗 100%有效，这种努力将会继续。进一步的优先行动包括更好地确定轮状病毒疾病的重点以及各种株系的流行性。

1407

呼吸道合胞病毒疫苗

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus vaccines, RSV)是婴儿和幼儿期高传染性病毒。在工业化国家，它是引起该年龄组人员下呼吸道感染的主要原因，然而在第三世界国家，每年有近 90 万孩子死于该种病毒的感染[1]。由 Hib 或肺炎球菌引起的感染常常是很复杂的。

RSV 对免疫抑制患者(如经历过器官或组织移植的人)、中老年以及慢性病患者等有较大的威胁[201]。此外，对于支气管发育不良、先天性心脏病、早熟儿童而言，使用高抗 RSV 滴度免疫球蛋白或人源化鼠单克隆抗体的免疫预防十分有利。

RSV 是一类有包膜的 RNA 副黏病毒，存在 2 个主要的株系 A 和 B，它们相差甚远，可能不能由一种疫苗的交叉保护。一种福尔马林灭活疫苗在 30 年进行了试验，但由于某些还不清楚的原因，被免疫过的孩子暴露于天然感染，居然会引起更高的发病率或更严重的 RSV 疾病[202]。这也许是因为免疫复合物沉积作用。这自然地减缓了疫苗研制的进程，但是新的努力正在尝试。有 2 种适合于低温、对温度敏感的 A 与 B 血清型株系已被分离，作为潜在的候选减毒活疫苗[203]。假定的疫苗经鼻给予，能刺激融合蛋白 F 特异性抗体 IgA 和 IgG 的形成，在肺内会存在 Th1 型 T 细胞应答，同时肺中也存在 CTL。可通过测量病毒在肺内的生长，证实这种疫苗能保护不受野生型 RSV 侵害。对突变株系的分析表明毒力的丧失与病毒聚合酶和(或)F 基因的突变相关[204]。早期的临床实验正在进行之中。

对患囊性纤维化的儿童，用纯化的 F 蛋白为基础的亚单位疫苗进行了双盲法、安慰剂对照研究[205]。未观察到疫苗加重疾病。免受感染的保护性也未获得，但大大减少了下呼吸通道疾病的平均数量和严重程度。Paradiso 等[206]报道了 F 蛋白亚单位疫苗在 24 ~ 28 个月大幼儿中的安全性和免疫原性[206]。将 F 蛋白或其他包膜糖蛋白(G)引入到腺病毒或牛痘病毒的活载体疫苗也在研究之中。

HIV 疫苗与获得性免疫缺陷综合征

人类免疫缺陷病毒(HIV-1)发展了十分厉害的策略以阻止人的免疫应答。它呈现出十分惊人的变异速率,特别是涉及感染的包膜蛋白部分,使得病毒逃脱了抗体的应答。现发现它可存在几个抗体不能到达的地方(如持续存在于巨噬细胞和 DC 细胞或穿入脑部)。更有甚者,HIV 还会以前病毒形式整合入宿主细胞基因组,从而没有任何病毒存在的外部线索,达到逃脱 CTL 攻击的目的。病毒靶向免疫应答的级联反应中最初的淋巴细胞-CD4⁺ T 细胞,可能是一个延迟免疫应答和促进疾病后期出现灾难性病毒高峰的原因,因为 T 细胞的数目下降到很低,以至于丧失了基本的抵抗力。HIV 病毒有非常高的复制速率。我们已知道从病毒一开始进入体内,免疫系统就成为战场前沿。大量的 CD4⁺ 淋巴细胞被感染、死亡和替换。CD8⁺ CTL 细胞帮助控制早期感染,并使病毒降至 1/1000 的水平,但 CD4⁺ 细胞的感染、死亡和控制感染细胞数量的 CD8⁺ 细胞的活化仍循环不断地进行[207]。事实上,病毒量降低的程度是一个重要预后因素[208]。但同时 HIV 病毒在淋巴组织中的高速复制还在不断地进行着[209]。

虽然早期开发艾滋病疫苗的尝试失败了,但一个有趣的"天然实验"提示我们不应放弃。有一小部分冈比亚妓女,她们重复地暴露于 HIV 病毒,但不像她们的姐妹,并不发生血清转阳,也不发展成艾滋病[210]。这些妇女表现出较强的 HIV 特异性 CTL 应答。同样,一些配偶为 HIV 阳性的人员也不发生血清转阳,而是表现为 Th1 型 CD4⁺ 免疫应答[211]。推测这极少部分人群之所以如此,是因为在刚接触 HIV 时(血清转阳之前)就活化了免疫系统,全部清除了这些病毒。一个有效的疫苗应该能在被免疫者体内持续引起这种免疫状态。

早期疫苗的临床试验均涉及到 HIV-1 包膜蛋白的制备,或是整个分子(gp160),或是缺少穿膜区的部分分子(gp120)。在这些试验中有两个非常令人失望地方,即免疫后仍有很少量病毒突破造成感染和不能产生中和刚分离 HIV 病毒的抗体,这与实验性传代株的结果相反。结果,一系列精心设计的实验也未能继续下去。回顾一下,可以发现这些结果并不太令人惊奇。首先,任何自然来源的病毒都可能有突变体,这些突变体可能不被特定疫苗诱导的抗体所中和。事实上,在猫免疫缺陷病毒模型中,用包膜糖蛋白亚单位疫苗免疫后,实际上增强了病毒的感染[212]。何况即使疫苗诱导了病毒的中和抗体也不能保护恒河猴免受 SIV 感染。其次,肠道外的疫苗免疫不能确保可在直肠(或阴道)获得足够的黏膜抗体,以中和全部病毒。即使只有一个 HIV 粒子被放过,它也能进入 CD4⁺ 淋巴细胞或 APC 并开始上面提及的复制循环。遗憾的是还不能确定这种类型的疫苗是否能降低(即便不能清除)感染或降低最初的病毒量,这或许会引起一个较长的无病期。在众多对免疫血清低中和能力可能的解释中,较低的分析灵敏度是其中之一。运用一个新的中和分析方法对接受 gp120 的志愿者进行研究,显示免疫血清可中和与免疫株系相近的基本进化支 B[214]。基于此结果,欣慰地看到,在泰国开始了一个由 WHO 发起的较大的重组 gp120 疫苗试验。这种试验要顺利进行必须满足:①这个国家的政府给予支持;②符合一定的伦理规范。实验必须被研究人群接受;对于特定人群,疫苗一定要适当;并且如果产品有效的话,被试验者应优先获得。当然,对任何预防实验,有必要为所有参与者提供关于使用已有预防措施的充分咨询。在本文写作时,一些 gp160 的 V_3 环区来源肽或整个灭活 HIV 病毒颗粒的一期临床实验正在进行中。

1408

有很好的理由相信 CD8⁺ CTL 在限制 HIV 传播扮演着重要的角色[209,210]。这个结论得到如下结果的支持:HIV-1 特异性 CTL 的出现与 HIV-1 感染巨噬细胞中的病毒水平降低相关[215]。如果结论正确的话,疫苗应包含感染细胞内产生的病毒蛋白,以便于这些蛋白的肽片段能被 MHC I 类分子结合、呈递到感染细胞表面。此外,如果利用佐剂或其他已知有利于 CD8⁺ T 细胞产生的技术,那将更为有利。再次,多抗原的应用可抵消发生在病毒感染细胞内任何单一成分的突变。最后,如能同时引发黏膜、淋巴结和脾 CTL 将是最理想的。事实上,在 AIDS 疫苗的开发中,大量抗原或抗原基因是基础研究和/或动物模型中保护性试验的对象。在各种重组疫苗中,靶抗原包括 gag、pol、nef、rev 和蛋白水解酶[2]。所使用的载体系统有牛痘病毒、疱疹病毒、腺病毒、脊髓灰质炎病毒、门哥病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、沙门氏菌、利斯特氏杆菌、结核菌以及志贺氏菌属等。就免疫力的类型和强度而言,某些实验在第一阶段产生了令人失望的结果。仅有禽痘病毒/

gp120(刺激 - 加强)重组疫苗已进入二期临床。

显然由于其诱导 Th1 和 CTL 免疫的能力,DNA 疫苗很有吸引力。现已有 2 种进入一期临床实验,这是一个令人惊异的事实,因为这种研究方法是如此之新。其结果应在这本专著出版之时被报道。在对鼠、非洲绿猴以及恒河猴潜伏期研究时,得到了很有希望的结果[216]。已制备了编码 gp120 和 HIV 调节蛋白 *rev* 的质粒 DNA 。它可诱导针对两种蛋白的 Th1 应答和针对 gp120 的 CTL 应答。在所有实验物种也获得显著的 gp120 特异性抗体水平。在低 DNA 剂量的情况下,某些动物不能产生相应的抗体但能产生 Th1 应答。然而,来源非洲绿猴的抗血清只有低到中等水平的病毒中和抗体。当然,体外抗体能中和 HIV 病毒并不能确保这种抗体也能在体内产生。Schutten 等[217]证实(在人和放射照射的小鼠嵌合模型),被动产生的高滴度抗体水平并不能达到中和病毒的目的。这对用中和抗体滴度来评价候选疫苗提出了质疑。

有很多关于先用载体或 DNA 疫苗刺激,然后用亚单位疫苗加强,以提高抗体水平的免疫策略的讨论。这已得到一个黑猩猩 HIV-1 保护实验的支持[218]。获得这个目的结果试验最初仅是为了延长 gp120 的免疫过程。在黑猩猩先用含有 HIV-1 gp160 基因的腺病毒重组载体鼻内刺激,然后用 gp120 进行肠胃外的加强免疫,结果黑猩猩产生了高滴度中和性抗体和强的 CTL 应答,并表现出 1 年或更长的保护期。进一步研究中还包括其他抗原,如 gag 和 nef。腺病毒载体或核酸疫苗是否将更为有效还正在观察之中。

尽管减毒活疫苗不太可能在实际中使用,但已得到了重新认识。几年前已经认识到:用减毒活 SIV (删除了调节基因 nef) 免疫接种猴,能保护其不受大剂量的 SIV 病毒感染[219]。但和期望相左,这种缺损病毒能在新生猴中引起艾滋病,并且能在宿主猴中持续增殖。Montagnier 曾讨论 Nef 免疫抵抗 HIV 的可能价值[220]。在人类也一个奇怪的相似发现[221]。1989 年,在悉尼进行的一次红十字输血服务中心注册检查中,发现了一位在 1980 年末或 1981 年初与 HIV 有染的男性同性恋献血者,他在 1981 年 2 月 ~ 1984 年期间献过血。献血者和 7 个血清转阳的受血者都未发展成任何与艾滋病相关的疾病,并且在血清转阳后的 13 ~ 16 年中都有稳定的、正常的 $CD4^+$ 淋巴细胞数量。第 8 个感染者是一个用高剂量类固醇治疗的患有系统性红斑狼疮的妇女,她最终死去。但不清楚她的死因是 HIV 感染,还是因为系统性红斑狼疮,或是两者兼而有之。对这些健康个体的分离病毒和周围血细胞的基因组进行分析,发现存在类似的 nef 基因和 nef-LTR 重叠区的删除突变。病毒突变体在体外复制速率较低,感染者每 10^5 个 $CD4^+$ 细胞中的 HIV-1 DNA 拷贝数较低,从 10 ~ 400 不等。尽管很难猜测减毒 HIV 持续存在的复制机制,但应记住黄热病株 17D,它是一个优秀的疫苗病毒,但能在免疫 30 年后恢复出来。除了减毒活疫苗外,悉尼研究组将注意力集中在 nef 和 LTR 在毒力方面的重要性,以促进作用于这些 DNA 区域的特异性药物的研究。

现在 3 种新药物的发现为 HIV/AIDS 的治疗和防御注入了新的希望,其中 2 种药物是反转录酶抑制剂,一种是 HIV 蛋白质酶抑制剂,它们可显著地降低 HIV 病毒量,常能达到不可检测的水平,从而延长生存期。这提高了在化学药物疗后使用治疗性疫苗的可能性,针对 CTL 活化的治疗性疫苗可清除残存的少数病毒感染细胞或确保病毒总在控制之下。

除了病毒快速变异外,在 HIV 疫苗研究中可能存在的最大问题是怎样检验疫苗的有效性。尽管强烈的事实暗示着 $CD8^+$ T 细胞起着保护作用,但 $CD8^+$ T 细胞与保护的关系仍不肯定。在令人鼓舞的一期临床实验之后,接下来又该怎么办?假如在发达国 HIV 的流行得到了部分控制,那么这个答案应是尽可能伦理控制后的高发率发展中国家。母婴传播仍是一个主要的问题,特别是 AZT 这种在这方面有效的药物对于落后国家而言过于昂贵。在未来的这一章节,我们将回顾在新生儿诱导 Th1 和 CTL 活化的可能途径。

显然,HIV 免疫的复杂问题还需更详细的分析。Heeney 等人[222]的论文中对一些关键问题提供了有用的总结。

针对寄生虫的疫苗

1409 如果说病毒与细菌具有精确细致的进化策略来抗御脊椎动物的免疫系统,有着更大数量 cDNA 的寄生

虫也则拥有更多更广的变化[223]。尽管至今还没有任何针对人类寄生虫疾病的疫苗获得许可，但是在兽医领域已显示出这种疫苗的可行性，如已有一批疫苗成功地应用于治疗原生动物和后生动物在动物的感染。要获得人类疫苗的成功所面临的困难是巨大的，在过去20年内，大批的疫苗学界精英投身于解决人类疫苗所面临的困难，但目前仅有的达到Ⅲ期临床阶段的疟疾疫苗也不稳定。然而，从大众健康的角度以及近年来在寄生虫分子生物与基因学方面所取得的显著进步来看，寄生虫学显得如此重要，也值得做出更多的努力。而且，寄生虫对化疗药以及传媒昆虫对杀虫剂耐药性的日益增长，更使疾病控制疫苗更显重要。

疟疾疫苗

疟疾是全球最普遍的媒介疾病，由原生动物门疟原虫属的4种病原体致病。它威胁着90个国家的20亿人，产生每年5亿病例与200万人死亡。全球疟疾最严重的大陆是非洲，死亡率高达90%，而且主要是5岁以下的儿童。恶性疟原虫（*P. falciparum*）是其中最凶险的一种，其引起的脑型疟，由于寄生的红细胞产生细胞黏附抗原而聚集，从而阻塞脑血管，是死亡的主要原因。现已知抗体具有治疗作用，并观察到某些地域的人群已逐渐获得了对疾病的部分免疫能力，这使疫苗研制有了成功的希望。

疟原虫的生活周期有4个阶段，并可在相当程度上受到免疫系统的干预。蚊子叮咬时，注入疟原虫的子孢子。这一时期其表面显著表达一种环子孢子蛋白（CSP），是其优势抗原。这种抗原的特征是，它显示一串多次的NANP重复序列，而该部位则是患者和CSP（或照射灭活的子孢子体）免疫人群血清中大部分抗体的靶位。然而，最初用CSP免疫来预防感染的尝试却失败了，也许是因为抗CSP血清中抗体浓度太低。

子孢子迅速移动至肝，呈递在感染肝细胞表面的抗原成为CTL攻击的目标。这些重要的多肽来自子孢子体和更多的是来自肝中发育的裂殖子，并正在逐步的鉴定中。一旦肝细胞破裂并释放出裂殖子，红细胞内无性生殖周期的复制也就开始了。正是因为红细胞期导致疾病的发作，因此针对这一时期的疫苗也就十分重要。这是因为，能减少70%子孢子进入肝的疫苗并不成功，而一个能减少70%由红细胞产生裂殖子的疫苗则能显著降低寄生虫量，并因此降低了发病率与死亡率。红细胞主要产生裂殖子，但也同时产生配子体，后者被吸血的蚊子吸入，并在其体内发育成熟为配子。能产生抗配子体抗体的疫苗则能杀死配子体和防止配子体在蚊子的体内成熟。因此，如果大范围内应用就可能降低传染率，但对接受疫苗的人则无直接的好处。通常都认为一个成功的疫苗要能够包括这4个，或至少其中3个阶段的抗原。

疟疾抗原的一个特征是从分离得到的大多数蛋白中有着明显的多次短序列肽的重复。这提出一个观点，即这些就是寄生虫希望免疫系统“看到”的表位。而且由这些多价表位提供的强烈T细胞非依赖性刺激，可能使免疫应答“锁定”在相对低亲和的IgM抗体形式，这种抗体形式不经过充分的亲和力成熟，特别是可对如此多的类似抗原产生或多或少的交叉反应[224]。不拥有更高亲和力的突变抗体分子可能被交叉反应的蛋白质持续地刺激。

许多疟疾抗原的另一个特征是在不同隔离群间有着相当的差异，大概是源于最初抗体攻击后的原虫突变。这将导致对相关抗原的保守部分进行研究。

就CSP而言，在佐剂和黏膜免疫原则一节中所描述的鼓舞性突破以前，已有20次失败的临床实验。其他方面的研究也仍在进行，包括在不同载体系统的CSP表达和人工合成的MAP疫苗。

由Patarroyo及其同事[225]研制的SPf66疫苗是其中有趣且有希望的一种。它包括来源CSP和血液期抗原的多肽，并在哥伦比亚及非洲的大量志愿者中进行了实验。在流行性相对较低的地区，这种制剂可以获得约30%的保护，但在流行性较高的地方，如冈比亚，这种疫苗则没有产生有统计意义上的疗效。

另一个有希望的疫苗是由基因重组减毒的牛痘病毒制成，它包括疟原虫生活周期中3个阶段的7种不同的抗原。但其Ⅰ期与Ⅱ期实验却令人失望。

对于血液无性生殖阶段的疫苗，已有至少6种备选分子作了前期临床或临床的疗效实验。其中的第一个是裂殖子表面抗原1（MSA-1），作为一种有效的免疫原，已发现其在许多种动物中有保护作用[226,227]。它C端19kda的片段能激发抗体，这些抗体在离体实验中可抑制恶性疟原虫子孢子侵入红细胞[228]。针对大鼠疟

疾原虫同源区的抗体也对小鼠被动转移模型有保护作用[229]。来源于 P. yoelii 的这个片段在酵母中表达制备，能在小鼠体内诱导完全的保护，进一步的分析表明，这种保护完全依赖于高滴度的抗体，而非 T 细胞[230]。另一个重要的抗原是 MSA-2，也表达在裂殖子的表面[231]。一种基于前期临床的极有前景的备选疫苗是顶端膜抗原 1(AMA-1)[232]，该抗原表达在入侵前裂殖子的顶端表面。这个蛋白似乎来源于棒状体，棒状体被认为是一种在裂殖晚期与裂殖子侵入红细胞有关的细胞器。AMA-1 由 3 个二硫键结构域，其较为保守的大部分 C 端正进行临床前期研究。环状红细胞表面抗原(RESA)是一种微丝来源的蛋白，也与侵入有关，在体外实验及前期临床研究中也显出较好的前景[224,233]。针对几个其他的棒状体产物，也作了不少的研究。上述分子的不同组合，作为亚单位疫苗，也进行着早期临床实验。

1410

毫不意外，鉴于问题的重要性，也曾经将大量载体、佐剂和 DNA 方法用于红细胞期抗原的研究。

有性增殖期研究最清楚的抗原是 PSf25，一个约来自配子体的 25kda 蛋白质，与其他疟原虫蛋白相比，被认为有着意想不到的免疫原性。它可阻止被蚊子咽下的配子体进一步的发育。现认为 PSf25 是一种"不自私"的疫苗，可和其他疫苗联合使用。

在某些方面，疟疾疫苗的研究进展是令人失望的，但目前这一领域充满活力，新的 DNA 疫苗方式给它注入的新的生机。在前几节提到的 Walter Reed Smith 和 Kline Beecham 小组的成就，将给这一研究带来更多的惊喜。

利什曼病疫苗

利什曼原虫，特别是热带利什曼原虫(*L. tropica*)、硕大利什曼原虫(*L. major*)、杜氏利什曼原虫(*L. donovani*)是能够引起多种严重疾病的媒介传播原生动物。对利什曼原虫的免疫学兴趣起源于对以下的现象的认识：在皮肤利什曼病(热疮)可获得牢固的免疫力，使再次感染痊愈。但是另一方面，引起黑热病的内脏利什曼病进展迅速并可致死。第二个令人兴奋的发现来自小鼠模型，许多证据表明 Th1 免疫有助于治疗而 Th2 免疫则加重病损与死亡[234]。

在过去天花接种过程中(参看前几节有关的历史回顾)，曾有关于利什曼病的古老经验：从活动病灶提取的物质可用以在正常人身上产生自限性的病疮。在 1940 年代已开始用灭活的利什曼原虫来做预防免疫。动物实验显示了使用减毒活疫苗是可行的[235]，通过缺失二氢叶酸还原酶及腺苷酸合成酶基因，一种减毒硕大利什曼原虫的研究仍在进行[236]。但是更多的关注放在亚单位疫苗上，不仅各种佐剂，还有通过载体和 DNA 传送途径。

Gp63 是硕大利什曼原虫的表面蛋白酶，其编码基因已经克隆进鼠伤寒沙门氏菌的营养缺陷突变株。这样就产生一种可口服活载体疫苗，能够保护遗传性易感的 BALB/c 小鼠[237]。DNA 疫苗也被成功地使用[238]。如果传送方法能诱导 Th1 反应，前鞭毛体表面抗原 PSA-2 也有具有保护作用[239]。其他蛋白和多肽也在研究之中。

一种相当有兴趣的抗原不是蛋白，而是糖脂-前鞭毛体的大量磷脂多糖(LPG)。它含有一种或多种涉及前鞭毛体穿透进入巨噬细胞的决定簇[240]。在小鼠模型，硕大利什曼原虫的 LPG 免疫接种具有保护作用。

与其他需要 Th1 免疫的疫苗一样，IL-12 基因最好是最终基因构建的一部分。

一个未解决的问题是：在利什曼疫苗基础研究获得结论后，是否能集中足够的支持进行应用研究和开发。因为这种疫苗对于商业公司并无丰厚的利润，中东的富油国可能成为这一领域的主要投资者。

血吸虫病

血吸虫病(schistosomiasis 或 bilharzia)又叫蜗牛热(snail fever)，是由后生动物寄生虫引起的最严重的人类疾病。寄生人体的血吸虫有 5 种，其中最重要的 3 种是：曼氏血吸虫(*S. mansoni*)、埃及血吸虫(*S. hematobium*)和日本血吸虫(*S. japonicum*)。淡水螺是这种寄生虫的中间宿主，它排出许多自由游动的尾蚴(cercariae)，它能够穿入人体皮肤。血吸虫也是一种动物传染病，同时存在多种动物宿主，因此对其传播的控

制也变得更为困难。经一个十分复杂的迁移过程中,成虫最终在静脉系统中发育和定居,其所在的优势器官因种属不同而异。雄虫与雌虫交配后,雌虫每天产下成千上万的卵。这些卵是导致免疫病理的真正原凶。它们穿透组织、到达胃肠道与泌尿道,随粪、尿排出体外。如果落入水中,螺被寄生则完成一个生活周期。与此同时,寄生在肝或膀胱中的卵则引起局部肉芽肿与纤维化。日本血吸虫引起的肝硬化是血吸虫病最致命的表现。成虫对血细胞的吸食亦可引起贫血。在埃及年轻人中,膀胱癌合并血吸虫病也是较为常见的。据估计,大约有2亿人感染有血吸虫,2千万人病情严重,而每年约20万人死于该病。在中国过去曾主要致力于控制中间宿主——钉螺,而高效治疗药吡咯酮可提供更为有效的控制[1]。在药物治疗后用疫苗进行感染预防可能是主要的新方案。

具有两种构型的血吸虫酶-谷胱甘肽-S-转移酶,作为备选疫苗已对其作了大量的研究,特别是Capron的实验小组[241]。它们在小鼠模型中有较高的疗效,但其原因仍不清楚。其他感兴趣的分子为:曼氏血吸虫迁移幼虫期的2种表面抗原和2种不同寄生虫的肌肉蛋白,前两者在动物模型中看上去很有前景。由于目前这些抗原无一进入临床研究阶段,WHO正积极选择一种最有希望的抗原,并将促进商家的结合,以推广最终疫苗的测试和生产。

总之,寄生虫感染是一个庞大的课题,需要从多个方面同时进行控制。显然,通过化学与生物控制传播虫媒,以防止其参与传染是重要的。药物治疗在许多病例有较高的疗效,但也常伴随有耐药性的危险。从各方面来说,寄生虫疫苗仍是一个遥远的梦想,但值得坚持下去。

针对肿瘤的疫苗

很少有领域像肿瘤免疫研究引起如此多的争议,随着时间和研究者的展望,这个领域在悲观和乐观之间彷徨。从19世纪50年代的中期到晚期,发现致癌物或病毒诱导的实验性肿瘤在同源大鼠与小鼠体内有很高的免疫原性,从而使肿瘤免疫治疗发展成一个独立的领域。这个现象的发现引起大量相关的实验,它们可灭活肿瘤,成为十分有效的肿瘤预防疫苗。当意识到啮齿动物的自发肿瘤很少或毫无免疫原性时,热情化为失望。对人体的一些重要癌症而言,情况也是如此(如乳癌或肺癌)。虽然如此,在人体尝试了一系列实验免疫疗法,它们通常涉及使用非特异性免疫刺激物,如卡介苗(BCG)和放射灭活的恶性细胞或它们的化学提取物。也有一阵使用BCG和其他免疫佐剂,这些免疫佐剂来源于理论设计,希望能增强人体的抗癌反应,尽管这并不常见。但它们确实出现了一定的缓解,但很快又意识到,这种情况只见于少数几种肿瘤(如恶性黑色素瘤、肾癌、急性髓性白血病、视网膜母细胞瘤和绒毛膜细胞癌)。有趣的是,这些癌可能自行缓解或有较长的静止期。因此认识到免疫治疗的结果难以预料。

1411

伴随这种经验性研究,现代分子生物学正在进行真正肿瘤抗原的鉴定研究,并提高测量肿瘤特异性CTL的能力。而且,不仅依赖肿瘤细胞本身作为疫苗物质,也对其进行改造以改变免疫原性。从而新的谨慎乐观态度已经进入这个领域。

杀死肿瘤细胞的免疫学机制并没有不足之处。抗体可独自导致补体固定活化,从而裂解肿瘤细胞。另外,抗体能启动针对肿瘤细胞的调理作用,引起抗体依赖的细胞毒作用。抗体还能用以携带药物、毒素或同位素通过适当的结合达到或进入肿瘤细胞。CTL是一种有力的杀伤性成分,使肿瘤浸犯淋巴细胞有更高程度的特异性。其他具有抗癌能力的细胞包括NK细胞、天然细胞毒细胞和淋巴细胞激活的杀伤细胞。长期以来,巨噬细胞就被认为能够杀死肿瘤,特别是通过其产物,如TNF-α和氧自由基等。

然而,应当注意到同时也存在着许多肿瘤细胞逃避免疫攻击的机制,特别是CTL的攻击。其中不少已在实验条件下引起重视。例如,所涉及的肿瘤相关抗原能够下调或完全消失。同样,MHC Ⅰ类分子也出现下调,使CTL只有很少的MHC多肽靶位能够攻击。由于生长迅速的肿瘤细胞趋向于发生突变,肿瘤相关抗原本身也将发生突变,因而影响到它的免疫原性。最后,还将注意到接受免疫治疗的人体本身也会发生免疫损害,例如由于药物、放射治疗、生长的肿瘤或随着年龄增长等,许多癌症患者在数年内进展迅速。以上这些

均是免疫治疗产生广泛效果的潜在或实际的障碍。

针对癌症相关病毒的疫苗

癌症的病因是复杂的、多因素的,但某些肿瘤与前期病毒感染之间的联系是十分密切的,以至于毫无疑问地认为病毒感染成为后期发展成为某些肿瘤的先决条件。如乙型与丙型肝炎病毒的慢性携带者常发生慢性肝病多结节增生、肝硬化,最终为原发性肝细胞癌。在癌细胞中可检测到病毒基因。在一些国家(如中国的乙型肝炎、日本的丙型肝炎),肝癌非常常见,成为大众健康关心的重点。并且,抗病毒治疗如阿昔洛韦、IFN-α 等并不能很好地清除病毒,也就不能成为癌症预防的策略。所以,进行防病毒感染的疫苗治疗将是一个首选方案。

对于乙型肝炎,问题相对直接一些。在一些国家,导致携带状态的感染是通过产道或在新生儿期母乳喂养而获得的。这样较为理想的治疗是“被动活化”,或注射乙型肝炎特异性的免疫球蛋白和乙型肝炎疫苗,时间是在出生时或至少出生后 48h 内。这一方案在工业化国家是可行的,如日本,在那儿携带率为 2%,所有的妊娠妇女均能够检测携带状态,此方案比对所有的新生儿进行免疫更易于接受。在许多国家,这却并不可行,因此只能给予主动的免疫治疗,即注射 3 次乙型肝炎疫苗(如 0、1、6 个月)。这同样能预防携带状态。在一些国家,感染在大多数情况下似乎是基于社区获得的,故可适合于延长主动免疫直到 6~8 周首次接受 DTP 疫苗。以 DTP 作为进一步疫苗接种的基础使得接种计划相对简单。一个 5 价的 DTP-乙型肝炎-流感 B 疫苗现正在临床实验。对于丙型肝炎,目前尚无疫苗,但却是十分需要。已知大约 80% 的丙型肝炎感染者成为了慢性携带者(此比例接近 HIV 的比例),他们大多数将最终发展成慢性肝病。

EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)代表了另一种情况。此病毒无处不在,与鼻咽癌、伯基特淋巴瘤和一些其他淋巴瘤及白血病有关。现在仍不清楚为什么大多数感染了 EB 病毒的人没有明显的疾病表现(特别是在儿童早期感染病毒),或仅有短期发热,而一部分则继续发展为恶性肿瘤。在一些地区(如南中国),更值得用一种预防性的 EB 病毒疫苗进行广泛的公共健康干预。

对于人类乳头状瘤病毒(human papilloma viruses, HPV)已作了大量的工作,特别是作为宫颈癌始动因素的 HPV-16 与 HPV-18 两种类型。两种不同类型的疫苗正在积极的研制当中,一个可以在初期预防病毒的感染,因此主要是针对十几岁尚无性活动的年轻人;另一个为治疗性疫苗,其中 HPV 的基因产物 E6 和 E7 最受关注。这些基因显然与病毒的转化能力有关,并在宫颈癌细胞持续表达,包括转移癌。积极的研究正在探讨使用这些抗原的重组 DNA 形式以增强 T 细胞对这些疾病攻击的可能性。

1412

衣壳蛋白是用来设计 HPV 预防疫苗的最合理候选者。主要的衣壳蛋白 L1,作为一种病毒样颗粒,特别受到青睐。而可用以设计治疗性疫苗的备选者很多。感染 HPV 的角质细胞表达 6-8 个病毒编码的蛋白,但均不是病毒体成分。在这些所谓的早期抗原中,2 个称之为 E6、E7 的蛋白在宫颈癌细胞持续表达。其表达量明显高于 E1 和 E2,并且 E4 仅在末端角质细胞中较为丰富。已经鉴定了 E6 和 E7 的 MHC Ⅰ类分子限制性 T 细胞表位。在动物模型中,诱导针对 E6、E7 蛋白 CTL 反应的多肽、蛋白或载体疫苗能有效消除肿瘤[242]。含有 HPV-16 上述抗原的转基因鼠可自发地产生燕麦细胞癌和豆状核肿瘤,这些研究支持这些基因产物与恶性转化有直接关系的观点[243]。回顾以上成就,已有 2 个宫颈癌免疫治疗Ⅰ期临床实验的报道。一个是编码 HPV16、18 的 E6、E7 蛋白的牛痘病毒,它可诱导特异性抗体(3/8)和循环 CTL 前体细胞(1/8)[244]。以铝盐为佐剂,给 5 个人注射 HPV-16 E7 蛋白,5 人均产生 E7 抗体其中 2 人产生 T 细胞增殖反应,但有特异性的 CTL 未能观察到[245]。E7 蛋白对于人类的免疫原性将鼓励使用其他佐剂、载体或 DNA 疫苗等的进一步临床实验。例如,3 个 HPV-16 E7 蛋白的人限制性 CTL 表位和乙型肝炎核心抗原一起表达在 aroA- aroD- *S. typhimurium*,作为临床前期的口服疫苗。这个极富想像力的途径很值得关注。

国际癌症研究协会已试图评估有多少癌症与病毒感染有关。在全球为 15%,在发展中国家为 20%。55% 的胃癌与幽门螺杆菌(*H. pylori*)有关(每年 5000 例),84% 的肝癌与乙型、丙型肝炎病毒有关(每年 40 万例),89% 的宫颈癌与 HPV 有关(每年 40 万例)。全社会免疫以进行控制是一个十分有吸引力的方法。

针对肿瘤特异性及肿瘤相关性抗原的疫苗

所有抗肿瘤疫苗均基于一个假说,即肿瘤细胞在生物化学上与正常细胞不同,肿瘤细胞可能表达一个或更多的正常细胞所没有的抗原。如果此抗原能以适当的方式注入体内而引发合适的免疫反应,就能保证对肿瘤细胞更有力的攻击。而目前大多数注意力集中于如何激活与肿瘤免疫相关的 $CD8^+$ T 淋巴细胞、抗体、$CD4^+$ T 细胞以及巨噬细胞。

不久以前曾认为,一个抗原如果要作为抗肿瘤监测的对象,就应当是一个完整的膜蛋白或其他质膜的关键成分。现在我们知道自身蛋白能被处理成多肽,然后与自身 MHCI 分子呈递在细胞膜表面。这样细胞内的蛋白也就变得重要。由于 CTL 可裂解靶细胞,并具有迁移、再次攻击的能力,CTL 就成为针对很多肿瘤抗原的有效手段。抗肿瘤免疫攻击的抗原大致分为如下 4 类。

突变抗原

首先确实存在肿瘤特异性抗原,有许多肿瘤细胞的蛋白发生随机点突变的例子,这些蛋白来源的多肽能被细胞的 MHC Ⅰ类分子呈递,从而构成肿瘤细胞独有的 T 细胞表位。在一系列重要研究中,Boon 小组[246]显示,看家基因的突变能导致在肿瘤细胞表面上呈递抗原性的 T 细胞表位,它们可成为 CTL 攻击的靶子。在人类肿瘤也发生同样的突变[247](如 CDK4 和 MuM1)。由于突变可发生在不同个体的不同蛋白质,或同一蛋白质的不同部位,将不得不针对每一个人对这些突变多肽作鉴定并组合成疫苗。这一实践中的困难只有在技术上有了较大的进步后才可能克服。然而,这种疫苗的两处优势是:对正常细胞绝对无效,并且由于是一个新抗原,故不存在优先免疫耐受。

在正常组织不表达的分享抗原,常为癌胚抗原

有一些蛋白并不在成人组织中表达,但却存在于肿瘤中,它们常常是一些原始基因。它们是非突变基因的产物,其中一些曾在胚胎时期有表达。在鼠类动物,这类癌胚抗原的研究超过 30 年,但直到发现它们在人类肿瘤中也存在,才显示出新的重要性。其中最主要的认识来自恶性黑色素瘤。患者的 CTL 被用来检测一个肿瘤来源的黏粒库,这个库由抗原性黑色素瘤的 DNA 所构建。检测转染后的细胞刺激 CTL 的能力,可鉴定原细胞没有的抗原。抗原 MAGE-1 是第一个通过这个方法鉴定的抗原[248]。其 HLA-A1 限制性的 CTL 表位是一个序列为 EADPTGHSY 的 9 肽。很快就发现 MAGE-1 属于一个多基因家族,这个家族至少有 12 个成员[249]。利用基本相同的方法,也鉴定了编码肿瘤排斥抗原的其他基因,如 BAGE 或 GAGE 基因等。它们是另外 2 个多基因家族成员,这些基因之间并没有基因同源性。至今从这 3 种类型的基因已鉴定了 7 种不同的能刺激 CTL 的抗原多肽,每个多肽序列和它对应 HLA 限制性也已研究清楚[250]。某些抗原含有不止 1 个的 T 细胞表位。例如,MAGE-3 编码多个抗原多肽,分别受 HLA-A1、-A2 和-B44 的限制。在高加索人中 60% 的黑色素瘤患者至少有 1 种以上的上述抗原阳性。RT-PCR 显示它们也表达于非小细胞肺癌细胞、膀胱癌、燕麦细胞癌和前列腺癌,尽管表达水平较低。它们很少表达于大肠癌,几乎不表达于白血病和淋巴瘤。

1413

用这些多肽进行免疫是否会导致正常组织损害呢? MAGE、BAGE 和 GAGE 能表达于睾丸和胎盘[249],但这些细胞缺乏 HLA Ⅰ类分子表达,如精原细胞、精母细胞、迷路滋养层细胞。因此不良反应似乎是不存在的。而且在一个 MAGE-3 多肽的小范围Ⅰ期实验中尚未遇见此类问题,这个实验在转移性黑色素瘤上取得了一些鼓舞性的结果。P1A 是一个具有和这组人类肿瘤抗原相似特征的小鼠基因,它表达在小鼠的肥大细胞瘤细胞和其他类型癌症,但除了睾丸和胎盘外,正常成年组织不表达。使用这种抗原免疫小鼠,不会产生自身免疫性睾丸炎或干涉正常的妊娠[252]。显然 P1A 只是一个模型。此问题还需进一步在临床研究中仔细随访每一个病例。

在进一步临床实验中这一组抗原拥有某些优势。首先,知道了患者 HLA 基因型以及特定肿瘤的表达特征,就可能作出合理的多肽选择。第二,量化分析特异性 CTL 反应(或抗体及 $CD4^+$ T 细胞反应),将可以动态建立关于肿瘤发展与潜伏的相关免疫信息。第三,如果已知所感兴趣的多肽,就能比较疫苗中使用的活载

体、不同形式的佐剂、蛋白载体和其他免疫处理方法。最后，由于许多肿瘤带有多于1个的抗原，组合不同的抗原多肽可以延迟或消除抗原丢失突变所带来的问题，因为2个抗原同时丢失情况很少发生。

对CTL识别抗原的研究还远没有结束。关于这个领域，Boon小组曾经发现一些令人激动的变化。如大约50%的黑色素瘤异常活化N-乙酰-葡萄糖氨基转移酶(N-acetyl-glucosaminyltransferase)基因，以至于产生一个由一内含子编码的HLA-A2限制性多肽[253]。采用自身CTL，鉴定了编码一个人类肾癌抗原的新基因，称之为RAGE[254]。总之，此类型的12个潜在疫苗多肽在文献中已有描述[249]。

是什么事件在黑色素瘤细胞中启动MAGE或其他基因的活化呢？这可能是源于相关启动子的去甲基化，这可能是肿瘤细胞中常见的基因组去甲基化的一个随机表现[255]。

分化抗原

被认为可用作癌症疫苗的另一类抗原是在恶性细胞和其对应的正常细胞中均有表达的抗原。其中一个特别类型的分化抗原是B细胞淋巴瘤的独特型，这些独特的免疫球蛋白受体在所有癌细胞上表达，从而使此分子成为被动与主动免疫治疗的靶抗原，并已获得一定成功[256]。同样的，分子如仅在淋巴细胞特定分化阶段表达的CD19及CD20，也属于此类型。现在一个更广受注视的是表达在黑色素瘤细胞分化抗原，它们能被同种T细胞识别，虽然正常黑色素细胞也表达这些抗原。其中首先是酪氨酸酶[257]，它已被鉴定含有5个HLA-Ⅰ限制性和2个HLA-Ⅱ限制性多肽[250]。酪氨酸酶多肽是一些肿瘤浸润淋巴细胞的靶抗原[258]。此类型的其他3种基因是：Melan-A/Mast1、gp100/8P与17、gp75/TPR-1。很明显以这些抗原为靶的免疫治疗将危及正常黑色素细胞。事实上，在一些看上去对黑色素瘤免疫治疗反应良好的患者中已有白癜风的出现。而更大的担心在于视网膜的脉络膜层中也有黑色素细胞存在。至今，在进行针对黑色素瘤免疫治疗的患者中，尚未遇见视网膜的问题。总之，由5种不同的MHC限制的15种多肽组成了这组具有潜力的疫苗分子[250]。

肿瘤相关黏蛋白

随着发现人T淋巴细胞可识别、杀死胰腺肿瘤细胞，上皮细胞黏蛋白表现出新的重要性[259]。Finn小组的一个系列实验提出一个假说(关于这个假说已有综述)[260]。上皮细胞黏蛋白抗原是由基因Muc-1所编码，是具高度糖基化的高分子量糖蛋白，由正常上皮细胞分泌以润滑黏膜表面。通常，Muc-1蛋白只限制于上皮细胞的管腔面。*O*-糖链多数以唾液酸残基结尾，连接于Muc-1的丝氨酸和苏氨酸残基。可以想象，这样致密的糖基化外衣可以在空间上限制TCR接近Muc-1的蛋白核心。当上皮细胞发生恶性转变时，如乳腺、胰腺和大肠的上皮腺癌细胞，可发现其黏蛋白发生重要变化。其在细胞表面上的表达不再具有极性，而变成均匀一致。黏蛋白的数量也10倍于正常。而且黏蛋白较少糖基化，因此完整的膜蛋白核心也易于暴露。许多研究小组几乎同时克隆了Muc-1[261,262]，发现此分子含有序列PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA的大量串接重复。此重复具有个体多态性，不同个体含有20～125个不等的重复。此重复显示了一个稳定的多聚脯氨酸β转角螺旋[263]。从不同肿瘤患者(如乳癌、卵巢癌、胰腺癌)分离到的CTL，显然能够以HLA非限制性方式识别20mer的多个串接重复。从患者分离的T细胞均为典型的αβTCR T细胞，针对TCR的抗体能抑制T细胞对黏蛋白核心识别。现在的推测是：T细胞上的多个TCR和肿瘤细胞的多套20mer结合，如此高度多价的结合从而克服一个重复序列和TCR的低亲和力。

1414

随着大量的前期临床研究，已见许多以Muc-1为癌症疫苗的早期临床研究。Goydos等[264]试验了一个105个氨基酸的合成多肽，它由5个重复的免疫优势域和一个链接区组成，并与BCG混合给药。患者最初接受100mg剂量，然后间隔3周再作2次接种。所选患者为进展期的胰腺癌、乳腺癌或大肠癌。如所预期，在注射局部产生了一个溃疡，但患者能相当好地忍受治疗。试验的患者中，1/3的Muc-1 CTL前体细胞有2～4倍的增加；2/3者有流感样症状，可能与IL-6的分泌有关；许多患者对黏蛋白特异性多肽产生较深的DTH反应。63个患者中有3人显示疾病稳定。更多的工作将集中于较小毒性的佐剂上。正在考虑使用自体APC，如DC[265]或EB病毒处理后高表达Muc-1的B细胞[266]以用作细胞疫苗。

关于其他的途径，已作了简要总结[267]，包括一个与钥孔血蓝蛋白（keyhole limpet hemocyanin，KLH）以共价连接的1.5个串接重复序列，以QS21分子为佐剂，试验显示9个乳癌患者产生了显著的抗体，但无CTL产生，这状态可能有利于控制微转移；另外包括活疫苗病毒载体/Muc-1/IL-2的构建，其Ⅰ期临床试验涉及9个3/4期的乳腺癌患者。

McKenzies小组[268]使用一种氧化的甘露聚糖-Muc-1 F蛋白，它能在小鼠体内引出较强的CTL反应。在25个患者的临床实验中，细胞反应较所期望的小，但体液反应则可见于70%的病例中。有趣的是：该小组用人Muc-1免疫小鼠，所得到的CTL反应则明显是MHC限制性的。对这些结果中的差异仍不清楚，但观察激动的人类CTL与自发产生相比，是否显示出MHC限制性将是十分有意义的[268]。

显然，以上描述的仅仅是一些例子。肿瘤抗原领域十分活跃，还存在许多其他的备选者。很高兴看到过去的临床经验主义（总是有其存在之处）得到现代细胞、分子科学的大力支持。

细胞疫苗

确定的分子疫苗因其精确性而十分诱人，但值得提出的是，一个疫苗不应当仅仅只用一种抗原，而应含有肿瘤细胞的所有抗原，因为抗原的选择性缺少突变可能挫败更精确疫苗的目标。现已有较多的文献涉及使用放射灭活肿瘤细胞、肿瘤细胞株、肿瘤细胞提取物或培养脱落抗原等所制备的疫苗。最多用以研究的肿瘤是黑色素瘤，毫无疑问，一小部分患者肿瘤已消退。最常使用的佐剂是BCG，或从BCG来源的细菌产物。就文献描述的抗肿瘤T细胞反应和延长的随访生存时间来看，一些实验取得了较好的效果[269-271]。当将疫苗或BCG直接注射入黑色素瘤的皮肤转移灶时，偶可导致注射或未注射的病灶在短期内消解，目前尚无证据表明长期的效果。此领域的历史是绵长而混乱的，很难相信这些粗糙的方式不经改进而能保存下来。

为了解细胞因子伴随公认肿瘤抗原是否能增强抗肿瘤T细胞反应，进行了大量细胞因子转染肿瘤细胞的研究[272]。在30个细胞因子和相关分子中，GM-CSF是其中惟一真正给人留下深刻印象的细胞因子。GM-CSF促进DC的分化与活化，从而增强免疫反应中的起始传入部分。在人体这种情况，必须使用特定患者的黑色素瘤细胞，这包括获得肿瘤组织，进行培养，转染GM-CSF基因，放射照射后进行一系列的自体疫苗注射。第一个用这方法治疗的患者[273]确实产生了额外的CTL前驱细胞，虽然较为短暂，一些临床和放射显影结果提示存在淋巴细胞对转移病灶的浸润，然而不幸的是，此患者临床状况毫无改善，最终死亡。另一个DC刺激物是flt-3配体，很值得深入研究[274]。无论是离体和在体，flt-3对DC均有较强的刺激作用，是一个极有潜力的T细胞佐剂。但从长远来看，使用自体肿瘤细胞疫苗进行个体化治疗可能并不可取。其他患者个体化技术包括：培养或细胞因子转染肿瘤浸润淋巴细胞后，注回患者，或离体培养DC，然后将粗制的肿瘤超声产物或特异性多肽抗原与DC细胞共浴。由于外周血源DC在GM-CSF与IL-4的刺激下能够大量生长，所以从理论上讲这个方案并不十分困难。其他较为普遍化的方案是在大量模型系统，用患者自身的原位肿瘤细胞为抗原来源，探索GM-CSF、可溶性flt-3配体的应用价值。

本节中所涉及的方法在目前用于治疗微小残余病变的研究尚不多。作者坚信在肿瘤免疫治疗领域将出现最为适合的靶抗原，同时也对佐剂治疗充满信心。

作为抗肿瘤药的免疫毒素与抗体

虽然本章主要讨论的是主动免疫，也将涉及肿瘤被动免疫治疗的一些主要进展。在实验系统，针对肿瘤细胞抗原的抗体分子与药物、毒素、同位素交联，进行了大量发展抗肿瘤治疗的研究，采用这类方案，也有相当数量的临床实验完成。这方面工作的最好例子是Vitetta小组的工作[275]。在她所命名的“第二代免疫毒素”，这种方案的许多不足之处已经通过不同的实验操作予以解决。如肝毒性、高凝状态、抗体的低效等。例如，一个针对CD19或CD22的抗体（这2个分子在大多数B细胞瘤中存在），能与一个去糖基的蓖麻毒素A链交联，从而形成一个免疫毒素，它具有较好的患者忍受性，有限的临床研究显示相当多患者可减少肿瘤负荷，特别是治疗初期肿瘤并不太大的病例。用于大量肿瘤患者的结果可视为中等，这些实验描述了可接受的

剂量水平，也建立了相当的可靠性。从这个意义上讲，攻击微小残余病变的结果十分有希望。

微转移是 Riethmueller 小组研究兴趣所在[276]。他们单独使用抗体，而不交联任何毒素，因为他们认为如果微转移形成的小细胞巢是治疗的目标，补体或 ADCC 就能胜任这个目的。使用非交联的小鼠单克隆抗体 17-1A，治疗患大肠癌患者，17-1A 是针对广泛表达的上皮糖蛋白的 IgG2A 抗体。在 189 例 Duke C 期大肠癌随机实验中，中期随访时间为 5 年，术后给予 500mg 抗体，然后每月给予 100mg，连续 4 次，能降低 30%的死亡率和 27%的复发率。并且疾病复发减少现象主要位于远隔区域，而非局部。这和治疗目的是微转移而不是局部残留肿瘤细胞聚集相一致。此实验十分令人鼓舞，因为这种抗体还仅仅处于早期阶段，人源化的工作尚未完成。在死亡率上的效果与辅助化疗所获得的效果很接近，最近几年对此种肿瘤的化疗也变得可有可无。但是，很难放弃这一结论，即如果抗体治疗结合辅助化疗将产生更好的效果。这样实验正在进行当中。

1415

从这些例子当中，有证据表明用抗体进行被动免疫治疗值得更多的深入研究。

总结

肿瘤治疗领域的学生学会一定程度的谦逊是适当的。虚张声势、夸大其词已经是过去的事。当意识到成功不易获得，而且最初阶段成功仅限于特定癌症的特定阶段，从而采用更谨慎、更科学的研究方法。但至少现在我们已经掌握了一系列科学分析的工具。这包括肿瘤抗原的鉴定、T 细胞反应的测量、抗体敏感性的评估和抗肿瘤反应的细致记录。在这些条件下，此领域已经适合进行更多的临床前期与临床研究。如果大量工作获得进展，上面的议题将可能出现很大变化，并且随着我们对免疫调节的了解增多，这些方案也将变得更为有用。

生育控制疫苗

在此作者无意深入回顾这一重要议题。而是通过对其进行介绍，以阐明这样一个观点，即诱导一个免疫反应不仅可用于传染性疾病和肿瘤，也可在未来用于使读者吃惊的意想不到的方面。

所需要的是这样一种疫苗，其效果能够持续一段适当的时期(如 3 年)，但又是可逆转的。如果用于女性，则不能干扰其月经周期，也不能引起过多的出血。也不能诱发任何自身免疫病理。一个可能的备选者是人类绒毛膜促性腺激素(hCG)。此激素在卵子受精后立刻由卵巢产生，对随后几日的受精卵在子宫壁上着床十分重要。并且干扰 hCG 对排卵和甾体激素没有影响。但有一个不利点，即 hCG 是一个由 α、β 两条链构成的异源二聚体。β 链是独特的，而 α 链则亦见于其他许多激素。一些临床实验使用了交联在其他蛋白上的 β 链，但是最有希望的结果是由一个伪装激素实验获得，这种伪装激素由 hCG 的 β 链和绵羊黄体激素的 α 链非共价结合而构成。这种异种二聚体(heterospecies dimer，HSD)又与 DT 或 TT 共价交联。在 148 例女性中，该疫苗共进行了 1224 个月经周期的实验[277]。所选择的女性均有至少 2 个孩子，性功能正常，曾参与家庭诊所计划。免疫包含 3 次吸附于明矾上的 HSD 注射。第 1 次注射包括 1mg LPS 的邻苯二甲酰衍生物作为佐剂。含 DT 或 TT 的制备被另外使用。受试妇女定期监测抗 hCG 抗体水平，并且已经确定其中和水平是 50ng/ml。80%抗体超过此水平的妇女，只有一位怀孕。大多数的妇女为维持此水平将接受后续的注射。如果不继续接受注射，则大多数将在 1 年或更短的时间内失去对妊娠的保护。

Ⅱ期临床实验证实这种方法确实可行。然而需要更强的佐剂，以便更好促使产生血清抗体。由于该疫苗看上去是安全、可逆的，因此有希望将其临床实验继续下去。

另一个有趣的备选疫苗是 10 肽的黄体化激素释放激素(luteinizing hormone-releasing hormone，LH-RH)，也叫促性激素释放激素(GnRH)。此激素是男、女共有的，它控制生殖细胞和性激素的产生。一个合成的疫苗，通过 D 酪氨酸替代第 6 位的甘氨酸，并与 DT 结合，使其成为有效的、可逆的家庭生育控制药物。在人类，该疫苗已进行Ⅰ期与Ⅱ期的临床实验，它替代睾丸切除术，用于治疗进展期的前列腺癌。在接受 400mg 剂量疫苗 3 次后，5/6 的患者前列腺抗原下降，4/6 患者酸性磷酸酶水平下降。在一些病例可见有临床及放射影像学

表现的改善，虽然并非所有的病例[278]。用 PLG 微粒体来传运抗原也正在研究之中。

另外的方法包括针对精子关键分子进行免疫[279]。能够黏着、固定、包裹精子表面的抗体将能抑制精子功能。原则上，用精子抗原进行免疫即能对男性也能对女性起作用。性交后进入输卵管的精子数量只有几十至几百个，免疫女性将易于对其进行中和。另一方面，长期以来女性一直担负生育控制的主要责任，因此也将考虑到对男性进行免疫。事实上，所有切除输精管的男性都将产生抗精子抗体，这种抗体对男性完全无损。已经有 6-7 种重要的抗精子抗体成为备选疫苗，另外有精子表面约有 200 种蛋白质分子可被放射碘或生物素标记。一个有希望的备选抗原是精子凝集抗原 1(SAGA-1)，其覆盖几乎整个精子表面[280]。自然，确定抗原是精子特异性的也是十分重要。一个对 SAGA-1 的临床实验也已处于后期规划阶段。

在自身免疫及变态反应中的阴性疫苗

疫苗是制备用以产生所期望的免疫应答。当然，也就存在一些情况需要降低免疫应答而不是增强。最常见的三种情况是：自身免疫性疾病、变态反应与移植。鉴于免疫耐受涉及清除或阴性选择免疫细胞，或在其中诱导一种失能状态[281]，因此采用与耐受原相关的词，疫苗，将进一步扩展这一概念。但是，除了经典耐受诱导途径外[282]，我们现在已经认识到存在着其他的调节或取消免疫应答的途径。尽管在文献中已经有了许多关于活化 T 细胞介导感染耐受的实际例子，但是使用抑制性 T 细胞这一术语仍须谨慎。最近发现，引导免疫反应偏离前导致炎症的 Th1 T 细胞途径，将有力地改变产生自身免疫反应的倾向，甚至能扭转已经出现的自身免疫损害。也许还没有哪一领域能如口腔耐受(作为黏膜耐受的一个例子)一样清楚的表现这一观点。如果这些都是由于诱导产生了调节性 T 细胞群，将这种治疗称作负性疫苗也就顺理成章。此题相对于本章的主旨较远，因此仅概要讨论。

1416

自身免疫性疾病的治疗

我们应对 Hafler 和 Weiner 深表感谢，因为他们重新唤起对口服耐受[284]这一古老课题的兴趣[284]，同样 Holt 及其同事也在呼吸道有着同样发现[285]。现在已经可以看到经口给予适当的抗原能抑制众多的实验性自身免疫性疾病，如自身免疫性脑脊髓炎、胶原诱导的关节炎、自身免疫性葡萄膜炎和非肥胖糖尿病小鼠的自身免疫性糖尿病。尽管存在多个机制参与，诱导调节性 T 细胞群可能是其中最重要的一个。这些细胞具有 2 个关键特征。在肠系膜淋巴结和肠相关淋巴组织中产生，并迁移到口服耐受原表达的靶器官和组织。在相遇“其”抗原时，它们将分泌 TGF-β1，也可能分泌或不分泌 IL-4、IL-10。这种 T 细胞曾被称作 Th3 细胞[286]。TGF-β1 是一种有趣的调节分子，一方面它是 T、B 细胞复制的强力抑制剂，另一方面，它又能增加 IgA 的合成。常伴随 IL-4 的产生则减弱 Th1 T 细胞方向的发展，从而降低 T 细胞介导的炎症。而且一个抗原 A 特异的 Th3 细胞，能吸附于有抗原 A 表达的组织，但在吸附部位，其抗炎症活性却是非特异的，所以同一组织表达的抗原 B 的特异性淋巴细胞也将被抑制。在常常涉及多个靶抗原的自身免疫性疾病中，这种旁抑制作用十分重要，

这一原理在小鼠实验中有效，它也导致启动口服耐受原作为负性疫苗的Ⅰ期临床实验，已经用于多发性硬化、葡萄膜炎、类风湿性关节炎。十分令人鼓舞的是促进使用髓鞘蛋白抗原治疗多发性硬化的Ⅲ期多中心实验。其结果报道于媒体，但奇怪的是并未发表，其中安慰剂组获得了 58% 的良性反馈，而实验组与对照组间无统计学差异。在类风湿关节炎使用Ⅱ型胶原的两个Ⅱ期实验也不尽如人意。

气雾吸入自身抗原是诱导免疫耐受的又一途径。Harrison 小组[287]在 NOD 小鼠疾病发作前和发作期给予胰岛素气雾剂，结果发现其糖尿病的发生和胰腺组织病变的严重性均有显著的下降。有趣的是脾内 T 细胞对许多重要多肽的特异性增殖反应已被消除，其对 β 细胞自身抗原、谷氨酸脱羧酶的增殖反应也明显减弱。因而提示存在一种非特异性的终末效应机制，这正如以上所描述的一样，同时也应注意到其中存在一些关键的不同之处。在 Harrison 工作中调节性细胞是 $CD8^+$ γδ T 细胞，而不是 $CD4^+$ Th3 细胞。在过继共转移模

型，气雾疗法在预防糖尿病方面也十分有效。

已知胰岛细胞抗体轻度阳性和糖尿病高度相关，在这些高危人群，已经开展了一些口服胰岛素的临床研究，但尚无结果。

French[288]等的工作进一步提示：诱导对单一蛋白的耐受可预防一种和多个自身抗体相关的自身免疫性疾病。使用NOD小鼠构建前胰岛素Ⅱ基因的转基因小鼠，构建中这个基因的启动子是MHC Ⅱ类分子启动子，因此在胸腺的DC可以表达这种抗原。结果发现几乎完全能够预防胰岛素炎症和糖尿病。这一结果提示，特定抗原可能在自身免疫疾病发展起到中心作用，其他抗原通过级联反应参与其中。

我们曾经提到过Sun[94]等的工作，他显示当CTB与抗原共价交联，就能增强蛋白口服诱导耐受的能力。该种治疗有力抑制了DTH的早期初始反应和后期效应阶段，这种抑制效应在过继转移后仍然有效。这种治疗在许多自身免疫性疾病的免疫治疗模型中有效，如髓磷脂碱性蛋白诱导的EAE，在NOD小鼠糖尿病中使用CTB交联的胰岛素[289]，在Ⅱ型胶原相关关节炎中气雾吸入25mg胶原结合CTB可有效预防关节炎，甚至在病损诱导注射后1周也有效[290]。最后，同种胸腺细胞结合CTB可显著地延长心脏移植的生存。这些鼓舞人心的发现促使开展交联CTB的早期临床研究，结果显示经鼻给药时，剂量提高到100mg可较好地产生耐受。

变态反应的治疗

用过敏原进行脱敏疗法已经进行了几十年，但仅在基因克隆时代，一些主要变态原（少数例外）才得以鉴定。已经克隆大多数重要变态原分子，它们等位多态性也进行了研究[291]。IgE形成密切依赖于T细胞辅助和IL-4，所有现在研究的重点在于鉴定相关的T细胞表位，并使用它们诱导耐受。根据前几节所提到的研究，可推测口服肽诱导的耐受有可能阻止完整变态原的免疫反应。例如，家尘螨的主要变态原是222个氨基酸的蛋白Der p 1。用此蛋白免疫小鼠，发现可产生至少4种特异性的T细胞表位，还有其他隐藏性表位。口服多肽能明显抑制完整蛋白在小鼠诱导免疫应答的能力，这包括阻碍T细胞对非口服多肽表位的免疫反应[292]。皮下注射变态原，这种传统形式的脱敏方式现在被认为至少部分是由于抑制了IL-4分泌型的$CD4^+$ T细胞，而正是这种细胞在诱导产生IgE中起到辅助作用[293]。在桦树花粉抗原Bet v1的变态反应小鼠模型，大量的皮下注射一个T细胞免疫优势表位-BV139，从而减弱整个蛋白的T细胞应答[294]。有趣的是DNA免疫途径也能产生同样效果[295]。在大鼠肌内注射编码家尘螨变态原Der p 5的质粒，可产生IgG2a、IgG1而不是IgE抗体。DNA疫苗可防止IgE合成和呼吸道高敏状态，与气雾吸入变态原相一致。此类结果是和T细胞反应从Th2型转移到Th1型相一致的[296]，但应注意到在抑制变态反应时$CD8^+$ γδ T细胞也可能参与其中。

1417

至今为止，在人类使用多肽进行脱敏治疗的数据只在会议上报道过（W. R. Thomas，个人通信），而有可能即将获得成功的是注射蜂毒和猫皮屑变态原。但是对于患者而言，注射多肽确实更易忍受。

以上提及的负性疫苗系主要用以治疗已经存在的疾病，更高的目标将是预防对环境变态原的初始致敏。本质上看，这意味着阻碍变态原诱导Th2细胞应答。

Holt[297]指出，考虑到在许多工业国家哮喘发病率的逐渐增多和先天性过敏症的经济影响，一个完整、大范围的预防策略应该慎重地进行。3岁之前的大多数小孩对食入和吸入的普遍变态原产生IgG抗体。这个反应随时间逐渐减弱，可能是因为存在抗原介导的下调机制。同时也注意到小孩对食物变态原也会产生低水平的IgE，但在非过敏体质个体IgE抗体会逐渐减弱。其中针对空气变态原的IgE增降均更为缓慢。先天性过敏症可能是因为在一些个体中Th2型细胞较Th1型细胞占有优势。与吸入变态原相比，食入变态原较为少见，有可能是因为所需的剂量不同。Holt还描述了一个免疫向Th1偏移和T细胞变态反应的保护机制来解释这种差异，即在呼吸道是最为有效的清除吸入抗原，而在消化道是建立最为完美的免疫应答。所以预防呼吸道变态反应（大多数是哮喘）的公认策略是口服天然或合成抗原（因地域区别而不同）。对于大多数疾病而言，有限几种抗原均为有效，而且还存在已讨论的旁观者效应。由于组合的合成多肽可使用在更为有效的鼻腔给药途径，也值得考虑。随着人类先天性过敏症相关基因的逐步鉴定，有助于明确不同高敏个体的治疗方案。由于在生命前3个月暴露于高水平的吸入性变态原可导致致敏，并且锁定Th2方向的应答，因此在

护理中估计吸入变态原降低的水平也十分重要[298]。有趣的是，频繁的呼吸道感染将产生一个有利于 Th1 诱导的环境，从而阻碍诱导变态反应状态。当然，这不值得鼓励。

疫苗的不良反应

有三个考虑说明疫苗不良反应的严重性。第一，疫苗一般正常个体使用，这与患者使用的其他生物制剂不同。第二，大多数疫苗是宝贵而脆弱的婴儿和儿童使用。第三，在发达国家，非常成功的免疫程序、很好的个人和环境卫生和提高的生活质量使流行性疾病变得陌生。并且抗生素和其他医疗处理可以对付它。换而言之，免疫接种的反对者可解释为由于缺乏个人经历不能理解疫苗的危险-回报公式。这需要通过很好的教育来克服。

幸运的是使用疫苗的严重不良反应事件至今尚未发生。这个现象第一眼看起来是有点奇怪。如果几乎所有儿童在生命的头一年注射相当少量的疫苗，那些本应该免疫接种的婴儿将会由于某些罕见疾病（如脑炎）减少一个合理的比例。这个并非因果而是相关关系的假设是十分人道的，而且仅能是那些大多数人不熟悉的统计学争论。我们将首先考虑被认为更为严重的不良反应。

最有争议的疫苗来源于包含完整灭活百日咳菌的 DPT 疫苗的不良反应。发烧、过敏、局部肿痛、食欲减退和嗜睡等反应十分普遍，虽然持续期短且易被药物（如扑热息痛）控制。2000～3000 例中有一例发热惊厥，他们也不导致长期损伤。随访数据也无神经损伤或智力障碍的证据。另一个特别关心的问题是引起严重急性神经疾病（如脑病）。1981 年英国的数据是每 33 万份疫苗量中有一例，但是重新分析这些数据和医学学院在美国的大量研究均挑战这个结论。美国小儿科学院发现[299]，虽然“积累至今的数据并不能证实百日咳疫苗不能导致脑损害，但是如果这种损害存在，其发生非常罕见”。美国医学学院的结论是严重脑损害的发生率为 0～20 万分之一。自从在美国使用这种疫苗，百日咳的发病数量下降了 50 倍。由于这种疾病伴有 1% 的脑损害和 0.1%～4%死亡率，根据这个研究，即使最糟糕的疫苗脑损害假设，这种疫苗不良反应的危险-回报公式还是非常的有利。

通过测定局部肿痛等表面参数，无细胞百日咳的确导致很少的急性反应。然而在这个疫苗的实际发展中，需要大量的实验决定是否这种纯疫苗具有更少的严重的不良反应。

医学学院的研究确定下面宣称的 DTP（完整细胞的百日咳）不良反应并不被事实支持：婴儿痉挛、肌痉挛性脑波、Reye 综合征和婴儿猝死综合征。然而似乎可将“长期时间、无法安慰缓解的哭泣”与罕见并发症联系起来。

下一个重要关心的领域是脊髓灰质炎。由于在工业化国家脊髓灰质炎病例已多年没有出现，其疫苗的不良反应显得更为重要。事实上 1991 年西半球脊髓灰质炎的传播已经停止。这样即使发生一例疫苗相关的脊髓灰质炎也成为一个悲剧。不幸的是脊髓灰质炎沙宾疫苗病毒存在导致神经毒的返祖现象，虽然十分罕见。其在 270 万个口服脊髓灰质炎病毒疫苗（一般在 3 型沙宾疫苗）剂量中发生一次。在美国每年平均有 5 个这样的病例。一些是由于疫苗，一些是由于接触。 *1418*

Joce 等人报道在 1985～1991 年间英格兰和威尔士总共有 21 例证实为麻痹性脊髓灰质炎的病例。13 例是疫苗相关，其中 9 例由接种引起，4 例由接触引起。5 例为外来病例，3 例病源不清。疫苗相关的瘫痪危险为一次剂量 $\frac{1.46}{1000\,000}$，2 次剂量为 $\frac{0.49}{1000\,000}$，三次剂量为 0。总的来说，在 7 年期间给予的 1.84 亿个免疫剂量中有 9 个瘫痪病例。这和美国的 270 万剂量中发生一次相似。两个疫苗相关的病例是免疫缺陷儿童，应该提供给他们无活性的脊髓灰质炎病毒疫苗（IPV）。

尽管口服脊髓灰质炎病毒疫苗（OPV）危险性非常的小，美国现在建议 2 次 IPV 后 2 次 OPV 或者 4 次 IPV 作为大众的预防选择。必须要提醒的是麻痹性脊髓灰质炎的死亡率是 5%～10%，主要是由于延髓的脊髓灰质炎。所以这个危险-回报公式还是有利于这种疫苗的使用。

一个人能拟出大量的“指控”来反对疫苗。的确,减毒活疫苗在免疫缺陷或免疫抑制的儿童可导致损害,如牛痘可能就是最好的例子。现在天花已经被根除,这个危险也消失了。如果牛痘病毒变种作为一种疫苗载体保留的话,他将是更少毒力的病毒。

一个人能逐一审查现存疫苗,鉴定它们的不良反应。麻疹疫苗可伴随温和的麻疹。然而对于未免疫的个体,麻疹是令人生厌的疾病,在第三世界未免疫婴儿的死亡率为2%~3%,在工业化世界其死亡率低得多,为0.01%~0.02%。而且普遍存在非死亡性的并发症,包括耳炎、肺炎和亚急性硬化性全脑炎(SSPE)。就这种关心的减毒活疫苗而言,脑炎和其他相似问题少有报道,但很难阻止。减少这些罕见、推测的并发症和那些已知较为普遍的并发症(如发热惊厥)的可行性在现阶段还不清楚。

麻疹疫苗和其共用者(流行性腮腺炎、风疹和很快包括的水痘)在不导致严重并发症方面有很好的记录。只要说它们是减毒活疫苗,就可推测在特定患者可导致问题。其反应较为温和,包括不适、发热、温和出疹和发热惊厥(罕见)。一个报告[301]调查麻疹、流行性腮腺炎和风疹疫苗使用后血小板减少性紫癜发生率。麻疹或风疹疫苗单独使用是五十万分之一,联合使用时是十二万分之一,而麻疹、流行性腮腺炎和风疹疫苗三联使用则为十万五千分之一。天然麻疹和风疹感染时可发生类似紫癜的综合征。89.5%的患者完全康复,而正常后有7%复发,未报道死亡。在几个其他国家获得与French研究相一致的结果。当一个似乎合理的因果关系被争论时,通常令人赞许的结果确保罕见的并发症不能显著改变这些疫苗的危险-回报公式。流行性腮腺炎疫苗偶尔可能导致无菌性脑膜炎[302]。

牛痘在使用时是一个合理的反应原性疫苗,但对于免疫缺陷-免疫抑制儿童十分危险。幸运的是由于天花的根除,这再不是问题。普遍意义上讲,这些患者也可能发生针对BCG、水痘、麻疹或其他活疫苗的严重反应。

在这些疫苗的辅料或佐剂也引起从炎症到脓肿形成的不良反应。更为严重的是疫苗偶尔导致过敏反应、血小板减少症和急性关节炎。这些严重并发症的发生率少于十万分之一。

总而言之,已经通过现在严格的审查过程的疫苗是非常的安全。这个事实应广泛的宣传,特别是传播媒体需通过持续和合作的努力进行教育。

前景

正如本章所示,疫苗学类似于文艺复兴时期。现在令人吃惊的大量临床前研究的努力将产生新的不断提高的产品。进一步的发展将聚焦于下面三个不确定问题。即现在的临床前研究最终有多少进入市场成为产品?组合疫苗和新的免疫方法将简化免疫方案到什么样程度(没有这些简化方案,婴儿免疫程序可能过于繁琐、困难)?新疫苗在什么情况下才可能提供给世界上所有的儿童和成人,而不仅是发达国家的公民?最后的问题是所有问题中最为重要的。这不仅仅是因为它具有人道的一面,而且是由于根除疾病(理论上可能大多数主要病原体)需要覆盖全球。很清楚疫苗学的将来不仅在科学家和公共健康官员手中,而且依赖社会态度和政治考虑。正是如此,这是免疫学界的义务,也包括阅读此卷的读者,他们将会成为全球免疫牢靠而鲜明的支持者。

疫苗和免疫接种的全球项目

在1993年,意识到EPI带来的巨大进展,WHO决定将疫苗领域的几乎所有努力集中于疫苗和免疫接种的全球计划(GPV)。这由两个现存的项目组成,EPI和一个被称之为PVD的促进和协调项目,这个项目促进提供充足的合适质量的疫苗。随后,1990年在纽约举行的儿童高峰会促成一个伞状组织结构的儿童疫苗促进会(CVI),它代表疫苗领域内几乎所有参与者的一个联盟,不仅仅WHO。在1993年,J.W. Lee博士出任GPV的主管和CVI的管理主席,在相互影响的机构间提供最好的合作。同时也决定成立单一的专家科学顾问小组(SAGE),为GPV和CVI提供科学指导。WHO的主管也给予作者最高的荣誉,请求其担任SAGE的主席。这样保证那些不在GPV中的努力成果,如艾滋病疫苗和抗寄生虫疫苗,能进入GPV的丰富知识,反之也

1419

是如此。这主要是通过与如下两个相关组织的正式和非正式的联系获得，一个是 Perter Piot 博士管理的 UNAIDS，一个是在 Tore Godal 博士管理下的热带疾病研究项目。尽最大可能，GPV 和 SAGE 将更大地在国际、区域研究项目及主要的厂商视为实际的伙伴，与他们创造一系列生动的交流渠道。在一个并不完美的世界，全球产生新的高效疫苗和使它们通过努力被合理地利用起来。资源的限制仍然是更快速进展的主要限制。在过去 23 年历史中，EPI 仅推荐 2 种新的疫苗——乙肝和黄热病疫苗，这清醒地提醒离目标还有很长的道路。

根除疾病的机会

天花的胜利显示在全球根除一种疾病是可能的。假设有一种有效的疫苗，在生物圈没有动物或其他宿主，一个真正的世界范围的组织就有可能根除相当数量的疾病。如果人类认真处理这个问题，第三个千年的第一个世纪可能就是实现的时候。

在 1985 年，EPI 发起后的 11 年，泛美健康组织确定了根除脊髓灰质炎的目标。这个策略有三个基础元素[303]：第一完成和维持高的 OPV 免疫接种水平；第二有效监察和精确的诊断；第三在新病例周围区域范围免疫。古巴是第一个发起这项国际运动的国家。从 1986～1989 年，美洲所有地方下降了 86%。到 1990 年只报道了 18 个病例。“清扫行动”在 1989 年开始，包括在认为危险的区域开展特殊的逐户运动。在 1991 年 8 月最后一例脊髓灰质炎发生在秘鲁。在 1994 年一个国际间委员会证明在西半球根除了脊髓灰质炎[304]。

在 2000 年 WHO 开始领导全球根除脊髓灰质炎。6 月内婴儿免疫接种达到大约 85%，但单有这个努力还不能完成这个目标。一个特别有价值的方法是建立国际免疫接种日（NID）。这些特别的日子通常在冬天，在这个季节脊髓灰质炎自然传播低，在这一天整个国家动员大量人力、物力免疫所有的适龄儿童（通常＜5 岁），无论其以前的免疫历史，其目的是抓住正常不易接触且还没有免疫的个人。NID 引人注目的成功，这归功于相关国家的健康官员和政治领导者，以及国际扶轮社（Rotary International），通过它的脊髓灰质炎附加运动（polio plus campaign）提供了来源于私人的数百万美元，并在发动当地志愿者支持方面起了重要作用，当然也包括百万计的志愿者。

中国也是一个显著成功的例子。NID 用于 1993 年 12 月和 1994 年 1 月，在随后两年重复。1996 年，在中国只有 3 个被证实的病例，并且均为入境带来。在老挝和柬埔寨只有 4 例。一个最为显著的例子是印度。这个次大陆在 1995 年 12 月开始他们的努力。1997 年 1 月，作者在新德里正好是那个季度第二个 NID。不可相信的是总共大约 1.67 亿 5 岁以下儿童接受了疫苗，不仅在印度，也包括这个次大陆的其他所有国家。这涉及 350 万志愿者和 65 万个免疫接种站。一个中东、高加索和中亚 18 个国家的组织被称之为 MECACAR，这些国家中大多数 NID 的成功率超过 95%。非洲 1996～1997 年冬天，Nelson Mandela 担任“脊髓灰质炎踢出非洲”运动的主席，在非洲联盟组织的赞助和 WHO 非洲地区官员的支持下，42 个国家开始了 NID。这些努力使得在 2000 年或稍晚时候根除脊髓灰质炎还是有可能的。

要消除脊髓灰质炎，疾病的监控是一个重要的环节。这包括一个报告各类急性软瘫病例的体系，以及一个实验室体系，通过检验粪便样品来确定诊断。当疾病传播链仅限于一些地区时，要撤消必需免疫就需要有好的监控体系。在传播停止后，仍需要多年的监控，以保证疾病确实消失，这样才能确认该疾病的消灭。

麻疹虽然具有强的传染性，但消灭脊髓灰质炎过程中的经验可以用于消除该疾病。WHO 美洲部已制定了 2000 年前消除麻疹的目标。在许多国家中，95%的婴幼儿免除了麻疹。在古巴及讲英语的加勒比海地区国家、智利，已停止了麻疹的传播。加勒比海地区国家已有 6 年未发生麻疹。在斯堪的纳维亚半岛的一些国家，已停止了麻疹、流行性腮腺炎和风疹的传播。这里有必要提及一个发生在英国的事例[3]。1993 年，在初中儿童中出现小规模的麻疹流行，运用合理的疫苗有效性假设对可能的易感人群进行流行病学研究，表明在学龄儿童中存在小规模流行的可能性。于是在 1994 年，启动了一个全国性免疫计划，目标人群为 5～16 岁的儿童，他们被接种了一种麻疹-风疹疫苗；约 8 百万儿童接受了巡回护士的免疫接种，约占目标人群的 90%。罕有严重不良反应的相关报道，约 10 万分之 7。这样，在英国几乎消除了麻疹，偶发的病例缘于入境

人口。

WHO也制定了全球消除麻疹的最后日期,但只有消除了脊髓灰质炎之后才好执行。这里,疾病的监控系统同样重要,因为有多种皮疹与麻疹的相似。考虑到目前的麻疹疫苗对小于9个月的婴儿无效,一些专家认为消除麻疹的障碍可能是4~6月(母体来源的被动免疫消退)与9个月之间的婴儿这一易感人群。因此,目前有研究试图研制在婴儿体内仍存在母体抗体时就有效的疫苗方案。

有人批评上述消灭传染病的努力和NID是纵向垂直计划,可能抢占了那些更广范围的卫生计划的资源。然而,在许多情况下,NID也提供了延伸活动的机会,如提供维生素A或在其他疾病中应用疫苗;而且NID要求全社会动员,这也促进了社会的健康意识,从而有利于那些常规卫生计划的实施。最后一点,永久地消除某疾病使之成为最经济有效的措施。

1420

婴幼儿和老年人的疫苗接种

这两个极端年龄的人群为新型和改良疫苗的设计者提出了特殊的要求。一些疫苗在生命的极早期接种,方能达到最佳效果,包括那些针对母体传播性疾病的疫苗,如乙型肝炎、丙型肝炎、HIV或CMV。在发展中国家,婴儿在出生后几天内会被常规BCG。针对老年人,也有一些相应的疫苗,包括流感和肺炎球菌疫苗。目前在保护老年人健康方面已兴起了极大的热情。

对于新生期的小鼠和人,其免疫系统存在相当程度的不成熟[305]。另外,这时期的小鼠体内免疫应答倾向于Th2型,若以后再给予加强免疫,该型应答还可能持续。在幼体内,难以诱发CTL应答。这一Th2/Th1型别的不平衡能被特定的佐剂部分地纠正,如含有块状共聚物的油包水佐剂,但常伴发明显的局部毒性[306]。一个令人兴奋的发现是,用DNA疫苗一次性免疫1周龄的小鼠,能诱发Th1型、以IgG2a为主的抗体应答,以及T细胞经体外再刺激后,分泌Th1型细胞因子[307];而且也出现了特异性CTL应答。分别编码麻疹病毒血凝素、破伤风毒素C片段或仙台病毒核蛋白的3种DNA疫苗,具有类似的免疫效应。然而,若小鼠在新生期已接受Th2型的免疫接种,DNA疫苗则不能诱发出上述类似成年小鼠的免疫应答。这又是一个例子,表明免疫应答如何可被“锁定”为一种模式。DNA疫苗这种可诱发Th1型免疫应答的特性,可能非常有利于研制针对人类AIDS核TB的DNA疫苗。另一方面,尚未开始对人类新生儿的临床试验。

在生命的另一端,即老年期,一些因素使得免疫应答效能衰退。胸腺皮质大部分被脂肪代替,不能或仅产生极少量的T细胞。这样针对新抗原的T细胞免疫必须依赖与以前致敏抗原的交叉反应。同时,骨髓中的B细胞前体细胞数目也会减少,但不像胸腺中的T细胞那样明显。有趣的是,大于65岁的老年人外周血中的DC数目略有增多,且形态和表面标志正常,也具有正常的抗原呈递能力[308]。这可能部分地弥补了衰老T细胞增殖活性的下降[309]。总体而言,在老年期,产生血清抗体应答的能力可能下降了约10倍。

众所周知,老年人相对易于发生结核、流感和肺炎等感染性疾病。有关破伤风,存在一个有趣但不常见的现象。有研究表明:25%~40%的健康老年人血清中存在防御水平的抗破伤风抗体,而30岁的成年人则有92%存在该抗体,这主要是因为老年人没有接受每10年一次的加强免疫。然而,70岁以后的老年人接受加强免疫的频率可能必需增加。免疫预防流感和肺炎球菌明显减少了老年人群中相关感染的发生率,这一事实促使我们研制其他对老年人有用的疫苗,尤其考虑到多种抗生素耐性菌株的出现和多种隐性感染病毒的潜在威胁,我们更有必要加紧该方向的研究。例如,急需研究用水痘疫苗预防以后带状疱疹的发生。

新的疫苗策略

在本章讨论的新型疫苗策略中,DNA疫苗、优化的佐剂方案、微包囊法和黏膜免疫具有较好的前景。虽然笔者对它们抱有很大的热情,但也意识到只有进行了非常广泛的临床研究之后,才可能改变国家性免疫计划,这一点尤其适用于那些已存在有效疫苗的疾病。因此,对于一个被少数人批评的策略,未来将会在相应的保守主义和谨慎的行动主义之间寻求一种合理的平衡,同时用充分的研究来评价每一种新的或改良疫苗的效能。也不应该反对一种健康的多元主义。一些国家由于其特殊的国情和存在问题的不同,会在某些疫苗发展和应

用上取得较快进展。这一切意味着来自研究机构的精良疫苗之推广速度可能要落后于研究者的预期。但新的疫苗学进展最终会使多种传染性疾病的防治手段发生革命。我们已很好地继承了 Jenner 和 Pasteur 的遗产。

致谢

笔者感谢众多友好的同事提供的材料和允许引用一些未发表的结果。也感谢世界卫生组织(WHO)提供并允许引用一些数据。特别感谢笔者的疫苗学导师 Dr. P. -H. Lambert。

(万　瑛 译)

参 考 文 献

1. *State of the world's vaccines and immunization, 1996.* Geneva: World Health Organization and United Nations Children's Fund, Publication WHO/GPV/96.04, 1996:161 pp.
2. Baker PJ, ed. *The Jordan Report. Accelerated development of vaccines.* Bethesda, MD: Division of Microbiology and Infectious Diseases, NIAID, NIH, 1996:79 pp.
3. Salisbury DM, Begg NT, eds. *Immunization against infectious disease. Edward Jenner Bicentenary Edition.* London: Department of Health, 1996.
4. Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID. *Smallpox and its eradication.* Geneva: World Health Organization, 1988:1460 pp.
5. Silverstein AM. The royal experiment on immunity, 1721–1722. *In: A history of immunology.* San Diego: Academic Press, 1989:24–37.
6. Jenner E. *An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of cow pox.* London: Published privately, 1778.
7. Jenner E. *The origin of the vaccine inoculation.* London: DN Shury, 1801.
8. Pasteur L, Joubert J, Chamberland C. The germ theory of disease. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1878;86:1037–1052.
9. Pasteur L. De l'attenuation du virus du cholera des poules. *C R Acad Sci Paris* 1880;91:673–680.
10. Pasteur L, Chamberland CE, Roux E. Sur la vaccination charbonneuse. *C R Acad Sci Paris* 1881;92:1378–1383.
11. Levine MR. Vaccines and vaccination in the historical perspective. In: Woodrow GC, Levine MM, eds. *New generation vaccines.* New York: Marcel Dekker Inc, 1990:3–17.
12. Calmette LCA, Guérin C, Weill-Hallé B. Essai d'immunisation contre l'infection tuberculeuse. *Bull Acad Med (Paris)* 1924;91:787–796.
13. von Behring EA, Kitasato S. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Dtsch Med Wochenschr* 1890;16:1113–1114.
14. Glenny AT, Hopkins BE. Diphtheria toxoid as an immunising agent. *Br J Exp Pathol* 1923–1924;4:283–288.
15. Enders JF, Weller TH, Robbins RC. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science* 1949;109:85–87.
16. Hilleman MR. The development of live attenuated mumps virus vaccine in historic perspective and its role in the evolution of combined measles-mumps-rubella in vaccinia, vaccination and vaccinology. In: Plotkin S, Fantini B, eds. *Jenner, Pasteur and their successors.* Paris: Elsevier Science, 1996:283–291.
17. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965;191:541–546.
18. Blumberg BS. Australia antigen, hepatitis, and leukemia. *Tokyo J Med Sci* 1968;76:1.
19. Hilleman MR, McAleer WJ, Buynak EB McLean AA. The preparation and safety of hepatitis B vaccine. *J Infect* 1983;7:3–8.
20. Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 1982; 298:347–350.
21. Pizza M, Fontana MR, Giuliani MM, et al. A genetically detoxified derivative of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin induces neutralizing antibodies against the A subunit. *J Exp Med* 1994;180:2147–2153.
22. Rappuoli R. New and improved vaccines against diphtheria and tetanus. In: Woodrow GC, Levine MM, eds. *New generation vaccines.* New York: Marcel Dekker Inc, 1990:251–268.
23. Mackett M, Smith GL, Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:7415–7419.
24. Panicali D, Paoletti E. Construction of pox viruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:4927–4931.
25. Moss B, Flexner C. Vaccinia virus expression vectors. *Annu Rev Immunol* 1987;5:305–324.
26. Ramshaw IA, Andrew ME, Phillips SM, Boyle DB, Coupar BEH. Recovery of immunodeficient mice from a vaccinia/IL-2 recombinant infection. *Nature* 1987;329:545–546.
27. Taylor J, Weinberg R, Tartaglia J, et al. Nonreplicating viral vectors as potential vaccines: recombinant canary pox virus expressing measles virus fusion (F) and hemagglutinin (HA) glycoproteins. *Virology* 1992;187:321–328.
28. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990;247:1465–1468.
29. Williams RS, Johnstone SA, Reidy M, Devit MJ, McElligott SG, Sanford JC. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2726–2730.
30. Tang DC, Devit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992;356:152–154.
31. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993;259:1745–1749.
32. Montgomery DL, Shiver JW, Leander KR, et al. Heterologous and homologous protection against influenza-A by DNA vaccination-optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol* 1993;12:777–783.
33. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. DNA vaccines—protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11478–11482.
34. Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 1997;15:617–648.
35. Boshart M, Weber F, John G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 1985;41:521–530.
36. Fu T-M, Ulmer JB, Caulfield MJ, et al. Priming of CTL by DNA vaccines: requirement for professional APCs and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol Med* 1997;3:362–371.
37. Bevan MJ. Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes *in vivo*. *J Exp Med* 1995;182:639–641.
38. Donnelly JJ, Friedman A, Martinez D, et al. Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine-enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nat Med* 1995;1:583–587.
39. Lu S, Santoro JC, Fuller DH, Haynes JR, Robinson HL. Use of DNAs expressing HIV-1 env and non-infectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice. *Virology* 1995;209:147–154.
40. Letvin NL, Montefiori DC, Yasutomi Y, et al. Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV DNA protein vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9378–9383.
41. Kim JJ, Ayyavoo V, Bagarazzi ML, et al. *In vivo* engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. *J Immunol* 1997;158:816–826.
42. Arntzen CJ. Edible vaccines produced in transgenic plants. In: Baker PJ, ed. *The Jordan Report. Accelerated development of vaccines.* Bethesda, MD: Division of Microbiology and Infectious Diseases, NIAID, NIH, 1996:43–48.
43. Nossal GJV, Ada GL, Austin CM. Antigens in immunity. II. Immunogenic properties of flagella, polymerized flagellin and flagellin in the primary response. *Aust J Exp Biol* 1964;42:283–294.
44. Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace V. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol* 1926;29:38–45.
45. Freund J, McDermott K. Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1942;49:548–553.
46. Morein B, Sundquist B, Höglund S, Dalsgaard K, Osterhaus A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature* 1984;308:457–460.
47. Lövgren K, Lindmark J, Pipkorn R, Morein B. Antigenic presentation of small

molecules and synthetic peptides conjugated to a preformed iscom as carrier. *J Immunol Methods* 1987;98:137-143.
48. Barr IG, Mitchell GF. ISCOMs (immune stimulating complexes): the first decade. *Immunol Cell Biol* 1996;74:8-25.
49. Weiss HP, Stitz L, Becht H. Immunogenic properties of ISCOMs prepared with influenza virus glycoprotein. *Arch Virol* 1990;114:109-120.
50. Alving CR, Detrick B, Richards RL, Lewis MG, Shafferman A, Eddy GA. Novel adjuvant strategies for experimental malaria and AIDS vaccines. *Ann NY Acad Sci* 1993;690:265-275.
51. Allison AC, Gregoriades G. Liposomes as immunologic adjuvants. *Nature* 1974; 252:252.
52. Sanchez Y, Ionescu-Matiu I, Dressman GR, et al. Humoral and cellular immunity to hepatitis B virus-derived antigens: comparative activity of Freund's complete adjuvant, alum and liposomes. *Infect Immun* 1980;30:728-733.
53. Chinnap AD, Baig MA, Tizard IR, Kemp MC. Antigen-dependent adjuvant activity of a polydispersed β-(1-4)-linked acetylated mannan (acemannan). *Vaccine* 1992;10:551-557.
54. Hamuro J, Chihara G. Lentinan, a T cell-oriented immunopotentiator. In: Fenichel RL, Chirigos MA, eds. *Immune modulation agents and their mechanisms*. New York: Marcel Dekker Inc, 1984:409-436.
55. Okawa Y, Howard CR, Steward MW. Production of anti-peptide antibody in mice following immunization of mice with peptides conjugated to mannan. *J Immunol Methods* 1992;142:127-131.
56. Ohta M, Kido N, Hasegawa T, et al. Contribution of the mannan side chains to the adjuvant action of lipopolysaccharides. *Immunology* 1987;60:503-507.
57. Lett E, Gangloff S, Zimmermann M, Wachsmann D, Klein JP. Immunogenicity of polysaccharides conjugated to peptides containing T- and B-cell epitopes. *Infect Immun* 1994;62:785-792.
58. Apostoulopoulos V, Pietersz G, Loveland BE, Sandro MS, McKenzie IFC. Oxidative/reductive conjugation of mannan to antigen selects for T_1 or T_2 immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10128-10132.
59. O'Brien-Simpson NM, Ede NJ, Brown LE, Swan J, Jackson DC. Polymerization of unprotected synthetic peptides: a view towards synthetic peptide vaccines. *J Am Chem Soc* 1997;119:1183-1188.
60. Zeng W, Jackson DC, Rose K. Synthesis of a new template with a built-in adjuvant and its use in constructing peptide vaccine candidates through polyoxime chemistry. *J Peptide Sci* 1996;2:66-72.
61. Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 5409-5413.
62. Davenport RM. Seventeen years experience with mineral oil adjuvant influenza virus vaccines. *Ann Allergy* 1968;26:288-292.
63. Ott G, Barchfeld GL, Chernoff D, Radhakrishman R, van Hoogevest P, Van Nest G. MF59: design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. In: Powell MF, Newman MJ, eds. *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*. New York: Plenum Press, 1995:277-296.
64. Valensi J-PM, Carlson JR, Van Nest GA. Systemic cytokine profiles in Balb/c mice immunized with trivalent influenza vaccine containing MF59 oil emulsion and other advanced adjuvants. *J Immunol* 1994;153:4029-4039.
65. Byars NE, Allison AC. Adjuvant formulation for use in vaccines to elicit both cell-mediated and humoral immunity. *Vaccine* 1987;5:223-228.
66. Chang TMS. Biodegradable, semi-permeable microcapsules containing enzymes hormones, vaccines and other biologicals. *J Bioeng* 1976;1:25-32.
67. Langer R. Polymers for the sustained release of macromolecules: their use in a single-step method of immunization. *Methods Enzymol* 1981;73:57-75.
68. O'Hagan DT, Rakman D, McGee JP, et al. Biodegradable microparticles as controlled release antigen delivery systems. *Immunology* 1991;73:239-242.
69. Eldridge JH, Staas JK, Meulbrock JA, et al. Biodegradable and biocompatible poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect Immun* 1991;59:2978-2986.
70. Aguado MT, Lambert PH. Controlled-release vaccines—biodegradable polylactide/polyglycolide (PL/PG) microspheres as antigen vehicles. *Immunobiology* 1992;184:113-125.
71. Schwendeman SP, Gupta RK, Constantino HR. Stabilization of tetanus and diphtheria toxoids against moisture-induced aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11234-11238.
72. Chang A-C, Gupta RK. Stabilization of tetanus toxoid in poly (DL-lactide-co-glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen. *J Pharm Sci* 1996;85:129-132.
73. Sanchez A, Gupta RK, Alonso MJ, et al. Pulsed controlled-release system for potential use in vaccine delivery. *J Pharm Sci* 1996;85:547-552.
74. McGee JP, Davis SS, O'Hagan DT. The immunogenicity of a model protein entrapped in poly (lactide-co-glycolide) microparticles prepared by a novel phase-separation technique. *J Cont Rel* 1994;31:55-60.
75. Sah H, Toddywalla R, Chien YW. Continuous release of proteins from biodegradable microcapsules and *in vivo* evaluation of their potential as a vaccine adjuvant. *J Cont Rel* 1995;35:137-144.
76. Macdonald L, Kleinig M, Cox J. A single dose (two component) experimental influenza vaccine. *Proc Intern Symp Control Rel Bioact Mater* 1997;24:1-2.
77. O'Hagan DT, Palin KJ, Davis SS. Poly (butyl-2-cyanoacrylate) particles as adjuvants for oral immunization. *Vaccine* 1989;7:213-216.
78. Moore A, McGuirk P, Adams S, et al. Immunization with a soluble recombinant HIV protein entrapped in biodegradable microparticles induces HIV-specific $CD8^+$ cytotoxic T lymphocytes and $CD4^+$ Th1 cells. *Vaccine* 1995;13: 1741-1749.
79. Vordermeier HM, Coombes AGA, Jenkins P, et al. Synthetic delivery system for tuberculosis vaccines: immunological evaluation of the *M. tuberculosis* 38 kDa protein entrapped in biodegradable PLG microparticles. *Vaccine* 1995;13: 1576-1582.
80. Ellouz F, Adam A, Ciorbaru R, Lederer E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycans. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;59:1317-1325.
81. Chedid L, Parant MA, Audibert FM, et al. Biological activity of a new synthetic muramyl dipeptide devoid of pyrogenicity. *Infect Immun* 1982;35:417-424.
82. Allison AC, Byars NE. An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and cell-mediated immunity. *J Immunol Methods* 1986;95:157-168.
83. Johnson AG, Tomai M, Solem L, Beck L, Ribi E. Characterization of non-toxic monophosphoryl lipid. *Rev Infect Dis* 1987;9:S512.
84. Morein B, Lövgren-Bengtsson K, Cox J. Modern adjuvants: functional aspects. In: Kaufmann SHE, ed. *Concepts in vaccine development*. Berlin: Walter de Gruyter, 1996:243-263.
85. Ruby J, Brinkman C, Jones S, Ramshaw IA. Response of monkeys to vaccination with recombinant vaccinia virus which co-express HIV gp160 and human interleukin-2. *Immunol Cell Biol* 1990;68:113-117.
86. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th-2-like helper effectors. *J Immunol* 1990;145:3796-3806.
87. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas-de St Groth B. The presence of interleukin 4 during *in vitro* priming determines the lymphokine-producing potential of $CD4^-$ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992;176: 1091-1098.
88. Hsieh C-S, Macatonia SE, Tripp CS, Wolff SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH-1 $CD4^+$ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 1993;260:547-549.
89. Macatonia SE, Hoskin NA, Litton M, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive $CD4^+$ T cells. *J Immunol* 1995; 154:5071-5079.
90. Snapper CM, Paul WE. Interferon-γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987;236:944-947.
91. Defrance T, Vanbervliet B, Briere F, Durand I, Bousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor β cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med* 1992;175: 671-682.
92. Schijns VE, Claassen IJ, Vermeulen AA, Horzinek MC, Osterhaus AD. Modulation of anti-viral immune responses by exogenous cytokines. *J Gen Virol* 1994; 75:55-63.
93. Dempsey PW, Allison MED, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 1996;271:348-350.
94. Sun J-B, Holmgren J, Czerkinsky C. Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10795-10799.
95. Sun J-B, Rask C, Olsson T, Holmgren J, Czerkinsky C. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by feeding myelin basic protein conjugated to cholera toxin B subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7196-7201.
96. Neutra MR, Pringault E, Krahenbuhl J-P. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:275-300.
97. Holt PG, Schon-Hegrad MA, McMenamin PG. Dendritic cells in the respiratory tract. *Int Rev Immunol* 1990;6:139-149.
98. Holt PG, Haining S, Nelson DJ, Sedgwick JD. Origin and steady state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *J Immunol* 1994;153:256-261.
99. Neutra MN, Krahenbuhl J-P. Transepithelial transport and mucosal defence. I. The role of M cells. *Trends Cell Biol* 1992;2:134-138.
100. Ermak TH, Dougherty EP, Bhagat HR, Kabok Z, Pappo J. Uptake and transport of copolymer biodegradable microspheres by rabbit Peyer's patch M cells. *Cell Tissue Res* 1995;279:433-436.
101. Neutra MR, Giannasca PJ, Giannasca KT, Krahenbuhl J-P. M cells and microbial pathogens. In: Blaser M, Smith P, Ravdin J, Greenberg HG, Guerrat R, eds. *Infections of the G-I tract*. New York: Raven Press, 1994:163-178.
102. Picker LJ, Butcher EC. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 1994;62:561-569.

103. Czerkinsky C, Holmgren J. The mucosal immune system and prospects for anti-infectious and anti-inflammatory vaccines. *Immunologist* 1995;3:97–103.
104. McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA, Holt PG. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med* 1994;179:1331–1336.
105. McWilliams AS, Marsh AM, Holt PG. Inflammatory infiltration of the upper airway epithelium during Sendai virus infection: involvement of epithelial dendritic cells. *J Virol* 1997;71:226–236.
106. Nelson DJ, Holt PG. Defective regional immunity in the respiratory tract of neonates is attributable to hyporesponsiveness of local dendritic cells to activation signals. *J Immunol* 1995;155:3517–3524.
107. Elson CJ, Ealding W. Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. *J Immunol* 1984;132:2736–2743.
108. Holmgren J, Lycke N, Czerkinsky C. Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* 1993;11:1179–1184.
109. Clements JD, Hartzog NM, Lyon FL. Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* 1988;6:269–277.
110. Gomez-Duarte OG, Galen J, Chatfield SN, Rappuoli R, Eidels L, Levine MM. Expression of fragment C of tetanus toxin fused to a carboxyl-terminal fragment of diphtheria toxin in *Salmonella typhi* CVD 908 vaccine strain. *Vaccine* 1995; 13:1596–1602.
111. Holmgren J, Czerkinsky C, Lycke N, Svennerholm A-M. Strategies for the induction of immune responses at mucosal surfaces making use of cholera toxin B subunit as immunogen, carrier and adjuvant. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50: 42–54.
112. Sanchez JL, Vasquez B, Begue RE, et al. Protective efficacy of oral whole cell/recombinant B subunit cholera vaccine in Peruvian military recruits. *Lancet* 1994;344:1273–1276.
113. Tamura S, Yamanaka A, Shimohara M, et al. Synergistic action of cholera toxin B subunit (and *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit) and a trace amount of cholera whole toxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* 1994; 12:419–426.
114. Douce G, Fontana M, Pizza M, Rappuoli R, Dougan G. Mucosal immunogenicity and adjuvanticity of site-directed mutant derivatives of cholera toxin. *Infect Immun* 1997;65:2821–2828.
115. Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 1997;336:86–91.
116. Mortimer EA, Kimura M, Cherry JD, et al. Protective efficacy of the Takeda acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids following household exposure of Japanese children. *Am J Dis Child* 1990;144:899–904.
117. Edwards KM, Meade BD, Decker MD, et al. Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic response. *Pediatrics* 1995;96:548–557.
118. Trollfors B, Taranger J, Lagergard T, et al. A placebo-controlled trial of a pertussis toxoid vaccine. *N Engl J Med* 1995;333:1045–1050.
119. Simondon F, Yam A, Gagnepain JY, Wassilak S, Danve B, Cadoz M. Comparative safety and immunogenicity of an acellular versus whole-cell pertussis component of diphtheria-tetanus-pertussis vaccines in Senegalese infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:927–932.
120. Greco D, Salmaso S, Mastrantonio P, et al. A controlled trial of two acellular vaccines and one whole cell vaccine against pertussis. *N Engl J Med* 1996;334: 341–348.
121. Greco D, Salmaso S, Mastrantonia P, et al. A difference in relative efficacy of two DTaP vaccines in continued blinded observation of children following a clinical trial. *Pediatr Res* 1996;39:173A.
122. Rappuoli R. Rational design of vaccines. *Nat Med* 1997;3:1–3.
123. Klein D. Pertussis vaccines: a continuing saga. In: Baker PJ, ed. *The Jordan Report. Accelerated development of vaccines.* Bethesda, MD: Division of Microbiology and Infectious Diseases, NIAID, NIH, 1996:29–32.
124. Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, Reizenstein E, Storsaeter J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med* 1996;334:349–355.
125. Klugman KP, Koornhof HJ, Robbins JB, Le Cam NN. Immunogenicity, efficacy and serological correlate of protection of *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine three years after immunization. *Vaccine* 1996;14:435–438.
126. Hoiseth SK, Stocker BAD. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as a vaccine. *Nature* 1981;291:238–241.
127. Tacket CO, Hone DM, Losonsky G, Guers L, Edelman R, Levine MM. Clinical acceptability and immunogenicity of CVD908 *Salmonella typhi* vaccine strain. *Vaccine* 1992;10:443–446.
128. Levine MM, Galeu J, Barry E, et al. Attenuated *Salmonella* as live oral vaccines against typhoid fever and as live vectors. *J Biotechnol* 1996;44:193–196.
129. Chatfield S, Strahan K, Pickard D, Charles IG, Hormaeche CE, Dougan G. Evaluation of *Salmonella typhimurium* strains harboring defined mutations in htrA and aroA in the murine salmonellosis model. *Microb Pathog* 1992;12:145–151.
130. Sztein MB, Tanner MK, Polotsky Y, Orenstein JM, Levine MM. Cytotoxic T lymphocytes after oral immunization with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi* in humans. *J Immunol* 1995;155:3987–3993.
131. Trach DD, Clements JD, Ke NT, et al. Field trial of a locally produced, killed oral cholera vaccine in Vietnam. *Lancet* 1997;349:231–235.
132. van Leon FPL, Clemens JD, Chakraborty J, et al. Field trial of inactivated oral cholera vaccines in Bangladesh: results from 5 years of follow-up. *Vaccine* 1996; 14:162–166.
133. Jertborn M, Svennerholm A-M, Holmgren J. Intestinal and systemic immune responses in humans after oral immunization with a bivalent B subunit—01/0139 whole cell cholera vaccine. *Vaccine* 1996;14:1459–1465.
134. Kotloff KL, Wasserman SS, O'Donnell S, Losonsky GA, Cryz SJ, Levine MM. Safety and immunogenicity in North Americans of a single dose of live oral cholera vaccine CVD 103-HgR: results of a randomized, placebo-controlled, double-blind crossover trial. *Infect Immun* 1992;60:4430–4432.
135. Tacket CO, Losonsky G, Nataro JP, et al. Onset and duration of protective immunity in challenged volunteers after vaccination with live oral cholera vaccine CVD103 HgR. *J Infect Dis* 1992;166:837–841.
136. Tacket CO, Losonsky G, Nataro JP, et al. Initial clinical studies of CVD112 *Vibrio cholerae* O139 live oral vaccine: safety and efficacy against experimental challenge. *J Infect Dis* 1995;172:883–886.
137. Pearson GDN, Woods A, Chiang SL, Mekalanos JJ. CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3750–3754.
138. Kenner JR, Coster TS, Taylor DN, et al. Peru 15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* O1. *J Infect Dis* 1995;172:1126–1129.
139. Phalipon A, Kaufmann M, Michett P, et al. Monoclonal immunoglobulin A antibody directed against serotype-specific epitope of *Shigella flexneri* lipopolysaccharide protects against murine experimental shigellosis. *J Exp Med* 1995;182: 769–778.
140. Barzu S, Fontaine A, Sansonetti PJ, Phalipon A. Induction of local anti-IpaC antibody response in mice by the use of a *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate: implications for use of IpaC as a protein carrier. *Infect Immun* 1996;64: 1990–1196.
141. Fontaine A, Arondel J, Sansonetti PJ. Construction and evaluation of live attenuated vaccine strains of *Shigella flexneri* and *Shigella dysenteriae* 1. *Res Microbiol* 1990;141:907–912.
142. Noriega FR, Wang JY, Losonsky G, Maneval DR, Hone DM, Levine MM. Construction and characterization of attenuated *CaroA CvirG Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203, a prototype live oral vaccine. *Infect Immun* 1994;62: 5168–5172.
143. Noriega FR, Losonsky G, Wang JY, Formal SB, Levine MM. Further characterization of *CaroA CvirG Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203 as a mucosal *Shigella* vaccine and as a live vector vaccine for delivering antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1996;64:23–27.
144. Kotloff KL, Norieja F, Losonsky GA, et al. Safety, immunogenicity, and transmissibility in humans of CVD 1203, a live oral *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate attenuated by deletions in *aroA* and *virG*. *Infect Immun* 1996;64:4542–4548.
145. Norieja FR, Losonsky G, Lauderbaugh C, Liao FM, Wang JV, Levine MM. Engineered *CguaB-A*, *CvirG Shigella flexneri* 2a strain CVD 1205: construction, safety, immunogenicity, and potential efficacy as a mucosal vaccine. *Infect Immun* 1996;64:3055–3061.
146. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1983;1:1311–1315.
147. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 1994;330:1267–1271.
148. Lee A, Hazell SL, O'Rourke J, Kouprach S. Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect Immun* 1988;56:2843–2850.
149. Lee A, Fox JG, Otto G, Murphy J. A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. *Gastroenterology* 1990;99:1315–1323.
150. Chen M, Lee A, Hazell S. Immunization against gastric *Helicobacter* infection in a mouse/*Helicobacter felis* model. *Lancet* 1992;339:1120–1121.
151. Marchetti M, Arico B, Burroni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics the human disease. *Science* 1995;267:1655–1658.
152. Doidge C, Gust I, Lee A, Buck F, Hazell S, Manne U. Therapeutic immunization against *Helicobacter* infection—the first evidence. *Lancet* 1994;343:914–915.
153. Corthesy-Theulaz I, Porta N, Glauser M, et al. Oral immunization with *Helicobacter pylori* urease B subunit as a treatment against *Helicobacter* infection in mice. *Gastroenterology* 1995;109:115–1121.
154. Lee A, Orourke J, Deungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection—introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 1997;112:1386–1397.
155. Anderson P, Peter G, Johnston RB, Wetterlow LH, Smith DH. Immunization of humans with polyribophosphate, the capsular antigen of *Hemophilus influenzae*, type b. *J Clin Invest* 1972;51:39–44.
156. Rodrigues LP, Schneerson R, Robbins JB. Immunity to *Haemophilus influenzae* type b. I. The isolation and some physico-chemical, serologic, and biologic properties of the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Immunol* 1971;107:1071–1080.
157. Peltala H, Käyhty H, Sivonen A, Mäkelä PH. *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine in children: a double-blind field study of 100,000 vaccinees 3 months to 5 years of age in Finland. *Pediatrics* 1977;60: 730–737.
158. Anderson P. Antibody responses to *Haemophilus influenzae* type b and diphtheria toxin induced by conjugates of oligosaccharides of the type b capsule with the

non-toxic protein-CRM197. *Infect Immun* 1983;39:233–238.

159. Schneerson R, Robbins JB, Chu C, Sutton A, Schiffman G, Vann WF. Semi-synthetic vaccines composed of capsular polysaccharides of pathogenic bacteria covalently bound to proteins for the prevention of invasive diseases. *Prog Allergy* 1983;33:144–158.
160. Eskola J, Käyhty H, Takala AK, et al. A randomized prospective field trial of a conjugate vaccine in the protection of infants and young children against invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *N Engl J Med* 1990;323:1381–1387.
161. Madore DV. Impact of immunization on *Haemophilus influenzae* type b disease. *Infect Agents Dis* 1996;5:8–20.
162. Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, et al. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *JAMA* 1993;169:221–226.
163. Mulholland K, Hilton S, Adegbola R, et al. Randomised trial of *Haemophilus influenza* type-b tetanus protein conjugate for prevention of pneumonia and meningitis in Gambian infants. *Lancet* 1997;349:1191–1197.
164. Thomas WR, Callow MG, Dilworth RJ, Audesho AA. Expression in *Escherichia coli* of a high molecular weight protective surface antigen found in nontypeable and type b *Haemophilus influenza*. *Infect Immun* 1990;58:1909–1913.
165. Flack FS, Loosmore S, Chang P, Thomas WR. The sequencing of the 80-kDa D15 protective surface antigen of *Haemophilus influenzae*. *Gene* 1995;156:97–99.
166. O'Brien KL, Steinhoff MC, Edwards K, Keyserling H, Thoms ML, Madore D. Immunologic priming of young children by pneumococcal glycoprotein conjugate, but not polysaccharide, vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15:425–430.
167. King JC, Vink PE, Farley JJ, et al. Comparison of the safety and immunogenicity of a pneumococcal conjugate with a licensed polysaccharide vaccine in human immunodeficiency virus and non-human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15:192–196.
168. de Moraes JC, Perkins BA, Camargo MC, et al. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet* 1992;340: 1074–1078.
169. Kaufmann SHE. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* 1993;11: 129–163.
170. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:496–514.
171. Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bennedsen J, Heron I. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun* 1991;59: 1905–1910.
172. Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, Nagai S. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 1995;154:3359–3372.
173. Wiker HG, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev* 1992;56:648–661.
174. Kaufmann SHE, Schoel B, van Embden JD, et al. Heat-shock protein 60: implications for pathogenesis of and protection against bacterial infections. *Immunol Rev* 1991;121:67–90.
175. Andersen P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun* 1994;62:2536–2544.
176. Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat Med* 1996;2:888–892.
177. Huygen K, Content J, Denis O, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* 1996;2:893–898.
178. Zaheer SA, Beena KR, Kar HK. Addition of immunotherapy with *Mycobacterium w* vaccine to multi-drug therapy benefits multibacillary leprosy patients. *Vaccine* 1995;13:1102–1110.
179. Brandt ER, Hayman WA, Currie B, et al. Opsonic human antibodies from an endemic population specific for a conserved epitope on the M protein of group A streptococci. *Immunology* 1996;89:331–337.
180. Brandt ER, Hayman WA, Currie B, Pruksakorn S, Good MF. Human antibodies to the conserved region of the M protein: opsonization of heterologous strains of group A streptococci. *Vaccine* 1997;15:1805–1812.
181. Hilleman MR. Hepatitis and hepatitis A vaccine: a glimpse of history. *J Hepatol* 1993;18:S5–S10.
182. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA* 1967;200:365–373.
183. Bradley DW, Krawczynski K, Beach MJ, Purdy MA. Non-A, non-B hepatitis. Toward the discovery of hepatitis C and E viruses. *Semin Liver Dis* 1991;11: 128–146.
184. Houghton M, Wiener A, Han J, Kuo G, Chao Q-L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991;14:381–388.
185. Gust ID, Coulepsis AG, Feinstone SM, et al. Taxonomic classification of hepatitis A virus. *Intervirology* 1983;20:1–7.
186. Frösner GG, Deinhardt F, Scheid R, et al. Propagation of human hepatitis A virus in hepatoma cell line. *Infection* 1979;7:303–304.
187. Provost PJ, Hughes JV, Miller WJ, et al. An inactivated hepatitis A viral vaccine of cell culture origin. *J Med Virol* 1986;19:23–31.
188. Mao J-S, Dong D-Y, Zhang H-Y, et al. Primary study of attenuated live hepatitis A vaccine (H2 strain) in humans. *J Infect Dis* 1989;159:621–624.
189. Adamowicz Ph, Tron F, Vinas R, et al. Hepatitis B vaccine containing the S and PreS-2 antigens produced in Chinese hamster ovary cells. In: Zuckerman AJ, ed. *Viral hepatitis and liver disease*. New York: Alan R. Liss, 1988:982–988.
190. Corman W, Thomas H, Domingo E. Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet* 1993;341:349–353.
191. Choo Q-L, Richman KH, Han JH, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2451–2455.
192. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362–364.
193. Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, et al. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991;180:842–848.
194. Farci P, Alter HJ, Wong D, et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated *in vitro* neutralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7792–7796.
195. Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, et al. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorometric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 1759–1763.
196. Ishii K, Rosa D, Watanabe Y, et al. High titres of envelope neutralizing antibodies correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; (in press).
197. Botarelli P, Brunetto MR, Minutello MA, et al. T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* 1993;104: 580–587.
198. Kapikian AZ, Hoshino Y, Channock RM, Perez-Schael I. Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea using a quadrivalent rhesus rotavirus (RRV) and human-RRV reassortant vaccine. *Arch Virol* 1996;12: 163–175.
199. Conner ME, Zarley CD, Hu B, et al. Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine. *J Infect Dis* 1996;174:S88–S92.
200. Mattion NM, Reilly PA, Composano E, et al. Characterization of recombinant polioviruses expressing regions of rotavirus VP4, hepatitis B surface antigen, and herpes simplex virus type 2 glycoprotein D. *J Virol* 1995;69:5132–5137.
201. Mills J. Immunotherapy and immunoprophylaxis of respiratory syncytial virus infections. *Curr Opin Infect Dis* 1995;8:473–478.
202. Kapikian AZ, Mitchell RH, Channock RM, Shreddof RA, Stewart CE. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am J Epidemiol* 1969;89:405–421.
203. Palladino G, York LJ, Adams SM, Giorgio DP, Randolph V, Mishkin EM. The immunogenicity of two cold-adapted, temperature-sensitive strains of respiratory syncytial virus in mice. *Vaccine Res* 1996;5:57–67.
204. Tolley KP, Marriott AC, Simpson A, et al. Identification of mutations contributing to the reduced virulence of a modified strain of respiratory syncytial virus. *Vaccine* 1996;14:1637–1646.
205. Piedra PA, Grace S, Jewell A, et al. Purified fusion protein vaccine protects against lower respiratory tract illness during respiratory syncytial virus season in children with cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15:23–31.
206. Paradiso PR, Hildreth SW, Hogerman DA, et al. Safety and immunogenicity of a subunit respiratory syncytial virus vaccine in children 24-48 months old. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:792–798.
207. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995;373:123–126.
208. Mellors JW, Rinaldo CJ, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272:1167–1170.
209. Pantaleo G, Grziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; 362:355–358.
210. Rowland-Jones S, Sutton J, Ariyoshi K, et al. HIV-specific cytotoxic T cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat Med.* 1995;1:59–64.
211. Clerici M, Shearer GM. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today* 1994;15:575–581.
212. Siebelink KHJ, Tijhaar E, Huisman RC, et al. Enhancement of feline immunodeficiency virus infection after immunization with envelope glycoprotein subunit vaccines. *J Virol* 1995;69:3704–3711.
213. Hulskotte EG, Geretti AM, Siebelink KHJ, et al. Vaccine-induced virus neutralizing antibodies and cytotoxic T cells do not protect macaques from experimental infection with simian immunodeficiency virus SIVmac32H (J5). *J Virol* 1995;69:6289–6296.
214. Zolla-Pazner S, Alving C, Belshe R, et al. Neutralization of a clade B primary isolate by sera from human immunodeficiency virus-uninfected recipients of candidate AIDS vaccines. *J Infect Dis* 1997;175:764–774.
215. Kent SJ, Woodward A, Zhao A. HIV-specific T cell responses correlate with control of acute HIV-1 infection in macaques. *J Infect Dis* 1997;176:1188–1197.
216. Shiver JW, Davies M-E, Perry HC, Freed DC Liu M. Humoral and cellular immunities elicited by HIV-1 DNA vaccination. *J Pharmaceut Sci* 1996;85: 1317–1324.
217. Schutten M, Tenner-Racz K, Racz P, van Bekkum DW, Osterhaus ADME. Human antibodies that neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 *in vitro* do not provide protection in an *in vivo* model. *J Gen Virol* 1996;77:

1667–1675.
218. Lubeck MD, Natuk RN, Myagkikh M, et al. Long-term protection of chimpanzees against high-dose HIV-1 challenge induced by immunization. *Nat Med* 1997;3:651–658.
219. Daniel MD, Kirchoff F, Czajak SC, Schgal PK, Desrosiers RC. Protective effects of a live attenuated SIV-1 vaccine with a deletion in the *nef* gene. *Science* 1992; 258:1938–1940.
220. Montagnier L. Nef vaccination against HIV disease. *Lancet* 1995;346:1170.
221. Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, et al. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 1995;270:988–991.
222. Heeney JL, Bruck C, Goudsmit J, et al. Immune correlates of protection from HIV infection and AIDS. *Immunol Today* 1997;18:4–8.
223. Mitchell GF. Problems specific to parasite vaccines. *Parasitology* 1989;98: S49–S60.
224. Anders RF, Saul AJ. Candidate antigens for an asexual blood stage vaccine against falciparum malaria. In: Good MJ, Saul AJ, eds. *Molecular immunological considerations in malaria vaccine development.* Boca Raton, FL: CRC Press, 1994:169.
225. Patarroyo ME, Amado R, Clavijo P, et al. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 1988;332:158–161.
226. Holder AA, Freeman RR. Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens. *Nature* 1981;294:361–364.
227. Siddiqui WA, Tam LQ, Kramer KJ, et al. Merozoite surface coat precursor completely protects Aotus monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3014–3018.
228. Daly TM, Long CA. A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii yoelii* 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice. *Infect Immun* 1993;61:2462–2467.
229. Daly TM, Long CA. Humoral response to a carboxyl-terminal region of the merozoite surface protein-1 plays a predominant role in controlling blood-stage infection in rodent malaria. *J Immunol* 1995;155:236–243.
230. Hirunpetcharat C, Tian J-H, Kaslow DC, et al. Complete protective immunity induced in mice by immunization with 19 kDa carboxylterminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP_{19}) of *Plasmodium yoelii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae:* correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not effector $CD4^{+}$ T cells. *J Immunol* 1997;159:3400–3411.
231. Smythe JA, Coppel RL, Brown GV, Ramasamy R, Kemp DJ, Anders RF. Identification of two integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5195–5199.
232. Peterson MG, Marshall VM, Smythe JA, et al. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol* 1989;9: 3151–3154
233. Perlmann H, Berzins K, Wahlgren M, et al. Antibodies in malarial sera to parasite antigens in the membrane of erythrocytes infected with early asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med* 1984;159:1686–1704.
234. Locksley RM, Louis JA. Immunology of leishmaniasis. *Curr Opin Immunol* 1992;4:413–418.
235. Handman E, McConville MJ. Vaccines against leishmania. In: Woodrow GC, Levine MM, eds. *New generation vaccines.* New York: Marcel Dekker Inc, 1990: 545–564.
236. Titus RG, Gueiros-Filho FJ, de Freitas LA. Development of a safe live Leishmania vaccine line by gene replacement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 10267–10271.
237. Xu D, McSorley SJ, Chatfield SN, et al. Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA- AroD⁻). *Immunology* 1995;85:1–7.
238. Xu D, Liew FY. Protection against leishmania by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63 of *L. major.* *Immunology* 1995;84:173–176.
239. Handman E, Symons FM, Baldwin TM, et al. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. *Infect Immun* 1995;63:4261–4267.
240. Kelleher M, Bacic A, Handman E. Identification of a macrophage-binding determinant on lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6–10.
241. Capron A, Riveau G, Grzych J-M, Boulanger D, Capron M, Pierce R. Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. *Trop Geogr Med* 1994;46:242–246.
242. Frazer IH. Immunology of papillomavirus infection. *Curr Opin Immunol 1996;* 8:484–491.
243. Frazer IH, Leippe DM, Dunn LA, et al. Immunological responses in human papillomavirus 16 E6/E7-transgenic mice to E7 protein correlate with the presence of skin disease. *Cancer Res* 1995;55:2635–2639.
244. Borysiewicz LK, Fiander A, Nimako M, et al. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 1996;347:1523–1527.
245. Frazer IH. Strategies for immunoprophylaxis and immunotherapy of papillomaviruses. *Clin Dermatol* 1997;15:285–297.
246. Boon T. Toward a genetic analysis of tumor rejection antigens. *Adv Cancer Res* 1992;58:177–210.
247. Wölfel T, Hauer M, Schneider J, et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995;269: 1281–1284.
248. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254:1643–1647.
249. Wölfel T, Van Pel A, Brichard V, et al. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1994;24:759–764.
250. Van den Eynde BJ, Boon T. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int J Clin Lab Res* 1997;27:81–86.
251. Marchand M, Weynants P, Rankin E, et al. Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int J Cancer* 1995;63:883–885.
252. Uyttenhove C, Godfraind C, Lethé B, et al. The expression of mouse gene P1A in testis does not prevent safe induction of cytolytic T cells against a P1A-encoded tumor antigen. *Int J Cancer* 1997;70:349–356.
253. Guilloux Y, Lucas S, Brichard VG, et al. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J Exp Med* 1996;183:1173–1183.
254. Gaugler B, Brouwenstijn N, Vantomme V, et al. A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics* 1996;44:323–330.
255. de Smet C, de Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7149–7153.
256. Levy R, Miller R. Therapy of lymphoma directed at idiotypes. *J Natl Cancer Inst* 1990;10:61–68.
257. Brichard V, Ban Pel A, Wölfel T, et al. The tyrosine gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1993;178:489–495.
258. Kang X, Kawakami Y, El-Gamil M, et al. Identification of a tyrosinase epitope recognized by HLA-A2-restricted, tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 1995;155:1343–1348.
259. Barnd DL, Lan M, Metzgar RS, Finn OJ. Specific, MHC-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7159–7163.
260. Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, et al. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol Rev* 1995;145:61–89.
261. Gendler S, Lancaster C, Taylor-Papadimitriou J, et al. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem* 1990;265:15286–15293.
262. Wreschner DH, Hareuveni M, Tsarfaty I, et al. Human epithelial cell tumor antigen cDNA sequences. *Eur J Biochem* 1990;189:463–473.
263. Fontenot JD, Finn OJ, Dales N, Andrews PC, Montelaro RC. Synthesis of large multideterminant peptide immunogens using a poly-proline beta-turn helix motif. *Pept Res* 1993;6:330–336.
264. Goydos JS, Elder E, Whiteside TL, Finn OJ, Lotze MT. A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. *J Surg Res* 1996;63:298–304.
265. Henderson RA, Nimgaonkar MT, Watkins SC, Robbins PD, Ball ED, Finn OJ. Human dendritic cells genetically engineered to express high levels of the human epithelial tumor antigen mucin (MUC-1). *Cancer Res* 1996;56:3763–3770.
266. Pecher G, Finn OJ. Induction of cellular immunity in chimpanzees to human tumor-associated mucin by vaccination with MUC-1 cDNA-transfected Epstein-Barr virus-immortalized autologous B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 1699–1704.
267. Fricker J. Mucin-based vaccines and cancer. *Mol Med Today* 1997;3:47.
268. Apostolopoulos V, Loveland BE, Pietersz GA, McKenzie IFC. CTL in mice immunized with human mucin 1 are MHC-restricted. *J Immunol* 1995;155: 5089–5094.
269. Morton DL, Foshag LJ, Hoon DSB, et al. Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine. *Ann Surg* 1992;216:463–482.
270. Barth A, Hoon DSB, Leland J, et al. Polyvalent melanoma cell vaccine induces delayed-type hypersensitivity and *in vitro* cellular immune responses. *Cancer Res* 1994;54:3342–3345.
271. Bystryn JC. Clinical activity of a polyvalent melanoma antigen vaccine. *Recent Results Cancer Res* 1995;239:333–345.
272. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;93:3539–3543.
273. Herr W, Wölfel T, Heike M, Méyer zum Buschenfelde K-H, Knuth A. Frequency analysis of tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of a melanoma patient vaccinated with autologous tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 1994;39:93–99.
274. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, et al. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 1996;184:1953–1962.
275. Thrush GR, Lark LR, Clinchy BC, Vitetta ES. Immunotoxins: an update. *Annu Rev Immunol* 1996;14:49–71.

276. Nossal GJV. Minimal residual disease as the target for immunotherapy of cancer. *Lancet* 1994;343:1172–1173.
277. Talwar GP, Singh O, Pal R, et al. A vaccine that prevents pregnancy in women. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8532–8536.
278. Talwar GP, Diwan M, Davar H, Frick J, Sharma SK, Wadha SN. Counter GnRH vaccine. In: Rajalakshmi M, Griffin PD, eds. *Male contraception—present and future.* New Delhi: New Age International, 1998;309–318.
279. Primakoff P, Lathrop W, Woolman L, Cowan A, Myles D. Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunized with the sperm protein PH-20. *Nature* 1988;335:543–546.
280. Diekman AB, Herr JC. Sperm antigens and their use in the development of an immunocontraceptive. *Am J Reprod Immun* 1997;37:111–117.
281. Nossal GJV, Pike BL. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:1602–1606.
282. Nossal GJV. Cellular mechanisms of immunological tolerance. *Annu Rev Immunol* 1983;1:33–62.
283. Chase MW. Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent. *Proc Soc Exp Biol Med* 1946;61:257–259.
284. Hafler DA, Weiner HL. Immunological mechanisms and therapy in multiple sclerosis. *Immunol Rev* 1995;144:75–107.
285. Holt PG, Batty JE, Turner KJ. Inhibition of specific IgE responses in mice by pre-exposure to inhaled antigen. *Immunology* 1981;42:409–417.
286. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J-I, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;265:1237–1240.
287. Harrison LC, Dempsey-Collier M, Kramer DR, Takahashi K. Aerosol insulin induces regulatory CD8 γδ T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med* 1996;184:2167–2174.
288. French MB, Allison J, Cram DS, et al. Transgenic expression of mouse proinsulin II prevents diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 1997;46:34–39.
289. Bergerot I, Ploix C, Petersen J, et al. A cholera toxiod-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4610–4614.
290. Holmgren J, Czerkinsky C, Sun JB, Svennerholm A-M. Oral vaccination, mucosal immunity and oral tolerance with special reference to cholera toxin. In: Kaufmann SHE, ed. *Concept in vaccine development. New York: Walter de Gruyter,* 1996:437–458.
291. Thomas WR, Smith W, Hales BJ, Carter MD. Functional effects of polymorphisms of house dust mite allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;908:113:96–98.
292. Hoyne GF, Callow MG, Kuo M-C, Thomas WR. Inhibition of T-cell responses by feeding peptides containing major and cryptic epitopes: studies with Der p 1 allergen. *Immunology* 1994;83:190–195.
293. O'Brien RM, Byron KA, Varigos GA, Thomas WR. House dust mite immunotherapy results in a decrease in Der p 2-specific IFN-γ and IL-4 expression by circulating T lymphocytes. *Clin Exp Allergy* 1997;27:46–51.
294. Bauer L, Bohle B, Jahn-Schmid B, et al. Modulation of the allergic immune response in Balb/c mice by subcutaneous injection of the dominant T cell epitope from the major birch pollen allergen Bet v 1. *Clin Exp Immunol* 1997;107:536–541.
295. Hsu C-H, Chua K-Y, Tao M-H, et al. Immunoprophylaxis of allergen-induced IgE synthesis and airway hyperresponsiveness *in vivo* by genetic immunization. *Nat Med* 1996;2:540–544.
296. O'Hehir RE, Hoyne GF, Thomas WR, Lamb JR. House dust mite allergy: from T cell epitopes to immunotherapy. *Eur J Clin Invest* 1993;23:763–772.
297. Holt PG. Immunoprophylaxis of atopy: light at the end of the tunnel? *Immunol Today* 1994;15:484–489.
298. Holt PG, Sly PD. Allergic respiratory disease: strategic targets for primary prevention during childhood. *Thorax* 1997;52:1–4.
299. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. The relationship between pertussis vaccine and brain damage: reassessment. *Pediatrics* 1991;88:397–400.
300. Joce R, Wood D, Brown D, Begg M. Paralytic poliomyelitis in England and Wales 1985–1991. *BMJ* 1992;305:79–82.
301. Jonville-Béra AP, Autret E, Galy-Eyraud C, Hessel L. Thrombocytopenic purpura after measles, mumps and rubella vaccination: a retrospective survey by the French Regional Pharmacovigilance Centres and Pasteur-Mérieux Sérums et Vaccins. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15:44–48.
302. Jonville-Béra AP, Autret E, Galy-Eyraud C, Hessel L. Aseptic meningitis following mumps vaccine. *Pharmacoepidemiol Drug Safety* 1996;5:33–37.
303. de Quadros CA, Andrus JK, Olivé J-M, de Macedo CG. Polio eradication from the Western Hemisphere. *Annu Rev Public Health* 1992;13:239–252.
304. Robbins FC, deQuadros CA. Certification of the eradication of indigenous transmission of wild poliovirus in the Americas. *J Infect Dis* 1997;175:S281–S285.
305. Barrios C, Brawand P, Berney M, Brandt C, Lambert P-H, Siegrist C-A. Neonatal and early life immune responses to various forms of vaccine antigens qualitatively differ from adult responses: predominance of a Th2-biased pattern which persists after adult boosting. *Eur J Immunol* 1996;26:1489–1496.
306. Barrios C, Brandt C, Berney M, Lambert P-H, Siegrist C-A. Partial correction of the TH2/TH1 imbalance in neonatal murine responses to vaccine antigens through selective adjuvant effects. *Eur J Immunol* 1996;26:2666–2670.
307. Martinez X, Brandt C, Saddallah F, et al. DNA immunization circumvents deficient induction of TH1 and CTL responses in neonates and during early life. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8726–8731.
308. Steger MM, Maczek C, Grubeck-Loebenstein B. Morphologically and functionally intact dendritic cells can be derived from the peripheral blood of aged individuals. *Clin Exp Immunol* 1996;105:544–550.
309. Steger MM, Maczek C, Grubeck-Loubenstein B. Peripheral blood dendritic cells reinduce proliferation in *in vitro* aged T cell populations. *Mech Ageing Dev* 1997;93:125–130.
310. Albright JW. The challenge of vaccinating the elderly. In: Baker PJ, ed. The Jordan Report. *Accelerated development of vaccines.* Bethesda, MD: Division of Microbiology and Infectious Diseases, NIAID, NIH, 1996:37–42.
311. Steger MM, Maczek C, Berger P, Grubeck-Loebenstein B. Vaccination against tetanus in the elderly: do recommended vaccination strategies give sufficient protection? *Lancet* 1996;348:762.

第 43 章　原发性免疫缺陷病

Rebecca H. Bckley①

自从 45 年前发现第一例人类原发性免疫缺陷病以来[1]，人们已对免疫系统各种组分功能的认识取得了突破性的进展。其后在动物身上实验性摘除胸腺或法氏囊使我们进一步加深了对免疫系统的认识，并建立了细胞免疫和体液免疫的概念。自此以后，在人类已发现了 70 多种原发性免疫缺陷病[2]，在各种实验动物模型中也观察到了许多自发性免疫缺陷病，研究每种疾病都能使我们对免疫系统的复杂作用机制获得独到的认识。最近，在分子水平上对免疫系统进行操作，如通过插入选定免疫组分的突变基因产生基因敲除小鼠，似乎为我们开启了一扇彻底阐释免疫系统的大门[3]。

1427

原发(先天)性免疫缺陷病可以影响免疫系统的一个或多个组分，包括吞噬细胞、补体蛋白、T 细胞、B 细胞和自然杀伤细胞。本章主要介绍与淋巴细胞有关的的人类最常见的免疫缺陷病的最新遗传学研究进展及其免疫缺陷机制(表 43.1)，并通过对自发性免疫缺陷动物模型和人工产生的缺陷小鼠的研究对其作进一步阐述。

免疫缺陷病的特征就是对各种感染极其易感。令人费解的是，许多免疫缺陷综合征同时伴发自身免疫病和 IgE 抗体的过量表达。在已有许多强力抗生素可以控制多种感染的今天，自身免疫病却成了免疫缺陷患者的主要死因。此外，免疫缺陷患者恶性肿瘤的发生率也增高[4,5]，这究竟是由于对肿瘤的免疫监视缺陷抑或由于对潜在致癌因子的易感性增加所致尚不清楚。

---

① R. H. Buckley: Departments of Pediatrics and Immunology, Duck University School of Medicine, Durham, North Caroline 27710 - 0001.

表 43.1 已鉴定的致人类原发性免疫缺陷病的致病基因

染色体	疾病
1q	RFX5 突变所致 MHC Ⅱ 类抗原缺陷[a]
1q25	gp67[phox]缺陷所致慢性肉芽肿性疾病(CGD)[a]
1q42-43	Chediak-Higashi 综合征[a]
2p11	κ 链缺陷[a]
2q12	ZAP70 缺陷所致 CD8 淋巴细胞减少症[a]
6p21.3	TAP2 突变所致 MHC Ⅰ 类抗原缺陷[a]
6p21.3	(?)常见的变异型免疫缺陷和选择性 IgA 缺陷
6q22-q23	γ 干扰素 R1 突变[a]
7q11.23	gp47[phox]缺陷所致慢性肉芽肿性疾病(CGD)[a]
8q21	Nijmegen 断指综合征
9p21-p13	软骨头发发育不良
10p13	DiGeorge 综合征/软腭-心-面综合征
10p14-15	IL-2 受体 α 链缺陷[a]
11	CD3γ 或 ε 链缺陷[a]
11p13	RAG1 或 RAG2 缺陷所致重症联合免疫缺陷[a]
11q22.3	毛细血管扩张失调症(AT)，由 AT 突变引起 DNA 依赖性激酶缺陷[a]
14q13.1	嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP)缺陷[a]
14q32.3	免疫球蛋白重链缺失[a]
16p13	CIITA 突变所致 MHC Ⅱ 类抗原缺陷[a]
16q24	gp22[phox]缺陷所致 CGD[a]
19p13.1	Janus 激酶 3 缺陷所致 SCID
20q13.11	腺苷脱氨酶缺陷所致 SCID[a]
21q22.3	CD18 缺陷所致白细胞粘连缺陷 1 型(LAD1)[a]
22q11.2	DiGeorge 综合征
Xp21.1	gp91[phox]缺陷所致 CGD[a]
Xp11.23	WAS 蛋白(WASP)缺陷所致湿疹-血小板减少-免疫缺陷综合征(WAS)[a]
Xp11.3-p21.1	备解素缺陷[a]
Xq13.1	共有细胞因子受体 γ 链(τ_c)缺陷所致 X 连锁 SCID[a]
Xq22	Bruton 酪氨酸激酶(Btk) 缺陷所致 X 连锁无丙种球蛋白血症[a]
Xq24-26	染色体连锁的淋巴细胞增生综合征
Xq26	CD154 (CD40 配基) 缺陷所致高 IgM 免疫缺陷[a]

[a]基因已被克隆并测序，基因产物已知。

除了常见的选择性 IgA 缺陷，由遗传所致的免疫缺陷少见[2]。B 细胞缺陷的常见程度远远超过了 T 细胞缺陷，吞噬细胞缺陷或补体蛋白缺陷。虽然在美国未行大规模人口统计，但据估计，丙种球蛋白缺乏血症和重症联合免疫缺陷病在新生婴儿中的发病率分别是 1/5 万和 1/10250 万。血清型和分泌型 IgA 的选择性缺陷最为常见，据报道发生率高达 1/333 ~ 700。婴幼儿和儿童的原发性免疫缺陷病比成人更为常见。在儿童，这些免疫缺陷病男女发病率之比是 5:1(男:女)，在青春期，男女发病率之比则变为 1:1.4。

原发性免疫缺陷病的分子遗传学

人类免疫缺陷病

直到前几年，人们一直对其遗传机制知之甚少，而今许多此类疾病的基因已被定位到特定的染色体上。自本书上一版出版以来(表 43.1)[8~12]，相当多的免疫缺陷病的遗传缺陷已被确定，通过联合应用分子细胞免疫学新知识及人类基因组中显著改进的疾病等位基因定位方法与检测手段，才取得了这些重大进展。

在过去 5 年中有 4 种 X 连锁免疫缺陷病的缺陷基因已被发现:X 连锁丙种球蛋白缺乏血症、X 连锁高 IgG 免疫缺陷病、Wiskott-Aldrich 综合征及 X 连锁重症联合免疫缺陷病(SCID)(图 43.1,表 43.1)[8~11]。X 连锁慢性肉芽肿病(CGD)的致病基因在几年前已被鉴定[13],编码备解素(P 因子,其突变可导致备解素缺陷)的基因已被克隆[14],X 连锁淋巴组织增生病的致病基因已被初步定位到 X 染色体上的一个特殊位点,尚待进一步精确定位(图 43.1)[15,16]。

常染色体隐性遗传免疫缺陷病的缺陷基因已确定,包括:白细胞黏附缺陷Ⅰ型(LAD1)[17,18],ADA 缺陷[19]、嘌呤-核苷磷酸化酶 PNP 缺陷[20]、共济失调-毛细血管扩张症[21]、DiGeorge's(德乔治)综合征[22~29],MHC 抗原缺陷[25,26]、ZAP-70 缺陷[28]、IL-2Rα 链缺陷[28]、Jak3 缺陷[29]、IFN 受体缺陷(表 43.1)[30,31]。对这些疾病基因的鉴定和克隆,对将来进行基因治疗有重大意义。其进展之神速预示不久人们会弄清更多此类问题。

WHO 的一个委员会在过去 30 年来曾出版过几版关于原发性免疫缺陷病的分类手册,最新一版是 1997 年出版的[2]。表 43.1 列出许多已知的免疫缺陷病的相关缺陷基因。表 43.2 则按存在的基因缺陷类型把这些疾病归类,随着更多的此类疾病的缺陷基因被确定,将来可能以突变为基础对其分类。

图 43.1 X 连锁免疫缺陷病的基因定位,在 X 染色体细胞遗传图上相应位置注明了对应的疾病。(经 deSaint-Basile 和 Fischer 允许做了修改。)

免疫缺陷动物模型

多年来,只有有限几种人类原发免疫缺陷病建立了相应的动物模型。在对免疫系统发育相关基因的研究中,通过同源重组进行基因敲除建立了更多的免疫缺陷动物模型,每种模型都表现出特异突变的生物学效应[3],许多此类基因敲除小鼠在人类已知的免疫缺陷病中并无对应者,在参与小鼠免疫系统发育和行使功能的 129 个基因中,任一突变均可致 T 细胞,B 细胞和 NK 细胞异常,相关概要最近已出版(表 43.3)[3],此数据库对于研究那些潜在的缺陷基因尚未知的遗传性(先天性)免疫缺陷患者有重大价值。现在已经建立了几种带有导致人类原发性免疫缺陷病的突变基因的基因敲除小鼠模型。据此,人们已知道小鼠和人某些突变基因的表型是相同的,例如 CD18、RAG1、RAG2 及Ⅱ类转移活化因子(CⅡTA)缺陷基因,其在人类免疫缺陷病与在免疫缺陷突变小鼠的表型间具有一致性。然而,也有许多例外,如 Btk、CD154、γc、Jak3、ZAP-70 和 ADA 突变小鼠,其表型要比相应的人类免疫缺陷严重甚至根本不同于相应的人类免疫缺陷[3]。所以,利用这些动物模型来研究阐明人类原发免疫缺陷病的病因有一定的局限性。由于篇幅所限,本章主要阐述一些天然动物模型以及突变小鼠中的少数几种免疫缺陷病(表 43.3)。

抗体缺陷型免疫缺陷病

X 连锁丙种球蛋白缺乏血症

患有 X 连锁丙种球蛋白缺乏血症(XLA)(亦称 Bruton 丙种球蛋白缺乏血症)[1]的多数男孩在出生后 6~9 个月内由于带有母源性 IgG 抗体可以免于感染[32],其后,除非预防性给予抗生素或丙种球蛋白治疗,他们将经常发生胞外化脓菌如肺炎球菌、链球菌、嗜血杆菌的感染。如果不是同时伴有中性粒细胞减少,慢性真菌感染及卡氏肺囊虫肺炎发病率较低[33]。通常对病毒感染有正常的抵抗力,但对肝炎病毒和肠道病毒缺乏抵抗力[34,35]。

表 43.2　根据已知缺陷分子对人类原发性免疫缺陷病分类

Ⅰ.信号分子缺陷
- A. 酪氨酸激酶
  1. Bruton 酪氨酸激酶(btk)。疾病:X 连锁丙种球蛋白缺乏血症
  2. ZAP-70。疾病:CD8 淋巴细胞减少症
  3. Jak3。疾病:常染色体连锁退行性重症联合免疫缺陷病
- B. 其他胞内分子
  1. 泡状膜成分。疾病:Chediak-Higashi 综合征
  2. 富含脯氨酸蛋白。疾病:湿疹-血小板减少-免疫缺陷综合征
  3. DNA 依赖性蛋白激酶。疾病:毛细血管扩张失调症
  4. 重组酶活化基因(RAG1、RAG2)产物。疾病:T-B-SCID
  5. 转运蛋白(TAP)1。疾病:MHC Ⅰ 类抗原缺陷

Ⅱ.转录因子缺陷
- A. X 盒结合蛋白(RFX5)。疾病:MHC Ⅱ 类抗原缺陷
- B. Ⅱ类转移活化因子(CⅡTA)。疾病:MHC Ⅱ 类抗原缺陷
- C. 活化 T 细胞核因子(NF-AT)。疾病:细胞因子缺陷

Ⅲ.细胞因子受体链缺陷
- A. 共有细胞因子受体 γ 链。疾病:X 连锁 SCID
- B. IL-2 受体 α 链(CD25)。疾病:淋巴组织增生性 T 细胞缺陷
- C. γ 干扰素 R1(IFN-γR1)。疾病:弥散性分枝杆菌病

Ⅳ.黏附分子或配基对成员缺陷
- A. CD18 缺陷。疾病:Ⅰ 型白细胞黏附缺陷(LAD1)
- B. CD154 缺陷。疾病:X 连锁高 IgM 综合征

Ⅴ.结构基因缺陷
- A. CD3γ 或 ε 链缺陷。疾病:CD3 缺陷
- B. κ 链缺陷。疾病:影响所有带 λ 链的免疫球蛋白
- C. 免疫球蛋白重链基因缺陷。疾病:由于 μ 链突变所致的 B 细胞阴性无丙种球蛋白血症;其他链缺陷所致的同种异型缺失

Ⅵ.代谢缺陷
- A. 腺苷脱氨酶(ADA)缺陷。疾病:SCID
- B. 嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP)缺陷。疾病:联合免疫缺陷(CID)

表 43.3　突变小鼠免疫表型基因在人类染色体上的定位

人染色体	基因
1	CD2、CD3η、CD3 ζ、CD30、CD45、CR2、E 选择素、FasL、FcγRII、FcγRIII、FcRγ、IL-10、L 选择素、Lyst、p56[lck]
2	CD8α、CD8β、CD28、CTLA-4、IL-1β、IL-8R、κ 链、Ku80、P 物质受体、ZAP-70
3	B7-1、IL-5Rα
4	IL-2、IRF-2、NF-κB (p50 亚单位)
5	CD14、GM-CSF、粒酶 A、IL-4、IL-5、IL-7R、IL-12、p40、IRF-1、itk、1i (恒定链)、Tcf-1
6	c-myb、C4、IFN-γ 受体 α、LMP-2、LMP-7、MHCII 类抗原、p59[fyn]、Pim-1、SOX-4、TAP1、TNF-β
7	Ikaros、IL-6、TCRβ 链
8	DNA 依赖性激酶(p350)、DNA 多聚酶 β、IL-7、Lyn
9	abl、Pax5/BSAP、Syk
10	Fas/CD95、IL-2Rα、PBSF/SDF-1、穿孔素、TDT
11	ATM、CD3ε、CD5、ETS-1、NF-κB (p65/Rel-A 亚单位)、RAG-1、RAG-2
12	β7 整合素、CD4、GATA-2、IFN-γ、Lag3、P 选择素、p27 kip1、TNFR p55 (a)、STAT-6
13	flk-2
14	c-fos、IgD、IgE、IgM、Ig Gm-2b、JH、switchγ1、TCRα 链、TCRδ 链
15	β2 微球蛋白、p50 csk
16	CD19、CD43、PKCβ
18	Bcl-2
19	Bax、C/EBPβ、C3、C5aR、CD23、E2A、ICAM-1、Jak-3、OCT-2、TGF-β 1、Vav
20	ADA、CD40、NFAT1
21	CD18
22	IL-2Rβ、IL-3/GMCSF/IL-5 Rβ、lambda 5
X	btk、CD40L/CD154、IL-2Rγ

经 Kokron CM, Bonilla FA, Oettgen HC, Ramesh N, Geha RS 及 Pandolfi F 许可引自:Searching for genes involved in the pathogenesis of primary immunodeficiency diseases:Lessons from mouse knockouts. J Clin Immunol 1997;17:109-126。

除了脓毒性关节炎外,患者亦可患与类风湿性关节炎相似的关节炎症[36]。即使经过静脉注射免疫球蛋白替代治疗,患者的关节液培养物中仍可分离出解脲脲原体[37,38]和病毒,如埃可病毒、柯萨其病毒及腺病毒[36]。这些研究提示,抗体尤其是分泌型 IgA 在机体抗这类病毒感染中具有重要作用,因为即使存在肠道病毒感染,XLA 患者的 T 细胞数量和功能都是正常的。各型免疫球蛋白的浓度非常低,循环 B 细胞则缺如。骨髓中前 B 细胞数量减少。胸腺结构如胸腺小体及脾和淋巴结的胸腺依赖区均是正常的。1993 年,两组研究人员几乎同时独立发现 XLA 的突变基因。由于 XLA 基因已被精确定位在 Xq22(图 43.1),一组研究人员成功地使用定位克隆技术在此病患者身上找出一个异常基因(表 43.1)[39]。为达到其他研究目的,另一组研究人员找到一个与 B 淋巴细胞信号转导紧密相关的酪氨酸激酶(TK),此酶由小鼠 X 染色体上的一个基因编码。当相应的人类基因被克隆出来后,发现其定位在 Xq22,基因产物与第一组发现的相同。转导胞内信号的 TK 以 Bfuton 博士的名字命名为 Bfuton TK(Btk),Btk 是胞质蛋白酪氨酸激酶 Tec 家族的成员[41]。Btk 在所有 B 细胞系(包括前 B 细胞)均高水平表达,这种激酶似乎为前 B 细胞增殖和成熟为表达膜性免疫球蛋白的 B 细胞所必须,也可能参与 B 细胞各个阶段的发育[42]。在 T 细胞系的任何细胞均没检出 Btk,却在骨髓细胞系检出其活性[40]。到目前为止,所有的有 XLA 家族史的 XLA 男性患者只有很低,甚至检不出的 Btk mRNA 和激酶活性。截止目前,已提出人类 Btk 基因的 250 多种不同突变型[41,43~46]。这些突变大多发生在该基因编码区,其突变位置与临床表型间没有显著相关性[45,47~50]。

1431

通过确定其 B 细胞非随机 X 染色体失活或通过检测突变基因(在该家族的突变基因已知时)能确定 XLA 基因女性携带者[8,47]。通过绒膜绒毛或羊膜穿刺样本检测突变基因能对可疑 XLA 男性胎儿进行产前诊断。研究 Btk 蛋白,酶活性或 mRNA 也为诊断无家族史的 X 连锁遗传低丙种球蛋白血症男儿创造了条件[80]。Btk 亦表达于骨髓细胞系的事实有助于研究 XLA 男性患儿的间发性中性粒细胞减少现象,特别是在一次急性感染的始发阶段[51,52]。可以推测 Btk 只是参与骨髓细胞成熟的几种信号分子之一。仅当急需产生中性粒细胞的情况下可观察到 XLA 患者的中性粒细胞减少。有 9 例报道称 XLA 与生长素缺陷相关[53,56]。

在一些低丙种球蛋白血症女性患者身上发现了与 XLA 表型相似的情形[57~59]。这种常染色体退行性缺陷的缺陷基因最近已弄清,是由于 14 号染色体的 μ 重链基因突变所致,这提示 B 细胞成熟过程中表达完整膜结合 μ 链是极其必要的。

小鼠 X 连锁免疫缺陷病

人类 XLA 的动物模型即为 CBA/N 系小鼠 X 连锁免疫缺陷(Xid)性突变[60]。Xid 小鼠骨髓中有正常数量的前 B 细胞,但淋巴组织中的 B 细胞却非同寻常地低[60]。这些动物的血清 IgG 与 IgM 浓度也较低,对胸腺非依赖性Ⅱ型(TI-2)抗原不能产生抗多糖抗体,与大多数 XLA 患者不同,Xid 小鼠的一些 B 细胞有成熟表型,并产生针对 TI-1 型抗原的一些抗体。然而,Xid 小鼠的 B 细胞在结合 CD40 后即使在 IL-4 或抗-Ig 存在的情况下也不发生增殖[61]。研究发现,CBA/N 系小鼠 Btk 基因的 28 位 AA 突变为其 B 细胞缺陷的遗传基础[62,63],因为这类小鼠的抗体缺陷比 XLA 男儿轻许多,人们推测,如果 Btk 基因的突变发生在非激酶编码区,其免疫缺陷症状则可能轻一些。然而研究证实,常见 XLA 患者的基因突变与 CBA/N 系小鼠一样,影响着相同的残基[64]。另外,和人类 XLA 基因女性携带者一样,Xid 雌性杂合小鼠的 B 细胞表现出非随机 X 染色体失活。

高 IgM 血症性免疫缺陷

同患 XLA 的男儿一样,高 IgM 患者在出生后 1~2 年内出现反复发生的化脓性感染症状,如中耳炎、鼻窦炎、肺炎及扁桃体炎[2,65]。然而与 XLA 患者相比,在发现该病的根本病因之前,高 IgM 患者经常发生的淋巴组织增生曾诱导人们误入歧途,人们一直认为并发的中性粒细胞减少可解释有些此类患者的卡氏肺囊虫肺炎(PCP)和泛发性寻常疣损害的发生[2,65]。

高 IgM 血症的特征为血清中 IgG、IgA、IgE 浓度极低,尽管有时其多克隆 IgM 浓度正常,但多数情况下 IgM 会显著增高,有些患者的低分子质量 IgM 会导致放射免疫扩散分析出现假性高 IgM 值。除了伴发其他抗体

缺陷综合征外，高 IgM 患者的自身免疫病发病率也增高[2,65]。异常淋巴结组织仅见到生发中心发育不全及滤泡树突细胞的表型异常和严重缺失[66]。然而，对胸腺依赖性淋巴组织及 T 细胞功能做标准检测时曾认为其是正常的。

患者血液中分泌 IgM 或 IgD 的 B 淋巴细胞数目是正常的或仅轻度减少。最近，该病由于只产生 IgM 缺陷被归类为 B 细胞缺陷型，然而，患者循环中的 B 淋巴细胞数目又是正常的。10 年前即已发现转化的 T 细胞系共孵育时其 B 淋巴细胞合成 IgM、IgA、IgG 的能力是正常的，提示缺陷在于 T 系细胞[67]。

X 连锁高 IgM 血症的缺陷基因定位于 Xq26[68]（图 43.1），并在 1993 年[69~72]被 6 个研究小组几乎同时发现[67~72]。其产物为一个被称作 CD154（即 CD40 配基）的膜分子，表达于活化辅助性 T 细胞表面[73]，可和 B 细胞上的 CD40 分子相互作用（表 43.1）[69]。CD40 为Ⅰ型整合性膜糖蛋白，属于肿瘤坏死因子（TNF）/神经生长因子受体家族；表达于 B 细胞，单核细胞，一些肿瘤细胞及其他类型细胞，用抗 CD40 的单抗或可溶性 CD154 并在细胞因子（IL-2、4 或 10）辅助下，使正常 B 细胞或 X 连锁高 IgM 型 B 细胞上的 CD40 交联，可活化 B 细胞使其增殖，完成类型转换，并分泌各型免疫球蛋白。CD154 是一种Ⅱ型整合性膜糖蛋白，与 TNF 有显著的序列同源性，仅表达于活化的 T 细胞上，主要是 CD4 亚型[73]。X 连锁高 IgM 患者编码 CD154 的基因突变，导致由活化 T 细胞介导的激活 B 细胞信号缺陷，所以高 IgM 患者的 B 细胞不能完成类型转换因而只能产生 IgM。

缺乏 CD40 的刺激除引起患者的抗体类型转换缺陷外，更为重要的是导致其 B 细胞不能上调 CD80 和 CD86 的表达。CD80 和 CD86 是与 T 细胞上的 CD28/CTLA4 相作用的重要共刺激分子[74]，缺乏共刺激信号导致 T 细胞无能。现已鉴定出编码 CD154 的许多显著性点突变和缺失突变，可引起的框移突变、终止密码子前移及单氨基酸替换，大多发生于 TNF 同源结构域的 C 端[75,76]，进而导致自身免疫病和恶性肿瘤的发病率升高。编码 CD154 的基因突变可导致自身反应型胸腺细胞阳性选择缺陷和由外周 T 细胞耐受信号所致的对肿瘤细胞的识别障碍。CD154 基因的 3’ 端非翻译区存在高度多态性的微卫星二核苷酸（CA）重复序列，利用这一特征可筛选 X 连锁高 IgM 血症性免疫缺陷基因携带者，并对胎儿进行产前诊断[77]。

CD154 基因突变小鼠与 X 连锁高 IgM 患者在许多方面有相同之处，包括其对 PCP[78]的易感性。然而，其在抗体类别转换无能上不同于人类，此类小鼠在接受多糖抗原免疫后能产生 IgG3。

1432

并非所有男性高 IgM 患者都会发生 CD154 基因突变[79]，而在女性也发现了几例高 IgM 患者，提示此病可能为多基因病。即使在与抗 CD40 单抗和多种细胞因子共培养时[79]，患者的 B 细胞也不能由 IgM 分泌型转变为 IgG、IgA 或 IgE 分泌型细胞。所以，这些患者的真正病因是 B 细胞缺陷，而患者的 CD40 表达于 B 细胞表面，故不可能是由缺乏该蛋白所致。现在有几个实验室正在对这些患者可能存在的一种或多种 B 细胞特异性、CD40 相关信号分子缺陷进行广泛深入的研究。

常见的变异型免疫缺陷（CVID）

CVID 亦称作获得性低丙种球蛋白血症，临床表现与 XLA 有颇多相似之处[2,81]。其感染类型及致病细菌通常相同。然而，幸运的是 CVID 患者发生埃可病毒脑膜脑炎的概率较低，其原因不清[35]。将这两种免疫缺陷做进一步比较，发现 CVID 的男女发病率几乎相等，并且感染发生年龄比 XLA 偏晚，感染症状要轻，并有产生自身抗体的倾向。扁桃体、淋巴结与脾大多正常，只有 25% 患者发生肿大。淋巴间质性肺炎、假性淋巴瘤、淀粉样变，非干酪样肉芽肿，在肺、脾、皮肤及肝均可见到。50~60 岁女性患者其淋巴瘤的发病率增加了 438 倍[82]。

CVID 患者的血清免疫球蛋白和抗体缺陷同 XLA 一样严重。虽然患者外周血表达免疫球蛋白的循环 B 细胞数量正常并且存在淋巴皮质滤泡，但即使在体外和正常 T 细胞共培养并用 PWM（美洲商陆丝裂原）刺激，其 B 细胞仍不能分化为免疫球蛋白分泌细胞，并且 L 选择素为阴性，可能是由于淋巴细胞活化异常所致[83]。根据这些现象，人们认为该综合征的根本病因是 B 细胞缺陷[81]。与此推测一致，最近的研究显示，患者的 B 细胞在用佛波酯或抗 μ 抗体刺激时，蛋白激酶 C（PKC）未被活化，未能转位到质膜[84]。然而，当用抗

CD40 加上 IL-4 或 IL-10 刺激时，CVID 患者的 B 细胞却能完成类型转换并合成和分泌免疫球蛋白[85,86]。

T 细胞及其亚类的百分比通常正常，但在有些患者却以 γδT 细胞为主[87]，在另一些患者 T 细胞功能退化[88~92]。从一些 CVID 患者分离出来的丝裂原活化 T 细胞的淋巴因子基因表达缺陷，尽管其增殖能力正常[93]。此外，用 KLH 免疫 CVID 患者后，其抗原特异型 T 细胞数量减少，功能降低[94]。据报道，一组 CVID 患者其活化 T 细胞的 CD40L(CD154)的 mRNA 及 CD154 膜表面蛋白表达显著减少(但并非缺失)，提示由于其 T 细胞表达 CD154 太少，信号太弱，从而导致 B 细胞不能分化[95]。CVID 患者的扁桃体和脾多正常，只有约 25%患者发生肿大。此外，甚者还有产生自身抗体倾向，据报道有几例红斑狼疮患者也转为 CVID[96]。更为少见的是，当一些 CVID 患者感染上 HIV 后，其 CVID 症状暂时性甚或永久性消失[97]。

由于 CVID 发生于选择性 IgA 缺陷(A Def)患者的一级亲属及在 A Def 后来转变成全丙种球蛋白过少血症后发生[98]，人们推测这些病有共同的遗传基础[99,100]。CVID 与 A Def 患者家族均有高发性的异常免疫球蛋白浓度、自身抗体、自身免疫病及恶性肿瘤发生率，提示其有共同的遗传影响因素[101]。在 A Def[101,102] 或 CVID[103,104] 患者身上发现的 MHCⅢ区 C4-A 基因缺失的高发率及 C2 罕见等位基因，进一步支持了这种观点，提示在 6 号染色体上此区有一个敏感基因。然而，此异常基因至今尚未被确定，这些研究也表明，CVID 和 A Def 患者有少量 HLA 单体型相同，77%的患者至少存在两个特殊单体型中的一个。在一个有 13 个成员的大家系中，2 人患有 A Def，3 人患有 CVID[99]。该家族中所有免疫缺陷患者至少有一个 MHC 单体型拷贝，缺失的该拷贝在 A Def 和 CVID 中极其常见：HLA-DQB1 * 0201、HLA-DR3、C4B-Sf、C4A-缺失，G11-15、Bf-0.4、C2α、HSP70-7.5、TNFα-5、HLA-B8 和 HLA-A1[105]。然而，此家系的 4 个免疫功能正常成员也含有这种单体型。提示其存在并不足以导致这种缺陷[99]。环境因子，特别是苯妥英之类的药物，被怀疑为具有这种潜在遗传背景的患者的触发因子，除非发生严重的自身免疫病或恶性肿瘤，CVID 患者的预后还是相当不错的[82]。

选择性 IgA 缺陷

血清型和分泌型 IgA 的单一，缺乏或几乎完全缺乏(如 < 10mg/dl)，被称为是最常见的免疫缺陷病。在一些献血者中的发生率高达 1:333[6,7,102]。尽管在外表健康个体也观察到这种异常，仍通常被认为与病理状态相关。由于该病以外分泌型免疫球蛋白缺乏为主，故而感染主要发生在呼吸道、消化道和泌尿道[7]。致病细菌与其他类型的抗体缺陷综合征中所发现的基本相同。目前还没有明确证据表明患者对病毒极易感。同 CVID 一样，A Def 患者经常伴发胶原血管病和自身免疫病[101]。与 CVID 患者更为相似的是其恶性肿瘤发病率也增高。

虽然曾有报道称其缺乏 IgG2 亚类[101,106,107]并且通常增高的 IgM 为单体体型，但 A Def 患者血清的其他免疫球蛋白浓度多是正常的。A Def 患儿鼻内接种灭活脊髓灰质炎病毒可在局部产生 IgM 和 IgG 抗体。高达 44%的 A Def 患者血清中存在抗 IgA 抗体，具有重要的临床意义并且可能是其病因。IgG 型抗 IgA 抗体能固定补体，其清除循环中的 IgA 的速率比 IgA 正常的降解速率快 4 ~ 20 倍。一些 A Def 患者在静脉内给予含 IgA 的血清制品后发生严重的甚至危及生命的过敏反应，研究提示，抗 IgA 抗体(尤其是 IgE 型抗 IgA 抗体)与此相关[108]。正因为如此，输血时正常的供者红细胞要经过 5 次洗涤（在 200ml 体积里)或仅有来自其他 IgA 缺陷个体的血液制品才能被输给这些患者。A Def 患者通常也有针对牛奶和反刍动物血清蛋白的 IgG 抗体[109]，这些抗反刍动物抗体在用山羊(只要非兔来源)抗血清做免疫检测时通常被误判为“IgA”。自身抗体存在的概率也相当高[110]。

1433

A Def 的根本病因尚不清楚，在体外培养中合用抗 CD40 抗体和 IL-10 可刺激一些 IgA 缺陷患者的 B 细胞产生 IgA。而经过这些处理后，比 B 细胞不能产生 IgA 的患者似乎更易发生感染[111,112]。有些药物如苯妥英类、柳氮磺胺吡啶[113]、d-青霉胺或金被怀疑为致 A Def 的元凶。此病可在苯妥英类治疗后缓解或发生自发性缓解[114,115]。通常情况下，A Def 的发生意味着类风湿性关节炎等病的永久缓解。A Def 的男女发病率及家族发病率的规律符合常染色体遗传，在大多数家族此病各种表达为差异显著[99]。已经发现，此病发生于 CVID 患者家系中，一些 IgA 缺陷患者能继续发展成 CVID[98]，最近研究显示这两种病的易感基因均定位于 6 号染

色体 MHCⅢ区，是等位基因病(表 43.1)[99,100,104,105]。

伴发胸腺瘤的免疫缺陷

伴发胸腺瘤的免疫缺陷患者为成人，几乎同时伴有反复感染、全血丙种球蛋白过少血症、细胞免疫缺陷及良性胸腺瘤，患者也可并发嗜酸性粒细胞上升或下降、再生障碍性贫血或溶血性贫血、粒细胞缺乏症、血小板减少、全血细胞减少。尽管表达免疫球蛋白的 B 细胞百分比通常是正常的，但抗体形成贫乏，淋巴细胞进行性减少，尽管也可有其他类型的良性和恶性胸腺肿瘤，但胸腺瘤通常以梭形细胞型为主。

IgG 亚类缺陷

据报道有些患者的一种或多种 IgG 亚类缺陷，尽管其血清总免疫球蛋白浓度正常或偏高[107,116,117]。如果患者反复发生荚膜细菌感染，就可能患有 IgG2 亚类缺陷，因为 IgG2 亚类是主要的抗多糖抗体分子，多数缺乏 IgG2 或 IgG2 浓度极低的患者同时患有 A Def[106,107]。然而，并非所有发生反复感染的 A Def 患者皆有 IgG2 缺陷，并且一些 A Def 患者尽管 IgG2 水平正常，抗多糖抗体反应却有缺陷。同样，WAS 患者，IgG 水平正常却有严重的抗多糖抗体缺陷，其他非 WAS 患儿和成人，尽管 IgG2 浓度正常，所有其他免疫球蛋白亚类浓度也正常，却因为其严重的抗多糖抗体缺陷而经常发生感染[118]。与此相反，一些健康儿童其 IgG2 浓度偏低，接种多糖抗原后免疫反应却正常[119]。对其他 IgG2 缺陷患者随访发现其可演变为免疫缺陷病(如转化为 CVID)，提示 IgG 亚类缺陷的存在可能是更广泛的免疫功能失调的一个标志[120]。所以，接下来的一个更相关的问题即：患者产生针对蛋白和多糖抗原的特异性抗体的能力何在？所以，很难确定已报道的多种 IgG 亚类轻度缺陷的生物学意义，特别是当完全无症状患者由于完全缺乏 IgG1、IgG2、IgG4 及由于基因缺失导致缺乏 IgG 时(表 43.1)[121]。

X 连锁淋巴组织增生病(XLP)

XLP 也被称作 Duncan 病(以第一例患者名字命名)，表现出对 EB 病毒感染免疫反应不足的隐性性状[15,122]。患者直到发生传染性单核细胞增生，外表一直看似健康[15]。通过使用针对 XLP 的限制性酶切片段长度多态性(RFLP)探针，现在已可以在男性患者发展成原发性 EB 病毒感染前诊断出该病[122]。免疫学研究证实 13 例 RFLP 阳性个体 IgA 或 IgM 浓度升高和(或)IgG、IgG1 和 IgG3 的不同程度缺乏。但在 14 例 RFLP 阳性、EBV 阴性男性个体却无一例出现这种情况[122]。所以，男性患儿的免疫缺陷不能完全归因于 EB 病毒感染，而且原来就存在异常与对 EBV 的应答不足相关。该病平均发病年龄 <5 周岁，最常见的发病类型(75%)是严重的单核细胞增生，其中 80%的病例是致命性的，主要死因是广泛性肝坏死[15]，由识别 EBV 感染的自体 B 细胞多克隆活化的异常反应性细胞毒 T 细胞所引起。经历初次感染后的大多数患者最终变成(包括 T 细胞、B 细胞、NK 细胞)的广泛性细胞免疫缺陷、淋巴瘤或低丙种球蛋白血症，产生针对 EBV 核抗原(EBNA)抗体的能力显著受损，与此同时针对病毒胞膜抗原的抗体滴度在 0 和显著升高间波动。许多患者针对 EBV 感染细胞的抗体依赖的细胞介导的细胞毒效应(ADCC)效应很低，NK 细胞功能退化，针对 EBV 的记忆 T 细胞也有缺陷，利用单抗研究淋巴细胞亚群异常显示 $CD8^+$ 细胞百分比上升，体外用 PWM 刺激后其 B 细胞比正常人的免疫球蛋白合成显著减少[15]。所以，这些患者发生了 EBV 特异性和非特异性的免疫缺陷。XLP 的缺陷基因定位于 Xq26-q27 区，但是撰写本文时其尚未被鉴定(图 43.1，表 43.1)[15,16]。少数 XLP 患者在给予 HLA 配型相合的相关或不相关全骨髓移植后，将近一半人现在仍健康存活，无症状[123]。

T 细胞缺陷

一般而言，T 细胞功能部分或完全缺陷的患者易于患上感染或其他尚无有效治疗措施的临床疾病，或临床症状比抗体缺陷病更严重，而且患者也鲜有活到成年者。

德乔治综合征

早期胚胎发育过程中第三、第四咽囊发育畸形导致胸腺发育不良，进而导致胸腺和甲状旁腺发育不良[2,124]。同一发育时期形成的其他结构通常也受到影响，导致大血管异常（右主动脉）、食管闭锁、悬雍垂裂、上肢发育不良[125]、先天性心脏病（房间隔和室间隔缺损）、上唇裂、两器官间距离过远、双眼反向先天愚型倾斜、下颌骨发育不全和低位器官的切迹耳。临床上德乔治综合征与酒精胎儿综合征有相似之处[124]。德乔治综合征的诊断提示通常首先是新生儿期的低钙性癫痫发作。自从第一次描述该综合征以来，人们发现胸腺和甲状旁腺不同程度的发育不全比完全不发育更为常见，有些患儿很少患上致命性感染并能正常成长，这些患者被称作不完全性德乔治综合征[126,127]。而那些完全性德乔治综合征患者就像 SCID 患者一样，对机会性病原菌（如真菌、病毒和卡氏肺囊虫）易感，输入未经辐射处理的血液时易发生移植物抗宿主病（GVHD）。

德乔治综合征患者通常仅有轻度淋巴细胞减少[126,127]，然而其 T 细胞的百分比却不同程度地减少；与此对应，B 细胞所占的百分比就相应上升，B 细胞的功能仅在与 Th 相关的部分受损，免疫球蛋白浓度通常正常，尽管有时 IgE 浓度上升而 IgA 浓度下降[126,127]，对血中的淋巴细胞作单抗分析证实，尽管 $CD3^+$ T 细胞数量下降，$CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的比例却正常。对血中的淋巴细胞给予丝裂原刺激后，会出现无反应，反应减弱或正常反应三种情况，这取决于胸腺缺陷的程度，提示存在的 T 细胞本身是正常的[126,127]。研究发现胸腺组织仍含胸腺小体，胸腺细胞密度正常，皮质和髓质界限仍存在，淋巴滤泡通常也会存在，但淋巴结副皮质区和脾的胸腺依赖区显示不同程度的缺失。

男女患者均可发生该综合征，但家族性聚集现象少见。但据报道发现了 3 例明显的常染色体显性遗传，22 号染色体上 q11.2（德乔治染色体区或 DGCR）特殊 DNA 序列的微缺失见于大多数患者[24,128,129]（表 43.1）。应用常见缺失区内的微卫星 DNA 标记物，通过 PCR 确定其基因型能够快速检测此类缺失。此区的其他几个候选基因已被鉴定[22,24,131,132]。似乎母源性 22q11.2 缺失最为常见[130,133]。德乔治综合征与软腭-心-面综合征（VCFS）、锥形躯体面综合征（CTAFS）有相似之处[134]。

由于这三种病均有锥形躯体心脏及 22q 缺陷，所谓 CATCH22 综合征（心与面部畸形、胸腺发育不良、腭裂及低钙血症）包括 22q11.2 缺失所致的各种临床病理表现[136]。另一与德乔治综合征及软腭-心-面综合征相关的基因缺失定位于 10 号染色体 p13 上（表 43.1）[23,137,138]。

不完全德乔治综合征不需要免疫治疗，若他们无严重的心脏损害，就很少有临床表现。除了有些发育迟缓及癫痫发作的患者需要进行胚胎胸腺移植外，对于大部分患者，由于免疫缺陷的严重程度不一样，胚胎胸腺移植是否会有助于患儿，疗效很难评估[139]。给此类患儿移植 HLA 配型相合的培养成熟的胸腺上皮组织已成功重建了其免疫功能[140]。3 例患者在接受了 HLA 配型相合的全骨髓移植后也重建了其免疫功能[141]。

裸鼠

与患德乔治综合征的婴儿最相似的免疫功能缺陷动物就是裸鼠[142,143]。然而，与德乔治综合征相比，裸鼠的缺陷存在于其上皮细胞，导致无毛[144]并且胸腺无发育[145]。研究发现，裸露表型是由于小鼠 11 号染色体上一个基因突变所致，此基因编码一个新的翼状螺旋或叉头功能域转录因子，即 Whn[146]。与德乔治综合征或软腭-心-面综合征发病更为相关的是小鼠 16 号染色体的 150Kb 区域。此区域最近被发现与这些综合征 22q11.2 最常见的缺失部分有同线性（syntenic）[147]。在此区已找出 7 个基因，最为有趣的是 2 个丝/苏氨酸激酶基因和一个新的鹅蛋螺旋样同源异形盒基因（Gscl）。这些基因将被作为基因敲除的靶点，以决定突变鼠的单体不足性（haploinsufficiency）是否可引起该综合征的区域缺陷特征。

联合免疫缺陷病

X连锁退行性重症联合免疫缺陷病

重症联合免疫缺陷病(SCID)是一种罕见的致命性的综合征,以严重的T细胞和B细胞功能缺陷为特征[2,148]。自从1950年发现第一例SCID至今的48年间[149],人们已逐渐认识到这种疾病的遗传背景是相当不同的(表43.1)。X连锁SCID(XSCID)是最常见的一型,全美近42%的SCID患者皆为此型。图43.2显示了SCID各种遗传类型所占的百分比,这是根据作者对过去30年的病例所做的统计估计的。患儿在出生后头几个月即经常发生腹泻、肺炎、耳炎、脓毒症、皮肤感染。最初的发育似乎是正常的,但一旦开始腹泻和感染就变得极度消瘦,机会性致病菌如白色念珠菌、卡氏肺囊虫、水痘、麻疹病毒、副流感3型病毒、巨细胞病毒、EB病毒、卡介苗的持续感染均可致死。这些患儿也缺乏排斥异体组织的能力,所以可能发生移植物抗宿主病(GVHD)。SCID胎儿在宫内由于母源性T细胞进入胎儿血液循环或输入未经放射处理的血液制品或异基因骨髓均可导致GVHD[123]。

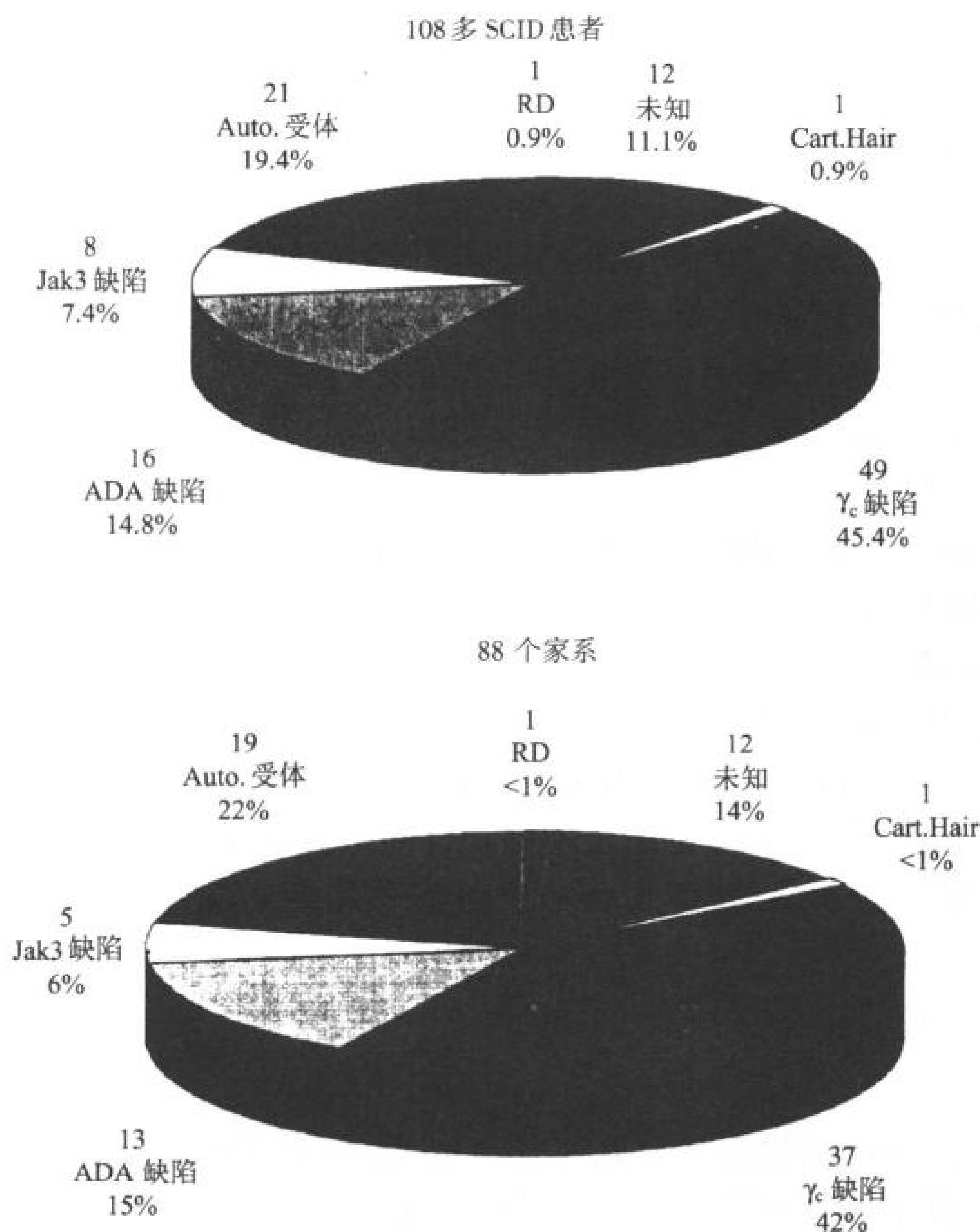


图43.2 作者对来自88个家系的108名SCID患者连续观察30年后,根据不同遗传型计算出的相对百分比(经Buckley RH,Schiff RI,Schiff SE等允许影印。J Pediatr 1997;I130:380)。

1435

SCID患儿淋巴细胞减少(图43.3)[150,151]。患儿的淋巴细胞,包括宫内采集的或脐血淋巴细胞在体外对丝裂原、抗原和同种异基因细胞的刺激不能发生淋巴细胞增殖反应。所以,新生儿的治疗医师应了解人脐血全淋巴细胞的正常值(2000~11 000/mm^3)并对低于正常值的新生儿做全血功能检测[150,152,153]。当大多数SCID患者确诊时(6~7个月),其正常同龄儿的绝对淋巴细胞计数会更高,所以,只要计数少于4000/mm^{3}即是淋巴细胞减少[154]。血清免疫球蛋白浓度可降至缺如,免疫后无抗体形成。

尽管T、B细胞功能均有严重缺陷,XSCID患者B细胞的百分比通常增高[150,152,153,155]。然而,这些B细胞

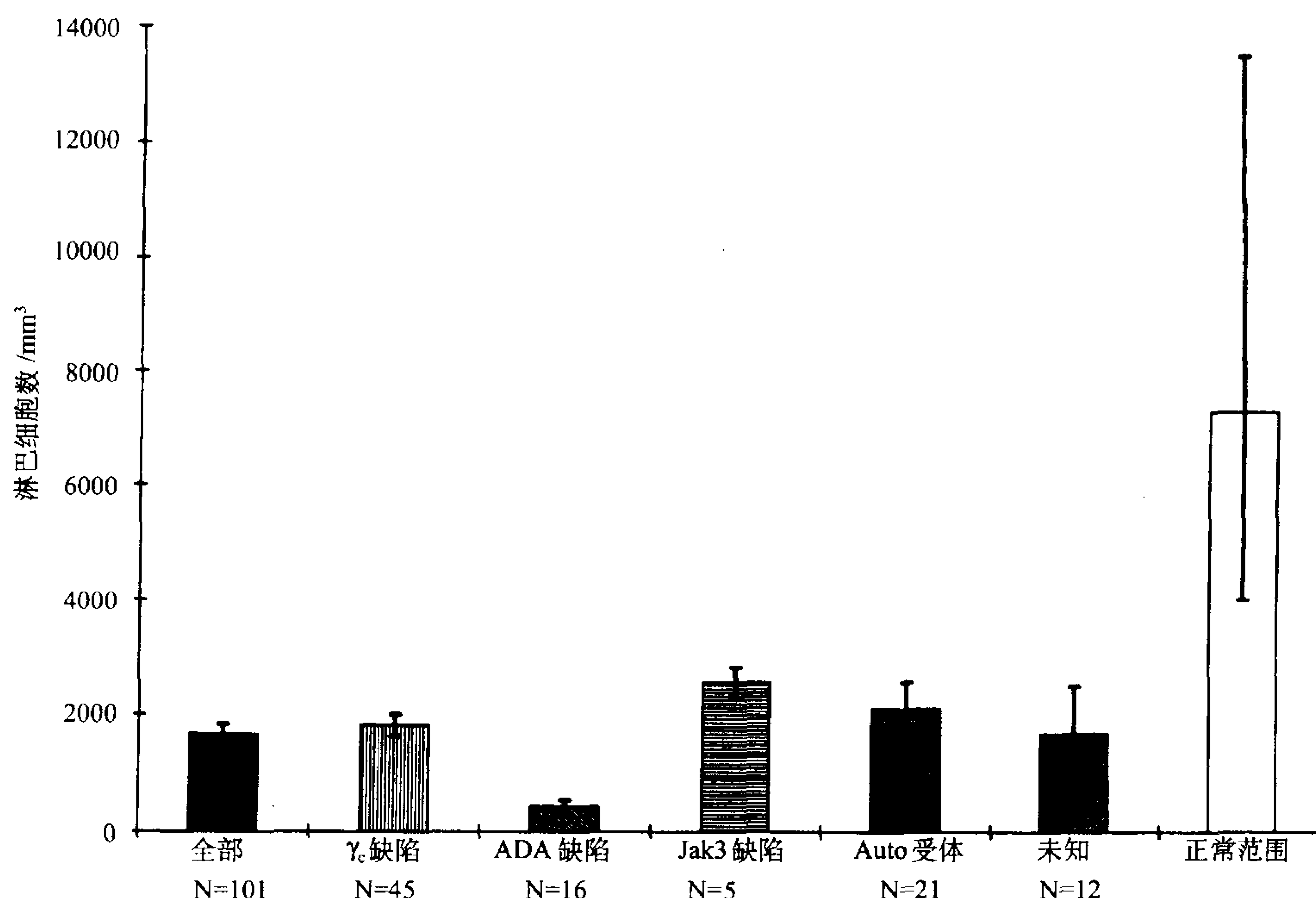


图 43.3　对不同类型 SCID 患者在初步评估基础上所作的全血淋巴细胞计数 MEAN ± SEM。6 月龄婴儿全血淋巴细胞计数正常均值应为 7300/mm^3，正常值范围 4000 ~ 13 500/mm^3。ADA 缺陷患儿淋巴细胞计数值显著低于其他类型 SCID 患者(经 Buckley RH. Schiff RI. Schiff SE 等允许影印自 J Pediatr 1997; 130:382)。

1436

却不能正常合成免疫球蛋白，即使在骨髓移植重建 T 细胞后也不能。相比之下，XSCID 患者除了从胎盘获得母源性 T 细胞外，只有很少或几乎无 T、NK 细胞，其功能也极低甚或根本无功能(图 43.4)[150,156]。最为典型的是，所有的 SCID 患者胸腺非常之小(通常 < 1g)，胚胎发育中不能从颈部延伸而来，包含极少的胸腺细胞，皮髓质无界限，缺乏胸腺小体。然而，胸腺上皮正常，移植的骨髓干细胞却能在微小的胸腺中发育成正常的 T 细胞。SCID 患者脾脏胸腺依赖区缺乏淋巴细胞，而且淋巴结，扁桃体，腺样体，集合淋巴结有缺陷或发育极度低下。

通过 RFLP 分析确定 XSCID 的致病基因定位于 Xq13 区[157](图 43.1)。后来确定该基因编码一个由几个细胞因子受体共享的 γ 链(γc)(表 43.1，图 43.5)。包括 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 和 IL-15 的受体(图 43.6)[158~161]。本病为美国 SCID 患者中最常见的类型(图 43.2)。在最初研究的 136 例患者中，在所有 8 个 IL-2RG 外显子区鉴定了 95 个显著突变，其中大多数在一至数个核酸水平存在小突改变(图 43.5)[162~164]这些突变导致 2/3 的患者的 γc 链异常，余下的 1/3 患者 γc 链缺如，即使成功进行了骨髓干细胞移植后 XSCID 患儿也不能正常合成免疫球蛋白，但作者和其他人[166]却发现 XSCID 的 B 细胞在体外与抗 CD40、IL-1 或 IL-13 共培养时，能够完成类型转换并合成 IgE，通过对 T 淋巴细胞 X 染色体非随机性失活的检测能查出 XSCID 基因携带者[8]。X 染色体失活研究结果早就提示，基因缺陷除了影响 NK、T 细胞系外，也影响 XSCID 患者的 B 细胞系[167,168]。研究发现，突变基因通过几个细胞因子受体介导错误信号，这就解释了为什么单一突变能够影响多种细胞类型[169~172]。通过单链构象多态性分析(SSCP)[163,173]，可筛选出致 XSCID 的 γc 基因突变。随着被研究的患者增多，有可能发现一些非典型病例，例如最近就报道了一例编码 γc 的已知基因的明显性回复突变[174]。

SCID 是一种儿科急症[150]，IVIG 替代疗法不能阻止疾病的进行性恶化[175]。除非给予 HLA 配型相合或 HLA-单体型相合的骨髓移植，患儿通常在 1 周岁内死亡，而在 2 岁内几乎全部死亡。另一方面，在出生后头 3 个月给予骨髓移植其存活率可提高到 95%以上[176]。所以，早期诊断至关重要。患儿的脐血淋巴细胞减

1437

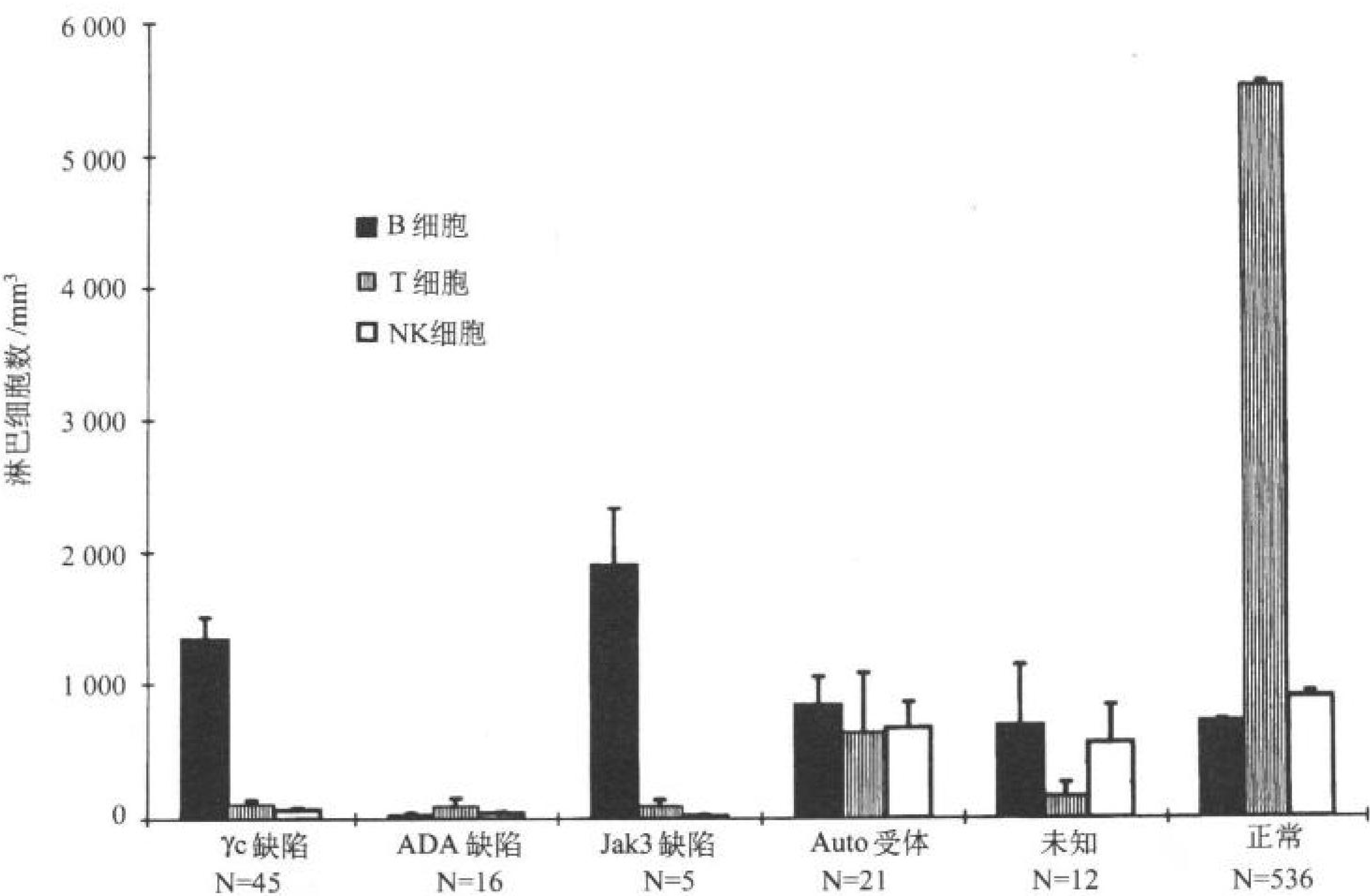


图 43.4 对不同类型 SCID 患者在初步评估基础上以正常儿童作对照，CD20⁺ B 细胞、CD3⁺ T 细胞及 CD16⁺ NK 细胞的 MEAN ± SEM(经 Buckley RH, Schiff RI, Schiff SE 等允许引用自 J Pediatr 1997; 130:383)。

1438

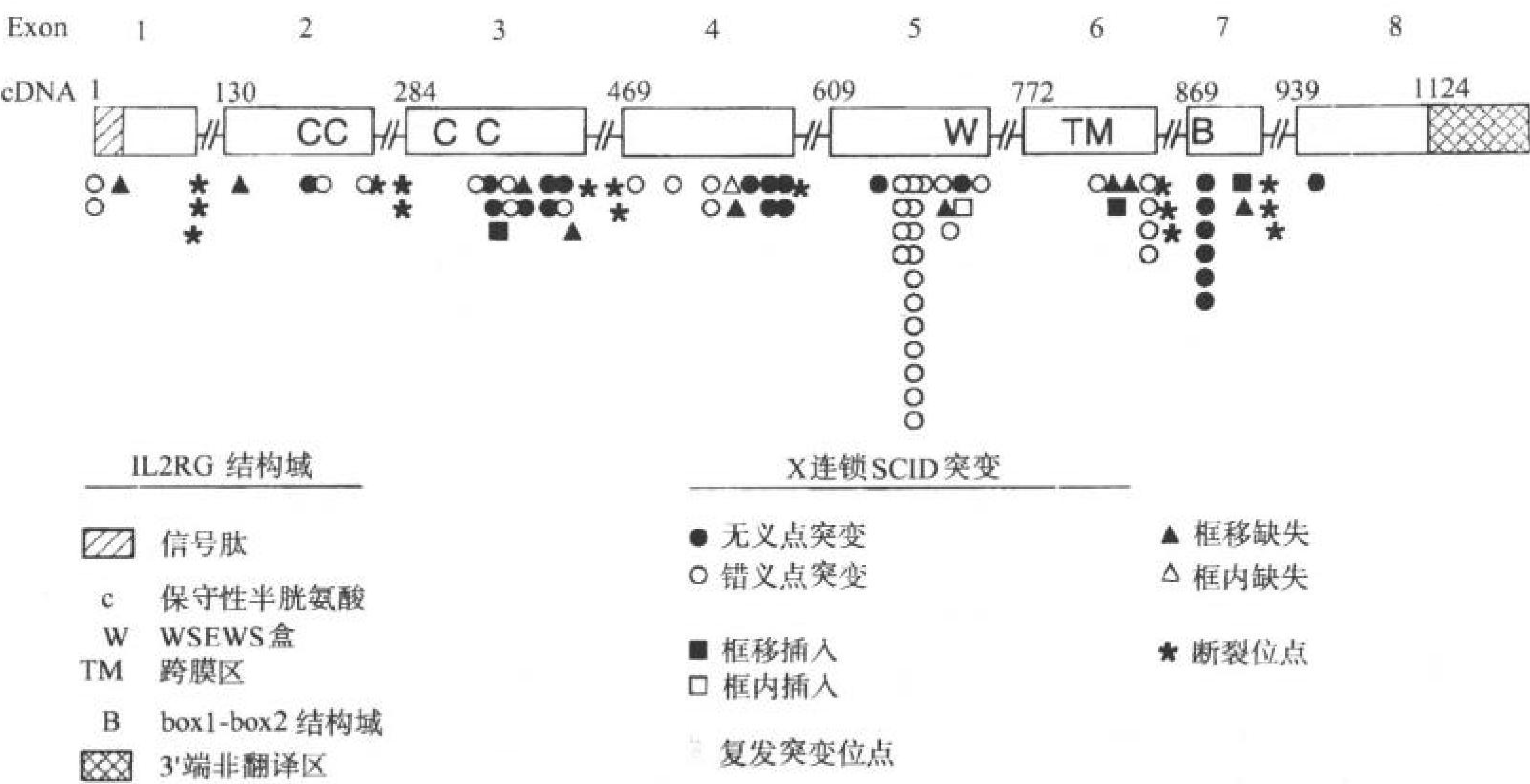


图 43.5 标明外显子的 IL-2RG cDNA 图谱，按照每个外显子，蛋白结构域的第一个编码核苷酸及在 87 个 XSCID 不相关家系发现的点突变来确定 cDNA 数目。在不相关父母发现的相同突变围绕于阴影框(经 Puck jm, Pepper AE, Henthorn PS 等许可影印 Blood 1997;89:1970)。

少[150,177]。这提示医师需进一步检查其 T 细胞功能并检测其脐血单核细胞表达 γc 的水平[178]。现在，由于成功地进行了骨髓移植[123]，世界上有 375 例 SCID 患者存活下来。

XSCID 也见于狗[179]。同人类 SCID 患儿一样，患病小狗在 5 个月内由于细菌性或病毒性感染全部死亡，包括犬瘟热、传染性肝炎、严重脓皮病和细菌性肺炎，与人类 XSCID 更为相似的是，这些狗的循环 B 淋巴细

胞数量增多,血清 IgM 浓度正常,但血清 IgG 和 IgA 浓度低甚至缺如。同人类 XSCID 患者一样,患 XSCID 的小狗在出生后头三周内几乎缺乏 T 细胞,但不像人类,一半患病小狗三周后能够产生数量达到正常值 1/3 的 T 细胞[180]。然而,尽管这些 T 细胞能够迅速从 CD45RA 转变成 CD45RO,但对 T 细胞丝裂原刺激的增殖反应却严重受损,尸检发现胸腺和淋巴组织发育不良[179]。然而,与人不同的是,胸腺中胸腺小体存在,偶尔可见正常的皮髓质交界,狗的 IL-2RG 基因的两处不同的突变已被鉴定[181,182]。

1439

敲除 IL-2RG 基因的突变小鼠也有胸腺发育不良并且缺乏 NK 细胞[183,184]。然而,其与人及狗 XSCIDS 不同的是其 B 细胞数量大为减少,它们的一些 $CD4^+$ T 细胞能对 γc 非依赖性而非 γc 依赖性丝裂原刺激发生反应。

常染色体隐性遗传重症联合免疫缺陷病

本病为首先发现的一类 SCID,1958 年最先由瑞士的研究人员报道[149],本病在美国比在欧洲少见(图 43.2)[150,153]。3 种 SCID 的常染色体上的突变基因已被确定:ADA(腺苷脱氨酶)缺陷、Jak3 缺陷及 RAG1 或 2 缺陷,尚有其他病因有待发现(表 43.1,图 43.2)[164,185]。

由于 ADA 缺陷所致的常染色体隐性遗传性 SCID

将近 15%的 SCID 患者缺乏 ADA 酶(图 43.2)[19,150]。如同 XSCID 一样,ADA 缺陷患者对机会性致病菌、病毒和寄生虫病易感并易发展成临床疾病。由于血液制品或骨髓中含有同种异基因 T 细胞,患者也易于发生 GVHD。然而,ADA 缺陷病也有一些独有的特征,包括存在肋骨支架异常,与 X 线所示佝偻病性肋骨串珠及软骨骨发育不良所致多种骨结构异常相似,这主要发生在肋骨软骨关节、髂骨骨突以及椎骨体。

ADA 缺陷患者的淋巴细胞减少比其他类型的 SCID 患儿更为严重,总的淋巴细胞计数平均值 < 500/mm^3(图 43.3);其 B 细胞或 NK 细胞百分比增高少见(图 43.4)[150],NK 细胞功能正常[150,152]。移植前未予化疗,给予骨髓移植恢复其 T 细胞功能后,其 B 细胞功能良好,这主要是由于 ADA 缺陷主要影响 T 细胞功能。与其他类型的 SCID 患儿做进一步的比较,正如其他类型的 SCID 一样,发现一些 ADA 缺陷患儿胸腺中胸腺小体少见,这种变化发生于胸腺分化早期[19]。此外,轻型患者也有报道,使得免疫缺陷的诊断延迟,有的甚至在成人后才被诊断出来。

编码 ADA 的基因定位于 20q13 末端,10 年前就已被克隆[186]出来并测序(表 43.1)[19]。该基因突变所致的 ADA 缺陷使得 2′脱氧腺苷酸和 2′-*O*-甲基化腺苷酸在体内大量积聚[187]。后者直接或间接地导致淋巴细胞毒性,从而引起免疫缺陷,由于腺苷酸和脱氧腺苷酸是 SAH (S-腺苷高半胱氨酸)水解酶的重要致死性灭活因子,故导致 SAH 的积聚(SAH 是针对几乎所有细胞甲基化反应的水解酶的重要抑制物)。

同其他类型 SCID 一样,可以给患者移植 HLA 相同或 HLA 单体型相同的去除 T 细胞的骨髓纠正 ADA 缺陷,移植前后并不需要给予化疗;但这仍然是一种选择性治疗方案[123,152,188]。患者一周一次皮下给予聚乙二醇修饰的牛 ADA 进行替代治疗,已使 40 多例 ADA 缺陷患者的临床症状和免疫功能获得了改善[189~191]。然而,所获得的免疫活性并不像骨髓移植那样有效[123]。有鉴于此,PEG-ADA 疗法如果骨髓移植有效,就可不采用,其会使婴儿产生移植物排斥能力。ADA 是第一种试行过基因治疗的遗传病,然而这些特殊试验到目前为止并不十分成功[192~196]。最近有一例报道称 ADA 突变基因在体内自发回复突变为正常基因[197,198]。

与人类患者不同,ADA 基因敲除小鼠并不能活过围产早期,多死于肝、小肠坏死及肺不张[199]。

Janus 激酶 3 缺陷所致的常染色体隐性遗传 SCID

最近发现了一类 SCID 患者,其免疫缺陷类似于其他类型的 SCID,对感染易感,对同种异体 T 细胞易于发生 GVHD。然而,其淋巴细胞特征却极为类似于 XSCID 患者,包括 B 细胞百分比上升,T,NK 细胞百分比极低(图 43.4)[150]。由于 Jak3 是已知的惟一与 γc 相关的信号分子,它是一个突变候选基因,该突变可导致并非由 ADA 缺陷所致的常染色体隐性 SCID(表 43.1,图 43.6)[200~205]。到目前为止,已诊断出 15 例缺乏 Jak3 的患

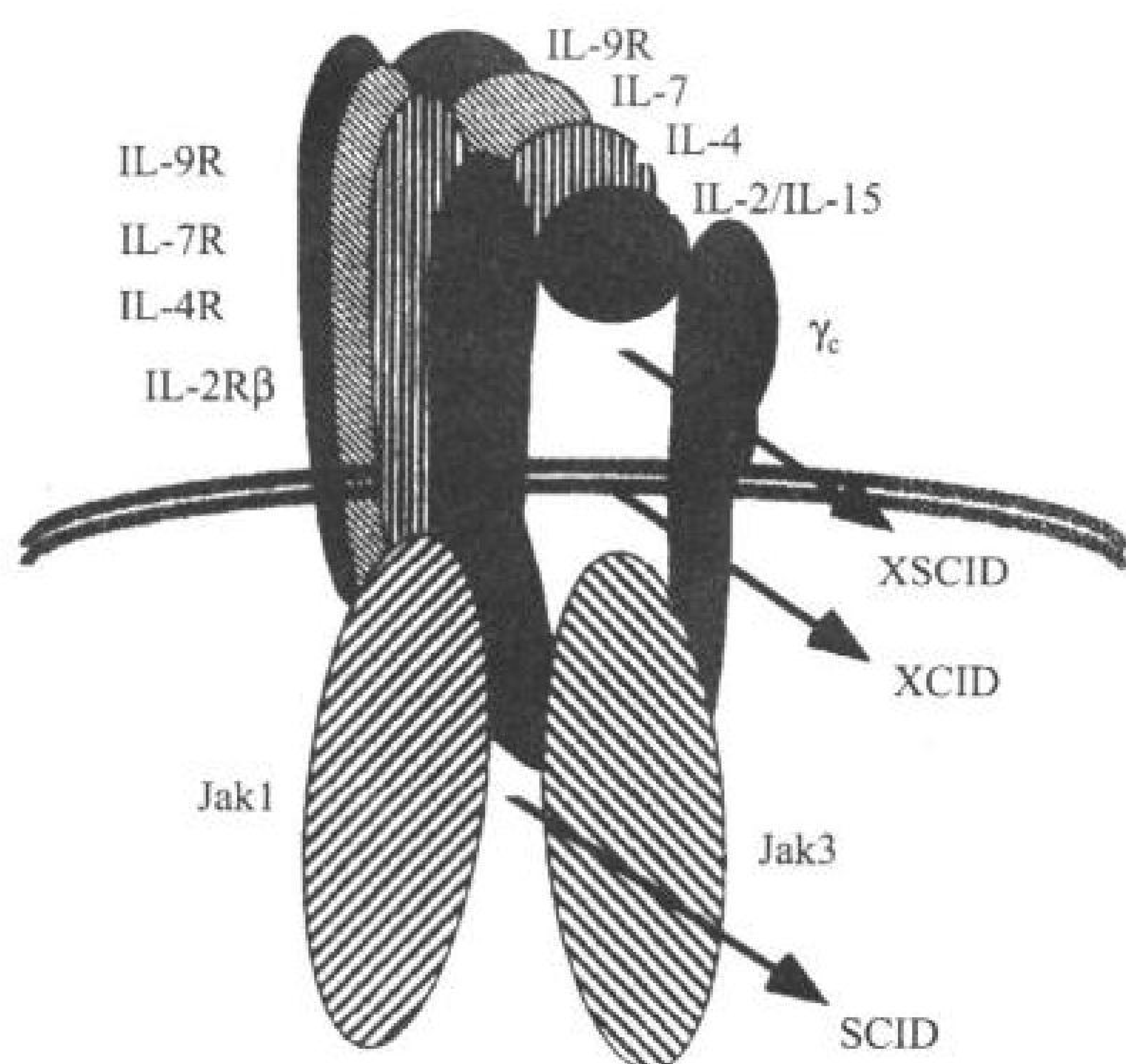


图 43.6 本图显示 Jak3 是共有 γ 链(γc)主要的信号转导因子,而 γc 被多种细胞因子受体共享。编码 Jak3 的基因突变产生一种类似于 XSCID 表型的常染色体隐性遗传 SCID(本图由 Drs. Sarah Russell 和 W arren Leonard 惠赠)。

者[29,150,206]。同 XSCID 患者一样,其 NK 细胞活性极低甚至缺如,通过移植单倍体相同的干细胞成功重建 T 细胞功能后,患者仍不能形成 NK 细胞[123]。此外,同 XSCID 患者一样,干细胞移植后尽管存在大量 B 细胞,患者的 B 细胞却不能具有正常的功能。其不能形成功能正常的 NK 细胞或 B 细胞的原因尚不清楚,被认为与几种细胞因子受体共享的 γc 功能缺陷相关 (图 43.6)[207]。

不同于人类 Jak3 基因缺陷病(但类似于 IL-2RG 突变鼠),Jak3 基因敲除小鼠的 B 细胞非常之少[208],同人类 Jak3 缺陷患儿一样,其 T 细胞或 NK 细胞极少或缺如。

RAG1 或 RAG2 缺陷所致常染色体隐性遗传 SCID

最近才发现此病患儿同其他 SCID 患者一样,易感染并完全缺乏 T、B 细胞功能,然而,其淋巴细胞表型不同于 γc,Jak3 或 ADA 缺陷所致 SCID 患者的表型,T、B 淋巴细胞均缺乏(所谓的 T-B-SCID),循环中以 NK 细胞为主(图 43.4)。这提示其抗原受体基因存在异常,而且实际上,带此表型的一些患者被发现其编码重组酶的活化基因 RAG1 或 RAG2(表 1)[209]存在突变,进而导致通过基因重组形成的抗原受体无功能,正如 RAG1 或 RAG2 突变小鼠一样[210,211]。后者的淋巴器官非常之小,所含的淋巴细胞基因完全不能重排成免疫球蛋白位点或 TCR 位点。

直到最近人们才发现,Bosma SCID 小鼠可能是人类 T-B-SCID 的一个动物模型[212]。如同人类 RAG1 或 RAG2 突变的 SCID 患者一样[209],这些小鼠只有很少部分的胸腺上皮含有稀疏的淋巴成分,但由于两个品系的抗原受体基因缺陷性重排导致外周血和所有外周淋巴组织中几乎完全缺乏 T、B 淋巴细胞[213]。"渗漏性" SCID 小鼠由于抗原受体重排的不完全阻断,导致存在 B 细胞、免疫球蛋白及一些有功能 T 细胞[214]。然而,像 RAG1 或 RAG2 突变一样,骨髓来源的髓系细胞和 NK 细胞数量正常[215]。现已清楚,Bosma SCID 小鼠缺陷是由于小鼠 16 号染色体上一个基因无义突变所致,该基因编码 DNA 依赖性蛋白激酶 p350 或 Ku 蛋白的催化亚单位[216,217]。编码相同蛋白的人类基因定位于人染色体 8p12-q12,但到目前为止尚未发现该基因突变所致的人类 SCID[218]。

20 多年前就已知道阿拉伯马携带有一个 SCID 隐性基因,最近确定了其遗传方式为常染色体隐性遗传[219]。在纯种(thoroughbred)马中杂合态该基因发生的概率为 1/4[219,220]。然而与人类常染色体隐性遗传 SCID 患者相比,除了小部分淋巴组织异常以外,患 SCID 的阿拉伯马的基本胸腺结构是正常的。但小马驹的淋巴细胞显著减少,并有低丙种球蛋白血症,细胞免疫和体液免疫完全缺陷,多在出生后 5 个月内死于感染[219,221]。最近的研究显示,Bosma SCID 小鼠发生的那个基因突变同样也可发生在阿拉伯马身上[222]。

1959 年在单卵双生兄弟身上发现了视网膜退行性变,患者外周血及骨髓中完全缺乏淋巴细胞及粒细胞。据报道,到目前为止 7/8 的此病患儿在出生后 3 ~ 119 天死于致命性感染;1/8 的患儿在骨髓移植后获得了完全的免疫重建[2]。30% 患者有成熟的表型正常的粒细胞(虽然数量也显著减少),1/4 患者脐血中 E 玫瑰花结 T 细胞百分比正常,这并不支持该病患者的细胞完全分化无能的观点。然而,尽管后者脐血中 T 细胞的百分比正常,在体外对丝裂原的刺激却不能发生增生反应,其胸腺全重 < 1g,无胸腺小体,胸腺细胞少见甚至缺如,这种常染色体隐性遗传病的缺陷基因尚不清楚。

联合免疫缺陷(CID)

CID 是一种综合征,其特征是 T 细胞功能很低但并非无功能。CID 患者在婴儿期即有反复发生的慢性肺

部感染、发育障碍、口部和皮肤念珠菌感染、慢性腹泻、反复皮肤感染、革兰氏阴性菌脓毒病、泌尿道感染或严重水痘[2]。

各型血清免疫球蛋白水平正常或升高,除了选择性 IgA 缺陷,有些病例 IgE 浓度显著增高。虽然大多数患者的抗体形成能力受损,但仍有近 1/3 的报道病例其抗体形成能力正常或貌似正常。此外,许多患者的固有层和淋巴结通常富含浆细胞,还发现其中性粒细胞、嗜酸性粒细胞减少。

细胞免疫功能研究发现患者对普遍存在的抗原迟发性皮肤超敏反应无能,淋巴细胞减少,在体外用丝裂原或同种异基因细胞刺激所致的淋巴细胞增殖反应极为低下,但并非缺如。CID 患者 $CD3^+$ T 细胞有严重缺陷,但和 AIDS 患者相比其 $CD4^+/CD8^+$ 细胞比例正常,而 AIDS 患者有选择性 $CD4^+$ T 细胞缺陷,CID 患者外周淋巴组织的副皮质区淋巴细胞缺如,胸腺非常小,胸腺细胞贫乏,通常无胸腺小体;然而,胸腺上皮未受到影响,本病为一种常见的常染色体隐性遗传病。

1440

CID 患者的存活期通常比 SCID 患儿要长,但他们发育障碍,并且早死,通过配型相合的同胞或不相关成人供体的全骨髓移植或脐血移植,有些患者已成功重建了其免疫功能,但是由于患者要在移植前进行化疗以能接受移植物,进行去除 T 细胞的单体型配型相同的骨髓干细胞移植却并不十分成功,而且对移植物有排斥。

嘌呤-核苷磷酸化酶(PNP)缺陷

40 多例 CID 患者被发现有 PNP 缺陷(表 43.1)[20]。虽然 ADA 与 PNP 均是参与嘌呤替代合成途径的酶,PNP 缺乏所致的免疫缺陷并不如 ADA 缺陷那样严重。与 ADA 缺陷作进一步的比较,PNP 缺陷无特异性身体或骨结构异常。全身性牛痘、水痘、淋巴肉瘤以及未经辐射处理的同种异基因血或骨髓来源的 T 细胞介导的 GVHD,均可致其死亡。2/3 的患者有神经系统异常,包括从痉挛到智力发育迟缓的各种症状,1/3 患者有自身免疫病,最常见的即为自身免疫性溶血性贫血,此外特发性血小板减少性紫癜及 SLE 也有报道。

尽管有少数例外,但大多数患者各种血清免疫球蛋白的浓度正常或升高。PNP 缺陷患者和 ADA 缺陷患者的淋巴细胞减少一样严重。绝对淋巴细胞计数通常 $< 500/mm^3$,应用单抗检测淋巴细胞亚群证实 T 及 T 亚群显著缺乏,但 NK 细胞数量上升,功能增强,T 细胞功能较低并非缺乏功能,并随时间推移而变化。

编码 PNP 的基因定位于 14q13.1,已被克隆并测序,PNP 缺陷患者身上已发现了 PNP 基因的各种突变型。由于 PNP 为形成尿酸盐前体次黄嘌呤及黄嘌呤所必需,故而 PNP 缺陷患者不同于 ADA 缺陷患者,其血中及尿中尿酸显著缺乏。与大多数 CID 患者不同,尸检发现 PNP 缺陷患者同一些 ADA 缺陷患者一样,其胸腺偶尔有胸腺小体,现可对该病进行产前诊断。

为了纠正其免疫及酶的缺陷,有人对 PNP 缺陷患者尝试给予酶替代疗法或脱氧胞苷治疗,但并不成功,除非进行免疫重建。对儿童而言此病总是致命性的。骨髓移植是一种可供选择的治疗方案,但到目前为止仅有 3 例成功[224]。将来进行基因治疗不失为一种选择[196]。

软骨-头发发育不良

1965 年在宾夕法尼亚的阿米西家族发现了一种不同寻常的短肢侏儒患者,经常发生严重感染。到目前为止,非阿米西家族患者也曾有报导[2,225]。患者由于皮肤过多显得身材短而矮胖,干骺端软骨发育不良,手足关节伸展过度但肘关节却不能完全伸展,有细而稀疏的头发和眉毛,这些特征使其被称为软骨-头发发育不良(CHH)。放射检查发现其干骺端扫描边缘不齐、硬化或囊性变,与 ADA 缺陷相比,ADA 缺陷患者主要是以髂骨骨突、肋骨、躯体的病变为主,CHH 的软骨发育不良则主要影响四肢。患者还可发生严重且通常致命的水痘感染,进行性/坏疽性牛痘、疫苗所致脊髓灰质类。相关疾病包括红细胞缺陷、先天性巨结肠,此外恶性肿瘤的发病率也增高。

与此有关的三种模式的免疫功能失调已确定:体液免疫缺陷、细胞免疫缺陷(最常见的形式)及 SCID。然而,这三种病均有 NK 细胞数量增多,功能增强。

CHH 是一种常染色体隐性遗传病,在阿米西及非尼西家族,其缺陷基因定位于 9p21-p13(表 43.1)[226]。然而其基因至今尚未被鉴定,故而其根本性的遗传缺陷尚未被确定。体外研究显示其 T 细胞数量减少,T 细胞增殖缺陷,由于与 G1 期相关的内在缺陷使单个细胞进入更长的细胞周期[225,227]。患者的成纤维细胞也发生了异常,体外红系、粒系、单核细胞系异常,提示 CHH 的常见细胞有增殖缺陷[228]。一些有 SCID 表型的 CHH 患者通过骨髓移植获得免疫重建,这些轻型免疫缺陷患者可以活到成年,有的甚至活到老年。

伴有血小板减少和湿疹的免疫缺陷病(Wiskott-Aldrich,威-奥综合征)

威-奥综合征是一种 X 连锁隐性遗传综合征,特征为湿疹、血小板减少性紫癜(巨核细胞貌似正常,但血小板小且有缺陷),并对机会性感染极其易感,患者在婴儿期即存在下述症状:或是包皮环切部位出血时间延长,或是血性腹泻,或是多处青肿,由于血小板内在缺陷导致血小板减少,进而引起自身而非同源的 Cr^{51} 标记血小板寿命缩短。

患者出生后 1 年内通常也患上特应性皮炎(婴儿湿疹)及反复感染,也可发生哮喘和其他疾病,在低龄患者,常由肺炎球菌和其他荚膜细菌引起感染。发生中耳炎、肺炎、脑(脊)膜炎或脓毒血症。后来,机会性致病菌如卡氏肺囊虫和疱疹病毒成为主要病原体。度过婴儿期之后,自身免疫性血细胞减少及脉管炎常见。对感染的易感程度及特异表型的表达程度不同,个体差别很大。然而,活过 10 周岁的患者少见,感染与出血是主要的死因,12%的患者有可能发生致命性的恶性肿瘤。

1441

WAS 患者对多糖抗原的体液免疫反应受损,表现为缺乏或显著减少的同族血凝素及多糖抗原的反应性抗体贫乏或缺如[2]。此外,蛋白抗原的抗体浓度随着时间延长而降低、免疫记忆通常很差甚至缺乏,在白蛋白高分解代谢的同时,IgA、IgG、IgM 的合成率上升,造成高度不均一的免疫球蛋白浓度[230],大多数情况下血清 IgM 浓度低,IgA 及 IgE 浓度上升,IgG 浓度正常或仅轻度降低。血液淋巴细胞经流式细胞分析提示,$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$ 百分比轻度降低,对丝裂原的刺激淋巴细胞反应转度退化,WAS 患者的外周血 T 细胞表达的 CD8 分子 α/β 异型二聚体减少,表达 α/α 同型二聚体 CD8 的水平增高,这可用来解释一部分淋巴细胞功能缺陷现象[231]。

致病的突变基因定位于 Xp11.22-11.23(图 43.1),1999 年已由 Derry 和同事分离出来(表 43.1)[9],仅有限地表达于淋巴细胞系和巨核细胞系[9],其基因编码产物为富含脯氨酸的含 501 个氨基酸的蛋白,缺乏疏水性跨膜区,被命名为 WASP(WAS 蛋白),研究发现其能够结合 CDC42H2 和 rac,rac 为 1 个 GTP 激酶的 Rho 家族的成员,是肌动蛋白聚合的重要成分[233,234]。此外,WASP 通过 src3 同源区[235]与 NCK 发生接触,并与酪氨酸磷酸化的 Shc 接触[236],WASP 似乎控制着肌动蛋白片段的组装,其组装过程要求 PKC 及 TK 信号下游的微泡形成[236],在 WAS 患者已发现了大量不同的 WASP 基因的突变[237,238],突变位置与感染易发性或其他症状在一些病例中有一定相关性(Ochs,个人通讯),而在其他病例并非如此[239]。单纯的 X 连锁血小板减少也是由 WASP 基因突变所引起的[240],通过检测几种造血细胞系非随机性 X 染色体失活或检测突变(在家族史已知的情况下),可以确定致病基因携带者[241-243],如果已知其家族中有该突变,可通过检测绒膜绒毛样品或羊膜穿刺对 WAS 进行产前诊断。最近报道了 2 个家系,其临床表型与 WAS 类似,是明显的常染色体遗传[244,245]。

许多 WAS 患者经过放疗或白消安与环磷酰胺治疗后再进行 HLA 配型相合的同胞骨髓移植,血小板与免疫异常能获得完全矫正[123],对 WAS 患者进行去除 T 细胞的单体型相同的干细胞移植,成功率却极低,这主要是由于移植前需要进行免疫抑制使其能接受移植物,并且去除 T 细胞后的免疫重建过程很长,对移植物的排斥,以及在那种背景下预先存在的机会性感染致死率高[123],最近,对 5 岁以下的 WAS 患者进行配型相合的无关供体移植,在一部分患者身上取得了成功[246]。由于二者的 T 细胞均被留在供者细胞悬液里,进行配型相合的脐血移植可能会取得同样的成功。除非进行免疫重建,临床表现更严重的 WAS 患者多在童年即死去,患 WAS 的大龄儿童面临的主要问题就是脉管炎,几例由于无法控制的出血而进行了脾切除的患者,血小板计数显著升高,并在预防性给予抗生素及 IVIG 的情况下临床表现良好[247,248],为了控制脉管炎而大剂量

应用阿斯匹林或其他的非甾体抗炎药可使血小板水平进一步升高,除非患者小于5岁并且有合适的不相关的配型相合的供体存在,在基因治疗还不可行而WAS患者又缺乏HLA相同供体的情况下,脾切除可作为一种治疗选择[196],现在WAS患者最常见的死因是EB病毒所致的淋巴网状内皮细胞恶性肿瘤。

X染色体相关皮屑(Sf)突变小鼠与WAS患者有些相似,有鳞屑状皮肤,血小板和红细胞计数低和消化道(胃肠道)出血[249],并出现一种致命的淋巴网状内皮疾病,由过度表达细胞因子IL-4,6,7及TNF-α基因的$CD4^+$ T细胞所介导。还不清楚这类鼠是否有免疫缺陷,然而,Sf突变小鼠的基因位点和人类WAS的基因位点均位于X染色体的同源片段区[252]。

共济失调——毛细血管扩张征(AT)

AT是一种复杂的联合免疫缺陷综合征,伴有相应的神经、内分泌、肝及皮肤疾病[2,253],最显著的特征是进行性小脑共济失调、眼(与)皮的毛细血管扩张、慢性窦肺病、恶性肿瘤的高发生率[254],以及各种体液、细胞免疫缺陷,在幼儿期开始学步时即有典型共济失调,并进行性恶化,直至不得不与轮椅为伴,通常发生在10~12岁。在3~6岁时出现毛细血管扩张症,接近80%的患者通常发生反复性细菌性窦肺感染,作者的一名患者即发生了致命的水痘感染,而输血相关的GVHD也有报道[255]。

50%~80%的本病患者有选择性IgA缺陷;有些患者部分原因可能是由于IgA高分解代谢所致[253],IgE浓度通常较低,IgA由各种不同低分子量的成分组成,IgG2或整个IgG减少,特异性抗体滴度减少或正常。细胞免疫受损,表现为迟发性皮试无反应性及同种移植物存活时间延长,体外淋巴细胞功能检查通常显示对T细胞和B细胞丝裂原的刺激其增殖反应轻度退化,$CD3^+$,$CD4^+$ T细胞的百分比仅稍低,$CD8^+$ T细胞百分比通常正常或增高,有时$\gamma\delta TCR^+$细胞数量上升。免疫球蛋白合成研究已显示Th细胞与内在B细胞缺陷。胸腺发育不全,组织少,缺乏胸腺小体。

患者的细胞与杂合子携带者的细胞一样对离子辐射的敏感性增高,DNA修复缺陷,染色体异常频发[253,256,257],50%的患者染色体断裂部位发生在7号染色体上编码TCR的基因处及14号染色体上编码免疫球蛋白重链的基因处,与导致联合T、B缺陷的基因突变十分相似,这些重排基因可克隆,或变得稳定,或向恶性肿瘤转化。本病中的恶性肿瘤常为淋巴网状内皮型,但腺癌及其他类型的肿瘤也有报道;未患病亲属其恶性肿瘤发病率也增高。

AT为常染色体隐性遗传,其致病的突变基因(ATM)经RFLP分析定位于11q22~23,最近已被克隆(表43.1)[21,253,256,258],基因产物为一DNA依赖性蛋白激酶,主要位于胞核,参与丝裂原性信号转导,减数分裂重组及细胞周期控制[250~261]。在目前所确定的突变之中,大部分被认为是通过阻断ATM蛋白,或终止正常的启动或转录或使大的成分缺失[262,263]来完全灭活ATM蛋白。现在已经建立了ATM基因敲除小鼠[264]。 1442

目前对该病还没有满意的有确切疗效的治疗措施[253],虽然有些患者能活到成年,但总的说来其预后极差,最常见的死因为淋巴网状内皮恶性肿瘤和进行性神经疾病[264]。

Nijmegen断裂结合征

本病为一罕见的常染色体隐性遗传病,其免疫、细胞遗传及放射敏感性表现与AT一样[265~267],然而,本病患者临床表现上与AT显著不同,包括身材矮小、鸟样面孔、小头(自出生后),缺乏典型的AT临床特征,如共济失调、毛细血管扩张,血清α-甲胎蛋白正常。智力可不同程度受影响:可以正常,可以中度智力发育迟缓。免疫缺陷似乎比AT严重,大多数患者有反复发生的呼吸道感染,7号和14号染色体有表达重排成分的倾向,患恶性肿瘤的概率比AT高许多。来自将近30个家系的40多名患者已被报道,大多是东欧血统[265,267],经过深入研究提示,此病患者遗传上与AT患者显著不同。本病的异常基因定位于8q21(表43.1)[268]。

组织相容性抗原表达缺陷

本病有两型:MHCⅠ型抗原缺陷(裸淋巴细胞综合征)和MHCⅡ型抗原缺陷[269]。

MHC Ⅰ型抗原缺陷

单独的 MHC Ⅰ型抗原缺陷罕见,所致的免疫缺陷比 SCID 轻得多,可能是由于年龄稍大才发病。患者血清 MHCI 类抗原和 β2 微球蛋白的量正常,但体内任何细胞上均检测不到 MHCI 类抗原,$CD8^+$ T 细胞缺陷,$CD4^+$ T 细胞正常,最近,发现 Moroccan 家族的 **2** 个同胞表现出相对较晚的反复发病,严重的细菌性肺部感染,并发现其 MHC 位点的 **2** 个基因中有 **1** 个发生了无义突变,在 **6** 号染色体上的这 **2** 个基因编码被称为 TAP 的抗原肽转运蛋白[25,270],这 **2** 个基因分别被称作 TAP1、TAP2。患病同胞的 TAP2 有 **1** 个无义突变(表 **43.1**),两人均有 $CD8^+$ T 细胞缺陷,淋巴细胞缺乏 MHC Ⅰ类抗原,TAP 的功能就是引导抗原肽段从胞质穿过高尔基器的膜,并将其连接到 MHC Ⅰ类抗原及 β2 微球蛋白的 α 链上,然后将其组装成 MHC Ⅰ类复合物,再转运到细胞表面,如果由于无抗原肽而不能完成复合物的组装,MHC Ⅰ复合物就会在胞质被破坏[271]。

MHC Ⅱ型抗原缺陷

不同基因型的此型常染色体隐性遗传综合征患者多为北非人后裔[269,272],不同基因型的患者在婴幼儿早期即存在顽固性腹泻,这通常与隐孢子虫病、肠道病毒(脊髓灰质炎病毒、柯萨其病毒)、疱疹病毒或其他病毒、口腔念球菌感染有关,患者也可发生细菌性肺炎,肺囊虫病(间质浆细胞性肺炎)、败血症。然而,其免疫缺陷并不像 SCID 那样严重,从不发生 BCG 病,输入未经放射处理的血液不发生 GVHD。[269]

MHC Ⅱ类抗原缺陷患者 $CD4^+$ T 细胞数量很低,$CD8^+$ T 细胞数量正常或增高,淋巴细胞轻度减少,虽然 B 细胞数量正常,血中的 B 细胞及单核细胞上检测不到 MHC Ⅱ类抗原 HLA-DP、-DQ 和 DR。由于缺少抗原呈递分子,其抗原特异性应答受损,导致低丙种球蛋白血症。此外,MHC 抗原缺陷型 B 细胞在混合淋巴细胞反应中不能刺激同种异基因细胞,淋巴细胞增殖研究显示其对丝裂原反应正常,但对抗原无反应,胸腺和其他淋巴器官极度发育不良,缺乏 MHC Ⅱ类分子导致胸腺选择异常,进而导致循环中的 $CD4^+$ T 细胞的 CDR3 构象改变[272,273],与 T、B 细胞免疫及 HLA 表达相关的免疫缺陷突出了 HLA 决定簇在有效的免疫细胞协同效应中的重要生物学功能。

MHC Ⅱ类抗原缺陷是多基因遗传的,至少已有 4 个不同的互补作用组被报道[26,272,274~276],目前所描述的基因缺陷影响Ⅱ类基因的表达调节,而不是引起 HLA-DP、DQ 或 DR 编码区的异常,在 6 号染色体上它们并没有同 MHC 基因分隔开,应用互补克隆技术已鉴定出两种不同的分子缺陷[276],二者均引起 B 细胞和巨噬细胞表面 MHC Ⅱ类分子的协同表达缺陷[274,277],其中一个在染色体上的编码蛋白 RFX5 的基因有突变,RFX5 为一个接合到 MHC Ⅱ类基因启动子区 X-BOX 的启动子 (表 43.1)[278],另一个在 16 号染色体 p13 上的编码一个新的 MHC CⅡTA 的基因有突变,MHC CⅡTA 协助蛋白结合到 MHC Ⅱ类基因启动子区[276,277,279,280],基因敲除 CⅡTA 小鼠的表型与人类患者表型一致[281]。

白细胞黏附缺陷

白细胞黏附缺陷 1

此病是由于 21 号染色体上 q22.3 上编码 CD18 的基因突变所致,CD18 是一个 95KDa 的 β 亚单位,被 3 个黏附性异源二聚体共享:B、T NK 淋巴细胞上的 LFA-1;中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞及 NK 细胞上的补体受体 CR3 及 p150,p95(另一种补体受体)[17,18,282]。这 3 个分子的 α 链(由 16 号染色体上的基因编码)因 β 链异常而无表达,患者有脐带延迟脱落、脐炎、牙龈炎、复发性皮肤感染,反复发生中耳炎、肺炎、败血症、回肠结肠炎[283,284]、腹膜炎、肛周脓肿,伤口愈合延迟。危及生命的细菌和真菌感染导致了高死亡率,患者对病毒感染和恶性肿瘤的易感性并没有增加,血液中性粒细胞计数在即使无感染时通常也显著增高,这是由于细胞不能黏附于血管内皮并迁移至血管腔。所有的细胞毒性淋巴细胞功能显著受损,是由于缺乏黏附性 LFA-1 所致;LFA-1 缺陷也干扰了免疫细胞相互作用及免疫识别。CR3 结合固定 C3 的 iC3b 片段和 β-葡聚糖;CR3 缺乏导致异常的吞噬细胞黏附,趋化性及吞噬作用中的呼吸爆发减弱。用针对 CD18 或 CD11a、b、c 的单克隆抗体对血液中的淋巴细胞进行筛选,可鉴定这些糖蛋白缺陷。由于 CD18 基因已被克隆并测序(表 43.1),本病在将来可考虑行基因治疗[196,,282],CD18 的基因敲除缺陷小鼠与人类患者有许多相似之处[285]。

1443

白细胞黏附缺陷 2(LAD2)

LAD2 是由于中性粒细胞的 Sialyl-Lewis X 缺乏所致,其为血管内皮细胞的 E 选择素配基[18,286]。本病首次发现于两个不相关以色列男孩,分别是 3 岁和 5 岁,两人父母均为近亲婚配(consanguinous parents),两人均有严重智力发育迟缓、矮身材、特征性的面貌及 Bombay(hh)血型,二者均是分泌者,Lewis 反应阴性,二者同 LAD1 患者一样均有反复发生的严重细菌感染,包括肺炎、牙周炎、中耳炎、局灶性峰窝织炎,同 LAD1 患者一样,感染伴发显著的红细胞升高(30,000 ~ 150,000/mm^3)但在反复发生峰窝织炎处无脓液形成,体外实验提示中性粒细胞有显著趋化缺陷,由于编码红细胞 H 抗原及分泌者状态的基因还编码独特的 α-1,2-岩藻糖苷转移酶,而且合成 Sialyl-Lewis X 需要 α-1,2-岩藻糖苷转移酶,作者推测岩藻糖代谢的原发缺陷是本病的根本病因[286];本病的异常基因到目前为止尚未确定。

IL-2Rα 链(CD25)突变

一个近亲婚配所生的男性婴儿 6 个月时就患有巨细胞病毒性肺炎、持续性口腔与食道念珠菌感染、腺病毒性胃肠炎,发育不良。还患上了淋巴组织顽固增生、肝脾肿大、下颌骨与肺部慢性炎症,活检显示肺、肝、肠、骨广泛性淋巴细胞浸润,血清 IgG、IgM 浓度升高,但 IgA 浓度低:其 T 淋巴细胞减少,CD4/CD8 之比更为降低,用抗 CD3,植物血凝素及其他丝裂原以及 IL-2 刺激其 T 细胞反应差,发现其 IL-2Rα 链(CD25)基因有一截断性突变(表 43.1)[28],不能排斥异体皮肤,使免疫细胞减少后成功地进行了同种异基因骨髓移植。

缺乏 IL-2Rα 链的低龄突变小鼠有表型正常的 T、B 细胞生成[287],然而,由于凋亡缺陷,长大后有巨大的淋巴器官和多克隆性 T、B 细胞增殖,并患有自身免疫病,如溶血性贫血、炎症性肠病。与此类似,IL-2Rβ 链基因敲除小鼠的 B 细胞在转化为浆细胞的过程中发生耗竭性分化,IgG1 与 IgE 浓度升高,含有引起溶血性贫血的自身抗体[288]。T 细胞对多克隆或抗原特异性活化因子无反应,已知 IL-2 可启动小鼠 αβ 淋巴细胞的凋亡[289]。根据这些实验结果,人们推测 IL-2Rα 和 β 链对 T 细胞活化过程,淋巴细胞活化后的克隆增殖与细胞死亡间的平衡以及防止自身免疫病均有重要的影响。

IFN-γR-1 突变

SCID 或其他严重 T 细胞缺陷婴儿发生弥散性 BCG 感染,然而,将近一半患者未发现特异性宿主缺陷。最近,在一 2.5 个月大患致命性特发性弥散性 BCG 感染的突尼斯女婴及 4 个患有弥散性非典型分枝杆菌感染并无可鉴别免疫缺陷[31]的马耳他儿童身上,找到了这种感染倾向性的一个可能解释,就这 5 个儿童而言,在其家谱中有亲缘关系,在其血液巨噬细胞对 IFN-γ 的刺激进行应答时,患者上调 TNF-α 表达的功能均有缺陷,此外,在其血液淋巴细胞或单核细胞上均缺乏 IFN-γR 的表达,每个患者的 6 号染色体 q22-q23 上编码 IFN-γR1 的基因均发现有突变(表 43.1),有意思的是,这些儿童对分枝杆菌以外的其他病原菌并不易感,患者的 Th1 应答正常。由于对分枝杆菌这些特殊胞内病原菌的 IFN-γ 途径应答的内在性损害,进而导致这些孩子对分枝杆菌感染易感,提示 IFN-γ 是维持有效巨噬细胞抗分枝杆菌活性所必需[30,31]。

IFN-γR 基因敲除小鼠并无明显异常,其免疫系统似乎发育正常[296]。然而,其对产单核细胞利斯特氏菌或牛痘病毒感染的易感性升高,尽管其对这些病原体的细胞毒和辅助 T 细胞应答正常,它们也不能产生正常的抗原特异性 IgG2α 抗体应答。同样,IFN-γ 基因敲除小鼠死于亚致死剂量牛分枝杆菌(BCG)感染,体外这些动物的脾细胞对丝裂原和同种异体抗原的刺激显示出不受控制的增生反应,混合淋巴细胞培养后细胞毒 T 细胞应答上调。与此同时静息 NK 细胞活性降低[291]。所以,IFNγ 及其受体对免疫系统几种细胞功能的负性调节是必需的。

切-东综合征

这种罕见病的特征是眼皮肤白化病,易反复发生呼吸道感染及其他类型的感染[292],本病标志为巨大溶酶体颗粒,不仅见于中性粒细胞,也见于其他类型的大多数细胞,包括黑色素细胞[293]、神经膜细胞、肾小管细 1444

胞、胃黏膜细胞、肺细胞、肝细胞、皮肤朗格汉斯细胞、肾上腺细胞[294]。中性粒细胞颗粒过氧化物酶、酸性磷酸酶、酯酶阳性，异常溶酶体不能与吞噬小体融合，以及内吞的细菌不能被正常溶解，由于溶酶体颗粒功能异常，几乎完全缺乏 CTL 及 NK 细胞活性[295,296]，趋化性异常也有报道，有证据表明中性粒细胞的细胞骨架发生了改变，亦有报道称中心粒相关微管数量减少和微管蛋白酪氨酸化异常。

最近发现这种常染色体隐性遗传病的根本缺陷是由于人 1 号染色体上 q42-43 处的一个基因突变所致(表 43.1)[297,298]，此基因与米色小鼠(NK 细胞缺陷小鼠)突变基因类似[299~301]，据推测本基因与其他基因一起发挥作用，作为一个泡状膜相关信号转导复合物的成分来调节胞内蛋白转运[297]，将近 85%的患者进入疾病进展期，伴发热、黄疸、肝脾肿大、淋巴结病、全血细胞减少、出血体质和神经病变[302]，一旦进入进展期，除非造成细胞减数状态后成功进行 HLA 配型相合的全骨髓移植[123,303]，否则患者常在 30 个月内死亡。

T 细胞活化缺陷

这些病的特征是：虽然存在正常或增多的血液 T 细胞，表型似乎也正常，但由于从 TCR 至胞内代谢通路的信号转导缺陷，使得丝裂原，抗原刺激或其他传到 TCR 上的信号不能引起 T 细胞增生或产生细胞因子(图 43.7)[304]，这些患者的临床表现与其他 T 细胞缺陷个体的相同，一些严重 T 细胞活化缺陷患者临床表现类似乎 SCID 患者(图 43.8、图 43.9)。

ZAP-70 缺陷所致的 CD8 淋巴细胞减少

此病患者在婴儿期即患有严重的反复发生的、通常是致命的感染，类似于 SCID 患者。已报道 8 例，大多是在孟洛确诊的[27,305,306]，其循环 $CD3^+$、$CD4^+$ T 淋巴细胞的数量正常或增高，但 $CD8^+$ T 细胞几乎缺如。在体外这些 T 细胞对丝裂原或同种异基因细胞的刺激无应答或不能产生 CTL 反应。相比之下，NK 细胞活性正常，B 细胞数量正常或增高，但与血清免疫球蛋白浓度升高程度相比 B 细胞数量则偏低。一个患者的胸腺结构正常，双阳性($CD4^+$、$CD8^+$)胸腺细胞数量正常，但缺乏 CD8 单阳性胸腺细胞，此病是由于编码 ZAP-70 的基因突变所致，ZAP-70 是非 src 家族的蛋白酪氨酸激酶(PTK)，在 T 细胞信号转导中有重要作用(图 43.7)[27,305]，此基因定位于 2 号染色体 q12(表 43.1)。ZAP-70 是胸腺阳性选择与阴性选择的必需成分(图 43.7)[307]，但胸腺为何会 $CD4^+$ T 细胞数量正常？有一假说提出胸腺细胞能利用同一酪氨酸激酶家族的其他成员——如 Syk 就能促进 $CD4^+$ 细胞的阳性选择，此外，Lck 与 $CD4^+$ 的联系比与 $CD8^+$ 细胞的联系更紧密，胸腺细胞的 Syk 水平比外周 T 细胞的水平高 4 倍，可能导致血液 $CD4^+$ T 细胞缺乏正常应答。

1445

ZAP-70 基因敲除小鼠不同于人类 ZAP-70 缺陷患者，其 $CD4^+$ 与 $CD8^+$ T 细胞数量均减少，这提示 ZAP-70 在小鼠的 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的发育中均扮演重要的角色[307]，突变小鼠不表达 $p59^{fyn}$ 的胸腺异形体，$p59^{fyn}$ 是淋巴细胞信号转导的另一种重要蛋白酪氨酸激酶(PTK)，也可通过同源重组获得 $p59^{fyn}$[308,309]。fyn 阴性胸腺细胞对 $M1s\text{-}1^a$ 自身超抗原的刺激发生有限克隆清除，但对葡萄球菌肠毒素 A 却无此反应，提示这些小鼠确实发生了一些胸腺选择[308]。这些小鼠的胸腺细胞对丝裂原或抗原通过 TCR 介导的刺激是可向下传递的。与此同时外周 T、B 细胞重新获得一定的抗原受体信号转导能力，通过这些基因敲除小鼠证实了 $p59^{fyn}$ 在 TCR 信号转导中的重要性；对 B 细胞而言，$p59^{fyn}$ 似乎并不参与 sIgM 偶联的信号事件，然而，通过 IL-5R 传导的通常和抗免疫球蛋白抗体的协同丝裂原刺激信号，在 $p59^{fyn}$ 缺陷后则被完全阻断[310]。$p56^{lck}$ 缺陷性突变小鼠的胸腺萎缩，双阳性($CD4^+$，$CD8^+$)胸腺细胞急剧降低，检测不出单阳性胸腺细胞，仅有少量外源 T 细胞，到目前如此，未发现人类 $p59^{fyn}$ 或 $p56^{lck}$ 缺陷患者(图 43.7)。

TCR-CD3 复合物的表达缺陷

本病的第一种类型是在一个西班牙家庭的 2 个男性同胞身上发现的[311]，先证者患上了严重感染并在 3 个月时同时死去，伴有自身免疫性溶血性贫血和病毒性肺炎，在体外其淋巴细胞对丝裂原与抗-CD3 的刺激

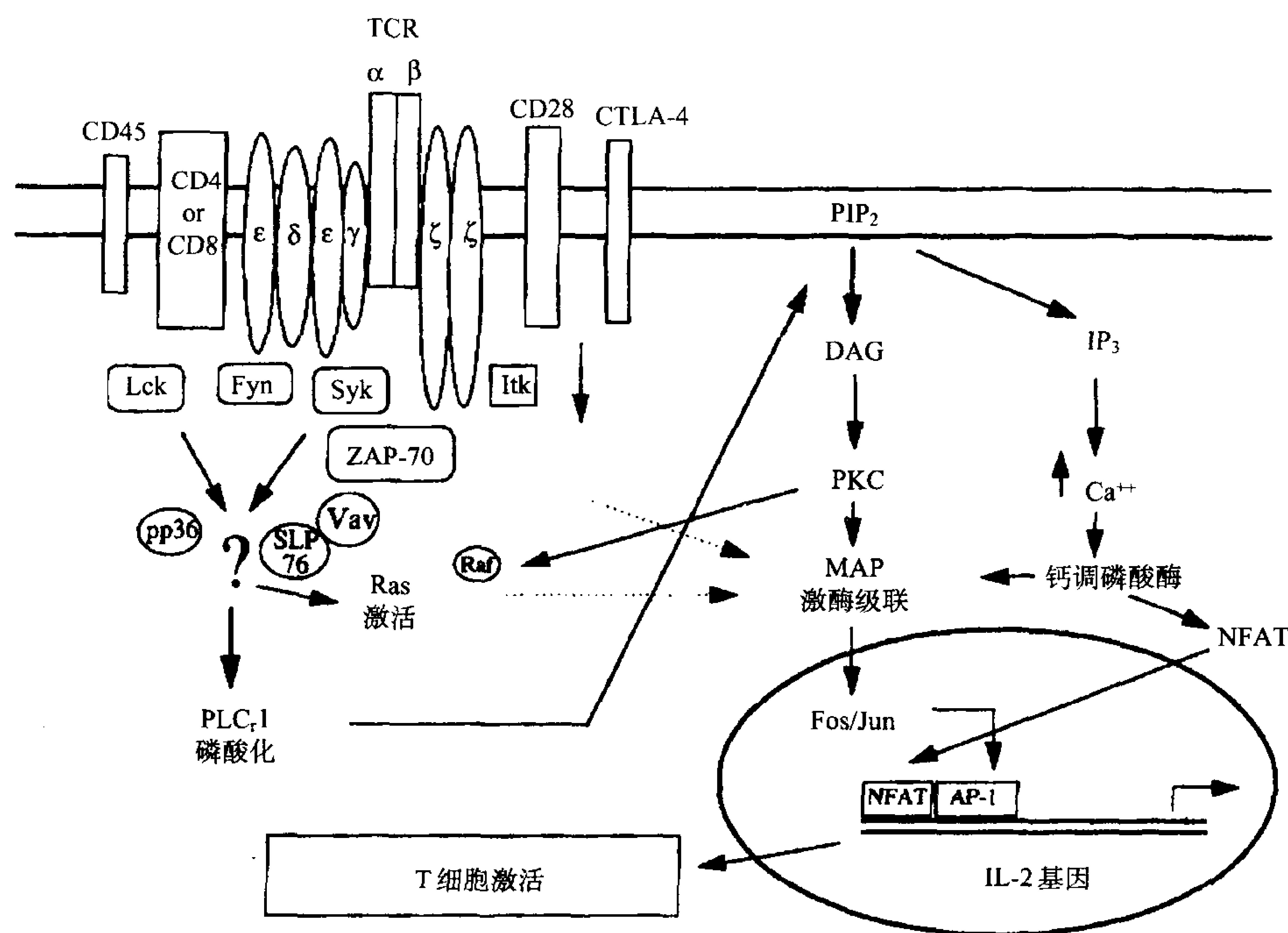


图 43.7 T 细胞信号转导途径。TCR 跨越质膜并与 CD3 和 ζ,CD4 或 CD8,CD28 和 CD45 相互作用。一旦抗原结合到 TCR 上,与 TCR 相联系的胞质蛋白酪氨酸激酶(PTK)就被激活。这些 PTK 包括 Lck,Fyn,ZAP-70 和 Syk。PTK 活化导致磷脂酶 Cγ1 的磷酸化,并激活其他信号分子。远端信号事件,包括 PKC 活化及钙动员,引起编码 IL-2 和其他蛋白的基因转录,促成 T 细胞活化、分化及增殖。离子霉素(Ionomycin)和佛波酯(PMA)能被用来模拟引起远端信号事件。编码 ZAP-70 的基因突变除使胸腺选择异常致 CD8 缺陷外,主要使 T 细胞活化严重受损(经 Elder ME 及 Dr. Mlissa Elder 允许修订。Pediatr Res 1996;39:744)。

应答弱,不能被刺激形成 CTL。然而,对蛋白抗原的体液免疫是正常的,提示辅助 T 细胞功能正常,其 12 岁兄弟体健,但他几乎无 CD3⁺ T 细胞并与其一样有 IgG2 缺陷,此家族的缺陷是由于 CD3 链基因突变所致(表 43.1)[311]。CD3 缺陷第二种表型发现于一 4 岁法国男孩,小时常反复发生流感嗜血杆菌肺炎与中耳炎,但现在一切正常,他表达的 TCR-CD3 (Ti-CD3)复合物有不完全性缺陷,导致 CD3⁺ T 细胞比例只有正常值的一半,流式细胞仪检测显示所有细胞 CD3 表达极低,其 T 细胞对抗 CD3 单抗或抗 CD2 单抗刺激无增生反应,在抗 CD3 或抗 CD2 刺激后亦无 IL-2R 表达或正常的钙内流。然而,其对抗 CD28 的共刺激或诸如破伤风类毒素的抗原刺激应答正常[312],此病是由于 2 个独立的 CD3ε 基因突变所致,导致缺陷性 CD3ε 链合成并阻止 TCR-CD3 复合物发生正常相互作用(association)及膜表达(表 43.1)[313]。

1446

CD3ε 基因敲除小鼠的胸腺细胞并不能跨越 CD44⁻/低 CD25⁺ 三阴性阶段并似乎周期静止在与 RAG 缺陷胸腺细胞相同的阶段[314],然而,也有可能是这些小鼠缺乏 Ti-CD3 受体复合物的其他成分,它们确实重排了其 TCR 基因片段并低水平表达全长 TCR 转录产物,但是共有极少的 TCR 基因重排有效。缺乏完整的 CD3ε 多肽,对 TCRγ 及 δ 基因完成重排毫无影响[314],CD3ζ 链的基因敲除小鼠有很稀少的 CD4⁺、CD8⁺ 胸腺细胞,且其产生 CD4⁺ 和 CD8⁺ 单阳性 T 细胞的能力受损但并非缺乏,外周 T 细胞表达少量 CD5 及稀少的 TCR。根据这些小鼠,我们可以得出结论:CD3 链的表达影响胸腺分化但并非产生单阳性 T 细胞所绝对必需[315]。

敲除前 TCRα 基因[316]或 TCRα 或 β 链基因的缺陷小鼠表现出不同阶段胸腺发育的阻断,TCRβ 链缺陷小鼠不能从(CD4⁻、CD8⁻)双阴性胸腺细胞分化为双阳性(CD4⁺、CD8⁺)胸腺细胞或使后者数量正常增长。同样,前 TCRα 基因缺陷小鼠从双阴性胸腺细胞分化为双阳性胸腺细胞并形成 αβT 细胞的能力严重缺乏[316]。

敲除 TCRα 基因的纯合小鼠的胸腺细胞能从双阴性发育为双阳性，但由于缺乏胸腺髓质故不能形成 $\alpha\beta^+$ T 细胞[318]，然而，不管是前 TCR-α 基因或 TCRα 或 β 链基因缺陷小鼠，均能正常形成 γδT 细胞。

细胞因子产生缺陷

已知细胞因子产生缺陷有两种主要类型：第一种是选择性 IL-2 产生缺陷，在报道的 2 例患者中，婴儿期均有严重的反复感染[319,320]，二者均存在 IL-2 基因，但无 IL-2mRNA 或蛋白产生，而其他 T 细胞因子产生正常；第二种只发现了一例，在婴儿期即有严重反复感染并且发育障碍[321]，并且几个淋巴因子基因转录有缺陷，包括 IL-2,3,4,5，可能是由于活化 T 细胞的核因子（NF-AT）异常结合到 IL-2,4 增强子的反应元件所致[321]，用重组 IL-2 治疗可使临床症状获得改善。这两种细胞因子缺陷的缺陷基因尚未确定。最近，一对有血缘关系的夫妇所生的 2 个男婴尽管其淋巴细胞表型正常，但仍同 SCID 一样对感染易感，然而其 T 细胞不能产生 IL-2、IFN-γ、IL-4 和 TNF-α。用电泳迁移试验（EMSA）来检测 AP-1、Oct、CREB、SP1、NF-κB 和 NF-AT 对 DNA 的结合，发现除 NF-AF 外其他结合均正常。就 NF-AT 而言，其对 IL-2 启动子反应元件的结合在 T 细胞刺激前后几乎是检测不到的[322]。这些研究提示，NF-AT/DNA 结合缺陷是导致这 2 个男孩多种细胞因子缺陷的病因。

1447

通过同源重组产生了许多细胞因子基因敲除小鼠[3]，根据此类鼠的胸腺发育正常，在 3～4 周龄前脾与淋巴结的淋巴细胞亚群分布正常，用 TNP-KLH 免疫这些小鼠产生了高滴度的针对 KLH 的 IgG 抗体。当用 TNP-KLH 刺激时也引起 T 细胞增生，然而 IgG1 和 IgE 的产量显著上升，T 细胞主要以 Th2 型为主，T 细胞增生下降并非完全终止；然而，CTL 有选择性缺陷。后来动物发生了淋巴结病、脾肿大及脾 T 细胞亚群的改变。此外，脾亦有未成熟 B 细胞。它们也患上了严重自身免疫病，包括溶血性贫血及溃疡性结肠炎，由 $CD4^+$ T 细胞未受控制的活化与增生所致[324,325]。根据这些结果，提示 IL-2 对体内自身耐受的维持是必需的。

Omenn 综合征

这种严重的免疫缺陷病的特征是：出生后不久即患上广泛性剥脱性皮炎和脱屑、生长不良、持久性腹泻，肝脾肿大，嗜酸性细胞增多，血清 IgE 水平显著提高[326]，此病也与新生儿微小病变性肾病综合征相关[327]。令人费解的是，循环及组织浸润的活化 T 淋巴细胞增多，但在体外对丝裂原或抗原并无正常的应答。这些 T 细胞来源于单克隆和多克隆的均有[328～330]，未发现循环 B 细胞，还有除 IgE 外的低丙种球蛋白血症，浅部淋巴结结构高度异常，这是由于并指状 S-100 蛋白阳性非吞噬网状组织细胞增生和 B 淋巴细胞缺乏所致[331,332]。现有证据提示此病是 Th2 介导的，但其根本病因尚不清楚[333～335]。在出生后头 5 个月此病是致命的，除非化疗后进行骨髓移植矫正[123]。

高 IgE 综合征

高 IgE 综合征是一种相对罕见的原发性免疫缺陷综合征，特征是皮肤、肺、内脏反复发生严重的葡萄球菌脓肿及血清 IgE 浓度显著升高（图 43.8）[336,337]，此病于 1972 年被作者及其同事从 2 个小男孩身上发现[336]，自此以后又发现了 30 多例，而且更多例患者也相继被报道[337]。这些患者均有婴儿期皮肤、肺、关节和其他部位葡萄球菌脓肿史，反复发生肺炎所致的持续性肺膨出（图 43.9）。发生的瘙痒性皮炎是非典型的异位性湿疹，并不总是持续存在，通常无呼吸道过敏症状。

实验室诊断包括极高浓度的血清 IgE，血清 IgD 浓度升高，而 IgG、IgA、IgM 的浓度正常；据称血液、痰液嗜酸性粒细胞减少，对增强免疫有异常低的回忆性抗体应答；对新抗原的体液与细胞免疫应答弱。体外研究显示 $CD2^+$、$CD3^+$、$CD4^+$ 和 $CD8^+$ 淋巴细胞百分比正常，表达 IgE 的 B 淋巴细胞百分比无升高，对丝裂原大多有正常的淋巴细胞增生应答；但对抗原或来自家族成员的异体细胞应答极低甚至缺乏。血、痰和淋巴结、脾、肺包囊的组织成分嗜酸性粒细胞急剧减少。对一例患者的尸检发现其胸腺小体和胸腺结构存在。

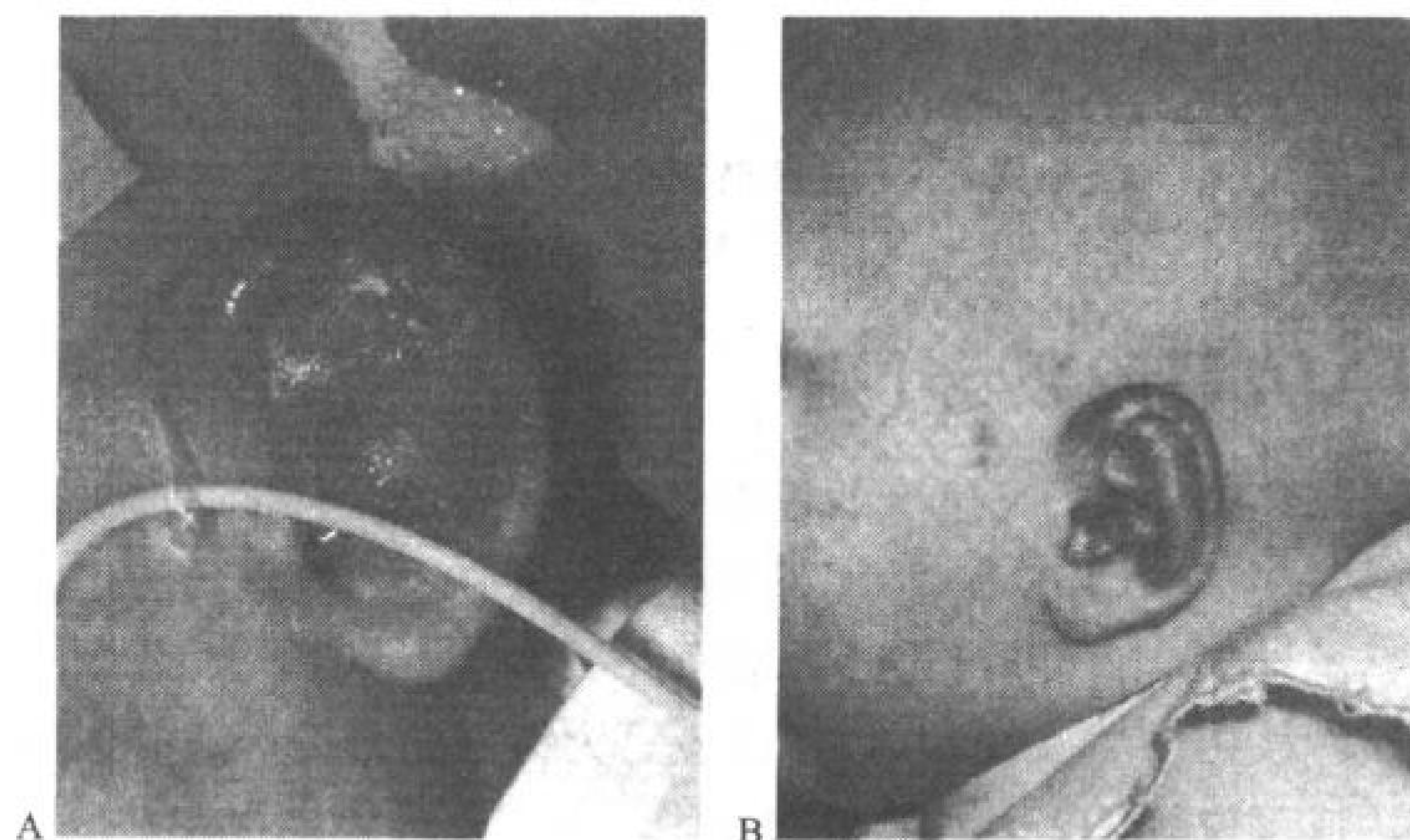


图 43.8 A:一名 T 细胞活化缺陷婴儿的坏疽性脓皮病,其不能产生 IL-2 的分子机制尚不清楚;B:给予重组 IL-2 治疗两周后。

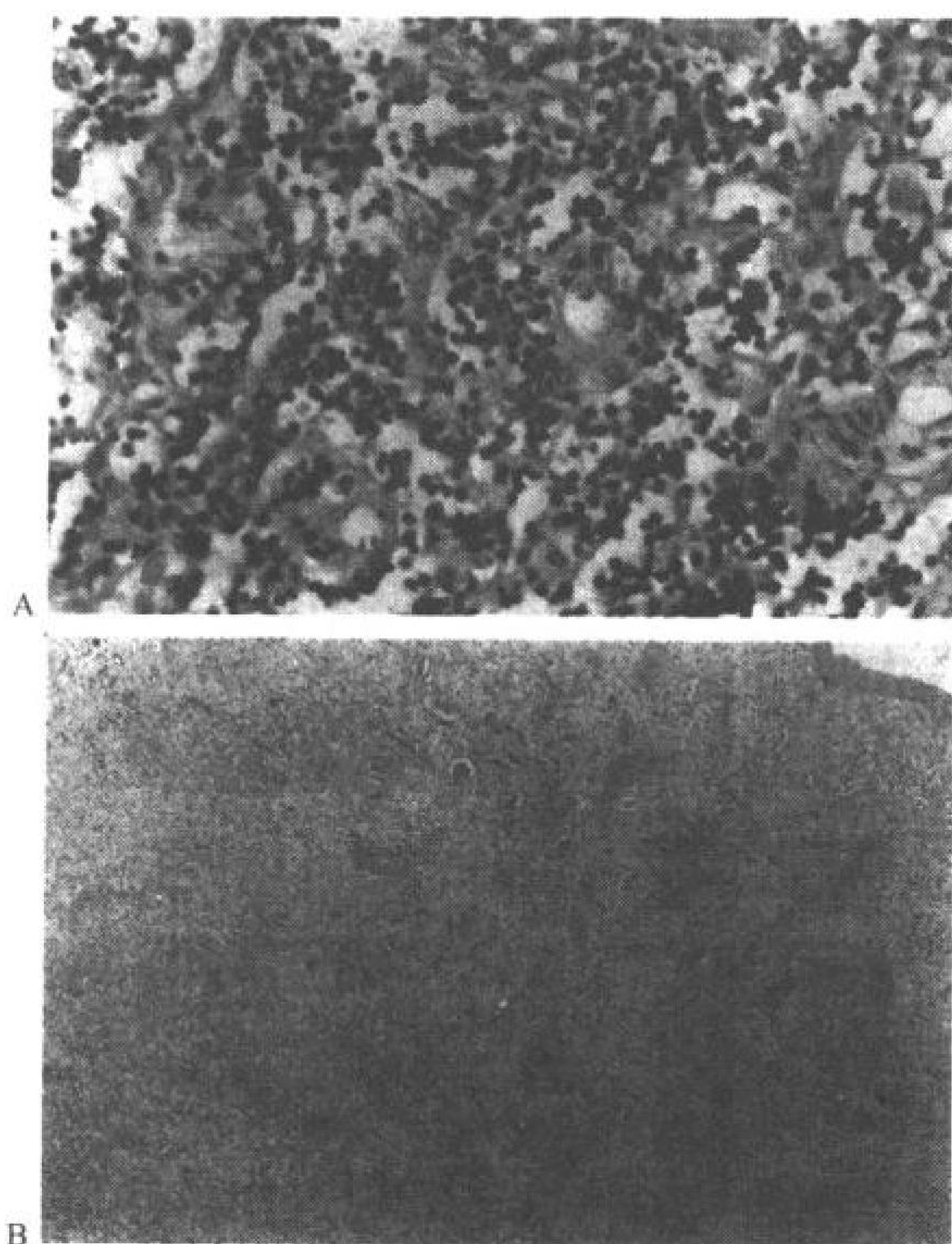


图 43.9 图 43.8 中患儿患持续性白细胞增多和复发性细菌感染时的胸腺(A)及脾(B)的显微照片,示胸腺中富含胸腺细胞而在脾中缺如。

所有患者吞噬细胞浸润、新陈代谢、杀伤及整个补体溶血活性是正常的,有些患者存在各种单核细胞或多形核细胞趋化缺陷,但并非每个患者均有,所以这些并不是根本病因[337]。

尽管进行了广泛的研究,本病的根本病因仍是未知的,作者观察发现,患者血中记忆型(CD45RO)T 细胞的百分比下降可能与回忆性抗体应答、特异性 T 细胞应答受损及异常的混合淋巴细胞反应相关。看似矛盾的是,患者的 B 细胞在体外与 IL-4 和抗 CD40 共培养时并不像正常或特应性 B 细胞那样产生同样的 IgE 抗体,这提示体内的 B 细胞已经与 IL-4 接触,由于其在体内已完成了类型转换,所以不再对 IL-4 敏感。由于在体内 IL-4 半衰期非常短,其血清浓度难于测到,所以,很难证明此病是由 IL-4 表达过多所致。血、痰及组织中嗜酸性粒细胞数量增多提示,一些病理状态可能是由于嗜酸性粒细胞所介导的。男女均可患病及连续遗传的现象提示,本病为不完全外显性常染色体显性遗传。

本病最有效的治疗措施包括用耐青霉素酶的青霉素或头孢菌素给予长期治疗,辅以针对特殊感染的其

他抗生素或抗真菌药,以及相应的胸外手术切除双重感染的肺气囊或持续存在6个月以上的肺气囊,曾试用过IFN-γ治疗,但无临床疗效[339],如能早期诊断并持续给予治疗剂量的抗生素治疗,预后良好。预后差主要是由于未经治疗患者的进展性肺病,已知有3名患者死于淋巴网状内皮细胞恶性肿瘤,并都患过隐球菌脑膜炎。

1448

STAT4 基因敲除小鼠

与高IgE综合征患者的根本病因有潜在相关性的动物是信号转导与转录蛋白活化因子4(STAT 4)的基因敲除小鼠。用IL-12刺激T细胞后该蛋白才酪氨酸磷酸化。STAT 4缺陷小鼠的IL-12所有功能均有缺陷,包括诱导IFN-γ,促有丝分裂,增强NK细胞溶细胞能力及Th1分化。结果,由于其对IL-12不能应答,反应以Th2型为主[340,341]。所以,以Th2应答为特征的人类疾病的根本病因之一可能是STAT4缺陷,例如高IgG综合征。或者说,IL-12信号通路的一些其他成分可能也存在缺陷。

结论

自从45年前发现第一例X连锁无丙种球蛋白血症以来,许多先天性免疫缺陷病相继被发现,其种类也在迅速增多。在鉴定如此之多的免疫缺陷病的缺陷基因方面,最近的研究有了重大的突破,毫无疑问,对其他疾病也会如此。这些信息无疑在以下方面有巨大价值:阐明这些免疫缺陷的各种类型,检出携带者,进行产前诊断,并在最终对许多此类疾病进行基因治疗方面很有应用前景[196]。

除了可以通过研究这些罕见患者的临床和免疫特征进一步认识免疫系统外,更多对免疫系统的了解来自对免疫异常患者和基因敲除突变小鼠的整体和比较研究,此外,这些研究有助于找到更有效和特异的疗法,尤其是在基因治疗尚不可行的情况下更是如此。

虽然对这些罕见病治疗上的进展并不像发现新的先天性免疫缺陷病及其缺陷基因那样神速,但在过去16年中还是取得了一些主要的治疗进展,包括:①开发出安全的可供静脉内注射的人类IgG,使得给抗体缺陷患者输入大量的外源免疫球蛋白成为可能;②清除T细胞技术的进步使得配型半相合父母作为治疗性(纠正性)干细胞供体提供给SCID婴儿成为可行。此外,通过这种技术产生的嵌合体使得下列研究成为可能:早期人类T、B细胞个体发生,耐受诱导及MHC限制机制(如胸腺培养,以一种目前尚不可行的方式)。未来几年通过这些有极大科研价值的患者和人工产生的免疫缺陷动物,无疑会使我们对免疫系统的正常作用机制有更深刻的认识。

(黄 钢译 白 云校)

参 考 文 献

1. Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952;9:722–728.
2. WHO Scientific Group. Primary immunodeficiency diseases: report of a WHO scientific group. *Clin Exp Immunol* 1997;99:1–124.
3. Kokron CM, Bonilla FA, Oettgen HC. Ramesh N, Geha RS, Pandolfi F. Searching for genes involved in the pathogenesis of primary immunodeficiency diseases: lessons from mouse knockouts. *J Clin Immunol* 1997;17:109–126.
4. Filipovich AH, Mathur A, Kamat D, Shapiro RS. Primary immunodeficiencies: genetic risk factors for lymphoma. *Cancer Res* 1992;52:5465s–5467s.
5. Elenitoba-Johnson KSJ, Jaffe ES. Lymphoproliferative disorders associated with congenital immunodeficiencies. *Semin Diagn Pathol* 1997;14:35–47.
6. Clark JA, Callicoat PA, Brenner NA. Selective IgA deficiency in blood donors. *Am J Clin Pathol* 1983;80:210–213.
7. Buckley RH. Clinical and immunologic features of selective IgA deficiency. In: Bergsma D, Good RA, Finstad J, Paul NW, eds. *Immunodeficiency in man and animals.* Stamford, CT: Sinauer Associates, 1975:134–142.
8. Puck JM. Molecular and genetic basis of X-linked immunodeficiency disorders. *J Clin Immunol* 1994;14:81–89.
9. Derry JMJ, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 1994;78:635–644.
10. Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJ. The primary immunodeficiencies. *N Engl J Med* 1995;333:431–440.
11. Buckley RH. Breakthroughs in the understanding and therapy of primary immunodeficiency. *Pediatr Clin North Am* 1994;41:665–690.
12. Fischer A, Arnaiz-Villena A. Immunodeficiencies of genetic origin. *Immunol Today* 1995;16:510–514.
13. Dinauer MC, Orkin SH, Brown R. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature* 1987;327:717
14. Westberg J, Fredrikson GN, Truedsson L, Sjoholm AG, Uhlen M. Sequence-based analysis of properdin deficiency: identification of point mutations in two phenotypic forms of an X-linked immunodeficiency. *Genomics* 1995;29:1–8.
15. Sullivan JL, Woda BA. X-linked lymphoproliferative syndrome. *Immunodef Rev* 1989;1:325–347.
16. Schuster V, Seidenspinner S, Grimm T, et al. Molecular genetic haplotype segregation studies in three families with X-linked lymphoproliferative disease. *Eur J Pediatr* 1994;153:432–437.

17. Fischer A, Lisowska-Grospierre B, Anderson DC, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: molecular basis and functional consequences. *Immunodef Rev* 1988;1:39–54.
18. Etzioni A. Adhesion molecule deficiencies and their clinical significance. *Cell Adhesion Commun* 1994;2:257–260.
19. Hirschhorn R. Adenosine deaminase deficiency. *Immunol Rev* 1991;3:45–81.
20. Markert ML. Purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Immunodef Rev* 1991; 3:45–81.
21. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995;268:1749–1753.
22. Budarf ML, Collins J, Gong W, et al. Cloning a balanced translocation associated with DiGeorge syndrome and identification of a disrupted candidate gene. *Nature Genet* 1995;10:269–278.
23. Daw SC, Taylor C, Kraman M, et al. A common region of 10p deleted in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Nature Genet* 1996;13:458–460.
24. Gong W, Emanuel BS, Collins J, Kim DH, Wang Z. A transcription map of the DiGeorge and velo-cardio-facial syndrome minimal critical region on 22q11. *Hum Mol Genet* 1996;5:789–800.
25. de la Salle H, Hanau D, Fricker D. Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science* 1994;265:237–241.
26. Steimle V, Reith W, Mach B. Major histocompatibility complex class II deficiency: a disease of gene regulation. *Adv Immunol* 1996;61:327–340.
27. Elder ME, Lin D, Clever J, et al. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* 1994;264:1596–1599.
28. Sharfe N, Dadi HK, Shahar M, Roifman CM. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3168–3171.
29. Russell SM, Tayebi N, Nakajima H, et al. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science* 1995;270: 797–799.
30. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N Engl J Med* 1996;335:1956–1961.
31. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996; 335:1941–1949.
32. Timmers E, DeWeers M, Alt FW, Kendriks RW, Schuurman RKB. X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;61(suppl):83–93.
33. Kozlowski C, Evans DIK. Neutropenia associated with X-linked agammaglobulinaemia. *J Clin Pathol* 1991;44:388–390.
34. Wilfert CM, Buckley RH, Mohanakumar T, et al. Persistent and fatal central nervous system Echovirus infections in patients with agammaglobulinemia. *N Engl J Med* 1977;296:1485–1489.
35. McKinney RE, Katz SL, Wilfert CM. Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemic patients. *Rev Infect Dis* 1987;9:334–356.
36. Lederman HM, Winkelstein JA. X-linked agammaglobulinemia: an analysis of 96 patients. *Medicine* 1985;64:145–156.
37. Roberts D, Murray AE, Pratt BC, Meigh RE. Mycoplasma hominis as a respiratory pathogen in X-linked hypogammaglobulinemia. *J Infect* 1989;18:175–177.
38. Mohiuddin AA, Corren J, Harbeck RJ, Teague JL, Volz M, Gelfand EW. Ureaplasma urealyticum chronic osteomyelitis in a patient with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:104–107.
39. Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 1993;361:226–233.
40. Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993;72: 279–290.
41. Haire RN, Ohta Y, Strong SJ, et al. Unusual patterns of exon skipping in Bruton tyrosine kinase are associated with mutations involving the intron 17 3′ splice site. *Am J Hum Genet* 1997;60:798–807.
42. de Weers M, Verschuren MCM, Kraakman MEM, et al. The Bruton's tyrosine kinase gene is expressed throughout B cell differentiation, from early precursor B cell stages preceding immunoglobulin gene rearrangement up to mature B cell stages. *Eur J Immunol* 1993;23:3109–3114.
43. Hashimoto S, Tsukada S, Matsushita M, et al. Identification of Bruton's tyrosine kinase (Btk) gene mutations and characterization of the derived proteins in 35 X-linked agammaglobulinemia families: a nationwide study of Btk deficiency in Japan. *Blood* 1996;88:561–573.
44. Vihinen M, Iwata T, Kinnon C, et al. BTKbase, mutation database for X-linked agammaglobulinemia (XLA). *Nucleic Acids Res* 1996;24:160–165.
45. Vihinen M. BTKbase: XLA mutation registry. *Immunol Today* 1996;17: 502–506.
46. Vorechovsky I, Vihinen M, de Saint Basile G, et al. DNA-based mutation analysis of Bruton's tyrosine kinase gene in patients with X-linked agammaglobulinaemia. *Hum Mol Genet* 1995;4:51–58.
47. Sideras P, Smith CIE. Molecular and cellular aspects of X-linked agammaglobulinemia. *Adv Immunol* 1995;59:135–223.
48. Bykowsky MJ, Haire RN, Ohta Y, et al. Discordant phenotype in siblings with X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet* 1996;58:477–483.
49. Jones A, Bradley L, Alterman L, et al. X linked agammaglobulinaemia with a "leaky" phenotype. *Arch Dis Child* 1996;74:548–549.
50. Satterthwaite AB, Witte ON. Lessons from human genetic variants in the study of B cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 1996;8:454–458.
51. Buckley RH, Rowlands DR. Allergy rounds: agammaglobulinemia, neutropenia, fever and abdominal pain. *J Allergy Clin Immunol* 1973;51:308–318.
52. Farrar JE, Rohrer J, Conley ME. Neutropenia in X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;81:271–276.
53. Conley ME, Burks AW, Herrod HG, Puck JM. Molecular analysis of X-linked agammaglobulinemia with growth hormone deficiency. *J Pediatr* 1991;119: 392–397.
54. Fleisher TA, White RM, Broder S, et al. X-linked hypogammaglobulinemia and isolated growth hormone deficiency. *N Engl J Med* 1980;302:1429–1434.
55. Sitz KV, Burks AW, Williams LW, Kemp SF, Steele RW. Confirmation of X-linked hypogammaglobulinemia with isolated growth hormone deficiency as a disease entity. *J Pediatr* 1990;116:292–294.
56. Monafo V, Maghnie M, Terracciano L, Valtorta A, Massa M, Severi F. X-linked agammaglobulinemia and isolated growth hormone deficiency. *Acta Paediatr Scand* 1991;80:563–566.
57. Conley ME, Sweinberg SK. Females with a disorder phenotypically identical to X-linked agammaglobulinemia. *J Clin Immunol* 1992;12:139–143.
58. Meffre E, LeDeist F, de Saint Basile G, et al. A human non-XLA immunodeficiency disease characterized by blockage of B cell development at an early proB cell stage. *J Clin Invest* 1996;98:1519–1526.
59. Yel L, Minegishi Y, Coustan-Smith E, et al. Mutations in the mu heavy chain gene in patients with agammaglobulinemia. *N Engl J Med* 1996;335:1486–1493.
60. Scher I. The CBA/N mouse strain: an experimental model illustrating the influence of X-chromosome on immunity. *Adv Immunol* 1982;33:1
61. Hasbold J, Klaus GG. B cells from CBA/N mice do not proliferate following ligation of CD40. *Eur J Immunol* 1997;24:152–157.
62. Thomas JD, Sideras P, Smith CIE, Vorechovsky I, Chapman V, Paul WE. Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science* 1993;261:355–361.
63. Rawlings DJ, Saffran DC, Tsudaka S, et al. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* 1993;261:358
64. de Weers M, Mensink RGJ, Kraakman MEM, Schuurman RKB, Hendriks RW. Mutation analysis of the Bruton's tyrosine kinase gene in X-linked agammaglobulinemia: identification of a mutation which affects the same codon as is altered in immunodeficient xid mice. *Hum Mol Genet* 1994;3:161–166.
65. Notarangelo LD, Duse M, Ugazio AG. Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM). *Immunodef Rev* 1992;3:101–121.
66. Facchetti F, Appiani C, Salvi L, Levy J, Notarangelo LD. Immunohistologic analysis of ineffective CD40-CD40 ligand interaction in lymphoid tissues from patients with X-linked immunodeficiency with hyper IgM. *J Immunol* 1995;154: 6624–6633.
67. Mayer L, Swan SP, Thompson C. Evidence for a defect in "switch" T cells in patients with immunodeficiency and hyperimmunoglobulinemia M. *N Engl J Med* 1986;314:409–413.
68. Padayachee M, Feighery C, Finn A, et al. Mapping of the X-linked form of hyper IgM syndrome (HIGM1) to Xq26 by close linkage to HPRT. *Genomics* 1992; 14:551–553.
69. Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper IgM syndrome. *Science* 1993;259:990–993.
70. Di Santo JP, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Fischer A, de Saint Basile G. CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper IgM. *Nature* 1993;361: 541–543.
71. Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper IgM syndrome. *Cell* 1993;72: 291–300.
72. Korthauer U, Graf D, Mages HW. Defective expression of T cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper IgM. *Nature* 1993;361:539–541.
73. Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:6550–6554.
74. Yang Y, Wilson JM. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 1996;273:1862–1864.
75. Notarangelo LD, Peitsch MC. CD40Lbase: a database of CD40L gene mutations causing X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol Today* 1996;17:511–517.
76. Katz F, Hinshelwood S, Rutland P, Jones A, Kinnon C, Morgan G. Mutation analysis in CD40 ligand deficiency leading to X-linked hypogammaglobulinemia with hyper IgM syndrome. *Hum Mutation* 1996;8:223–228.
77. Disanto JP, Markiewicz S, Gauchat J, Bonnefoy J, Fischer A, de Saint Basile G. Brief report: prenatal diagnosis of X-linked hyper IgM syndrome. *N Engl J Med* 1994;330:969–973.
78. Grewal IS, Xu J, Flavell RA. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* 1995;378:617–620.
79. Conley ME, Larche M, Bonagura VR, et al. Hyper IgM syndrome associated with defective CD40-mediated B cell activation. *J Clin Invest* 1994;94:1404–1409.
80. Oliva A, Quinti I, Scala E, et al. Immunodeficiency with hyperimmunoglobulinemia M in two female patients is not associated with abnormalities of CD40 or CD40 ligand expression. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:403–410.
81. Cunningham-Rundles C. Clinical and immunologic analyses of 103 patients

with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 1989;9:22–33.

82. Cunningham-Rundles C, Siegal FP, Cunningham-Rundles S, Lieberman P. Incidence of cancer in 98 patients with common varied immunodeficiency. *J Clin Immunol* 1987;7:294–298.
83. Zhang JG, Morgan L, Spickett GP. L-selectin in patients with common variable immunodeficiency (CVID): a comparative study with normal individuals. *Clin Exp Immunol* 1996;104:275–279.
84. Kaneko H, Katagiri-Kawade M, Motoyoshi F, Tashita H, Teramoto T, Kondo N. Abnormal B cell response of protein kinase C in some common variable immunodeficiency. *Exp Clin Immunogenet* 1996;13:36–42.
85. Nonoyama S, Farrington M, Ochs HM. Activated B cells from patients with common variable immunodeficiency proliferate and synthesize immunoglobulin. *J Clin Invest* 1993;92:1281–1287.
86. Punnonen J, Kainulainen L, Ruuskanen O, Nikoskelainen J, Arvilommi H. IL-4 synergizes with IL-10 and anti-CD40 MoAbs to induce B cell differentiation in patients with common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol* 1997;45: 203–212.
87. Katial RK, Lieberman MM, Muehlbauer SL, Lust JA, Hamilos DL. δ T lymphocytosis associated with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 1997;17:34–42.
88. Spickett GP, Webster ADB, Farrant J. Cellular abnormalities in common variable immunodeficiency. *Immunodef Rev* 1990;2:199–219.
89. Pandolfi F, Trentin L, San Martin JE, Wong JT, Kurnick JT, Moscicki RA. T cell heterogeneity in patients with common variable immunodeficiency as assessed by abnormal T cell subpopulations and T cell receptor gene analysis. *Clin Exp Immunol* 1992;89:198–203.
90. Jaffe JS, Strober W, Sneller MC. Functional abnormalities of CD8⁻ T cells define a unique subset of patients with common variable immunodeficiency. *Blood* 1993;82:192–201.
91. Funauchi M, Farrant J, Moreno C, Webster ADB. Defects in antigen-driven lymphocyte responses in common variable immunodeficiency (CVID) are due to a reduction in the number of antigen-specific CD4⁺ T cells. *Clin Exp Immunol* 1995;101:82–88.
92. Fischer MB, Wolf HM, Hauber I, et al. Activation via the antigen receptor is impaired in T cells, but not in B cells from patients with common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol* 1996;26:231–237.
93. Eisenstein EM, Jaffe JS, Strober W. Reduced interleukin-2 (IL-2) production in common variable immunodeficiency is due to a primary abnormality of CD4⁺ T cell differentiation. *J Clin Immunol* 1993;13:247–258.
94. Kondratenko I, Amlot PL, Webster ADB, Farrant J. Lack of specific antibody response in common variable immunodeficiency (CVID) associated with failure in production of antigen-specific memory T cells. *Clin Exp Immunol* 1997;108: 9–13.
95. Farrington M, Grosmaire LS, Nonoyama S, et al. CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1099–1103.
96. Baum CG, Chiorazzi N, Frankel S, Shepherd GM. Conversion of systemic lupus erythematosus to common variable hypogammaglobulinemia. *Am J Med* 1989; 87:449–456.
97. Wright JJ, Birx DL, Wagner DK, Waldmann TA, Blaese RM, Fleisher TA. Normalization of antibody responsiveness in a patient with common variable hypogammaglobulinemia and HIV infection. *N Engl J Med* 1987;317:1516–1519.
98. Slyper AH, Pietryga D. Conversion of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency in an adolescent female with 18q deletion syndrome. *Eur J Pediatr* 1997;155:155–159.
99. Ashman RF, Schaffer FM, Kemp JD, et al. Genetic and immunologic analysis of a family containing five patients with common variable immune deficiency or selective IgA deficiency. *J Clin Immunol* 1992;12:406–414.
100. Truedsson L, Baskin B, Pan Q, et al. Genetics of IgA deficiency. *APMIS* 1995; 103:833–842.
101. French MA, Dawkins RL. Central MHC genes, IgA deficiency and autoimmune diseases. *Immunol Today* 1990;11:271–274.
102. Schaffer FM, Monteiro RC, Volanakis JE, Cooper MD. IgA deficiency. *Immunodef Rev* 1991;3:15–44.
103. Howe HS, So AKL, Farrant J, Webster ADB. Common variable immunodeficiency is associated with polymorphic markers in the human major histocompatibility complex. *Clin Exp Immunol* 1991;84:387–390.
104. Volanakis JE, Zhu Z, Schaffer FM, et al. Major histocompatibility complex class III genes and susceptibility to immunoglobulin A deficiency and common variable immunodeficiency. *J Clin Invest* 1992;89:1914–1922.
105. Fiore M, Pera C, Delfino L, Scotese I, Ferrara GB, Pignata C. DNA typing of DQ and DR alleles in IgA deficient subjects. *Eur J Immunogenet* 1995;22: 403–411.
106. Oxelius VA, Laurell AB, Lindquist B. IgG subclasses in selective IgA deficiency. *N Engl J Med* 1981;304:1476–1477.
107. Cunningham-Rundles C, Fotino M, Rosina O, Peter JB. Selective IgA deficiency, IgG subclass deficiency, and the major histocompatibility complex. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;61(suppl):61–69.
108. Burks AW, Sampson HA, Buckley RH. Anaphylactic reactions after gamma globulin administration in patients with hypogammaglobulinemia. *N Engl J Med* 1986;314:560–564.
109. Buckley RH, Dees SC. The correlation of milk precipitins with IgA deficiency. *N Engl J Med* 1969;281:465–469.
110. Goshen E, Livne A, Krupp M, et al. Antinuclear and related autoantibodies in sera of healthy subjects with IgA deficiency. *J Autoimmun* 1989;2:51–60.
111. Briere F, Bridon JM, Chevet D, et al. Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *J Clin Invest* 1994;94:97–104.
112. Friman V, Hanson LA, Bridon JM, Tarkowski A, Banchereau J, Briere F. IL-10–driven immunoglobulin production by B lymphocytes from IgA-deficient individuals correlates to infection proneness. *Clin Exp Immunol* 1996;104: 432–438.
113. Leickly FE, Buckley RH. Development of IgA and IgG2 subclass deficiency after sulfasalazine therapy. *J Pediatr* 1986;108:481–482.
114. Plebani A, Monafo V, Ugazio AG, Burgio GR. Clinical heterogeneity and reversibility of selective immunoglobulin A deficiency in 80 children. *Lancet* 1986;1:829–831.
115. DeLaat PCJ, Weemaes CMR, Bakkeren JAJM. Immunoglobulin levels during follow-up of children with selective IgA deficiency. *Scand J Immunol* 1992;35: 719–725.
116. Preud'Homme JL, Hanson LA. IgG subclass deficiency. *Immunodef Rev* 1990; 2:129–149.
117. Shield JPH, Strobel S, Levinsky RJ, Morgan G. Immunodeficiency presenting as hypergammaglobulinaemia with IgG2 subclass deficiency. *Lancet* 1992;340: 448–450.
118. Ambrosino DM, Umetsu DT, Siber GR, et al. Selective defect in the antibody response to *Haemophilus influenzae* type b in children with recurrent infections and normal IgG subclass levels. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:1175–1179.
119. Shackelford PG. IgG subclasses: importance in pediatric practice. *Pediatr Rev* 1993;14:291–296.
120. Shackelford PG, Granoff DM, Polmar SH, et al. Subnormal serum concentrations of IgG2 in children with frequent infections associated with varied patters of immunologic dysfunction. *J Pediatr* 1990;116:529–538.
121. Lefranc MP, Hammarstrom L, Smith CIE, Lefranc G. Gene deletions in the human immunoglobuln heavy chain constant region locus: molecular and immunological analysis. *Immunol Rev* 1991;2:265–281.
122. Grierson HL, Skare J, Hawk J, Pauza M, Purtilo DT. Immunoglobulin class and subclass deficiencies prior to Epstein-Barr virus infection in males with X-linked lymphoproliferative disease. *Am J Med Genet* 1991;40:294–297.
123. Buckley RH. Bone marrow transplantation in primary immunodeficiency. In: Rich RR, ed. *Clinical immunology: principles and practice.* St. Louis: CV Mosby, 1995:1813–1830.
124. Hong R. The DiGeorge anomaly. *Immunodef Rev* 1991;3:1 14.
125. Prasad C, Quackenbush EJ, Whiteman D, Korf B. Limb anomalies in DiGeorge and CHARGE syndromes. *Am J Med Genet* 1997;68:179–181.
126. Junker AK, Driscoll DA. Humoral immunity in DiGeorge syndrome. *J Pediatr* 1995;127:231–237.
127. Muller W, Peter HH, Kallfelz HC, Franz A, Rieger CH. The DiGeorge sequence. II. Immunologic findings in partial and complete forms of the disorder. *Eur J Pediatr* 1989;149:96–103.
128. Driscoll DA, Budarf ML, Emanuel BS. A genetic etiology for DiGeorge syndrome: consistent deletions and microdeletions of 22q11. *Am J Hum Genet* 1992; 50:924–933.
129. Webber SA, Hatchwell E, Barber JCK, et al. Importance of microdeletions of chromosomal region 22q11 as a cause of selected malformations of the ventricular outflow tracts and aortic arch: a three year prospective study. *J Pediatr* 1996; 129:26–32.
130. Bonnet D, Cormier-Daire V, Kachaner J, et al. Microsatellite DNA markers detects 95% of chromosome 22q11 deletions. *Am J Med Genet* 1997;68:182–184.
131. Kkurahashi H, Akagi K, Inazawa J, et al. Isolation and characterization of a novel gene deleted in DiGeorge syndrome. *Hum Mol Genet* 1995;4:541–549.
132. Llevadot R, Scambler P, Estivill X, Pritchard M. Genomic organization of TUPLE1/HIRA: a gene implicated in DiGeorge syndrome. *Mammalian Genome* 1996;7:911–914.
133. Demczuk S, Levy A, Aubry M, Croquette M, et al. Excess of deletions of maternal origin in the DiGeorge/velo-cardio-facial syndromes. A study of 22 new patients and review of the literature. *Hum Genet* 1995;96:9–13.
134. Goldmuntz E, Emanuel BS. Genetic disorders of cardiac morphogenesis—the DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Circ Res* 1997;80:437–443.
135. Pierpont JW, Erickson RP, Thompson FH, Yang JM. Size of 22q deletions in four previously reported patients with conotruncal anomaly face syndrome. *Clin Genet* 1996;50:545–547.
136. Wilson DI, Burn J, Scambler P, Goodship J. Syndrome of the month. DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet* 1993;30:852–856.
137. Schuffenhauer S, Seidel H, Oechsler H, et al. DiGeorge syndrome and partial monosomy 10p: case report and review. *Ann Genet* 1995;38:162–167.
138. Lipson A, Fagan K, Colley A, Colley P, Sholler G, Issacs D. Velo-cardio-facial and partial DiGeorge phenotype in a child with interstitial deletion at 10p13—implications for cytogenetics and molecular biology. *Am J Med Genet* 1996;65: 304–306.
139. Cleveland WW, Fogel BJ, Brown WR, Kay HEM. Fetal thymus transplant in a case of DiGeorge's syndrome. *Lancet* 1968;2:1211–1214.
140. Davis CM, McLaughlin TM, Watson TJ, et al. Normalization of the peripheral

blood T cell receptor V repertoire after cultured postnatal human thymic transplantation in DiGeorge syndrome. *J Clin Immunol* 1997;17:167–175.
141. Goldsobel AB, Haas A, Stiehm ER. Bone marrow transplantation in DiGeorge syndrome. *J Pediatr* 1987;111:40–44.
142. Wortis HH. Immunological responses of "nude" mice. *Clin Exp Immunol* 1971; 8:305.
143. Festing MFW, May D, Connors TA, Lovell D, Sparrow S. An athymic nude mutation in the rat. *Nature* 1978;274:365.
144. Flanagan SP. "Nude," a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res* 1966;8:295.
145. Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 1968;217:370
146. Segre JA, Nemhauser JL, Taylor BA, Nadeau JH, Lander ES. Positional cloning of the nude locus: genetic, physical, and transcription maps of the region and mutations in the mouse and rat. *Genomics* 1995;28:549–559.
147. Galili N, Baldwin HS, Lund J, et al. A region of mouse chromosome 16 is syntenic to the DiGeorge, velocardiofacial syndrome minimal critical region. *Genome Res* 1997;7:17–26.
148. Bortin MM, Rimm AA. Severe combined immunodeficiency disease. Characterization of the disease and results of transplantation. *JAMA* 1977;238:591–600.
149. Glanzmann E, Riniker P. Essentielle lymphocytophtose. Ein neues krankeitsbild aus der Sauglingspathologie. *Ann Paediat* 1950;174:1–5.
150. Buckley RH, Schiff RI, Schiff SE, et al. Human severe combined immunodeficiency (SCID): genetic, phenotypic and functional diversity in 108 infants. *J Pediatr* 1997;130:378–387.
151. Gossage DL, Buckley RH. Prevalence of lymphocytopenia in severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 1990;323:1422–1423.
152. Buckley RH, Schiff SE, Sampson HA, et al. Development of immunity in human severe primary T cell deficiency following haploidentical bone marrow stem cell transplantation. *J Immunol* 1986;136:2398–2407.
153. Stephan JL, Vlekova V, Le Deist F, et al. Severe combined immunodeficiency: a retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 cases. *J Pediatr* 1993;123:564–572.
154. Altman PL. Blood leukocyte values: man. In: Dittmer DS, ed. *Blood and other body fluids.* Washington DC: Federation of American Societies for Experimental Biology, 1961:125–126.
155. Conley ME, Buckley RH, Hong R, et al. X-linked severe combined immunodeficiency. Diagnosis in males with sporadic severe combined immunodeficiency and clarification of clinical findings. *J Clin Invest* 1990;85:1548–1554.
156. Schiff SE, Buckley RH. Variation in natural killer (NK) lymphocyte function among the different molecular forms of severe combined immunodeficiency (SCID). *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:273
157. Puck JM, Conley ME, Bailey LC. Refinement of linkage of human severe combined immunodeficiency (SCIDXI) to polymorphic markers in Xq13. *Am J Hum Genet* 1993;53:176–184.
158. Puck JM, Deschenes SM, Porter JC, et al. The interleukin-2 receptor gamma chain maps to Xq13.1 and is mutated in X-linked severe combined immunodeficiency, SCIDX1. *Hum Mol Genet* 1993;2:1099–1104.
159. Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 1993;73:147–157.
160. Sugamura K, Asao H, Kondo M, et al. The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Ann Rev Immunol* 1996;14:179–205.
161. Leonard WJ. Dysfunctional cytokine receptor signaling in severe combined immunodeficiency. *J Invest Med* 1996;44:304–311.
162. Puck JM. IL2RGbase: a database of gamma c-chain defects causing human X-SCID. *Immunol Today* 1996;17:506–511.
163. Puck JM, Pepper AE, Henthorn PS, et al. Mutation analysis of IL2RG in human X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood* 1997;89:1968–1977.
164. O'Marcaigh AS, Puck JM, Pepper AE, de Santes K, Cowan MJ. Maternal mosaicism for a novel interleukin-2 receptor gamma chain mutation causing X-linked severe combined immunodeficiency in a Navajo kindred. *J Clin Immunol* 1997;17:29–33.
165. Nash DR, Levine AD, Buckley RH. B cells from most patients with either X-linked (XL) or autosomal recessive (AR) forms of severe combined immunodeficiency (SCID) produce IgE and other isotypes normally when stimulated with anti-CD40 mAb and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:273
166. Matthews DJ, Clark PA, Herbert J, et al. Function of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain in biologic responses of X-linked severe combined immunodeficient B cells to IL-2, IL-4, IL-13 and IL-15. *Blood* 1995;85:38–42.
167. Conley ME, Lavoie A, Briggs C, Brown P, Guerra C, Puck JM. Nonrandom X chromosome inactivation in B cells from carriers of X chromosome-linked severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:3090–3094.
168. Wengler SG, Allen RC, Parolini O, Smith H, Conley ME. Nonrandom X chromosome inactivation in natural killer cells from obligate carriers of X-linked severe combined immunodeficiency. *J Immunol* 1993;150:700–704.
169. Disanto JP, Dautry-Varsat A, Certain S, Fischer A, de Saint Basile G. Interleukin-2 (IL-2) receptor chain mutations in X-linked severe combined immunodeficiency disease result in the loss of high-affinity IL-2 receptor binding. *Eur J Immunol* 1994;24:475–479.
170. Russell SM, Keegan AD, Harada N, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* 1993;262:1880–1883.
171. Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 1993;262: 1977–1880.
172. Voss SD, Hong R, Sondel PM. Severe combined immunodeficiency, interleukin-2 (IL-2), and the IL-2 receptor: experiments of nature continue to point the way. *Blood* 1994;83:626–635.
173. Clark PA, Lester T, Genet S, et al. Screening for mutations causing X-linked severe combined immunodeficiency in the IL-2R gamma chain gene by single strand conformation polymorphism analysis. *Hum Genet* 1995;96:427–432.
174. Stephan V, Wahn V, LeDeist F, et al. Atypical X-linked severe combined immunodeficiency due to possible spontaneous reversion of the genetic defect in T cells. *N Engl J Med* 1996;335:1563–1567.
175. Buckley RH, Schiff RI. The use of intravenous immunoglobulin in immunodeficiency diseases. *N Engl J Med* 1991;325:110–117.
176. Myers LA, Riester DE, Schiff RI, et al. Bone marrow transplantation for SCID in the neonatal period. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99(suppl):101
177. Hague RA, Rassam S, Morgan G, Cant AJ. Early diagnosis of severe combined immunodeficiency syndrome. *Arch Dis Child* 1994;70:260–263.
178. Saito S, Morii T, Umekage H, et al. Expression of the interleukin-2 receptor gamma chain on cord blood mononuclear cells. *Blood* 1996;87:3344–3350.
179. Jefyk PF, Felsburg PJ, Haskins ME, Patterson DF. X-linked severe combined immunodeficiency in the dog. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;52:173–189.
180. Somberg RL, Tipold A, Hartnett BJ, Moore PF, Henthorn PS, Felsburg PJ. Postnatal development of T cells in dogs with X-linked severe combined immunodeficiency. *J Immunol* 1996;156:1431–1435.
181. Henthorn PS, Somberg RL, Fimiani VM, Puck JM, Patterson DF, Felsburg PJ. IL-2R gene microdeletion demonstrates that canine X-linked severe combined immunodeficiency is a homologue of the human disease. *Genomics* 1994;23: 69–74.
182. Somberg RL, Pullen RP, Casal ML, Patterson DF, Felsburg PJ, Henthorn PS. A single nucleotide insertion in the canine interleukin-2 receptor gamma chain results in X-linked severe combined immunodeficiency disease. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;47:203–213.
183. Disanto JP, Muller W, Guy GD, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:377–381.
184. Cao X, Shores EW, Hu-Li J, et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 1995; 2:223–238.
185. Taccioli GE, Alt FW. Potential targets for autosomal SCID mutations. *Curr Opin Immunol* 1995;7:436–440.
186. Shovlin CL, Simmonds HA, Fairbanks LD, et al. Adult onset immunodeficiency caused by inherited adenosine deaminase deficiency. *J Immunol* 1994;153: 2331–2339.
187. Hirschhorn R. Adenosine deaminase deficiency: molecular basis and recent developments. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;76(suppl):219–227.
188. Buckley RH, Schiff SE, Schiff RI, et al. Haploidentical bone marrow stem cell transplantation in human severe combined immunodeficiency. *Semin Hematol* 1993;30:92–104.
189. Hershfield MS, Buckley RH, Greenberg ML, et al. Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase (PEG-ADA). *N Engl J Med* 1987;316:589–596.
190. Hershfield MS, Chaffee S, Sorensen RU. Enzyme replacement therapy with polyethylene glycol-adenosine deaminase in adenosine deaminase deficiency: overview and case reports of three patients, including two now receiving gene therapy. *Pediatr Res* 1993;33(suppl):42–48.
191. Hershfield MS. PEG-ADA replacement therapy for adenosine deaminase deficiency: an update after 8.5 years. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;76(suppl): 228–232.
192. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science* 1995;270:470–475.
193. Hoogerbrugge PM, van Beusechem VW, Fischer A, et al. Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency. *Gene Ther* 1996; 3:179–183.
194. Mullen CA, Snitzer K, Culver KW, Morgan R, Anderson WF, Blaese RM. Molecular analysis of T lymphocyte-directed gene therapy for adenosine deaminase deficiency: long-term expression *in vivo* of genes introduced with a retroviral vector. *Hum Gene Ther* 1996;7:1123–1129.
195. Kohn DB, Weinberg KI, Nolta JA, et al. Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1995;1:1017–1023.
196. Fischer A, de Saint Basile G, Disanto JP, Hacein-Bey S, Sharara L, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of primary immunodeficiencies. *Adv Nephrol* 1997;26: 107–120.
197. Hirschhorn R, Yang DR, Israni A, Huie ML, Ownby DR. Somatic mosaicism for a newly identified splice-site mutation in a patient with adenosine deaminase deficiency immunodeficiency and spontaneous clinical recovery. *Am J Hum Genet* 1994;55:59–68.
198. Hirschhorn R, Yang DR, Puck JM, Huie ML, Jiang CK, Kurlandsky LE. Spon-

taneous in vivo reversion to normal of an inherited mutation in a patient with adenosine deaminase deficiency. *Nature Genetics* 1996;13:290–295.

199. Migchielsen AA, Breuer ML, van Roon RM, et al. Adenosine-deaminase-deficient mice die perinatally and exhibit liver-cell degeneration, atelectasis and small intestinal cell death. *Nature Genet* 1995;10:279–287.
200. Kawamura M, McVicar DW, Johnston JA, et al. Molecular cloning of L-Jak, a Janus family protein tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6374–6378.
201. Johnston JA, Kawamura M, Kirken RA, et al. Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature* 1994;370:151–153.
202. Miyazaki T, Kawahara A, Jujii H, et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* 1994;266:1045–1047.
203. Russell SM, Johnston JA, Noguchi M, et al. Interaction of IL-2R and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science* 1994; 266:1042–1045.
204. Ihle JN, Kerr IM. JAKs and STATs in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 1995;11:69–72.
205. Johnston JA, Bacon CM, Riedy MC, O'Shea JJ. Signaling by IL-2 and related cytokines: JAKs, STATs, and relationship to immunodeficiency. *J Leukoc Biol* 1996;60:441–452.
206. Macchi P, Villa A, Gillani S, et al. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature* 1995;377:65–68.
207. Sharfe N, Dadi HK, Roifman CM. Jak3 protein tyrosine kinase mediates interleukin-7–induced activation of phosphatidylinositol-3′ kinase. *Blood* 1995;86: 2077–2085.
208. Nosaka T, van Deursen DJ, Tripp RA, et al. Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science* 1995;270:800–802.
209. Schwarz K, Gauss GH, Ludwig L, et al. RAG mutations in human B cell–negative SCID. *Science* 1996;274:97–99.
210. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1–deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992;68: 869–877.
211. Shinkai Y, Rathbun G, Lam K, et al. RAG-2–deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992;68: 855–867.
212. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983;301:527–530.
213. Schuler W, Weiler IJ, Schuler A, et al. Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency. *Cell* 1986;46: 963–972.
214. Bosma MJ. B and T cell leakiness in the SCID mouse mutant. *Immunodef Rev* 1992;3:261–276.
215. Dorshkind K, Pollack SB, Bosma MJ, Phillips RA. Natural killer cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (SCID). *J Immunol* 1985; 134:3798
216. Miller RD, Hogg J, Ozaki JH, Gell D, Jackson SP, Riblet R. Gene for catalytic subunit of mouse DNA-dependent protein kinase maps to the scid locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10792–10795.
217. Araki R, Fujimori A, Hamatani K, et al. Nonsense mutation at Tyr-4046 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:2438–2443.
218. Itoh M, Hamatani K, Komatsu K, Araki R, Takayama K, Abe M. Human chromosome 8(p12- q22) complements radiosensitivity in the severe combined immune deficiency (SCID) mouse. *Radiat Res* 1993;134:364–368.
219. Felsburg PJ, Somberg RL, Perryman LE. Domestic animal models of severe combined immunodeficiency: canine X-linked severe combined immunodeficiency and severe combined immunodeficiency in horses. *Immunodef Rev* 1992; 3:277–303.
220. Poppie MJ, McGuire TC. Combined immunodeficiency in foals of Arabian breeding: evaluation of mode of inheritance and estimation of prevalence of affected foals and carrier mares and stallions. *J Am Vet Med Assoc* 1977;170:31
221. McGuire TC, Banks KL, Poppie MJ. Combined immunodeficiency in horses: characterization of the lymphocyte defect. *Clin Immunol Immunopatholh* 1975; 3:555
222. Wiler R, Leber R, Moore BB, VanDyk LF, Perryman LE, Meek K. Equine severe combined immunodeficiency: A defect in V(D)J recombination and DNA-dependent protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11485–11489.
223. Pannicke U, Tuchschmid P, Friedrich W, Bartram CR, Schwarz K. Two novel missense and frameshift mutations in exons 5 and 6 of the purine nucleoside phosphorylase (PNP) gene in a severe combined immunodeficiency (SCID) patient. *Hum Genet* 1996;98:706–709.
224. Broome CB, Graham ML, Saulsbury FT, Hershfield MS, Buckley RH. Correction of purine nucleoside phosphorylase deficiency by transplantation of allogeneic bone marrow from a sibling. *J Pediatr* 1996;128:373–376.
225. Polmar SH, Pierce GF. Cartilage hair hypoplasia: immunological aspects and their clinical implications. *Clin Immunol Immunopathol* 1986;40:87–93.
226. Sulisalo T, van der Burgt I, Rimoin DL, Bonaventure J. Genetic homogeneity of cartilage-hair hypoplasia. *Hum Genet* 1995;95:157–160.
227. Pierce GF, Polmar SH. Lymphocyte dysfunction in cartilage hair hypoplasia. II. Evidence for a cell cycle specific defect in T cell growth. *Clin Exp Immunol* 1982;50:621
228. Juvonen E, Makitie O, Makipernaa A, Ruutu T. Defective in-vitro colony formation of haematopoietic progenitors in patients with cartilage-hair hypoplasia and history of anaemia. *Eur J Pediatr* 1995;154:30–34.
229. Remold-O'Donnell E, Rosen FS. Sialophorin (CD43) and the Wiskott-Aldrich syndrome. *Immunodef Rev* 1990;2:151–174.
230. Inoue R, Kondo N, Kuwabara N, Orii T. Aberrant patterns of immunoglobulin levels in Wiskott-Aldrich syndrome. *Scand J Immunol* 1995;41:188–193.
231. Kawabata K, Nagasawa M, Morio T, Okawa H, Yata J. Decreased α/β heterodimer among CD8 molecules of peripheral blood T cells in Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;81:129 135.
232. de Saint Basile G, Fraser NJ, Craig IW, et al. Close linkage of hypervariable marker DXS255 to disease locus of Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1989;2: 1319 1320.
233. Symons M, Derry JMJ, Karlak B, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42H2, is implicated in actin polymerization. *Cell* 1996;84:723–734.
234. Aspenstrom P, Lindberg U, Hall A. Two GTPases, cdc42 and rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Biol* 1996;6:70
235. Finan PM, Soames CJ, Wilson L, et al. Identification of regions of the Wiskott-Aldrich syndrome protein responsible for association with selected Src homology 3 domains. *J Biol Chem* 1996;271:25646–25656.
236. Miki H, Nonoyama S, Zhu Q, Aruffo A, Ochs HD, Takenawa T. Tyrosine kinase signaling regulates Wiskott-Aldrich syndrome protein function, which is essential for megakaryocyte differentiation. *Cell Growth Differentiation* 1997;8:195–202.
237. Schwarz K. WASPbase: a database of WAS- and XLT-causing mutations. *Immunol Today* 1996;17:496–502.
238. Schwartz M, Bekassy A, Donner M, et al. Mutation spectrum in patients with Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia: identification of twelve different mutations in the WASP gene. *Thromb Haemost* 1996;75:546–550.
239. Greer WL, Shehabeldin A, Schulman J, Junker A, Siminovitch KA. Identification of WASP mutations, mutation hotspots and genotype-phenotype disparities in 24 patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Hum Genet* 1996;98:685–690.
240. de Saint Basile G, Lagelouse RD, Lambert N, et al. Isolated X-linked thrombocytopenia in two unrelated families is associated with point mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome gene. *J Pediatr* 1996;129:56–62.
241. Wengler G, Gorlin JB, Williamson JM, Rosen FS, Bing DH. Non-random inactivation of the X chromosome in early lineage hematopoietic cells in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 1995;85:2471–2477.
242. Kwan SP, Hagemann TL, Radtke BE, Blaese RM, Rosen FS. Identification of mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome gene and characterization of a polymorphic dinucleotide repeat at the DXS6940, adjacent to the disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4706–4710.
243. Ariga T, Yamada M, Sakiyama Y. Mutation analysis of five Japanese families with Wiskott-Aldrich syndrome and determination of the family members' carrier status using three different methods. *Pediatr Res* 1997;41:535–540.
244. Kondoh T, Hayashi K, Matsumoto T, et al. Two sisters with clinical diagnosis of Wiskott-Aldrich syndrome: Is the condition in the family autosomal recessive? *Am J Med Genet* 1995;60:364–369.
245. Rocca B, Bellacosa A, de Cristofaro R, et al. Wiskott-Aldrich syndrome: report of an autosomal dominant variant. *Blood* 1996;87:4538–4543.
246. Filipovich AH, Pelz C, Sobocinski K, Ireland M, Kollman C, Horowitz MM. Allogeneic bone marrow transplantation (BMT) for Wiskott Aldrich syndrome (WAS): comparison of outcomes by donor type. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99S:102
247. Mullen CA, Anderson KD, Blaese RM. Splenectomy and/or bone marrow transplantation in the management of the Wiskott-Aldrich syndrome: long-term follow-up of 62 cases. *Blood* 1993;82:2961–2966.
248. Litzman J, Jones A, Hann I, Chapel H, Strobel S, Morgan G. Intravenous immunoglobulin, splenectomy, and antibiotic prophylaxis in Wiskott-Aldrich syndrome. *Arch Dis Child* 1996;75:436–439.
249. Lyon MF, Peters J, Glenister PH, Ball S, Wright E. The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2433–2437.
250. Blair PJ, Bultman SJ, Haas JC, Rouse BT, Wilkinson JE, Godfrey VL. $CD4^{+}CD8^{-}$ T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse. *J Immunol* 1994;153:3764–3774.
251. Kanangat S, Blair P, Reddy R, et al. Disease in the scurfy (sf) mouse is associated with overexpression of cytokine genes. *Eur J Immunol* 1996;26:161–165.
252. Derry JMJ, Wiedemann P, Blair P, et al. The mouse homolog of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene is highly conserved and maps near the scurfy (sf) mutation on the X chromosome. *Genomics* 1995;29:471–477.
253. Gatti RA, Boder E, Vinters HV, Sparkes RS, Norman A, Lange K. Ataxia-telangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis. *Medicine* 1991;70:99–117.
254. Taylor AMR, Metcalfe JA, Thick J, Mak Y. Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood* 1996;87:423–438.
255. Watson HG, McLaren KM, Todd A, Wallace WH. Transfusion associated graft-versus-host disease in ataxia telangiectasia. *Lancet* 1997;349:179
256. Swift M. Genetic aspects of ataxia telangiectasia. *Immunodef Rev* 1990;2:67–81.
257. Beamish H, Williams R, Chen P, Lavin MF. Defect in multiple cell cycle checkpoints in ataxia telangiectasis postirradiation. *J Biol Chem 1996;271:*

20486–20493.
258. Lavin MF, Shiloh Y. Ataxia telangiectasia: a multifaceted genetic disorder associated with defective signal transduction. *Curr Opin Immunol* 1996;8:459–464.
259. Hartley KO, Gell D, Smith GC, et al. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell* 1995;82:849–856.
260. Xu Y, Baltimore D. Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. *Genes Dev* 1996;10:2401–2410.
261. Heintz N. Ataxia telangiectasia: cell signaling, cell death and the cell cycle. *Curr Opin Neurol* 1996;9:137–140.
262. Gilad S, Khosravi R, Shkedy D, et al. Predominance of null mutations in ataxia telangiectasia. *Hum Mol Genet* 1996;5:433–439.
263. Wright J, Teraoka S, Onengut S, et al. A high frequency of distinct ATM gene mutations in ataxia telangiectasia. *Am J Hum Genet* 1996;59:839–846.
264. Barlow C, Hirotsune S, Paylor R, et al. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 1996;86:159–171.
265. Weemaes CMR, Smeets DFCM, van der Burgt CJAM. Nijmegen breakage syndrome: a progress report. *Int J Radiat Biol* 1994;66(suppl):185–188.
266. Kleijer WJ, van der Kraan M, Los FJ, Jaspers NGJ. Prenatal diagnosis of ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome by the assay of radioresistant DNA synthesis. *Int J Radiat Biol* 1994;66(suppl):167–174.
267. Chrzanowska KH, Kleijer WJ, Krajewska-Walasek M, et al. Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet* 1995;57:462–471.
268. Saar K, Chrzanowska KH, Stumm M, et al. The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. *Am J Hum Genet* 1997;60:605–610.
269. Klein C, Lisowska-Grospierre B, LeDeist F, Fischer A, Griscelli C. Major histocompatibility complex class II deficiency: clinical manifestations, immunologic features, and outcome. *J Pediatr* 1993;123:921–928.
270. Donato L, de la Salle H, Hanau D, et al. Association of HLA class I antigen deficiency related to a TAP2 gene mutation with familial bronchiectasis. *J Pediatr* 1995;127:895–900.
271. Grandea AG, Androlewicz MJ, Athwal RS, Geraghty DE, Spies T. Dependence of peptide binding by MHC class I molecules on their interaction with TAP. *Science* 1995;270:105–108.
272. Elhasid R, Etzioni A. Major histocompatibility complex class II deficiency: a clinical review. *Blood Rev* 1996;10:242–248.
273. Henwood J, van Eggermond MC, van Boxel-Dezaire AN, et al. Human T cell repertoire generation in the absence of MHC class II expression results in a circulating $CD4^-CD8^-$ population with altered physicochemical properties of complementarity-determining region 3. *J Immunol* 1996;156:895–906.
274. Reith W, Steimle V, Mach B. Molecular defects in the bare lymphocyte syndrome and regulation of MHC class II genes. *Immunol Today* 1995;16:539–546.
275. Peijnenburg A, Godthelp B, van Boxel-Dezaire A, van den Elsen P. Definition of a novel complementation group in MHC class II deficiency. *Immunogenetics* 1995;41:287–294.
276. Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* 1996;14:301–331.
277. Steimle V, Otten LA, Zufferey M, Mach B. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 1993;75:135–146.
278. Reith W, Barras E, Satola S. Cloning of the major histocompatibility complex class II promoter binding protein affected in a hereditary defect in class II gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:4200
279. Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon-γ mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994;265:106–109.
280. Zhou H, Glimcher LH. Human MHC class II gene transcription directed by the carboxyl terminus of CIITA, one of the defective genes in type II MHC combined immune deficiency. *Immunity* 1995;2:545–553.
281. Chang C-H, Guerder S, Hong S-C, van Ewijk W, Flavell RA. Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression. *Immunity* 1996;4:167–178.
282. Kishimoto TK, Springer TA. Human leukocyte adhesion deficiency: molecular basis for a defective immune response to infections of the skin. *Curr Prob Dermatol* 1989;18:106.
283. D'Agata ID, Paradis K, Chad Z, Bonny Y, Seidman E. Leucocyte adhesion deficiency presenting as a chronic ileocolitis. *Gut* 1996;39:605–608.
284. Rivera-Matos IR, Rakita RM, Mariscalco MM, Elder FFB, Dreyer SA, Cleary TG. Leukocyte adhesion deficiency mimicking Hirschprung disease. *J Pediatr* 1995;127:755–757.
285. Wilson RW, Ballantyne CM, Smith CW, et al. Gene targeting yields a CD18-mutant mouse for study of inflammation. *J Immunol* 1993;151:1571–1578.
286. Etzioni A, Frydman M, Pollack S, et al. Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N Engl J Med* 1992;327: 1789–1792.
287. Willerford DM, Chem J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 1995;3:521–530.
288. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor. *Science* 1995;268:1472–1476.
289. Lenardo MJ. Interleukin-2 programs mouse α T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 1991;353:858–861.
290. Huang S, Hendriks W, Althage A, et al. Immune response in mice that lack the interferon-γ receptor. *Science* 1993;259:1742–1745.
291. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-γ genes. *Science* 1993;259:1739–1742.
292. Stolz W, Graubner U, Gerstmeier J, Burg G, Belohradsky BH. Chediak syndrome: approaches to diagnosis and treatment. *Curr Prob Dermatol* 1989;18:93
293. Zhao H, Boissy YL, Abdel-Malek Z, King RA, Nordlund JJ, Boissy RE. On the analysis of the pathophysiology of Chediak-Higashi syndrome—defects expressed by cultured melanocytes. *Lab Invest* 1994;71:25–34.
294. Holcombe RF, Jones KL, Stewart RM. Lysosomal enzyme activities in Chediak-Higashi syndrome: evaluation of lymphoblastoid cell lines and review of the literature. *Immunodeficiency* 1994;5:131-140.
295. Merino F, Esparza B, Sabino E. Chediak-Higashi syndrome natural killer cells: a protein kinase C defective activation/regulation defect? *Eur J Pediatr* 1996; 155:254–258.
296. Baetz K, Isaaz S, Griffiths GM. Loss of cytotoxic T lymphocyte function in Chediak-Higashi syndrome arises from a secretory defect that prevents lytic granule exocytosis. *J Immunol* 1995;154:6122–6131.
297. Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, et al. Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nature Genet* 1996;14: 307–311.
298. Barrat FJ, Auloge L, Pastural E, et al. Genetic and physical mapping of the Chediak-Higashi syndrome on chromosome 1q42-43. *Am J Hum Genet* 1996;59: 625–632.
299. Perou CM, Moore KJ, Nagle DL, et al. Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nature Genet* 1996;13: 303–308.
300. Barbosa MDFS, Nguyen QA, Tchernev VT, et al. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature* 1996;382:262–265.
301. Fukai K, Oh J, Karim MA, et al. Homozygosity mapping of the gene for Chediak-Higashi syndrome to chromosome 1q42-q44 in a segment of conserved synteny that includes the mouse beige locus (bg). *Am J Hum Genet* 1996;59:620–624.
302. Aslan Y, Erduran E, Gedik Y, Mocan H, Yildiran A. The role of high dose methylprednisolone and splenectomy in the accelerated phase of Chediak-Higashi syndrome. *Acta Haematol* 1996;96:105–107.
303. Haddad E, Le Deist F, Blanche S, et al. Treatment of Chediak-Higashi syndrome by allogenic bone marrow transplantation: report of 10 cases. *Blood* 1995;85: 3328–3333.
304. Chatila T, Wong R, Young M, Miller R, Terhorst C, Geha RS. An immunodeficiency characterized by defective signal transduction in T lymphocytes. *N Engl J Med* 1989;320:696–702.
305. Arpaia E, Shahar M, Dadi H, Cohen A, Roifman CM. Defective T cell receptor signaling and $CD8^+$ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* 1994;76:947–958.
306. Elder ME. Severe combined immunodeficiency due to a defect in the tyrosine kinase ZAP-70. *Pediatr Res* 1996;39:743–748.
307. Negishi I, Motoyama N, Nakayama K, et al. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 1995;376:435–438.
308. Stein PL, Lee H, Rich S, Soriano P. p59fyn mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells. *Cell* 1992;70:741–750.
309. Appleby MW, Gross JA, Cooke MP, Levin SD, Qian X, Perlmutter RM. Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59fyn. *Cell* 1992;70:751–761.
310. Appleby MW, Kerner JD, Chien S, Maliszewski CR, Bondada S, Perlmutter RM. Involvement of p59fynT in interleukin-5 receptor signaling. *J Exp Med* 1995; 182:811–820.
311. Arnaiz-Villena A, Timon M, Corell A, Perez-Aciego P, Martin-Villa JM, Regueiro JR. Brief report: primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the CD3-γ subunit of the T lymphocyte receptor. *N Engl J Med* 1992;327:529–533.
312. Thoenes G, Soudais C, Le Deist F, Griscelli C, Fischer A, Lisowska-Grospierre B. Structural analysis of low TCR–CD3 complex expression in T cells of an immunodeficient patient. *J Biol Chem* 1992;267:487–493.
313. Soudais C, de Villartay J, Le Deist F, Fischer A, Lisowska-Grospierre B. Independent mutations of the human CD3-ε gene resulting in a T cell receptor/CD3 complex immunodeficiency. *Nature Genet* 1993;3:77–81.
314. Malissen M, Gillet A, Ardouin L, et al. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-ε gene. *EMBO J* 1995;14:4641–4653.
315. Love PE, Shores EW, Johnson MD, et al. T cell development in mice that lack the chain of the T cell antigen receptor complex. *Science* 1993;261:918–921.
316. Fehling HJ, Krotkova A, Saint-Ruf C, Von Boehmer H. Crucial role of the pre-T-cell receptor α gene in development of α but not δ T cells. *Nature* 1995;375: 795–798.
317. Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, et al. Mutations in T cell antigen receptor genes α and thymocyte development at different stages. *Nature* 1992;360: 225–231.
318. Philpott KL, Viney JL, Kay G, et al. Lymphoid development in mice congeni-

tally lacking T cell receptor αβ-expressing cells. *Science* 1992;256:1448–1452.
319. Weinberg K, Parkman R. Severe combined immunodeficiency due to a specific defect in the production of interleukin-2. *N Engl J Med* 1990;322:1718–1723.
320. Disanto JP, Keever CA, Small TN, Nichols GL, O'Reilly RJ, Flomenberg N. Absence of interleukin 2 production in a severe combined immunodeficiency disease syndrome with T cells. *J Exp Med* 1990;171:1697–1704.
321. Castigli E, Pahwa R, Good RA, Geha RS, Chatila TA. Molecular basis of a multiple lymphokine deficiency in a patient with severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:4728–4732.
322. Feske S, Muller JM, Graf D, et al. Severe combined immunodeficiency due to defective binding of the nuclear factor of activated T cells in T lymphocytes of two male siblings. *Eur J Immunol* 1996;26:2119–2126.
323. Schorle H, Holtschke T, Hunig T, Schimpl A, Horak I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 1991;352:621–624.
324. Sadlack B, Lohler J, Schorle H, et al. Generalized autoimmune disease in interleukin-2–deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 1995;25:3053–3059.
325. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis–like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993;75: 253–261.
326. Businco L, Di Frazio A, Ziruolo MG, et al. Clinical and immunologic findings in four infants with Omenn's syndrome: a form of severe combined immunodeficiency with phenotypically normal T cells, elevated IgE, and eosinophilia. *Clin Immunol Immunopathol* 1987;44:123–133.
327. Rybojad M, Cambiaghi S, Moraillon I, et al. Omenn's reticulosis associated with the nephrotic syndrome. *Br J Dermatol* 1996;135:124–127.
328. Karol RA, Eng J, Cooper JB, et al. Imbalances in subsets of T lymphocytes in an inbred pedigree with Omenn's syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 1983;27: 412–427.
329. de Saint-Basile G, Le Deist F, de Vallartay J, et al. Restricted heterogeneity of T lymphocytes in combined immunodeficiency with hypereosinophilia (Omenn's syndrome). *J Clin Invest* 1991;87:1352–1359.
330. Mathioudakis G, Good RA, Chernajovsky Y, Day NK, Platsoucas CD. Selective gamma-chain T cell receptor gene rearrangements in a patient with Omenn's syndrome: absence of V-II subgroup (V 9) transcripts. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:616–619.
331. Ruco LP, Stoppacciaro A, Pezzella F, et al. The Omenn's syndrome: histological, immunohistochemical and ultrastructural evidence for a partial T cell deficiency evolving in an abnormal proliferation of T lymphocytes and S-100⁺/T-6⁺ Langerhans like cells. *Virchows Arch* 1985;407:69–82.
332. Martin JV, Willoughby PB, Giusti V, Price G, Cerezo L. The lymph node pathology of Omenn's syndrome. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1082–1087.
333. Melamed I, Cohen A, Roifman CM. Expansion of CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ T cell population expression high levels of IL5 in Omenn's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1994;95:14–21.
334. Schandene L, Ferster A, Mascart-Lemone F, et al. T helper type 2-like cells and therapeutic effects of interferon gamma in combined immunodeficiency with hypereosinophilia (Omenn's syndrome). *Eur J Immunol* 1993;23:56–60.
335. Chilosi M, Facchetti F, Notarangelo LD, et al. CD30 cell expression and abnormal soluble CD30 serum accumulation in Omenn's syndrome: evidence for a T helper 2-mediated condition. *Eur J Immunol* 1996;26:329–334.
336. Buckley RH, Wray BB, Belmaker EZ. Extreme hyperimmunoglobulinemia E and undue susceptibility to infection. *Pediatrics* 1972;49:59–70.
337. Buckley RH, Sampson HA. The hyperimmunoglobulinemia E syndrome. In: Franklin EC, ed. *Clinical immunology update.* New York: Elsevier North-Holland, 1981:147–167.
338. Claassen JL, Levine AD, Schiff SE, Buckley RH. Mononuclear cells from patients with the hyper IgE syndrome produce little IgE when stimulated with recombinant interleukin 4 in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:713–721.
339. King CL, Gallin JI, Malech HL, Abramson SL, Nutman TB. Regulation of immunoglobulin production in hyperimmunoglobulin E recurrent infection syndrome by interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:10085–10089.
340. Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in stat 4–deficient mice. *Nature* 1996;382: 174–177.
341. Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, et al. Requirement for stat4 in interleukin-12–mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 1996; 382:171–173.

第44章　人免疫缺陷病毒感染免疫发病机制

Oren Collen, Drew Weissman and Aathony S. Fzuci[①]

人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)于 1983 年被发现,1984 年研究证实,HIV 是引起获得性免疫缺陷综合征(acauried immunodeficiency syndrome, AIDS)的病原体[1-3]。HIV 感染以 CD4⁺ T 细胞减少

1455

① O. Cohen and A. S. Fauci: Laboratory of Immunoregulation, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, *National Institutes of Health, Bethesda,* Maryland 20892. D. Weissman: Division of Infectious Diseases, University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia, Pennsylvania 19104.

为主要特征，可引起严重的免疫抑制，同时伴有神经系统病变、恶性肿瘤及机会性感染[4]。全世界约有 2900 万 HIV 感染者，其中在美国约 65 万～90 万[5-6]。预计到 2000 年，全球将新增 0.4～1 亿的 HIV 感染患者。1981 年首例 AIDS 被报道，而到 1997 年 6 月，美国已诊断出 60 万例 AIDS，其中超过 60% 的患者已死亡[7]。HIV 病毒主要通过性接触、母婴传播、血液制品等途径传播[8]。直肠及外生殖器的损伤将极大地增加通过性接触感染 HIV 病毒的危险性[8~14]。

1456

本章节将主要阐述以下问题：HIV 的生物学、HIV 与靶细胞的相互作用，HIV 感染的临床症状、HIV 感染过程中的免疫缺陷及发病机制，以及 HIV 疾病的遗传调节因子。如下详述，HIV 病毒主要感染人类的免疫系统，其发病机制与机体的正常免疫反应密切相关。

HIV 感染的临床症状

临床症状多发生于首次感染 HIV 后 3～6 周，至少 50% 患者将出现急性自限性综合征，持续一至数周，通常可自行缓解[15]。急性综合征与病毒血症的爆发有关，外周血 $CD4^+$ T 细胞水平下降（有时降幅剧烈），随后恢复至接近或比正常值稍低的水平[16]（图 44.1）。在某些病例的急性综合征期，由于 $CD4^+$ T 细胞水平下降及病毒血症均较严重，此期则可出现机会性感染[17]。急性综合征期间 $CD8^+$ T 细胞和 B 细胞的水平同样下降，而在疾病开始后 3～4 周，$CD8^+$ T 细胞通常可回升到正常或比正常稍高的水平[16]。因为 $CD8^+$ T 细胞计数比 $CD4^+$ T 细胞恢复得更快，因而在急性综合征后期将出现 CD4/CD8 比值倒置，并将在急性综合征缓解后仍将保持[4]。CD4/CD8 比值倒置绝大多数 HIV 感染者都存在，即使没有出现临床症状。

1457

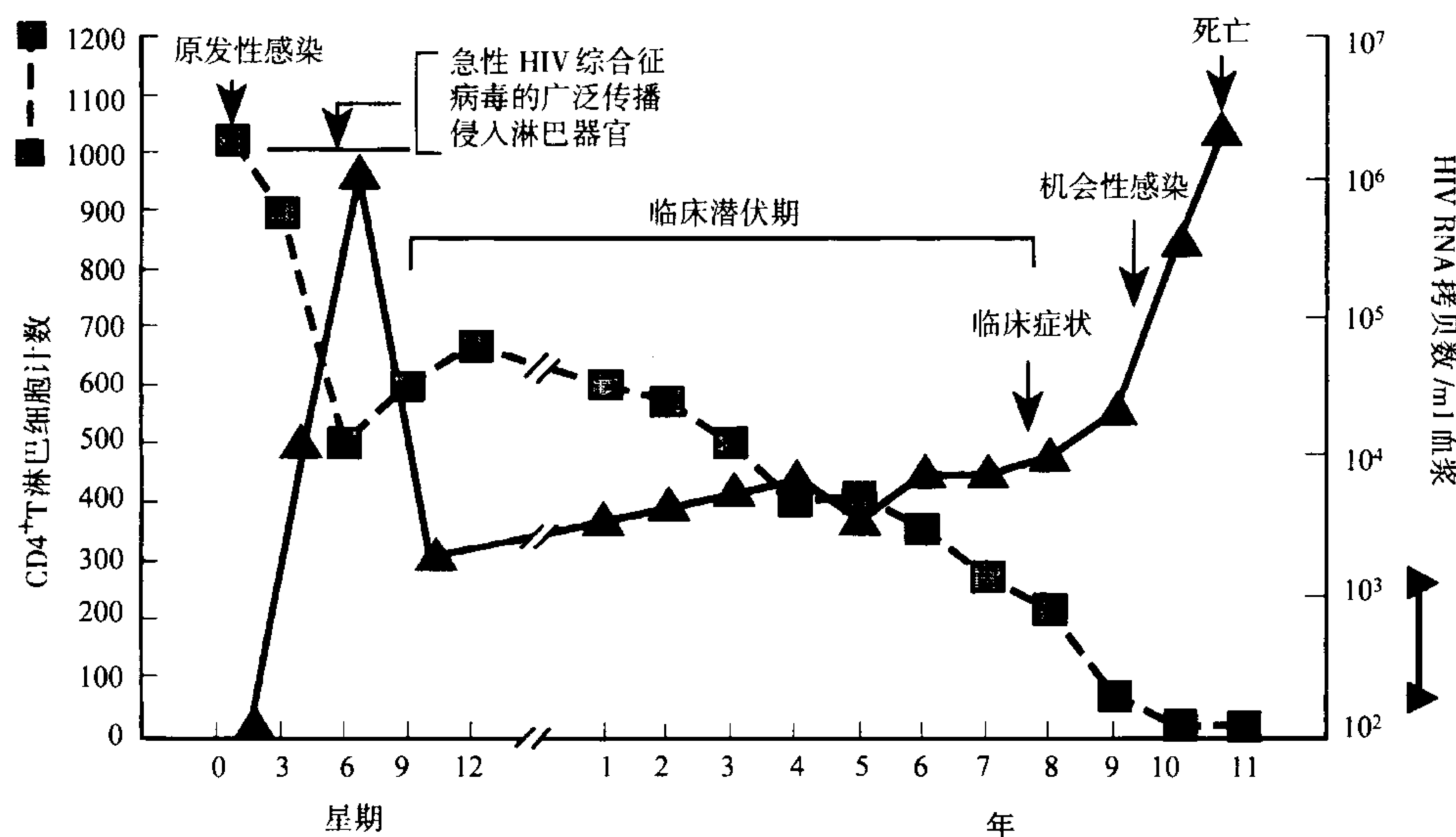


图 44.1 HIV 感染个体的典型临床过程。原发性感染后，发生病毒血症同时伴有 $CD4^+$ T 细胞计数的降低。对病毒复制的免疫控制可导致一个可变的临床潜伏期的出现。与 $CD4^+$ T 细胞计数降低相随的是机体发生各种临床症状及机会性感染的危险性增加。

HIV 疾病包括以下阶段：无症状期、渐进性免疫缺陷期、临床疾病期。从 HIV 首次感染到出现 AIDS 的时间平均为 10 年[18]。在此期间，$CD4^+$ T 细胞计数持续降低，直至降至某一水平，机会性感染的发生呈高危险性[19]。在出现机会性感染前，HIV 感染者可能出现各种临床征兆及症状[4]。AIDS 的神经系统病变可在没出现机会性感染时发生[20]。渐进性免疫缺陷包括各种机会性感染、恶性肿瘤[4]。早日诊断出 HIV 感染，采用有效的抗反转录病毒疗法以及积极的预防均可有效降低机会性感染的发生率。随着渐进性免疫缺陷的患者生存时间的延长，恶性淋巴瘤发病率却在增加。

流行病学

目前估计全球 HIV 感染人数已突破 2900 万[5]。HIV 在世界各地传播的趋势不尽相同。世界上有部分地区发病率近来已到了平台期，而有些地区发病率则在持续上升(图 44.2)。在非洲亚撒哈拉地区，HIV 感染率已达到总人口的 10%，相似的情形将来可能会在亚州的某些地区出现。在美国，男性同性恋是 HIV 最普遍的传播途径，而毒品注射也是 HIV 传播的重要途径。异性性接触也是 HIV 传播的途径之一，对性伴侣为毒品注射者的妇女，HIV 感染的概率更高。

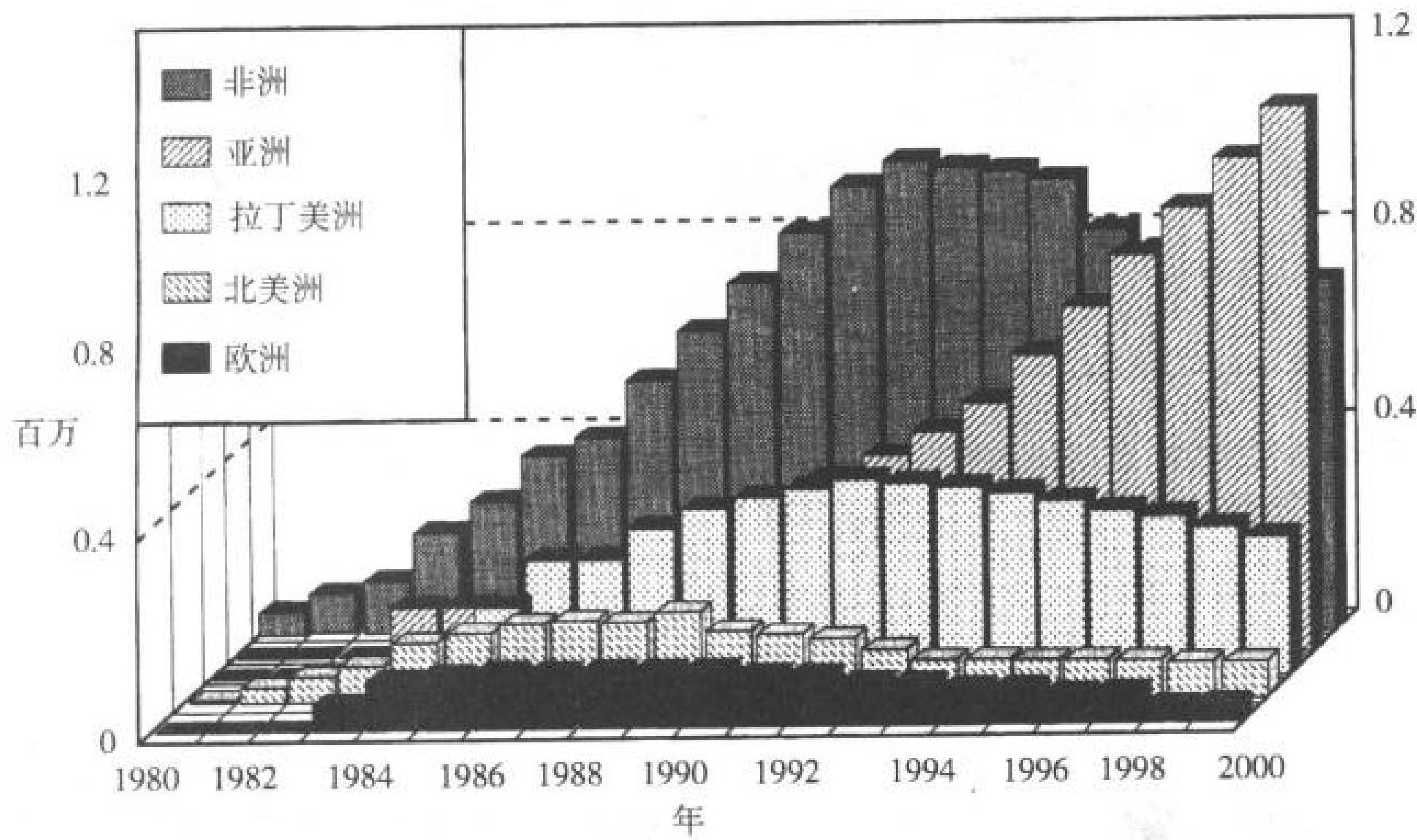


图 44.2 HIV 感染发病率的地区分布。

HIV 病毒可分为几种亚型(图 44.3)。对 HIV 前病毒序列的种类史分析表明，HIV 病毒主要分为 M 亚群和 O 亚群。O 亚群相对较少，主要集中于北非，并且不能为标准的 HIV-1 抗体所检测。在 M 亚群，可根据 HIV 病毒遗传学的相似性大小可分为 A-J 亚型[21]，其中 A 亚型最为普遍，HIV-1 病毒 A-J 亚型的地区分布如下：A 亚型——中非、欧洲、俄罗斯、东亚；B 亚型——南美(包括巴西)、中国台湾、马来西亚、日本；C 亚型——巴西、中国、印度、南非；D 亚型——中非；E 亚型——巴西、罗马尼亚、扎伊尔；F 亚型——扎伊尔、加蓬、中国台湾、G、H 及 J 亚型——中非；I 型——主要在塞浦路斯[22]。

HIV 的生命周期

HIV 属于反转录病毒科，具有特征性的酶，即反转录酶(reverse transcriptase, RT)。RT 可使 HIV 病毒到双链 DNA 中进一步自我复制[23,24]。在反转录病毒科中，HIV 归为慢病毒，其 3 个主要编码区分别编码核心蛋白(gag)、多聚酶(pol)和包膜蛋白(env)(表 44.1、图 44.4)。此外，HIV 基因组还编码其他一些辅助蛋白，这些蛋白可能在 HIV 感染的发病机制中起着关键的作用。病毒的生命周期(图 44.5)从病毒包膜蛋白 gp120 与靶细胞 CD4 分子[25-28]及一个具有七跨膜结构的共同受体的结合开始[29]。病毒脂质包膜蛋白通过(gp160 的亚单位)gp41(gp160 的亚单位)的融合区与靶细胞膜融合[30,31]。HIV 病毒核心颗粒进入细胞内，在反转录酶 RT 的作用，病毒 RNA 被反转录为双链 DNA。HIV 双链 DNA 与病毒的整合酶(*pol* 基因产物)形成复合物转运入细胞核内，嵌入细胞染色体 DNA 中，当细胞激活时，病毒的 mRNA 随之指导新病毒体的产生。病毒体的外膜含有 HIV 编码的包膜糖蛋白(表 44.1)。此外，当 HIV 病毒从细胞膜芽生时，其病毒体膜同时含有来自感染细胞的胞膜蛋白[33]。

1458

原书缺页

表 44.1 人免疫缺陷病毒(HIV)蛋白

名称	大小	功能	位置
Gag MA	P17	膜锚入,转运病毒核心蛋白人胞核	病毒颗粒
Gag CA	P24	核心壳体	病毒颗粒
Gag NC	P7 P6	壳体核酸,结合 RNA	病毒颗粒
Env	Gp120/gp/41	病毒糖蛋白,结合 CD4 及辅助受体	胞质膜,病毒包膜
蛋白酶	P15	Gag-Pol 清除和突变	病毒颗粒
逆转录酶	P66/p14	反转录,RNA 酶 H 活性	病毒颗粒
整合酶		DNA 前病毒的整合	病毒颗粒
Tat	P16/p14	病毒转录反式激活因子	细胞核,核仁
Rev	P19	RNA 转运	细胞核,核仁
Vif	P23	促进病毒突变和感染	胞质
Vpr	P10-15	促进整合前复合物的胞核定位	病毒颗粒,胞核
Vpu	P16	促进病毒体的释放,降解 CD4 分子	保持膜蛋白的完整性
Nef	P27/25	下调 CD4	胞浆膜,胞浆、病毒颗粒

HIV 穿入

CD4 分子的单克隆抗体在体外可抑制 HIV 感染细胞,表明 CD4 分子是 HIV 结合并穿入靶细胞的主要作用部位。将人的 CD4 转染至非人的细胞的研究表明,其他共同受体也是 HIV 有效穿入细胞所必需的[34]。最近发现趋化因子受体也与 HIV 的穿入作用有关。

1459

目前认为 HIV 穿入细胞的过程主要如下,病毒的包膜糖蛋白与 CD4 分子相作用,导致病毒包膜蛋白构象改变,使病毒 gp41 蛋白(3 个内部结构域和 3 个高度保守的疏水槽沟组成的一束 6 个双螺旋结构蛋白)和共同受体融合,产生膜的融合[35,36]。这种反应模式与低 pH 值环境引起流感血凝素构型改变而与胞质膜融合的过程很相似[37]。发生融合作用以后,病毒核心蛋白释放入胞质,随之反转录反应开始。

反转录

反转录病毒是根据其独特的生命周期而确定,其基因组经 RT 的催化作用反转录生成前病毒 DNA。病毒 RT 和宿主 tRNA 及病毒 RNA 相连。宿主 tRNA 具有与 HIV 互补的序列,RT 以此为探针,从病毒长末端重复序列(long terminal repeat sequence,LTR)5′R-U15 区开始合成负性 DNA。RT 具有 RNA 酶 H 的活性可将 5′R 区裂解,并诱导新合成的负链与带有同样遗传信息的 RNA 链杂交。病毒 *env*、*pol* 和 *gag* 基因也通过 RT 反转录。正链 DNA 的合成从复制 3′LTR 开始;分子内的跳接可使反转录过程完成及产生侧面 LTR。反转录过程可出现突变并传给子代病毒。体外测定表明每 6000 个核苷酸在反转录中有发生一次错误的概率,体内试验则显示每轮复制过程可能产生一次突变[38,39]。病毒反转录的效率取决于靶细胞的激活状态,在静止期 $CD4^+$ T 细胞,反转录过程是不完全的,而当 $CD4^+$ T 细胞因感染 HIV 被激活后,细胞内可产生 HIV 的完全反转录,部分转录的 HIV 基因组易被降解[40,41]

整合

反转录过程结束后,在 HIV 感染细胞的胞质形成了由双链 HIV DNA、成型蛋白、整合酶和 RT 组成的复合物[32,42]。p17 基质蛋白至少有 2 个核定位序列,而 Vpr 蛋白与整合性复合物随后的跨膜定位于细胞核的作用有关[43]。

在细胞核内,HIV 整合酶可除去前病毒线状双链 DNA[44]末端的 2 个核苷酸,该酶还可非特异性地剪切宿主染色体 DNA,形成一个 5′-5 个核苷酸的悬突[44]。细胞内的 DNA 修复酶可完成整合过程并修复缺失的核苷酸部位。

前病毒 DNA 的转录

转录在 5′LTR 的 R 区的始端启动，在 3′LTR 的 R 区终端结束。转录过程由源于病毒和宿主的多种顺式和反式作用因子控制。

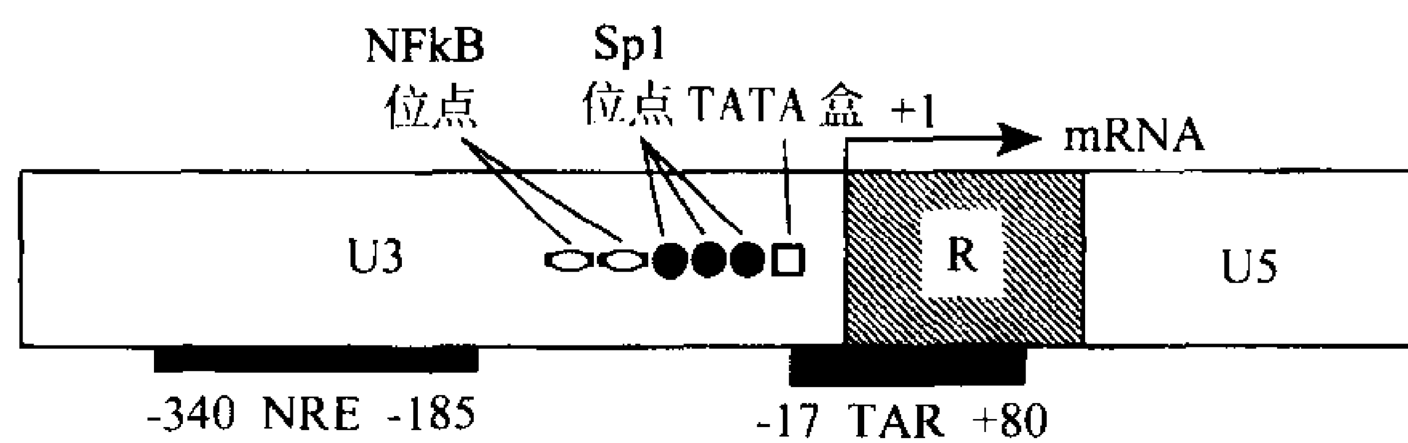


图 44.6 HIV 病毒的 LTR 序列上的转录调控元件。

在 LTR 的病毒调节基因主要包括(图 44.6)：TATA 盒(促进转录始动复合物的组装)[45,46]，3 个 Sp-1 位点、2 个 NF-κB 位点及其他结合细胞因子的位点(如 NF-AT、AP-2、AP-1、HIP-1)及皮质醇应答因子。NF-κB 位点可与 rel 癌基因家族[47,48]结合并对细胞激活和细胞因子对 HIV 病毒表达的调节效应有重要作用[49~51]。

Tat 蛋白与 LTR 的反式激活应答区域(trans-activating response region, TAR)结合可使病毒转录效率的显著提高。病毒的转译产物可分为两类，包含 30 多种成员。第一类包括非拼接性和单链拼接性 RNA(其中含 Rev 应答要素，Rev-responsive element，RRE)，该类产物依赖病毒 Rev 蛋白由胞核转运至胞质，这类 RNA 主要编码 Gag、Pol、Env 等结构蛋白和 Vif、Vpr、Vpu 及 Tat-1 等调节蛋白。第二类产物包括不含 RRE 的拼接性 RNA，如 Tat、Rev、Nef。

病毒装配

HIV 开始在胞质膜或胞质内的囊泡装配 Gag p55 蛋白形成低聚物[52]，被 p17 基质蛋白转移至细胞膜。p55 壳体核苷酸区引起 HIV RNA 的两份复制产物组装[53]。Gag-Pol 多聚体、宿主 tRNA[lys]和基质 RNA 形成成熟的锥形病毒颗粒[54](图 44.7)。病毒蛋白酶可加工多种病毒蛋白，gp160 包膜蛋白(由 gp120 和 gp41 以非共价方式结合形成)移至细胞膜，病毒从细胞芽生而出时可吸收 gp160 参与组成其脂质外膜的组成。

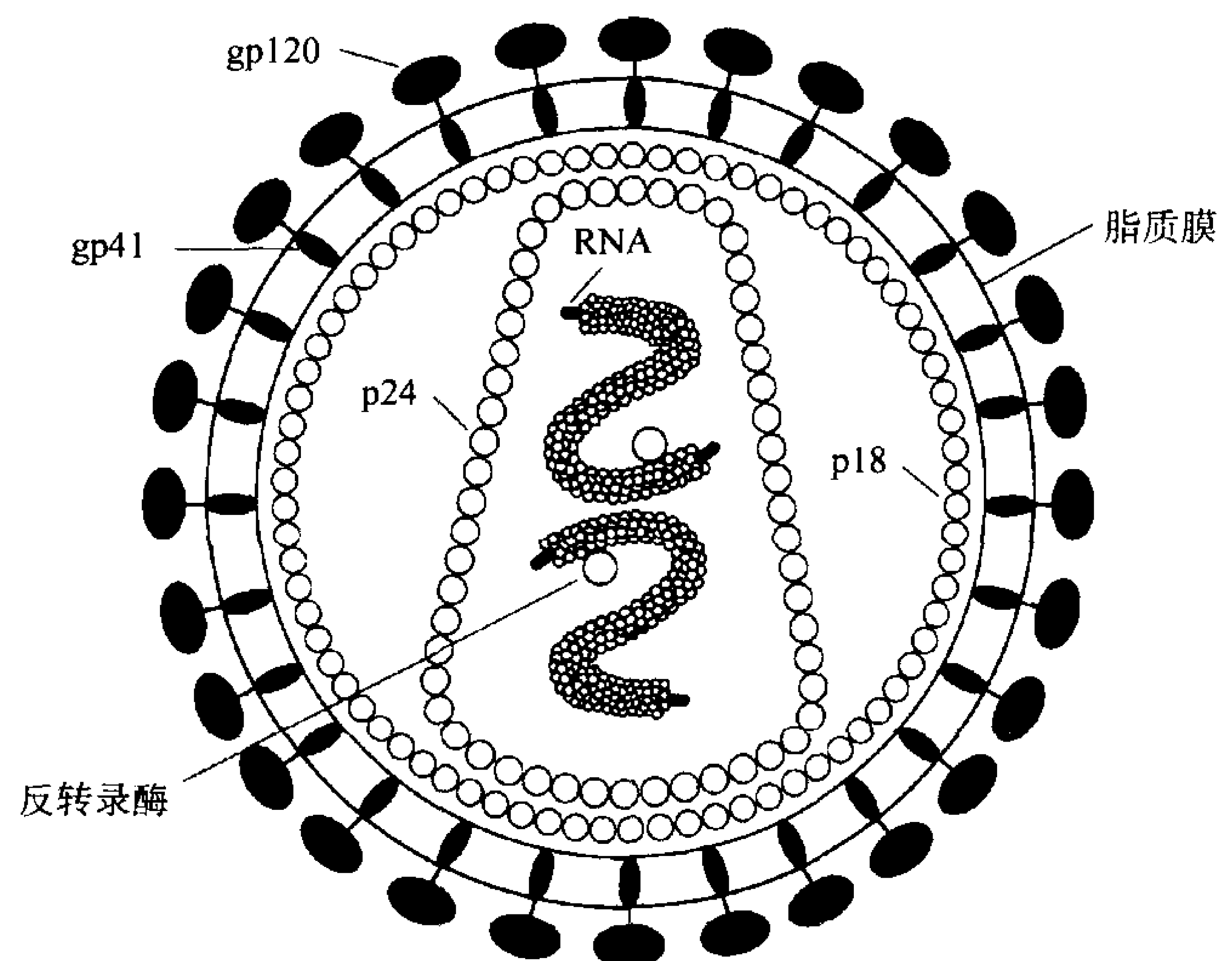


图 44.7 HIV-1 病毒颗粒的构造。

HIV 感染的靶细胞

CD4⁺ T 细胞和单核细胞是 HIV 感染的主要靶细胞。而实际上任何表达有 CD4 分子和适当的共同受体的细胞都可能成为 HIV 感染的靶细胞。此外，体外试验证实 HIV 可感染很多种类的细胞与细胞系，这些细胞有的并未表达 CD4 分子及 HIV 共同受体[55]，这些细胞包括滤泡状树突细胞(follicular dendritic cells, FDC)、微神经胶质细胞、巨核细胞、嗜酸性粒细胞、CD8⁺ T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞(natural killer cells, NK 细胞)、胸腺和骨髓基质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、肾上皮细胞、颈细胞、滋养层细胞、直肠及内脏黏膜细胞以及来自心脏、肌肉、肝、肺、唾液腺、眼、睾丸、肾上腺、前列腺等器官的实质细胞。而在体内实验表明只有 CD4⁺ T 细胞和单核/巨噬细胞才是 HIV 感染的靶细胞，表明 HIV 体外可感染较多种类细胞的临床意义很微小。

HIV 的细胞趋化性主要根据其在体外培养的巨 T 细胞系中的增殖能力而定。能在巨噬细胞和外周血单核细胞群(peripheral blood mononuclear cells, PMBC)而不能在 T 细胞群中繁殖的可称巨噬细胞趋化性病毒(macrophage trophic, M 型)；可在外周血单核细胞群和 T 细胞群中生长而不能在巨噬细胞群中增殖的称为 T

细胞趋化性病毒(T trophic,T 型)[56~58];可在巨噬细胞群及 T 细胞群中生长则称为双向趋化性(dual trophic)病毒。HIV 还可称为合胞体诱导型(syncytium inducing, SI 型),因其在体外可诱导 T 细胞形成巨细胞或合胞体,不具备该能力的病毒则称为非合胞体诱导型(nonsyncytium inducing, NSI 型)。T 型与 SI 型之间和 M 型和 NSI 型之间有明显但非完全的重叠。病毒的细胞趋化性决定簇主要位于 HIV-1 的包膜蛋白 gp120 的 V3 可变区[59~68],而 V3 区同时也是与辅助受体结合的主要部位[69]。

HIV 感染的不同阶段其病毒表型也有变化。M 型和 NSI 型出现 HIV 感染的初始期及感染的绝大部分时期[70,71]。约 50%的 HIV 感染者疾病后期可出现 T 型和 SI 型的病毒,预示着 $CD4^+$ T 细胞的加速减少和疾病的急剧恶化[72~76]。NSI 型病毒向 SI 型转变主要是由 V3 区的某几个氨基酸残基发生突变[59~65,68];尽管存在 RT 的高错误率和 HIV 复制的快速性,但 V3 区氨基酸残基突变仅发生于疾病后期,揭示机体可能存在某种选择性有利作用机制,而这种选择性的作用可阻碍突变的发生。这种选择性作用的性质尚不清楚,可能与 SI 病毒利用共同受体分子穿入细胞的作用有关。

HIV 共同受体

1984 年的实验证实 CD4 是 HIV 融合和穿入细胞作用的主要受体。$CD4^-$ 人细胞若被转染 CD4 后则易为 HIV 感染[34],将人 CD4 分子转染给鼠细胞,却不能为 HIV 感染,尽管 HIV 的 gp120 可与 CD4 结合,表明其他因子与 HIV 与融合和穿入细胞的效应有关[77,78]。这些其他因子的参与很多年来一直令人困惑。

1995 底和 1996 初一系列论文的发表改变了人们对 HIV 进入靶细胞的理解。Cocchi 等[79]首先发现 β 化学激活素,巨噬细胞炎症蛋白(macrophage inflammatory protein, MIP)-1α、MIP-1β 和调节正常 T 细胞表达、分泌及激活因子(regulated on activation, normal T cell expressed and secreted ,RANTES)是源于 $CD8^+$ T 细胞的 HIV 抑制因子的主要成分(见后"免疫应答")。他们还观察到这些抑制因子可组合起来,抑制某些种类的病毒如 HIV-1,HIV-2 及 SIV(猴免疫缺陷病毒)感染激活态的 $CD4^+$ T 细胞,但不能抑制 HIV-ⅢB 的感染,因 HIV-ⅢB 是原始型 T 细胞适合的 HIV 品系。后来从人子宫颈癌传代细胞(Hela 细胞)的 mRNA 基因库中分离出一种基因,其表达产物可在 CD4 共存下介导 gp160 与细胞的融合作用[80,81]。这种蛋白称为融合因子(后来称为 CXCR4),是由 7 个跨膜结构组成的趋化因子受体。CXCR4 与 CD4 是 T 型 HIV 与靶细胞间融合所必需,但对 M 型与靶细胞的融合却非必要。后来研究发现 CXCR4 的天然配体即是基质细胞衍生因子(stromal cell-derived factor, SDF-1)[82,83](图 44.8)。

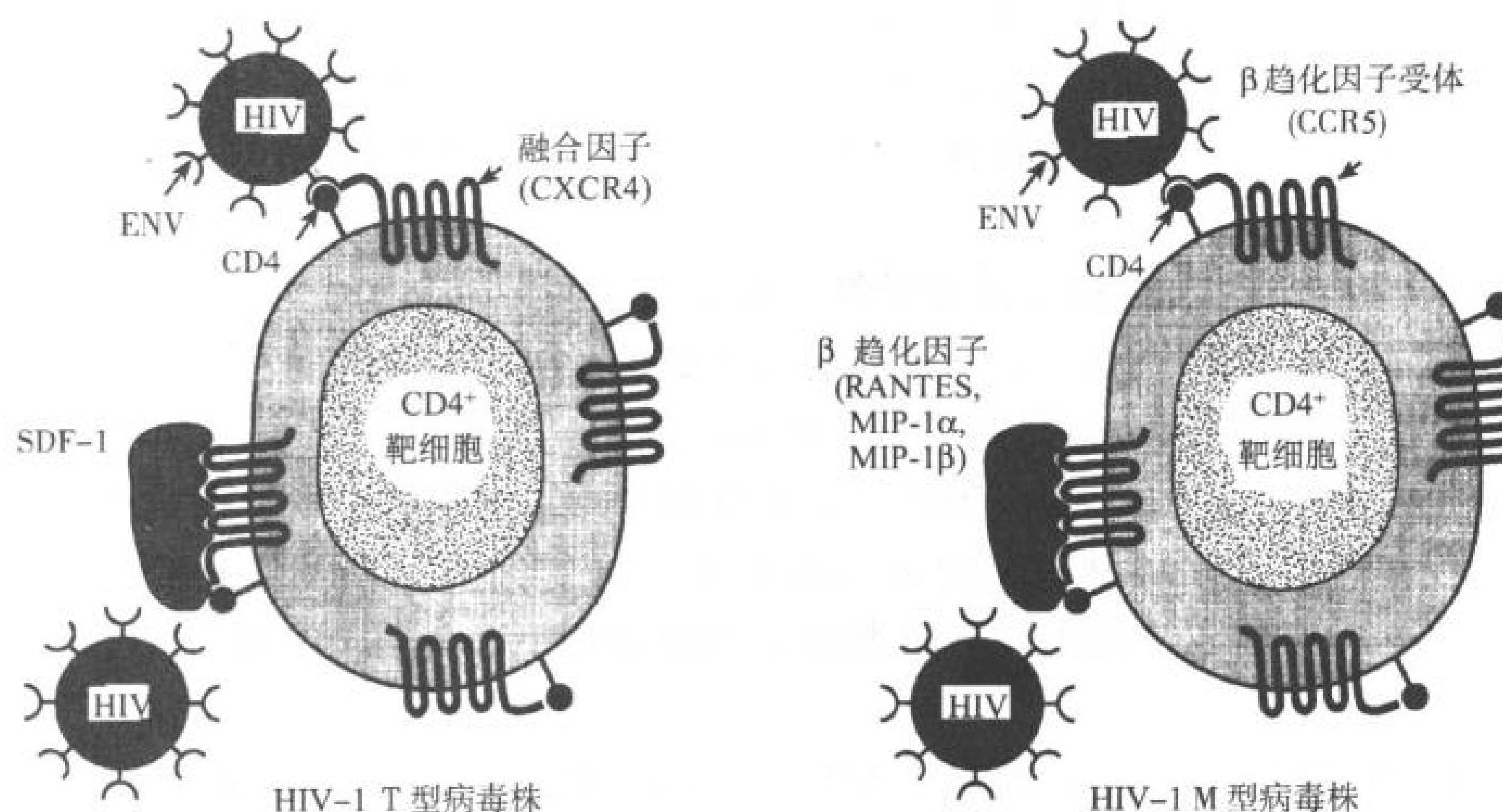


图 44.8 HIV 与共同受体的结合及共同受体配体的抑制效应。CCR5 配体如 MIP-1α、MIP-1β 及 RANTES 可抑制 M 型 HIV 株进入细胞;CXCR4 的配体 SDF-1 可抑制 T 型病毒株的进入。

Paxton 发现有配偶为 HIV 感染者的却并未感染 HIV 的个体组成的一个总体[84]。这些个体的 $CD4^+$ T 细胞对 M 型 HIV 有抗感染性，却易被 T 细胞适合的 HIV 株感染。其 $CD4^+$ T 细胞表达有较高水平的 MIP-1α、MIP-1β 和 RANTES 等(前文述其为 HIV 感染的抑制因子)。此后一种新的β趋化因子受体即 CCR5 被发现，其天然配体为 MIP-1α、MIP-1β 及 RNA[85~87]。结合以前的研究则揭示 CCR5 的配体可抑制 M 型 HIV 进入靶细胞，但又提出一个疑问：CCR5 是否同时又是 HIV 与靶细胞结合的共同受体，后来的研究证实 CCR5 确为 HIV 感染的共同受体[88~92](图 44.8)，其他趋化因子受体包括 CCR1、CCR2 和 CCR3，同时也被证明是某些 HIV 株潜在的共同受体。最近，属于趋化因子受体类的孤儿受体也被证实为 HIV 的共同受体[93~95]。

1462

也有少数例外，如原发性的 M 型 HIV 通过与 CCR5 结合而进入细胞，而原发性的 T 型 HIV 可与 CCR5 和 CCR4 结合，T 细胞适合性的病毒株如 HIV-ⅢB 则只与 CCR4 结合[96,97]。通过对疾病进程中 HIV 的细胞趋化性分析显示，在疾病早期几乎只产生结合 CCR5 的 M 型 HIV，随着病程进展，HIV 结合的共同受体扩展到 CCR2b、CCR3，最后是 CCR4。值得注意的是很少有原发性 HIV 失去了与 CCR5 结合的能力[98]。

CCR5 是 M 型 HIV 结合的优势辅助受体，M 型 HIV 与绝大多数 HIV 的传播性有关。2 个暴露于 HIV 但未受感染的个体，其细胞的 CCR5 基因的 32 对等位碱基缺失(CCR5-Δ32)，导致缩短型的受体形成，该受体不能表达于细胞表面[99]。对 CCR5 基因缺失 HIV 未感染者的大规模筛选则发现，20%的北欧和西欧白种人是杂合子性突变，1%为纯合子性突变[100~103]。在 HIV 感染的白种人群中，没有发现 CCR5 有纯合子性 32 对碱基缺失，提示 CCR5 的纯合子性基因缺失可完全保护人免于 HIV 感染，然而极少有纯合子性基因缺失的病例报道[104~106]。杂合子 CCR5-Δ32 虽不能使人免于 HIV 感染，但可对疾病的进程有适当的延缓效应，这在病情长期稳定的 HIV 感染者中已得到充分证实(见下"长期病情稳定者"章节)。杂合子 CCR5-Δ32 对 HIV 疾病的延缓效应的机制，可能是其可降低急性 HIV 感染期后病毒数量的临界点及抑制 $CD4^+$ T 细胞耗竭有关[102]。这些效应可能与 $CD4^+$ T 细胞 CCR5 表达减少[107,108]，或 32 对碱基缺失的 CCR5 蛋白的抑制性反式优势活性有关。CCR5-Δ32 等位基因在亚、非及印第安人中并未被发现，这些人携带 2 个缺陷性 CCR5 基因的拷贝，且未出现免疫功能的异常。

最近的研究着重于阐述 HIV 包膜蛋白、CD4 和趋化因子受体间的相互作用机制[35,36]。MIP-1α、MIP-1β 和 RANTES 通过竞争性抑制 M 型 HIV 感染(图 44.8)[89]。趋化因子通过 CCR5 的信号传导并不能有效抑制 HIV 进入细胞。尽管其对病毒的生命周期有一定的影响[109~111]。

T 型 HIV 包膜蛋白与其共同受体间的相互作用和 M 型 HIV 与共同受体间的作用，在很多方面都相似，然而它们之间的差异对于评估这些病毒在疾病进程中所起的作用十分重要。已证实，T 型 HIV gp120 通过免疫沉淀与 CD4 和 CXCR4 结合[112]。SDF-1(CXCR4 的天然配体)可抑制 T 型 HIV 对细胞的感染，但其对 M 型 HIV 无此效应[82,83]。此外，针对 CXCR4 的单克隆抗体同样可抑制 T 型 HIV 感染，而 T 型 HIV 的 gp120 可抑制 CXCR4 与其单克隆抗体的结合[113,114]。值得注意的是，某些 HIV-2 和 T 型的 HIV 可在缺少 CD4 的情形下通过结合 CXCR4 而进入细胞[114]。

病毒 gp120 包膜蛋白与 CD4 和共同受体分子结合可能通过两种不同的机制。针对 CCR5 而言，gp120 与 CD4 分子的结合可增强邻近 CCR5 的亲和力，(此亲和力在缺少 CD4 分子时很低[36])；gp120 与 CD4 结合也可引起 gp120 构象改变，使 CCR5 的亲和力提高[35]。T 型 HIV 对表达低水平 CD4 的细胞感染效率相对较低，提示 T 型 HIV 感染性对 CD4 分子有较强的依赖性[115]。T 型 HIV 在 T 细胞群中生长适应性，与病毒包膜蛋白和 CD4 分子的亲和力增强有关[115]。M 型 HIV 对表达低水平 CD4 的细胞仍有较强的感染性表明 M 型 HIV 对 CD4 的依赖性较弱。尽管 CCR5 或 CCR4 与不同类型病毒的亲和力有异，但 gp160 与 CD4、CCR5 或 CCR4 的相互作用基本相似。

决定 CCR5、CCR4 和 gp120 结合的重要结构域只有部分被确定了。多种 HIV 株如 HIV-1、HIV-2 和 SIV 均能与 CCR5 结合[36,91,97,116,117]，但并未鉴定出一个共同的结合基序。实际上不同品系的 HIV 利用 CCR5 的不同结构域与 CCR5 结合。Gp120 的 V3 环对于其与 CCR5、CCR4 的结合至关重要，并至少对决定病毒的 T 型、M 型趋化性有一定作用[64,84,91]。gp120 内部各种不同的缺失已突出地显现与共同受体结合有关的重要结构域。

gp120 第 1 和第 2 可变区的缺失不妨碍与 CCR5 的结合[35]。而 V3 环缺失的 gp120 则完全失去与 CCR5 结合的能力[35,36]。针对 V3 环的抗体可终止 gp120 与 CCR5 的结合;然而可中和 HIV 感染性的两种抗体虽不能与 V3 环结合,同样可抑制 gp120 与 CCR5 的结合;此外,与一个结构域的结合可能对其他结构域的功能有一定影响。

为了进一步确定与 gp120 结合的 CCR5 的结构域。人们合成了由人 CCR5 和鼠 CCR5 或人 CCR2 构成的嵌合体。这些研究虽没有鉴定出导致 HIV 融合和进入细胞的特定区域或结构域,但证实了这些位点是复合性或非连续性的[109,118~120],如同 IL-8 与 CXCR1 的结合[121,122]。

T 型 SIV 也可通过与 CCR5 结合而进入细胞内[97,117,120]。在分离出趋化因子受体前,T 型和 M 型 SIV 进入巨噬细胞的效率几乎相同,但惟有 M 型 SIV 可在细胞内有效复制[123]。M 型 SIV 病毒株主要与 CCR5 的 N 端结合,T 型 SIV 则主要与 CCR5 的第二细胞内环结合[120]。

HIV 与巨噬细胞的共同受体的结合可能比与 $CD4^+$ T 细胞的更为复杂。对 CCR5-Δ32 缺失的纯合子性个体研究显示,M 型 HIV 未能感染巨噬细胞,表明 CCR5 为 M 型 HIV 进入巨噬细胞和 $CD4^+$ T 细胞所必需[124,125]。CCR5 的 β 趋化因子配体并不能抑制 HIV 感染巨噬细胞,表明 HIV 可能有与 CCR5 无关的另一条结合途径结合。T 型 HIV 不能感染巨噬细胞被称为融合前和融合后现象[123,127]。T 型 HIV 对单核细胞和培养的成熟巨噬细胞(即使有 CXCR4 的 mRNA 和膜表面蛋白表达)的感染力也相对较弱,这是个奇怪的现象[83,128]。最后,大脑小胶质细胞被证实表达有 CCR5 和 CCR3,CCR3 的配体——嗜酸细胞活化因子可对 HIV 感染有潜在抑制效应[129]。

树突细胞(DC)可能通过将 HIV 从感染病位转运至淋巴器官,$CD4^+$ T 细胞被感染,病毒开始传播(见下"HIV 感染和发病过程")[130]。组织和血液中的 DC 细胞表达有 CD4 分子和多种趋化因子受体,包括 CCR5、CCR3、CCR2b 和 CCR1[131]。绝大部分但不是所有的血液 DC 可被 M 型和 T 型 HIV 感染,尽管两种病毒感染后的繁殖力有差异。对成熟 DC 的初期研究表明,T 型 HIV 对 DC 的感染可为 SDF-1 抑制,而 MIP-1α、MIP-1β 和 RANTES 可抑制 M 型 HIV 对 DC 的感染。源于纯合子性个体的 DC32 对碱基缺失的 CCR5,易被 T 型而非 M 型 HIV 感染[131]。后来对未成熟 DC(可集聚朗格汉斯细胞)的研究发现,HIV 可通过与 CCR3 结合而进入细胞内,此外,一种可替换的非 CXCR4、SDF-1 敏感性受体可与 T 型和 M 型 HIV 结合。源于纯合子性个体的 DC,其 CCR5 的 32 对碱基缺失,不仅可被 T 型 HIV 感染,而且可被有 CCR5 依赖性的 HIV 感染。因此表达有多种趋化因子受体的细胞可提供各种途径供 HIV 利用,使 HIV 进入细胞内。

病毒动力学

发展敏感的测定血浆病毒血症的量化方法,使研究人员能更好地理解 HIV 感染过程中病毒复制的动力学。检测的病毒载量(包括病毒血症)在特定的患者数周内均维持相对稳定[132~135]。这种稳定的状态是由于病毒的产生和清除保持动态平衡所致。针对 HIV-1 蛋白酶的抗反转录酶药物可抑制 99%的病毒复制,导致体内 HIV 应用在体动力学平衡状态的破坏。因为抗反转录酶药物可阻断 HIV 重新感染细胞,应用这些药物后定期检测血浆病毒量,可绘制一条反应病毒从血浆的清除率及 HIV 繁殖细胞的消除率的衰减曲线。研究发现血浆病毒的半寿期约为 2 天[136,137]。Perelson 等提高检测频率后则发现血浆病毒的半寿期为 5.8 小时[138],但若进一步的分析,其半寿期可能更短。因为病毒产生量与感染 HIV 的细胞数和每细胞 HIV 产生量成比例,靶细胞被 HIV 快速持续的感染可破坏血浆 HIV 血症的相对稳定。病毒体的产生量平均约为 10^{10}/天个,HIV 在体内的平均产生时间约为 2.6 天,具备 HIV 繁殖力的感染细胞半寿期为 1.6 天[138]。

在有效的抗反转录病毒药物治疗期间,血浆病毒血症的衰减曲线是双相的。以上所提的半寿期值主要是由 HIV 衰减的快速第一相推算(主要是药物治疗期的第一周)。随后,衰减曲线的斜率明显平缓,表明病毒血症第二相的半寿期明显延长。治疗期间源于新感染的淋巴细胞的 99%HIV 呈指数衰减,病毒血症的第二相只对治疗前的稳定状态有 1%的贡献比。病毒血症的第二相的半寿期约为 14 天。半寿期长的原因是

此时相主要包括生存期长的感染细胞(如巨噬细胞和树突细胞),静息期细胞被激活,淋巴组织 FDC 网络所捕获的病毒释放入血[139],尽管第二相只占病毒血症稳定期很小一部分,但却是疾病发病进程的主要原因,就疾病进程而言,捕获于 FDC 细胞表面的病毒具备感染性[140],可促进激活的 $CD4^+$ T 细胞游走出生发中心(见后“淋巴组织在 HIV 发病过程中的作用”)。若没有这种促进作用,HIV 感染的原发性原因则减少许多。

根据 HIV 第二相半寿期的估计值可确定用摄生法(该治疗法能完全抑制 HIV 的复制)清除 HIV 所需的最短治疗时间,有的研究认为需 2.3~3.1 年[139],另有人认为时间应更长。在摄生法治疗期间,病毒动力学的数学模型引导出一种预测,即该疗法对病毒血症病毒的抑制是暂时性的,原因是由于被重新感染的靶细胞数量的增多。高效抗反转录病毒疗法(highly active antiretrovial therapy, HAART)对 HIV 血症有延长性的抑制效应,是由于抗 HIV 的免疫应答可耗竭未被感染的靶细胞,导致 HIV 复制在某些组织被清除,而在其他组织却没有[141]。由于有潜在感染性的可诱导的静息期 $CD4^+$ T 细胞的存在,接受 HAART 治疗的患者仍有持续的病毒复制,只是其血浆病毒量在可检测限以下,这表明通过持久的治疗根除 HIV 感染还不太现实。

在有效的抗反转录病毒药物治疗期间 $CD4^+$ T 细胞计数的增加可被模型化,这样可得到 $CD4^+$ T 细胞在病情稳定期间的更新率。据估计约有 2×10^9 个 $CD4^+$ T 细胞每天被破坏和再生[136,137],这种观点存在很多纰漏。治疗期间 $CD4^+$ T 计数增加是由于祖细胞分化为新细胞或成熟细胞的增殖而来,这种假设忽略这种可能性,即 $CD4^+$ T 细胞可由淋巴器官转移至外周血[142]。IL-2 和抗反转录病毒药的疗法未能修复 T 细胞谱系的损伤,这与 T 细胞由干细胞分化而再生相驳[143]。因此,$CD4^+$ T 细胞的更新源于成熟细胞的增殖或由淋巴器官游走至外周血的解释是否更为合理。

1464

另一测定 $CD4^+$ T 细胞更新率的方法是检测端粒末端限制酶切片段长度(telomeric terminal restriction fragment, TRF——细胞复制史的指标)。每轮细胞分裂后,端粒序列缺失,导致复制能力退化。$CD4^+$ T 细胞更新率增高预计可使 TRF 长度缩短,然而通过对 HIV 感染者和未感染者 $CD4^+$ T 细胞 TRF 长度的检测,发现 TRF 长度两者间并无改变[144]。另一研究则比较单卵双生子 $CD4^+$ T 细胞(其对 HIV 感染有非协调性)TRF 长度,发现与未感染 HIV 的双生子相比,HIV 感染的双生子 $CD4^+$ T 细胞的 TRF 长度明显增加。但两者之间端粒末端转移酶(可转移 6 核苷酸端粒重复序列至染色体的酶)活性的差异和 $CD4^+$ 初始细胞数量的差别不能解释两者之间 TRF 长度有差别这种现象[145]。总之目前的研究尚不能阐明 HIV 感染期 $CD4^+$ T 细胞更新的原因。抗反转录酶药治疗期间所观测到的 $CD4^+$ T 细胞的计数增加、淋巴细胞的再分布和向外周血的转移之间的相对联系尚待确定。

病毒序列的多样性

检测 HIV 感染者 HIV 的遗传多样性可为以下的研究提供重要信息:如 HIV 的流行病学、病毒复制的动力学、宿主免疫反应或抗反转录酶药对 HIV 所产生的效应以及 HIV 的宿主体内复制的区室化。而且,研究 HIV 的遗传多样性可为合成疫苗及防止和克服药物耐受性提供理论依据。

同一感染者体内 HIV 序列的高度多样性(intrahost variation,宿主内差异)和 HIV 感染者之 HIV 序列的多样性(interhost variation,宿主间差异)已为许多实验所报道[146~153]。分析宿主间差异对于研究 HIV 感染的流行病学特别有益,而分析宿主内差异可对宿主和病毒间的复杂作用进行有价值的研究。病毒序列多样性与病毒 RT 活性的不忠实性有关[38,39],病毒复制的快速动力学与其序列多样性直接关联。宿主的细胞和体液免疫也可对病毒序列多样性有选择压力。病毒的细胞趋化性(共同受体与 HIV 结合的细胞和组织特异性调节作用)也可对病毒序列多样性有一定的作用。而有些研究人员对以上因素引起病毒多样性的有效性提出质疑,并认为病毒序列多样性与以下机制有关:突变型进化[154]、中性进化[155]及对整合有各种原病毒的细胞基因组的机会性刺激[156,157]。但早期研究病毒序列多样性主要集中在 HIV 包膜蛋白基因[148,152,158],表明病毒序列多样性并非中性或机会性事件。

分析同义(保守性氨基酸)和非同义性(变异性氨基酸)突变来确定选择压力对 HIV 序列多样性的影响。若病毒复制过程中其序列的差异性完全是由于聚合酶的随机错误造成的,则同义和非同义性突变的数目应相似。而许多研究人员发现,产生非同义性突变的概率比同义性突变大得多。提示宿主的选择压力对病毒突变有明显影响[159]。这种结果与以下假说有一致性,即病毒序列的多样性归因于免疫系统对病毒完整的特异性免疫应答;这些数据同时也反映了疾病进程中病毒的细胞趋化性已到了平台期。病毒的传播主要与所选择的同质 V3 序列有关[70,71],同质 V3 序列可使与共同受体结合的多样化及病毒细胞趋化性多样化[96,98,116]。

病毒的多样性是否由以下因素所诱使:如试图逃逸宿主的免疫应答或抗病毒药的压力[160-162],与共同受体位点的改变[61,98,163]。病毒通过特异性突变所获得的选择性优点将对病毒基因组的生成产生有力的影响[164]。所观察到的 HIV 序列多样化的模式与纯粹的中性机制完全不符。发展可诱导特异性病毒(如 S2 变异型)产生的疾病模型存在很大的难度。如前所述,病毒由 NSI 型向 SI 型转变可能只是由于病毒包膜蛋白 V3 环的几个氨基酸残基突变。由于病毒 RT 的错误率和病毒复制的快速动力学,阻碍此类突变的效应直至疾病后期才去除,表明在疾病进程中突变的选择性优点产生改变。与 NSI 型病毒相比,SI 型的病毒可通过与更大范围的共同受体结合进入细胞,SI 变体的出现可能与高浓度的 β 化学激活素(可抑制 NSI 型病毒通过结合 CCR5 进入细胞)。SI 病毒的出现同时可代表对中和抗体作用的逃逸,这样干扰 HIV 包膜蛋白与 CCR5 的相互作用。这种形势无疑十分复杂,因为多种宿主因子和在不同组织的共同受体表达的调节因子可决定产生 NSI 变体或 SI 变体的环境[107,166,167]。

有效的宿主免疫反应可增加病毒序列的多样化,并可延缓疾病的进程。通过测定异型双链迁移率分析准前病毒(在某一个体遗传特征性 HIV 序列)的遗传多样性发现,病毒序列多样性的增加与 $CD4^+$ T 细胞下降速度的延缓有关,反之,病毒序列样性的减少,则可能反应对病毒免疫应答能力的减弱,这与 $CD4^+$ T 细胞的加速耗竭有关[168]。Lukashov 等发现,与病情渐进型患者相比,病情稳定者的包膜蛋白 V3 区的非同义性突变更为普遍(每年每位点非同义性突变率,病情稳定者为 0.011 ± 0.001,病情渐进者为 0.007 ± 0.001),而两者同义性突变的数目却无甚区别。非同义性突变与同义性突变之比值,可反映宿主免疫反应对病毒的选择压力[169],这对病情稳定者更具意义。另有研究发现,包膜蛋白 V3—V5 区和 C1—C3 区序列变异性的增加可延缓疾病进程[170,171]。高频率的 CTL 前体细胞与延缓疾病进程有关,而在病情稳定者,Ⅰ类 HLA 相关性限制表位的突变经常发生。渐进型 HIV 患者,病毒序列多样性的减少,可能是低频率的 CTL 前体细胞所致,因而机体对病毒的免疫反应能力降低。

另外一种观点认为病毒序列多样性和疾病进程间的相互关系源于抗原多样性阈值理论。这种观点认为,随着时间的推移,病毒序列多样性的增加减弱了机体免疫反应对病毒复制的控制,导致病毒数量增加和病情加重[172-174]。根据这种理论,病情快速渐进型患者的病毒序列多样性的阈较低,机体对病毒复制的免疫应答能力减弱,使病毒数量急剧增加,且无逃逸免疫的突变。而病情稳定者的病毒序列多样性阈值较高,这与患者免疫应答能力较强的可塑性有关。免疫应答使病毒载量减少,并使病毒选择逃逸免疫的突变,此外,宿主产生的二次免疫应答可部分控制类前病毒的出现。如果病毒能诱使宿主免疫反应愈渐远离免疫显性表位,超过了某一病毒序列多样性的阈值,病毒因而可抑制宿主恢复任何有效免疫应答的能力。HIV 疾病被视为在达尔文的进化论——宿主针对持续突变的靶病毒的免疫应答能力与病毒逃逸宿主免疫应答的能力间的斗争。这种理论很难得到试验验证,尽管有实验结果提示,限制性 CTL 作用与原发性感染 HIV 疾病的快速渐进型有关[175]。

病毒序列多样性归因于病毒复制和免疫应答的区室化。检测发现 PBMC 原病毒序列的多样性与源于血浆或 PBMC 的病毒 RNA 序列的多样性并不相同[176-178];即使是在微环境内,例如一个脾白髓和另一个脾白髓之间,病毒序列的差异也是惊人的。分析源于同一患者血浆的 HIV RNA 和 PBMC 的 HIV 发现,病毒序列多样性开始发生于血浆,最后成为 PBMC 原病毒的优势序列[176]。分析源于尸体解剖的各种组织以及源于血浆 PBMC 病毒序列多样性,证实类前病毒来源于淋巴结、骨髓和血浆[179]。这些结果表明,淋巴结和骨髓是病毒

复制活跃的重要部位。

对中枢神经系统组织病毒序列的分析可为类前病毒演变过程的区室化提供最明确的证据。比较 HIV 的 LTR,来自同一个体的 Pol 和 env 序列表明在中枢神经系统呈显著的聚集(与其他解剖学的区室相比)[179~184]。因此与淋巴结、骨髓相比,中枢神经系统的选择压力分外不同。病毒复制的区室化的证据在肺[185]和生殖器分泌物[186]也有相似发现。这些发现突出了这样一种可能性,即病毒序列的差异性在每个微环境中,根据选择压力的不同作用而变化。在中枢神经系统,选择压力主要存在于与扩充型共同受体的结合上[129];而在肺部的选择压力则与选择特定的 HIV 品系有关,而特定的 HIV 品系可感染肺泡巨噬细胞并能逃避系统和局部的免疫应答。

HIV 感染和发病过程

原发性感染

HIV 原发性感染后会引起一系列的继发事件,包括病毒在全身的快速扩散以及随后诱导的能部分控制病毒复制的免疫反应[187]。原发性 HIV 感染期间里发生的事件涉及病毒和宿主两个因素,并在艾滋病的病程方面起重要作用。由于感染途径不同,感染的机制有所不同,但不论是经过血液途径还是黏膜途径,其临床表现在个体间没有显著的差别。这一现象提示,即使 HIV 感染的最初细胞不同,随后的病毒传播在相似的细胞则出现相似的结果。直接进入血流的 HIV(如通过输血、母婴传播、使用未消毒的注射器注射药物),可能被脾、肝、肺的网状内皮细胞清除。不过,如果这些部位的淋巴组织被感染,可引起持续的病毒复制及病毒血症,并扩散到其他的淋巴器官。

哪种类型的细胞最先感染,是淋巴组织、脾或黏膜,目前仍不清楚;不过,对慢性 HIV 传染的研究显示,

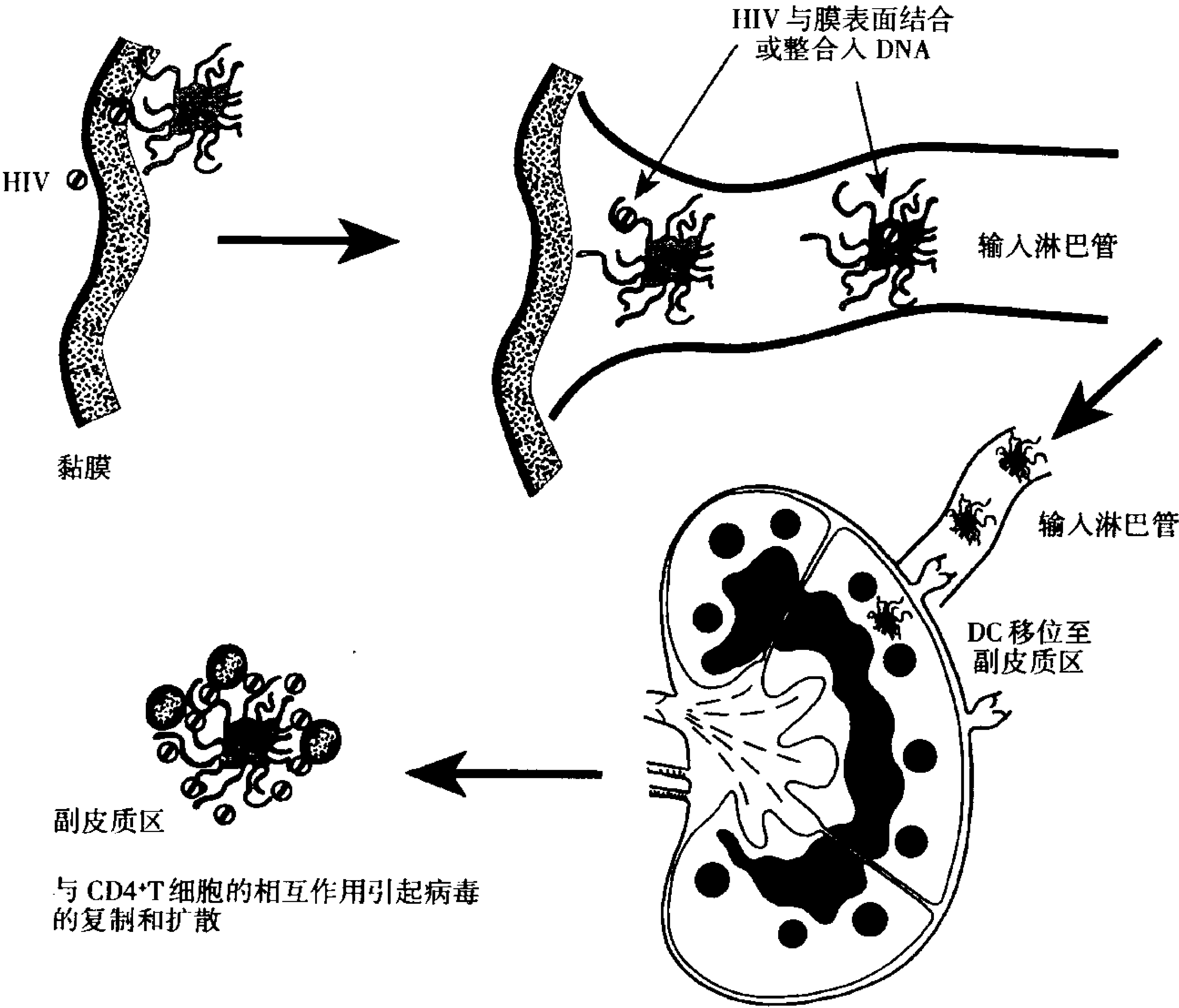


图 44.9 DC 在启动 HIV 复制中的作用:DC 将 HIV 由暴露部位转运淋巴组织的副皮质区,引起 $CD4^+$ T 细胞的感染。

HIV 主要在 CD4⁺ T 细胞群中存在[188]。对经阴道感染 HIV 的短尾猿的研究发现，位于阴道黏膜骨髓源性 DC 是第一个包含有 HIV DNA 的细胞，2 天后就可检测到 SIV DNA。在后来对淋巴器官的检查中发现，SIV 的出现和扩散方式反映了 DC 可从外周组织转移到淋巴器官[189]。DC 通过在周围组织结合抗原，与主要组织相容性复合体抗原（major histocompatibility complex，MHC）相关联的加工过程生成肽类，经过传入淋巴管迁移到副皮质区，活化 T 细胞（第 16 章）而起作用。DC 能在它们的表面保持病毒的传染性，从而延长其生存的时间[190]。因此，它们在启动 HIV 传播中的作用可能包括捕获进入点的病毒颗粒，将 HIV 运到淋巴器官副皮质区，把病毒交付给 CD4⁺ T 细胞，后者与 DC 相互作用而被活化（图 44.9）。

在原发性 HIV 及 SIV 感染的早期引起病毒在淋巴组织复制的确切机制尚未阐明。DC 表达低水平的 CD4，并且，一般认为这些细胞仅仅能在低的水平时感染 HIV（见"HIV 感染引起的免疫功能失调"章节）。体外研究已经证明，DC 与 CD4⁺ T 细胞结合，有活性的病毒在其结合处进行复制[191]。包括有 HIV 抗原的 DC 和 CD4⁺ T 细胞结合物已经在来自受 HIV 感染的扁桃体活组织检查标本[192]、少量外周血[190]以及接触过 SIV 的阴道黏膜下组织中[189]检测出。这很有可能是 DC 将病毒从最初复制的部位带到淋巴结，在这里 CD4⁺ T 细胞与 DC 接触后受到感染。在没有 HIV 特异性免疫性应答的情况下，将导致病毒又一次复制和扩散。

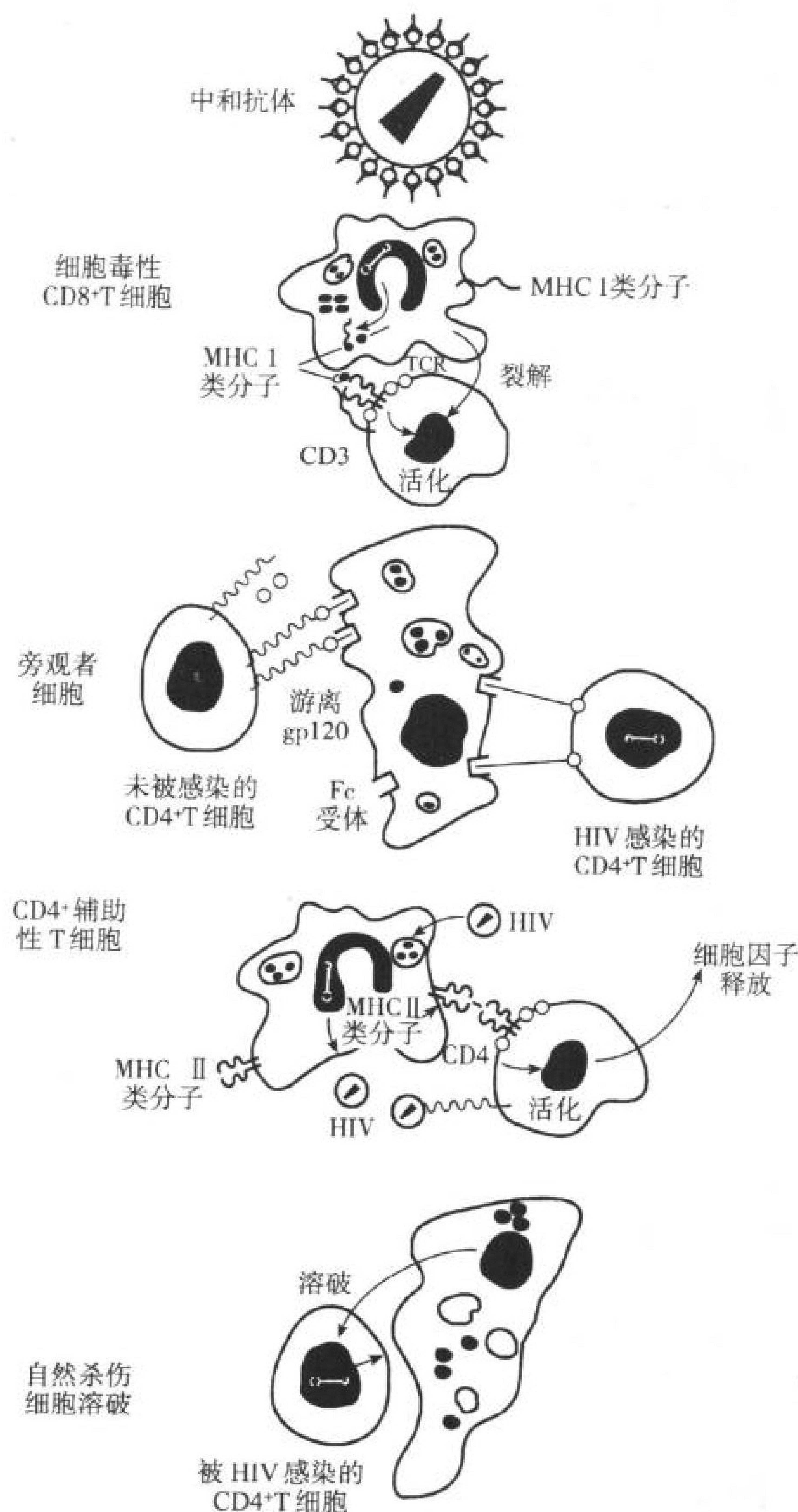


图 44.10　免疫应答引起 HIV 复制下调的可能机制。中和抗体结合病毒颗粒成分，阻止其对靶细胞的附着。传统 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞识别被感染细胞上由 MHC Ⅰ类分子呈递的病毒抗原决定簇，可直接溶破这些细胞。ADCC 不仅导致 Fc 受体介导的感染细胞的清除而且导致结合了 HIVgp120 和抗体的未感染细胞的清除。CD4⁺ T 细胞对感染细胞表面病毒抗原决定簇的识别的发生与 MHC Ⅱ类呈递紧密联系。细胞因子的释放可部分控制病毒复制。NK 细胞也可直接溶破 HIV 感染细胞，再版经 Fauci AS，Lane HC 许可。人免疫缺陷病毒（HIV）疾病：AIDS 及相关疾病。见：Fauci AS, et al., eds. Harrison's Principles of internal Medicine, 14th ed. 1998. Chapter 308. pp. 1791. 1856。

1466

免疫应答和 HIV 复制的下调效应

原发感染不久，强烈的抗 HIV 的反应就能被检测到，可能涉及病毒数量的下调，并可显著但不能彻底地清除血循环中的病毒[193~197]。这些抗病毒效应可被分成 HIV 特异性的抗体反应、HIV 特异性细胞介导的细胞毒性作用和细胞因子反应几种类型（图 44.10）。体液免疫与细胞免疫在下调病毒复制中的相对作用是一个很有争论的话题。不过，两个看来都重要。

出现高滴度的 HIV 特有的抗体是 HIV 原发性免疫反应的特征，它出现在病毒血症的高峰或稍晚些时间[195,198]。有趣的是，这最初的抗体反应不包括中和抗体[196,197]。不过，这种中和活性的缺乏并不意味着抗体反应在下调病毒复制中不重要。通过补体介导的细胞溶解、抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用（antibody-dependent cellular cytotoxicity，ADCC）以及存在于淋巴组织生发中心的 FDC 网络或者网状内皮系统中的补体受

体依赖的病毒清除机制，HIV 感染产生的抗体能够降低 HIV 复制和病毒血症[196,197,200,201]（图 44.11A）。这样情形已经在 SIV 传染的短尾猿模型中观察到，降低血中的 SIV 抗原及补体结合的抗体和淋巴组织中 FDC 网

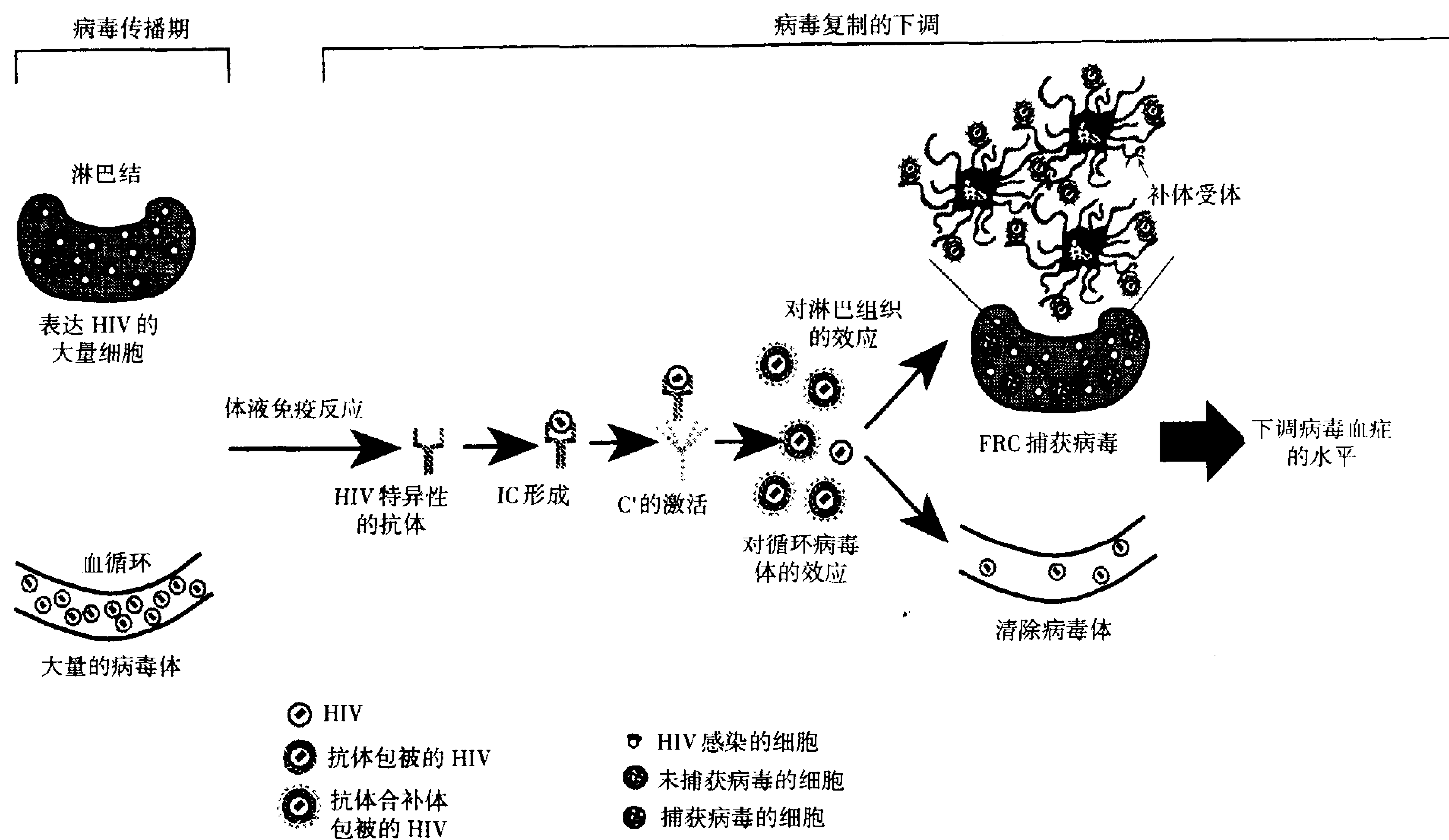


图 44.11A 血浆病毒血症的下调与淋巴结生发中心滤泡树突细胞（FDC）对病毒免疫复合物的捕获。HIV 特异性抗体与病毒体结合形成免疫复合物（IC），补体（C′）与 IC 结合，并与补体受体 C3b 及 C3d 结合，最后为 FDC 网络捕获。

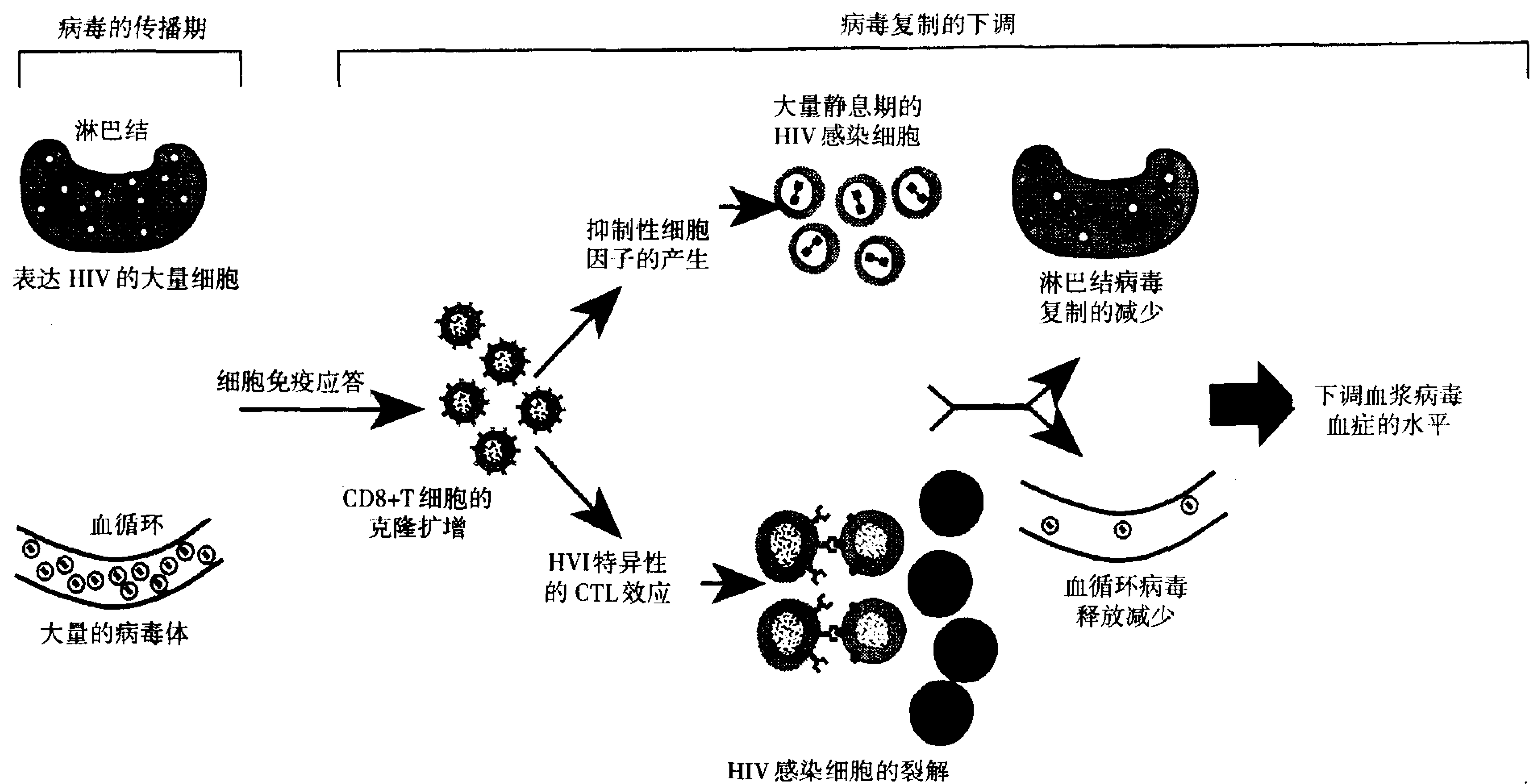


图 44.11B 血浆病毒血症的下调及原发性 HIV 感染后病毒储库的建立。细胞介导对 HIV 的免疫应答清除了淋巴结内大量有繁殖能力的 HIV 感染细胞，这可在一定程度上降低血浆病毒血症的水平。

络捕获的病毒数量[200,202,203]。中和抗体特征性出现在从急性期向 HIV 疾病的慢性临床潜伏期的过渡阶段[197,204,205]。有趣的是，在 HIV 感染的个体检测的中和抗体可与 T 型病毒株发生强烈反应，而中和抗体与自身同源病毒或 M 型 HIV 反应强度则较弱(见下文“免疫应答”)。

HIV 特异性的细胞介导的免疫应答能在急性病毒综合征期间检测出来，并与病毒血症的下调相平行[193,194,197]。原发感染期间，HIV 特异的 CTL 发生率也许高达 1%[197]。CTL 主要识别结构性 HIV 蛋白质。非细胞裂解性的、$CD8^+$ T 细胞介导的、MHC 非限制性 HIV 的抑制性活性也可被识别[206](见下文“免疫应答”)。

1467

分子分析已经证明，HIV 病毒特异性 $CD8^+$ CTL 克隆在原发的 HIV 感染期间里开始时扩展，在最初的扩展后就减少。$CD8^+$ T 细胞亚型可根据 T 细胞受体 V_β 链的可变区(V)表达不同进行分类。在 T 细胞受体库里有 24 个 V_β 家族(第 10 章)。在 HIV 病毒传染的急性期可发生 3 种类型 $CD8^+$ CTL 扩展形式，并且，这些类型和疾病进程相关。CTL 扩展的第一个类型是主要的扩展型，含 1 或 2 V_β 家族。此扩展型和疾病的快速进程有关，患者在 1 ~ 2 年之内患获得性免疫缺陷综合征(AIDS)。CTL 扩展的第二型包括更小的扩展的 3 或 4 V_β 家族，与中度病情相关。小而散或不显著扩展的第 3 个类型最有利于 HIV 疾病的诊断[175]。特别的 V_β 家族的扩展型通常在一定时间里消失；有趣的是，扩展型 CTL 克隆可在缺乏影响 CTL 相关性表位的病毒突变时发生消失[207]，消失的原因尚不清楚，也许是由于克隆耗尽或被清除所致[207]。这些数据提示：与动用大量窄谱表位特性的 CTL 相比，在原发感染期间调动广泛的抗 HIV 的 CTL 效应，可更好地控制病毒复制并改善预后。

1469

HIV 感染初期的细胞因子反应已经在外周血和淋巴细胞得到肯定。初期反应由高水平的 γ 干扰素(interferon，IFN)，肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor，TNF)和 IL-10 构成；在 PBMC 或淋巴结单核细胞中 IL-2、IL-4 和 IL-6 一般不增加[208]。在短尾猿模型中，SIV 急性感染可引起 IL-6、TNF-α、IL-10 和 IFN 增加，这和大多数动物的反应相一致[209~211]。

慢性持续感染

HIV 是一种慢病毒，这类病毒以慢性持续感染为特征。与其他的慢病毒相似，尽管原发感染可引起强烈的细胞及体液免疫反应，HIV 病毒仍不能从机体彻底清除。相反，在患者出现临床症状前慢性感染持续 10 年[18]。慢性感染期间，在血浆和淋巴组织均能检测到病毒在进行性地复制(见后“检测 HIV 感染的实验室指标”)。

在其他的慢病毒感染，如 B 型肝炎，针对病毒颗粒的特定部分发生的免疫反应与慢性感染的发展有关。HIV 疾病的慢性感染常见，也没有一种免疫反应能具有彻底的保护作用。病毒具有避开免疫清除的能力的重要因素是 HIV 具有的特殊的复制动力学[136~139]，并且 RT 的高错误率[38,39]，使病毒基因组不断地产生新的突变。

HIV 感染的个体在外周血有 HIV 特异的 CTL 活性，通过体外直接检测 $CD8^+$ T 细胞即可发现[212,213]。这现象在其他的疾病状态或病毒感染中还未发现。在 HIV 急性感染期，活化 HIV 特有的 CTL 和 CTL 前体细胞在外周血中被分开[207]，这里有很少量有活性的病毒进行复制，相反，在淋巴组织则没有分开，这里是病毒复制和扩散的主要部位。这种将 CTL 反应的解剖位置与病毒复制的部位分隔开来是 HIV 逃避宿主免疫反应的另一机制。

在体外 HIV 感染能引起细胞溶解，能建立潜在感染细胞群(如 $CD4^+$ T 细胞和单核细胞/巨噬细胞)。体内也发生类似的情况。在身体的某些(例如中枢神经系统小胶质细胞)组织中，可发现大量的 HIV 感染的细胞。这些细胞不被急性感染的 HIV 杀死，而成为病毒的储库。这样的储库引起 AIDS 并发症，如 AIDS 性痴呆和其他神经综合征[214~217](见下文“细胞因子与 HIV”)。对这些在染色体中整合有 HIV DNA 的潜在感染细胞的研究证实其数量低(在疾病的较晚期，每 50 000 个中有一个)；不过，再次刺激这些细胞，就会产生病毒颗粒[218]。HIV 的其他储库包括与抗体和补体结合的病毒颗粒，即便结合在 FDC 的 HIV 仍保持感染性[140]。这

样，即便强有力的免疫反应降低了病毒的复制，在许多情况下 HIV 建立起一种慢性感染状态，即潜伏感染细胞储藏了具有不同复制活性的病毒。

获得性免疫缺陷综合征(AIDS)

临床方面

HIV 疾病的进程和 CD4$^+$ T 细胞的耗竭有关，从而增加了获得性免疫缺陷综合征发生的危险[19]。缺乏细胞介导的免疫反应的完整性使一般的外周器官的有限毒性变成危及生命的病变(例如，肺孢子和分枝杆菌感染)。HIV 感染时提示细胞介导的免疫抑制，但不能因此而确定 AIDS 的一些并发症包括口咽、周期性外阴道念珠菌，杆状多发性血管瘤(通常由于感染巴尔通氏体属 *henselae* 引起)，反复或多发皮肤带状疱疹，由于感染红球菌属等引起的利斯特氏菌病、骨盆炎、与 EBV 相关的口腔多毛黏膜白斑、宫颈发育异常(通常与人乳头状瘤病毒感染有关)、不明原因的发热或超过一个月的持续腹泻、特发性血小板减少性紫癜以及周围神经病[219]。HIV 感染时，细胞介导的严重免疫抑制可引起一系列获得性免疫缺陷综合征。这些情况包括真菌感染(如食道或者肺念珠菌病、肺外隐球菌病、网状内皮细胞真菌病、球孢子菌病以及肺内外的孢子虫感染)，病毒感染(如巨细胞病毒性视网膜炎、脊髓炎、胰腺炎或肾上腺炎、单纯疱疹病毒支气管炎、肺炎、食管炎或慢性皮肤溃疡)，细菌和分枝杆菌感染(如肺结核、由分枝杆菌引起的肺外感染、周期性发生的细菌性肺炎和周期性发生的 *Salmonella* 败血症)，原生动物感染(如由隐孢子虫或等孢子球虫感染引起的胃肠综合征以及 *toxoplasmic* 脑炎)，肿瘤形成(如浸润性子宫颈癌，伯基特免疫母细胞瘤或原发性中枢神经系统淋巴瘤，卡波西肉瘤)以及 HIV 相关的脑病，进行性多发性脑白质病(由于 JC 病毒的复活)和消耗综合征[219]。由细胞介导的免疫反应受到严重损伤，但不包括在现在定义的获得性免疫缺陷综合征的 HIV 相关疾病，包括慢性小孢子虫病，*Cyclospora cayetanensis* 引起的胃肠感染、弥散青霉菌感染(流行于东南亚)大脑或弥散性锥虫感染(流行于拉丁美洲)、复发性或慢性内脏利什曼病、肛门癌、EBV 阳性的 *leiosarcoma*、平滑肌肉瘤以及霍奇金病[220]。现在知道几乎所有这些 HIV 相关疾病，包括某些恶性病症，是由机会菌感染或再激活引起。从这一角度看来，乳头状瘤病毒、EBV 以及人疱疹病毒 8 分别在免疫缺陷综合征引起的宫颈癌、淋巴瘤、卡波西肉瘤中起着致病作用[221~225]。

1470

机会性感染或再激活综合征发生的概率可根据 CD4$^+$ T 细胞计数来进行推论[19,226,227]。当 CD4$^+$ T 细胞数降至 250~500 个/μl 时，口腔念珠菌病和结核菌感染就可发生。如果 CD4$^+$ T 细胞数≥200 个/μl. 隐孢子虫病一般不会发生。卡氏肺囊虫肺炎、散播分枝杆菌综合感染、隐球菌病、弓形体病提示存在严重的免疫缺陷。当 CD4$^+$ T 细胞数 < 50 个/μl，巨细胞病毒(cytomegalovirus，CMV)性视网膜炎的诊断通常可确立。CD4$^+$ T 细胞数 < 200 个/μl 可显著地增加获得性免疫缺陷综合征引起并发症的危险性，导致 AIDS CDC 的 1993 修订版出台，其中包括了 CD4$^+$ T 细胞计数(< 200 个/μl)[219]。

对伴有进展阶段病症的 HIV 感染患者的临床处理要特别谨慎，因为与 HIV 直接相关的并发症以及机会性感染可对任何器官系统产生严重影响。联合进行抗反转录病毒疗法及预防机会性感染可显著提高 HIV 患者的生存率和生活质量[228~230]。

免疫方面

各种免疫系统功能的缺失与 HIV 疾病后期有关。免疫系统各个成员(包括 T 和 B 淋巴细胞、抗原呈递细胞、NK 细胞及中性粒细胞等)的功能异常在前文已有描述(见下"HIV 感染引起的免疫功能失调"章节)。在疾病晚期，免疫缺陷的含义十分深奥，由于 HIV 病毒的高水平复制，HIV 特异性抗体和溶细胞性 T 淋巴细胞的效应逐渐减弱。在体外，外周血淋巴细胞的增殖效应的相继减弱，导致细胞对抗原、异型抗原及促细胞分裂素的记忆障碍，预示着 HIV 疾病期间免疫反应能力的降低。[231]

与 HIV 感染的 CD4$^+$ T 细胞相关的各种直接或间接机制可能与以下效应有关：T 细胞群体形成的缺损、

自体同源的混合性淋巴细胞反应、IL-2 受体的表达及 IL-2 的产生[232]。HIV gp120[233]、Nef[234]、和 Vpu[235,236]对细胞 CD4 表达的干扰可能损害已感染 HIV 的 $CD4^+$ T 细胞与适当的 MHC Ⅱ类分子相互作用的能力。HIV 病毒对 $CD4^+$ $CD45RO^+$ 记忆细胞的优先感染，及这些细胞对 HIV 病毒致细胞病变效应的高灵敏性或许可在一定程度上解释细胞对可溶性抗原记忆效应的丧失及随后机体机会性感染率的增高[237,238]。血循环中 gP120 分子可传递模糊的免疫信号并使共刺激分子的表达失调，导致这些细胞成为无反应性的细胞[239~248]。

对 $CD4^+$ T 细胞受体 V_β 库的研究能为发生于 HIV 感染后期的免疫缺陷提供更确切的定义。利用 T-细胞受体 V_β 家族特异性的引物经 CDR3 结构域，通过 PCR 反应扩增生成各种长度的产物(产物的长度取决于各种不同接合性基因的重组)。未能检测到 V_β 家族中某些成员提示 V_β 库存在解体。V_β 库的解体见于 HIV 疾病的后期，尤其是当 $CD4^+$ T 细胞计数少于 200 个细胞/μl 时更为常见[143]。有趣的是，抗反转录病毒药和 IL-2 的治疗虽可使 $CD4^+$ T 细胞计数增加，却未能使解体 V_β 库恢复[143]。这些结果表明 HIV 引发的 V_β 库缺失是永久性的或需很长时间来再生，提示 AIDS 患者的治疗必须是连贯性的。

最后，HIV 病毒引起的免疫缺陷必须放在免疫应答产生的微环境中予以考虑。HIV 疾病的后期是以淋巴组织结构的显著破坏为特征[249~256]。滤泡退化、高维管性及纤维化是 HIV 疾病后期淋巴结发生的一些重要病理变化。FDCS 缺损，导致滤泡退化，这与 HIV 相关的免疫缺陷的发病机制有重要影响。当完整的 FDC 网络消失时，机体对新抗原的免疫应答及维持记忆效应的能力均遭严重损害[257]。产生和维持免疫应答的功能性底物的缺失导致对 HIV 病毒复制的失控，并促进机会性感染的产生。

病毒学

在 HIV 疾病进展期血浆病毒数量的增多是由淋巴结捕获病毒能力的降低及 HIV 特异性免疫应答的衰退所引起(源于 FDC 网络的退化)[200]。而且病毒性质上的差异可能在 HIV 感染疾病晚期的发病机制扮有重要角色。如前所述(见前文“HIV 感染的靶细胞”和“HIV 共同受体”)，源于 HIV 疾病后期的病毒致细胞病变的效应更强，并可在更多种类的细胞内复制[72~76]。当患者 $CD4^+$ T 细胞平均计数为 50 个细胞/μl，SI 型病毒株可在 50%的患者中出现，这预示着 $CD4^+$ T 细胞的加速耗竭[75]。病毒由 NSI 型向 SI 型转变与其所结合的共同受体的改变平行相关(见“HIV 共同受体”)[98]。NSI 型优先结合 CCR5 而进入细胞，而 SI 型则利用 CXCR4。病毒由 NSI 型向 SI 型转变，其结合的辅助受体由 CCR5 变为 CXCR4，这些变化与 HIV 包膜蛋白 V3 环的突变相应。V3 环中不带电的氨基酸残基为带电的氨基酸残基所替代。这些突变并不只是包膜蛋白序列多样化所造成的后果，因为病情稳定型患者的包膜蛋白基因序列虽高度多样化，可病毒仍为 NSI 型与 CCR5 结合的。如前所述，选择病毒趋化性的宿主因子与病毒类型的转变有关(图 44.12)。

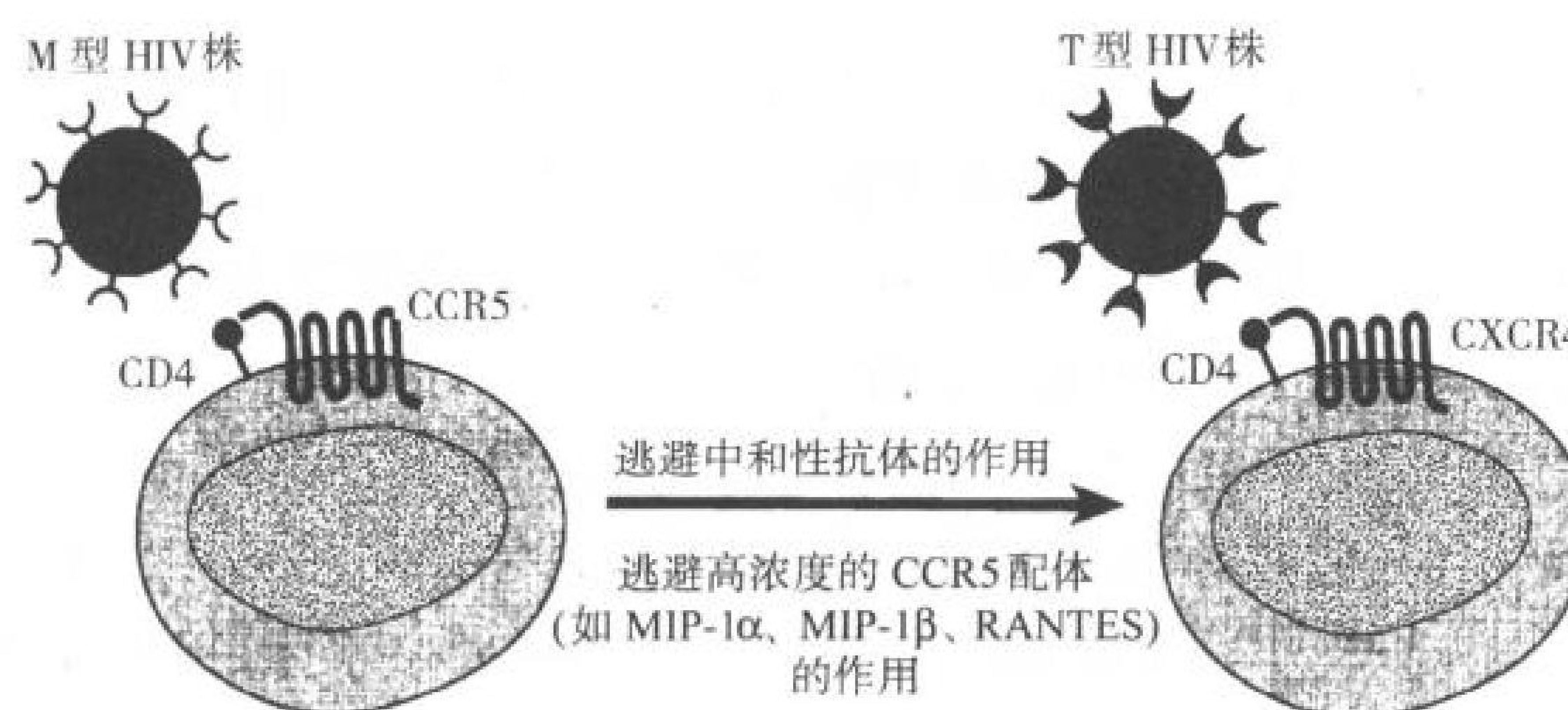


图 44.12 HIV 疾病进程中病毒趋化型的改变。

检测 HIV 感染的实验室指标

从 HIV 感染的自然史和发病机理来看，应寻求实验室指标以显示出现临床症状前的活动(表 44.2)。理

想的实验室标志应对所有疾病个体简单易行且重复性好[258]，此外这种指标随疾病的发展而恶化并随治疗的积极而改善。虽然目前还未找到理想的指标，但一些临床措施在治疗病人方面发挥了重要作用，尤其是抗反转录病毒药的早期治疗和预防机会性感染标准的建立。

表 44.2　HIV 疾病的实验室指标

免疫功能耗竭和失调的指标	病毒负载的指标
$CD4^+$ T 细胞计数	病毒载量(如 HIV DNA PCR^+ 细胞)
β 微球蛋白水平	细胞相关性病毒
新蝶呤水平	(通过培养或分子定量检测)
TNFα 受体水平	HIV DNA 的剪切形式
体外抗 CD3 T 细胞增殖应答	血浆病毒血症
体内抗原迟发型超敏反应	(通过培养或分子定量检测)
$CD8^+$ 细胞的 CD38 表达	p24 抗原血症

免疫功能耗竭和失调的指标

由于 $CD4^+$ T 细胞为 HIV 感染的靶细胞且 $CD4^+$ T 细胞消耗是 HIV 病发展的免疫学特点，因此检测 $CD4^+$ T 细胞应是 HIV 感染的良好指标。事实上，对 HIV 感染自然史的研究证实，在确诊为 AIDS 病 4 年内，有近 90%的患者 $CD4^+$ T 细胞计数 $<200/\mu l$，而有 1/2 ~ 1/3 的人 $CD4^+$ T 细胞数为 200 ~ 400 个/μl，仅有 15% ~ 20% $CD4^+$ T 细胞数 >400 个/μl 的人需用更多时间发展为有临床症状的 AIDS[259~261]，在所有 HIV 高危人群包括血友病[262,263]和注射吸毒者[264]中证实了这种趋势。除绝对 $CD4^+$ T 细胞计数外，外周血 $CD4^+$ T 细胞百分比及 $CD4^+$ T 细胞计数在一段时间内的改变，也可作为疾病发展的有效实验室指标。

在抗反转录病毒药物治疗过程中 $CD4^+$ T 细胞数相应增加，这种有效反应已作为新的抗 HIV 药物的认证标准[268~271]，$CD4^+$ T 细胞数的增加能导致预后改善[258,272~274]。

通常的免疫激活标志如血清 β_2 微球蛋白和新蝶呤水平也是显示 HIV 疾病发展的有效指标。β_2 微球蛋白是一种 11kDa 的蛋白质，它与体内多数有核细胞表面的 MHC Ⅰ类分子有关。血清游离 β_2 微球蛋白主要来自淋巴细胞，当淋巴细胞激活或受到破坏时如淋巴细胞增生综合征、自身免疫病及病毒感染，其水平升高。血清 β_2 微球蛋白水平与发展为 AIDS 病的危险性直接相关[275]，血清 β_2 微球蛋白水平是非依赖 $CD4^+$ T 细胞。经大量研究，仅有 1% $CD4^+$ T 细胞数多于 300 个/μl 的患者在 AIDS 发病 1 年后 β_2 微球蛋白水平低于 4ml/L，相反 18%的患者相同 $CD4^+$ T 细胞数而 β_2 微球蛋白水平多于 4ml/L。在 $CD4^+$ T 细胞数少于 300 个/μl 的发展为 AIDS，33%的患者 β_2 微球蛋白为高浓度，18%的患者 β_2 微球蛋白为低浓度[276]。

1472

新蝶呤是三磷酸鸟苷(GTP)的代谢产物，主要由单核巨噬细胞及淋巴细胞在合成四氢生物蝶呤时产生。血清新蝶呤水平升高见于自身免疫疾病和病毒感染的患者。如 β_2 微球蛋白，血清新蝶呤水平升高预示非依赖于 $CD4^+$ T 细胞数向 AIDS 的发展[277,278]。将 $CD4^+$ T 细胞数与 β_2 微球蛋白或新蝶呤水平结合在一起预测疾病发展，具有比分别检测任何一个指标更大的价值[261]。

TNF-α 受体的胞外区是从细胞膜通过蛋白裂解而释放的，其可溶形式可在血清中检测到，此可溶性 TNF 受体水平可反映 TNF 活性。因 TNF 在上调 HIV 复制中发挥关键作用(见下“细胞因子和 HIV”章节)[279,280]，可溶性 TNF 受体水平是反映 HIV 疾病发展的有效指标。个别研究发现，可溶性 TNFⅡ型受体随血浆病毒血症及 AIDS 的进程而相应增高[281,282]，然而，可溶性 TNF 受体水平似乎还不能作为反映抗反转录病毒药物疗效的可靠指标[283]。

还有很多反映随 HIV 疾病发展免疫功能失调的指标。体外抗 CD3 抗体的 T 细胞的增殖效应的减弱可对免疫缺陷有指示作用，如同体内对二次抗原迟发型超敏反应的减弱[268~288]。标志 CD38 激活的外周血 $CD8^+$ T 细胞百分比随疾病发展而相应增加[289,290]。$CD8^+$ $CD38^+$ 细胞介导调节细胞溶解，在 HIV 感染的慢性阶段，这些细胞的增加可能反映了病毒的高载量。其他指示 HIV 活动的指标包括血细胞比容、血清免疫球

蛋白 IgA 水平和血清 1,25-维生素 D 水平[291,292]。

病毒载量的指标

在发展灵敏的分子技术定量 HIV RNA 分子之前,发现直接培养的血浆或单核细胞的 HIV 随疾病的发展阶段而相应增加[293~295]。通过血浆病毒血症的培养变化进一步反映抗反转录病毒药疗效的可靠性[296],然而,这些分析相当费力且灵敏度比目前应用的分子诊断低。

在病毒复制期间,病毒核心蛋白 p24 被释放到血浆,可被免疫分析所检测。检测血浆中的 p24 灵敏度相对较低;然而 p24 抗原检测阳性预示 $CD4^+$ T 细胞数的加速降低并同时发展为 AIDS。多 AIDS 同龄组的研究发现,在发展为 AIDS 的 HIV^+ 个体中,4 年里有 61%检测到 p24 抗原血症,与之相对则有 17%的个体不会发展成 AIDS[260]。在发展为 AIDS 的患者中,确诊为 AIDS 前平均 16.8 个月内抗 p24 抗原血症被首先检测到。p24 抗原血症的检测与 $CD4^+$ T 细胞数的相应降低有关,p24 抗原血症阴性的 $CD4^+$ T 细胞计数降低则平均低于每年 119 个细胞/μl,p24 抗原血症阳性的则达 157 个细胞/μl。尽管 p24 抗原血症的阳性检测对疾病的发展具有预示价值,但在抗病毒治疗期间,p24 抗原血症水平的变化还不能判断疗效作用[297]。

HIV 感染细胞频率可由 PCR 检测 HIV-1 DNA 来定量,这种检测对 HIV 疾病的发展有一定的预测价值。许多调查者发现,在发展为 AIDS 的患者中,其外周血 HIV 感染细胞频率增加近 1~2 个数量级[298~301]。在抗反转录病毒治疗期间,HIV 感染细胞频率仅适量减少或无改变[135,302~308]。整合有缺陷型原病毒的细胞可通过 DNA PCR 检测,但它们对 HIV 疾病的致病机制却尚未明了。此外,由于整合了前病毒的细胞生活周期更长,因而在抗反病毒治疗期间 HIV 感染细胞频率的降低可能是表明疗效不敏感。基于此点,检测未整合病毒 DNA 也许是随后判断抗反转录病毒治疗疗效的动态指标[309]。未整合病毒 DNA 介导病毒 RNA 的反转录,且在整合至宿主 DNA 或发生降解时具有相对较短的半衰期[40,41]。

尽管有技术上的要求,许多研究表明外周血检测细胞相关的 HIV mRNA 可作为疾病发展的独立指示,尤其是对早期 HIV 疾病及 $CD4^+$ T 细胞数相对高的患者能预示疾病的发展。在对 $CD4^+$ T 细胞数多于 600 个/μl,而外周血单细胞未检测到 HIV mRNA 且 8 年内未发展为 AIDS 的患者研究中发现,近 50%的患者 HIV mRNA 拷贝数/μg 总 RNA 为 101~4500,而在同期内,80%HIV mRNA 拷贝数/μg 总 RNA > 4500 的患者发展为 AIDS[310]。检测外周血单核细胞 HIV mRNA 的剪切形式能进一步增加预测疾病发展的价值。尽管多剪切或未剪切 HIV mRNA 水平随疾病发展而增加,未剪切 HIV mRNA 的不成比例地增加强烈预示 $CD4^+$ T 细胞数加速减少及临床疾病的发展[311~315]。在对体内主要的 HIV 聚集和复制场所,淋巴组织感染细胞进行抗反转录病毒治疗效果的研究证实,未剪切 HIV mRNA 水平在治疗期间伴随血浆病毒血症的减轻而降低[134,316]。结合 HIV mRNA 在淋巴结数量高于外周血单核细胞的事实,提出这样一个观点即在抗反转录病毒治疗期间,血浆病毒血症的改变可反映与细胞相关的淋巴组织病毒 mRNA 产量的变化[134,316,317]。

通过定量分析血浆中 HIV RNA(如血浆病毒血症)了解病毒复制的水平,使检测 HIV 的实验室指标得到彻底的更新。检测 $CD4^+$ T 细胞数来获取有关免疫缺陷程度和机会性感染的短期危险性(反映免疫系统遭受的损害),与之相对,血浆 HIV RNA 的定量可预测免疫系统随后的变化。目前应用的可重复检测病毒血症的技术包括:PCR[132,318]、核酸序列扩增(nucleic acid sequence-based amplification,NASBA)[319]和分支 DNA(branched DNA,b-DNA)分析[320]。PCR 和 NASBA 均为循环扩增系统,而 b-DNA 为单步信号扩增系统,它利用多种 HIV 特异性的核酸作靶探针,每个探针与含有多聚寡核苷酸的放大分子结合,每种寡聚核苷酸依次与酶标互补探针杂交并通过加入底物进行检测。每种分析(PCR、NASBA 和 b-DNA)可检测每毫升血浆近 20~50 个 HIV RNA 分子,每种分析有多个动态数量范围。

1473

Bagnarelli 等采用高灵敏度的 PCR 病毒检测技术于 1992 年报告,早、中、晚期患者的平均血浆病毒血症水平分别为 21 000、43 000、270 000 HIV RNA 拷贝/ml[299]。Piatak 等发现,在同样患者中用 PCR 检测与用终末稀释培养检测到的血浆病毒血症水平平行相关,然而,通过 PCR 检测到的血浆病毒血症水平大于通过培养检测的 60 000 倍[132]。与外周血相比,淋巴组织病毒载量及病毒复制水平均较高,进一步证实高水平 HIV 复制

甚至可在疾病的临床潜伏期出现[256,321]。

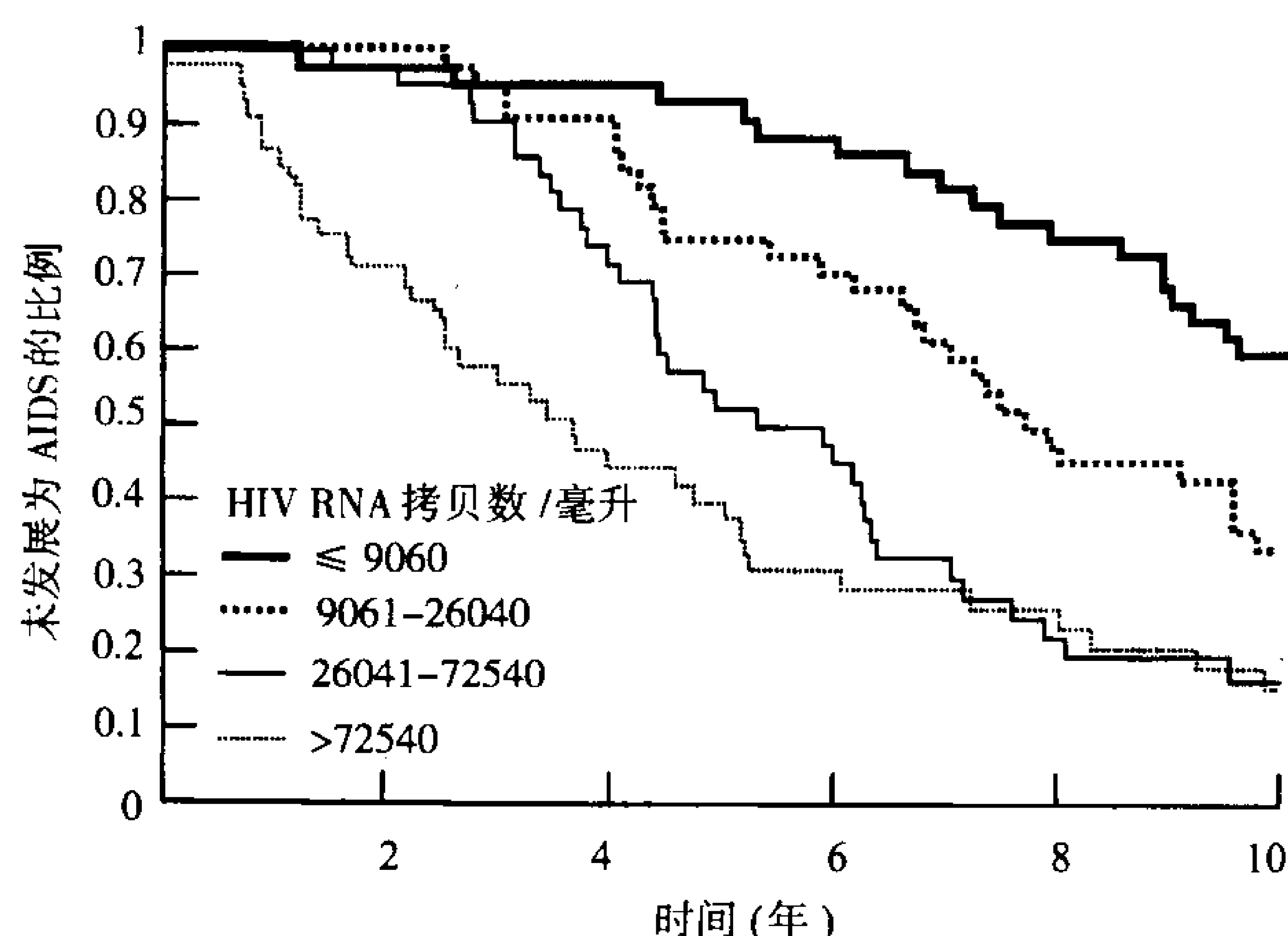


图 44.13　血浆病毒载量水平和疾病进程的关系。

血浆病毒血症作为反映疾病进程指标的预测价值也由 Multicenter AIDS Cohort Study 所证实，在那里根据基础病毒血症水平将患者分为4组，5年内患者发展为 AIDS 的比例由低至高分别是8%、26%、49%和62%[322]（图 44.13）。血浆病毒血症水平 > 10190HIV RNA 拷贝/ml 的患者，有6.8年的中等幸存时间，与之相对，具有相同 $CD4^+$ T 细胞数但血浆病毒血症水平 < 10190 HIV RNA 拷贝/ml 的患者则幸存时间 > 10 年[322]。AIDS 临床试验研究组(AIDS clinical trials group)进一步验证进行血浆病毒血症检测的价值，他们发现检测血浆病毒血症的基础水平及随时间的变化可有效预测疾病进程[323,324]。

许多研究小组报告在联合抗反转录病毒治疗期间，血浆病毒血症的降低，提示检测血浆病毒血症可作为一种有效指标，不仅可预测进程，还可作为监测 HIV 感染个体的治疗效果。有研究机构已找出接受治疗的个体其血浆病毒血症下降与临床结果改善的关系[325]，他们发现在抗反转录病毒治疗的最初6个月内，75%有病毒血症降低，59%临床治疗有效(不发展成 AIDS)。最终，事实证明在治疗期间病毒血症的降低反映了淋巴组织病毒复制的降低，从而进一步验证病毒血症可作为 HIV 发病机制的实验室指标[134,316]。

在 HIV 感染的最初几个月，血浆病毒血症水平已可预测疾病进程(如病毒载量调定点的确定)。Mellors 等发现，与同样时间未发展为 AIDS 的患者相比(19 000 HIV RNA 拷贝/ml)，在血清转化6个月内，血浆病毒血症水平明显高于那些追踪近5年发展为 AIDS 的患者(74 000 HIV RNA 拷贝/ml)。在血清转化6个月内，> 100 000 HIV RNA拷贝/ml 的病毒血症水平发展为 AIDS 的概率为10.8%。Schacker 及合作者发现，病毒血症水平稳定在 Mellors 所报告的稍后一时间点上。血清转化后的0~6个月中，血浆病毒血症水平与随后的临床结果无关，而在血清转化后的7~12个月中，根据血浆病毒血症水平有效预测 $CD4^+$ T 细胞消耗[327]。这些结果支持了以往的研究，即在血清转化时间附近血浆病毒血症水平并不能预测随后临床过程[328]。在感染初期血浆病毒血症稳定在一调定点可能反映了对病毒复制的早期抗 HIV 免疫反应能力，尽管对病毒载量调定点独立出现在宿主免疫反应中有争论[329]。

由于血浆病毒血症这种指标能预测疾病的进程并可判断治疗效果，因此发展灵敏的、能定量分析血浆病毒血症，已为 HIV 感染者提供了开始和维持抗反转录病毒治疗的重要方案。具有相似 $CD4^+$ T 细胞数的早期 HIV 患者中，如有导致疾病发展的血浆病毒血症水平上的变化，则考虑进行早期介入治疗，在治疗中 $CD4^+$ T 细胞计数低的患者，血浆病毒血症的微小变化将对治疗作用产生影响。目前推荐实施和维持抗反转录病毒治疗主要依赖于反映 HIV 疾病进程的两个最佳实验室指标：$CD4^+$ T 细胞数和血浆病毒血症水平[330~332]。

1474

抗反转录病毒的治疗

目前对 HIV 疾病发病机制的探索，结合有关有效抗反转录病毒制剂的发展，可为 HIV 感染者提供了众多的治疗选择。对临床潜伏期 HIV 不断在淋巴组织中复制的认识，增强了早期干预的理论性[256,321]。对体内病毒复制水平的定量评估为早期抗反转录病毒治疗提供了理论依据[136~139]。如病毒复制未被抗反病毒药物完全抑制，则病毒复制的迅速及高突变率可能导致药物耐受性[164]。因此，根据病毒动力学，对与淋巴组织病毒载量有明显冲突的抗反转录病毒单一治疗的失败并不惊奇[135]。近来，对患者实行综合治疗包括抑

HIV-1 蛋白酶,其外周血和淋巴组织的病毒载量得到了快速和明显的降低[139,333~337]。监测血浆病毒血症的临床实验室检测手段的运用为抗反转录病毒提供了时间上的保证,其有效性应以迅速降低病毒载量而确定[136~139]。

病毒生命周期和抗反转录病毒因子

病毒生命周期的多个阶段可作为目前应用或研制制剂的靶向(图 44.14)。结合可溶性 CD4 抑制病毒黏附和进入细胞的有效治疗方式,让只要干扰病毒与共同受体结合就可在病毒生命周期的最早期达到治疗目的的观点占了上风,十分令人遗憾[111,338~341]。

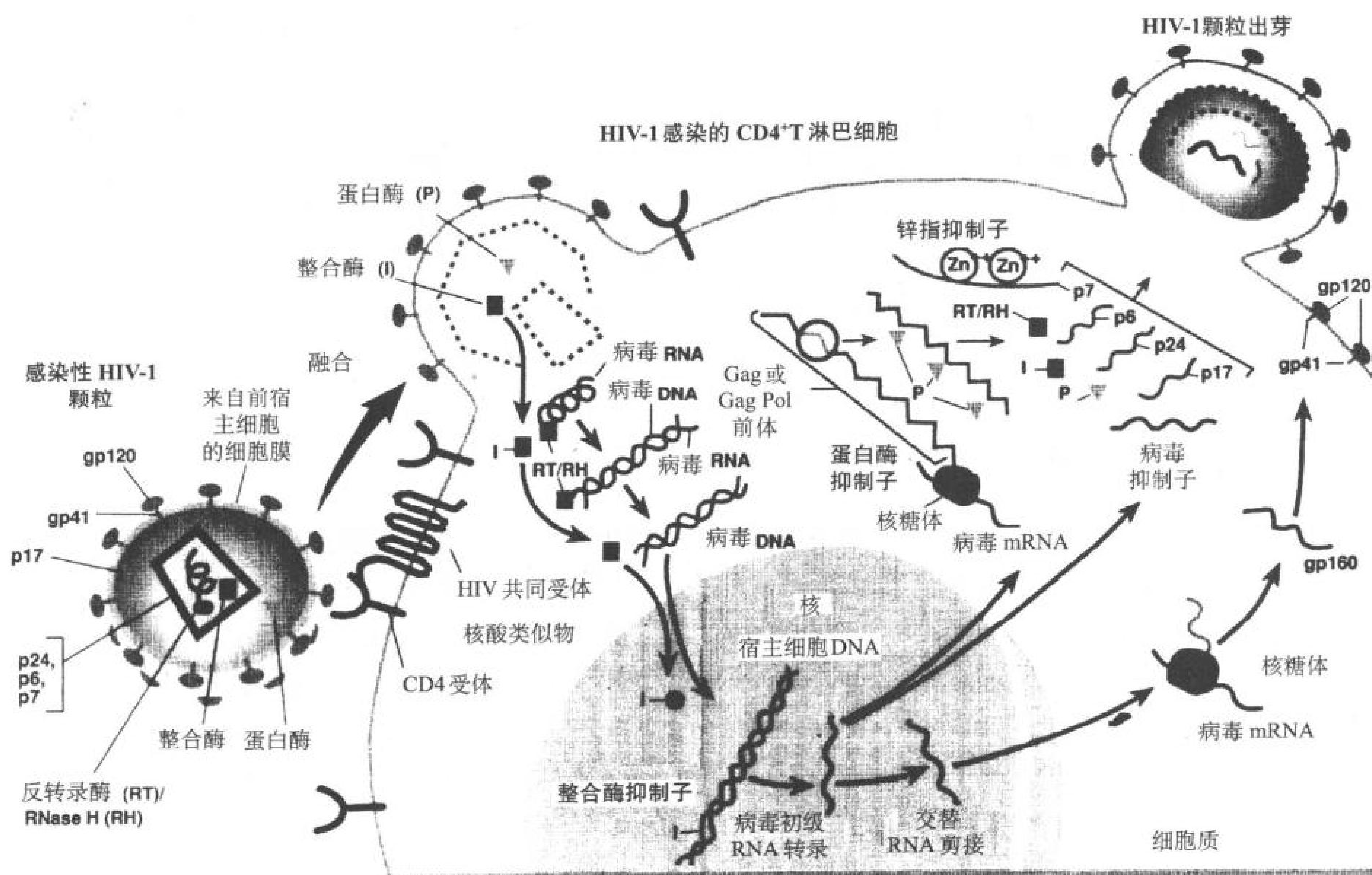


图 44.14 抗 HIV 治疗的病毒及细胞靶点:干扰病毒与细胞融合及进入细胞的过程;作用于 HIV 的共同受体;抑制病毒的 RT、蛋白酶及整合酶。

抑制 HIV 反转录是需发展治疗 HIV 感染的首要制剂,它包含抗 HIV 的重要成分。多数反转录抑制剂是核苷酸衍生物,这些制剂由于其结构中缺乏链延长所必需的 3-羟基而起到 DNA 链终止子的作用。非核苷反转录抑制剂也用于临床。反转录抑制剂也有不少缺点,包括对神经和血液方面的不良反应,当单独应用时,能迅速选择性地对病毒变异体产生耐受,但缺乏对 HIV 感染细胞产生作用。HIV-1 蛋白酶裂解 Gag 的前体蛋白可生成病毒感染细胞所必需的 p24 和 p17 病毒颗粒[342]。基于蛋白酶晶体结构而发现的 HIV-1 蛋白酶抑制剂是合理设计药物的成功例子[343,344]。将抑制细胞重新感染(如 RT 抑制剂)的制剂与可促进缺陷的、非感染性病毒从已被 HIV 感染的细胞中释放出来的制剂(如蛋白酶抑制剂)结合起来,可产生有效的抗病毒活性。RT 抑制剂和蛋白酶抑制剂的联合应用已迅速成为治疗 HIV 感染的选择。

反转录病毒 DNA(前病毒)整合到宿主 DNA 是由病毒整合酶促成的。近来对整合酶晶体结构的测定已促使寻求合成抑制该酶的制剂,此制剂应在不久的将来成为临床治疗的有效制剂[346]。

对 HIV 辅助蛋白的靶向治疗已被前述这些蛋白的生化特性所困。Tat 拮抗剂 Ro24-7429 临床试验未能证实此制剂的抗病毒活性[347],然而针对 HIV-1 Rev 和 Nef 蛋白的靶向制剂正在研制之中。

原发性 HIV 感染的治疗

在 HIV 感染广泛传播到淋巴组织前以及在建立病毒载量调定点前进行治疗，目前掌握的 HIV 早期感染的发病机制已为此提供了足够的支持[200]。治疗 HIV 感染的时间可在急性感染后延续 12 ~ 18 个月，这是基于在这期间淋巴组织有大量持续感染的细胞，已明显达到血浆病毒血症的调定点。

在 HIV 感染初期，给予 6 个月的叠氮胸苷治疗与对照试验显示，进行积极治疗的患者保持着较高 $CD4^+$ T 细胞计数、低水平的病毒血症，且在随后 15 个月向较轻的临床终末期缓慢发展（如口念珠菌病、带状疱疹及口毛状白斑）[348]。目前正研究在 HIV 感染初期（如 90 天）对患者进行叠氮胸苷、拉米夫定和蛋白酶抑制剂的联合治疗。初步结果显示，在这种联合治疗的持续期（目前为 1 年多），血浆病毒血症可被抑制到 < 20HIV RNA 拷贝 /ml 的水平[334]。

数学模式提示对 HIV 感染采用有效的联合药物治疗完全抑制病毒复制约需 3 年，急性期予以治疗可根除 HIV 感染（见上文“病毒动力学”）[139]，这些模式显示，病毒血症第二期的缓慢消退源于感染细胞的长周期而不是潜伏期细胞的激活。然而，实验数据提示，潜伏期感染细胞的激活可能是在有效联合治疗期间病毒持续的一种机制。另外在数学模式中可根除病毒复制的理论依据，而在血浆病毒血症则未检测到，说明对病毒复制的抑制并不完全[335]。尽管有令人振奋的临床结果，对有效的抗反转录病毒疗法联合治疗急性 HIV 感染存在许多问题尚待解决，包括最佳抗反转录病毒疗法的组成及治疗持续时间。另外，是否能根除 HIV，病毒抑制不彻底的患其临床后果又会怎样不得而知。

1476

慢性 HIV 感染的治疗

对叠氮胸苷的早期治疗学研究证实：单用能改善反映 HIV 疾病的实验室指标，并且对有症状或 $CD4^+$ T 细胞计数相对低的无症状 HIV 感染者，都可延迟疾病发展[268 ~ 271,349]。随后研究表明，用二脱氧肌苷取代叠氮胸苷治疗，会进一步延缓疾病的进程[350 ~ 354]，另外，与二核苷类似物合用，通常优于单个药物治疗[354 ~ 358]。

最近研究，叠氮胸苷与抗反转录病毒药物联合应用能更有效地延长抑制病毒复制时间。例如，叠氮胸苷和拉米夫定联合用药，治疗晚期 HIV 感染者，可使存在于血浆内至少半年到 1 年的病毒数量减少 0.5 ~ 1 个 log 单位[359 ~ 362]。这种疗法的有效性源于病毒突变的优先选择性（此突变可使病毒对叠氮胸苷产生耐受性），而联合疗法可恢复病毒对叠氮胸苷的敏感性[363]。

蛋白酶抑制剂成为抗反转录病毒药物的一员，使人们对 HIV 疾病的治疗出现了谨慎的乐观，因为它能显著改善 HIV 感染者的预后情况。蛋白酶抑制剂如沙奎那韦、利托那韦、印地那韦和那非那韦都是强效抗反转录病毒药。尤其与核苷类似物 RT 抑制剂合用时，疗效更为显著[139,333,364 ~ 368]。这种联合疗法可供 HIV 感染患者选择[331,332]。临床实验，在现有的抗反转录病毒药中添加利托那韦与添加安慰剂的对照组相比，前者可使 $CD4^+$ T 细胞数 < 100 个/μl 的 HIV 感染者，发展成为艾滋病或死亡的比率下降 50%[369]。印地那韦、叠氮胸苷和拉米夫定联合应用，对 HIV 晚期患者（$CD4^+$ T 细胞数 < 100 个/ml 血浆，血浆病毒 > 20 000 个 HIV RNA 拷贝/ml 血浆）进行治疗，90% 患者在 24 周内对血浆中病毒复制可被抑制，使血浆病毒降至 500 HIV RNA 拷贝/ml 血浆，而单用印地那韦对 43% 患者有疗效[336]；但单用叠氮胸苷或拉米夫定治疗，则不能达到上述疗效。另一研究表明，印地那韦、叠氮胸苷和拉米夫定联合应用治疗 $CD4^+$ T 细胞数 < 200 个/μl 的 HIV 感染者，与不加蛋白酶抑制剂的对照组（叠氮胸苷和拉米夫定）相比，可明显延迟艾滋病或死亡的发生[337]。上述研究证明，添加蛋白酶抑制剂（RT 抑制剂）的联合疗法能快速高效地降低血浆病毒数量。这可能是由于淋巴器官内的感染细胞，以及生发中心内与 FDC 结合的病毒颗粒被快速清除所致[335]。另外，联合疗法还能明显降低潜在的可能受 HIV 感染的细胞数量[228]。这些资料表明对病毒复制进行长期控制有望成功。然而，当抑制病毒不充分时，病毒还可大量地快速复制，这仍是一个难题[370]。

最后，长期抗反转录病毒药物治疗的成功与否，不仅取决于能否抑制病毒的复制，而且还与免疫功能的部分恢复有关。免疫应答能力的增强可阻止与 HIV 相关的机会性感染疾病的出现，也可能与抗病毒药协同

控制病毒复制。最近研究显示，在 HAART 过程中，$CD4^+$ T 细胞的功能增强，极有可能使疾病得到控制[371]。但是，用 IL-2 和抗反转录病毒药试图重建 T 细胞受体 Vβ 库的失败，暗示免疫系统的损伤可能存在阈值，若超过该阈值，免疫功能便不能重建[143]。

虽然抗反转录病毒药物的联合应用可能对急性期、中期到晚期的 HIV 感染患者的疗效显著，但对早期无症状的 HIV 感染患者疗效并不确切。因此，这些患者长期应用抗反转录病毒药，可能引发各种毒性反应如破坏病毒的生活方式、促进病毒耐药性的出现等，是否弊大于利，尚不清楚[332]。

淋巴组织在 HIV 发病过程中的作用

急性感染期

在 SIV 感染的动物模型中，淋巴器官是首先被感染的器官之一。在感染 1 周内，从外周淋巴结即可检测出病毒[202,203]。原位杂交显示，此时几乎所有 SIV RNA 均具有细胞相关性，它们源自于淋巴结中感染细胞。并且，淋巴器官个别感染细胞内首先有病毒产生，它可能就与 SIV p26 抗原峰有关。感染后第 2 周，此时 SIV 特异性免疫反应开始出现，即可观察到细胞受感染的频率降低。感染后第 4 周，随着 SIV 特异性细胞介导的免疫反应对感染细胞的消除，以及淋巴生发中心内免疫复合物(包括病毒、抗体和补体)对病毒颗粒的清除，血液中抗原开始下降[202,203]。

在急性 HIV 感染的 SIV 模型确证了以上的结论(图 44.15)。SIV 模型中 HIV 血液动力学与外周血液 HIV 特异性免疫反应相平行[194,195,197,198,208]。另外，将急性感染个体的一定量淋巴结进行活检，得出的初步结果表明，SIV 模型在模拟早期有关淋巴组织 HIV 感染时是恰当的。在急性感染后几星期到几个月内，淋巴组织内细胞受感染的频率急剧降低，淋巴滤泡内生发中心明显形成，并且在 FDC 处理病毒的网络中可检测到与胞外病毒颗粒相结合的病毒 RNA 和抗体、补体结合成复合物[200,256,372-374]。如上所述，免疫系统能有效地消除淋巴器官内的感染细胞，有效下调血浆中的病毒数量。然而，大量的病毒颗粒被生发中心 FDC 网络所捕获并处于潜伏期，避免了免疫攻击，从而引起滞留的或从淋巴器官游离出去的 $CD4^+$ T 细胞不断的重复感染[140,218,375]。

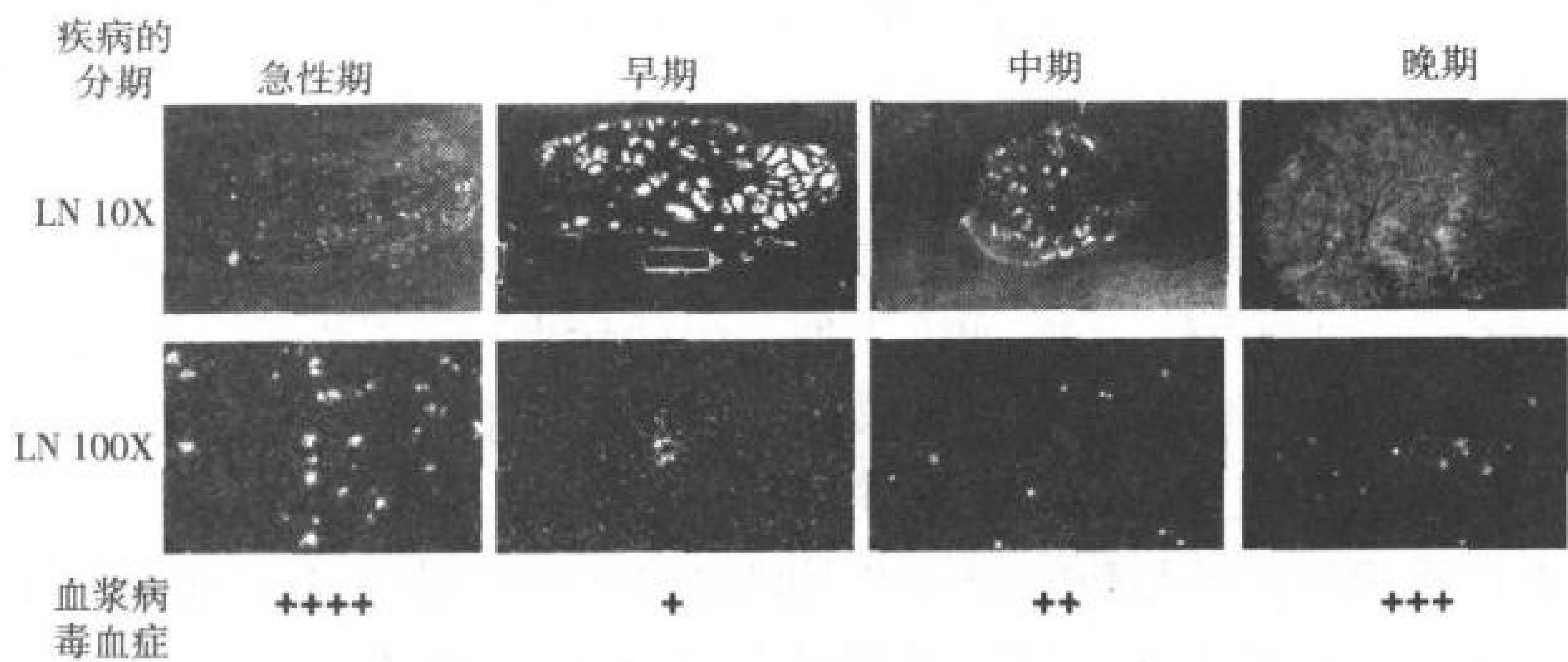


图 44.15 疾病不同时期淋巴结 HIV RNA 表达的形式。检测 HIV RNA 的原位杂交显示 HIV RNA 似白色谷粒，在急性期 HIV RNA 主要感染副皮质区的 T 细胞。血浆病毒血症的水平在 HIV 特异性的免疫应答出现前处于最高点。在疾病的慢性感染早期阶段，HIV 特异性的免疫反应可促进淋巴结清除绝大多数有繁殖力的感染细胞，下调血浆病毒血症水平，在生发中心捕获包被 HIV 的免疫复合物。在疾病的中晚期，随着滤泡的渐进性退化和对病毒复制控制能力的减弱，生发中心对病毒的捕获能力减退，副皮质区 T 细胞感染频率及血浆病毒血症的水平升高。

慢性感染：临床潜伏期

1477

HIV 疾病早期慢性阶段是以存在于外周血和淋巴组织间病毒数量的二分性为特征。淋巴结细胞被 HIV 感染的频率较外周血细胞高 5-10 倍，前者的病毒复制水平较后者高 10～100 倍[135,201,256]。Embreston 等的研究表明，高达 25%整合 HIV DNA 的 $CD4^+$ T 淋巴细胞出现在淋巴结生发中心，这更强调淋巴组织作为体内 HIV 病毒临时储库的角色[321]。此前所述的血浆病毒高水平的更新率(如前所述 10^9/d 个病毒体更新)与病毒在淋巴组织中较强的复制能力有关。

抗原刺激后淋巴生发中心滤泡的过度增生可在一定程度上造成外周血和淋巴结之间病毒数量及复制能力的二分性[252～255,372]。FDC 网络在增生的淋巴滤泡中的扩展，可形成有效捕获病毒的机制，即抗体通过与 FDC 膜表面的补体受体分子 C3b 和 C3d 结合与补体包被的病毒产生相互作用。除此以外，免疫反应也对维持淋巴结和外周血间病毒的二分性起重要作用，淋巴结的微环境是保持免疫反应高活性的理想场所。免疫效应细胞和淋巴结产生的高浓度的原炎性细胞因子间的密切联系可使淋巴结捕获病毒，并通过几种不同途径促进病毒的复制。由淋巴组织游走出的激活型 $CD4^+$ T 淋巴细胞可作 HIV 病毒重新感染的理想靶细胞[375～380]。在活化的淋巴结中有许多由原炎性细胞因子传导的活化信号(促使静息型感染细胞 HIV 病毒复制的有效诱导因素)[40,41,218,381～383]，并可增加激活型 HIV 敏感性细胞的数量[379,381,382]。另有实验发现病毒自身的复制可诱导免疫应答的过度激活，导致免疫系统的损害[380]。淋巴组织病理学的异常及细胞因子的失衡，可引起细胞游走能力的缺陷，使 HIV 感染细胞滞留于淋巴结，这在对淋巴结和外周血间病毒二分性的形成有一定作用[384]。

在病毒二分性存在于淋巴结和外周血之间的这个阶段，淋巴样组织的病理学模式由滤泡过度增生型向滤泡退化型转变。此转变是以 FDC 网络的瓦解为特征的。FDC 网络的瓦解导致淋巴生发中心对病毒捕获能力的降低，并使血浆病毒数量增加[200,256]。此外，HIV 病毒感染细胞在淋巴结的滞留能力也降低。因此淋巴结和外周血间病毒数和复制能力差异性的变化至少部分依赖于病毒在此两室间的再分布。

疾病后期

HIV 疾病与 HIV 病毒载量一样呈渐进性。$CD4^+$ T 淋巴细胞降至 200 个/μl 期间，外周血区室的病毒数量快速增加，使外周血和淋巴结的病毒数量趋于平衡。如前所述，FDC 网络的瓦解和其对病毒捕获能力的降低，极大地促进了病毒数在淋巴结和外周血间的平衡进程，淋巴组织的破坏是导致 HIV 疾病后期严重免疫功能失调和抑制病毒复制能力丧失的主要原因。结果是淋巴结副皮质区的细胞相关性病毒 RNA 明显增加，表明病毒复制能力的增强。因此在 HIV 病的进展期，淋巴结的优势病毒有一个翻转效应，即细胞外性病毒(如捕获性病毒)逐渐减少，而细胞内性病毒(如进入细胞内的病毒)增多[200,256]。在疾病后期，淋巴组织的结构几乎完全溶解。淋巴滤泡退化、纤维化、淋巴细胞耗竭和脂肪样变性，预示免疫缺陷状态的出现及机会性感染概率的增大。

1478

HIV 疾病进程中淋巴组织的破坏与药物治疗干预间的关联令人难解，HIV 感染的 FDC 的生产性感染显著发生于 HIV 疾病的后期[385]；而绝大多数研究结果证实，在疾病中期当 FDC 网络开始裂解时，FDC 的生产性感染很少发生[386]。病毒基因产物的直接毒性可能与 FDC 网络完整性的丧失有关。Tat 和 gp120 可破坏细胞间正常的信号传导[245,246]并可诱使细胞凋亡[387～389]，这些效应主要在对 $CD4^+$ T 细胞的研究中发现，对 FDC 的正常生理功能及其与 HIV 病毒蛋白的相互作用却知之甚少。Tat、Nef 和 Vpu 可向下调节 MHC Ⅰ类分子的表达[386,390,391]，干扰淋巴微环境正常细胞间的相互作用。HIV 疾病进程中 $CD4^+$ T 细胞的耗竭同样可导致维持 FDC 存活的营养因子作用丧失。诱导组织损伤的 HIV 基因产物可能也与 FDC 网络的破坏有关，其他可能的调节因素包括一氧化氮(NO)[392～394]、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases，MMP)如 MMP-9[395,396]。无辜旁观者现象也可能诱使 FDC 网络破坏的因素，比如增生淋巴结中高浓度的 TNFα 可能对浸润其中的 $CD8^+$ T 细胞和巨噬细胞有毒性作用。

HIV 感染引起的免疫功能失调

在 HIV 感染的过程中，免疫系统各个成员实际上都存在功能障碍。CD4^{+} T 细胞功能障碍可能是由 HIV 直接感染造成，也可以间接地因非感染性细胞接触了病毒蛋白所引起。因为 CD4^{+} T 细胞是人体正常免疫反应的一个重要成员，所以在 HIV 疾病中，CD4^{+} T 细胞数目和功能进行性下降则是主要的，许多其他免疫缺陷都位于其次。

CD4^{+} T 细胞

CD4^{+} T 细胞功能障碍是 HIV 疾病的特征。病程中逐步发展的机会性感染主要是因为 HIV 直接或间接地造成 T 细胞数目下降及功能降低。HIV 影响 CD4^{+} T 细胞功能的直接作用包括感染和随着细胞绝对数目减少而产生的细胞毒作用。HIV 感染的间接作用则使 CD4^{+} T 细胞增生、分化、调节功能降低，IL-2 和其他细胞因子产生减少，IL-2 受体表达下降，缺陷的克隆群体形成和其他前体细胞缺陷。

由于 CD4^{+} T 细胞的耗竭，CD4^{+} 和 CD8^{+} T 细胞比例倒置是 HIV 疾病的一个特征。直到疾病的晚期阶段，通过 CD3^{+} T 细胞与 CD8^{+} T 细胞总数目增加，来抗衡 CD4^{+} T 细胞的减少[397]。这个现象称为 T 细胞稳态[398]，在其他疾病中也有此现象。在 T 细胞稳态中，当 T 细胞减少，不管是 CD4^{+} 减少或是 CD8^{+} 减少，机体产生更多的 CD3^{+} T 细胞来维持 CD4^{+} 和 CD8^{+} 比例恒定。如果像 HIV 疾病一样发生了 CD4^{+} T 细胞的选择性减少，CD4^{+} 和 CD8^{+} T 细胞的补充将导致 CD4^{+} T 细胞进一步减少和 CD8^{+} T 细胞数目的增加[397-400]。疾病的更晚期阶段，淋巴细胞生成障碍导致 T 细胞稳态失衡，CD4^{+}、CD8^{+} T 细胞将进一步减少。

随着 HIV 病程，CD4^{+} T 细胞功能逐步丧失。最初功能异常表现为对异型抗原 T 细胞增生反应缺陷，之后对正常记忆抗原如破伤风类毒素失去反应、IL-2 生成减少，再之，伴随着 CD4^{+} T 细胞数目下降，对促有丝分裂的刺激反应也丧失了[231]。

CD4^{+} T 细胞缺陷的发生机制仅部分为人所知。病毒蛋白质以前被认为直接改变了 T 细胞的功能。gp41 能够抑制抗原和丝裂原介导的 PBMC 的增生[401]。gp120 和 CD4 的相互作用导致了细胞活性的改变，第二激活信号导致了细胞凋亡。离体实验，使用 CD4 交联抗体或 HIV 包膜蛋白三聚体能促使 CD4^{+} T 细胞凋亡[387,402,403]。这种 CD4 介导的作用能被 CD28 或 CD2 交联抑制[402,404]。另外，HIV 患者分离的细胞可能比正常个体分离的细胞更敏感也更容易因 CD4 交联发生凋亡[387,388,403,405-408]。

从 HIV 感染者分离的 T 细胞证实有各种各样的异常表型。相比非感染个体，HIV 感染者的 CD4^{+} T 细胞表达 CD28，B-7 配体和激活 T 细胞必需的共同激活信号的比例减少了（HIV 感染者 68%、非 AIDS 个体 96% 健康）[409]。CD28^{-} T 细胞不能对激活信号产生反应，这些激活信号包括抗 CD3 单克隆抗体或分裂素。CD28T 细胞也不能表达末端激活标志物，包括 HLA-DR，CD38 和 CD45RO[410]。HIV 感染者显示 CD45RO 表达记忆细胞增加，相反，表达 CD45RA 的初始细胞减少。众所周知，CD45RO 细胞是 HIV 在体内复制的主要场地，离体实验较 CD45RA 细胞能产生更多的 HIV[237,411]。

HIV 感染者中发现 T 细胞克隆形成缺陷，CD34 骨髓祖细胞和胸腺细胞被感染，以及骨髓中发生了髓浆样改变。这些缺陷可能造成在疾病终末期 T 细胞重构障碍。

CD4^{+} T 细胞的耗竭机制

直接感染

CD4^{+} T 细胞功能障碍和耗竭是 HIV 感染的标志及免疫缺陷最主要的原因。CD4^{+} T 细胞是 HIV 在体内感染攻击的主要靶细胞[188,412]，体外实验证实 HIV 感染 CD4^{+} T 细胞可引起细胞病变[1,2,146,413-417]。人们由此推测：活体的 CD4^{+} T 细胞的直接感染 HIV 造成了 CD4^{+} T 细胞的耗竭。然而，大量研究活体 HIV 感染细胞比

率的资料提示,由 HIV 直接感染造成的单细胞死亡不是 $CD4^+$ T 细胞耗竭的主要机制。就这一方面而言,在 HIV 感染潜伏期,HIV 感染外周血 $CD4^+$ T 细胞的比例波动在 1/1000 ~ 1/10 000[201,298,412,418,419]。虽然随着疾病的进程,这个比例在增加,但 HIV 感染外周血 $CD4^+$ T 细胞的比例很少超过 1/100,甚至在 AIDS 患者中也未出现。在疾病的早期阶段,淋巴组织中受 HIV 感染的细胞比外周血多 0.5 ~ 1.0 个 log 单位,而更早期,这些组织中的比例是一致的[201,256]。在淋巴组织,细胞整合 HIV DNA 和活性表达病毒 mRNA 的比例一般 < 1%[321]。虽然通过原位杂交方法证实病毒的载量和表达远远高于预计,但数据表明单用直接感染来解释 $CD4^+$ T 细胞的耗竭是十分勉强的[420]。然而,需要指出的是,$CD4^+$ T 细胞的耗竭可能是由于一小群细胞受感染,病毒又复制,感染其他细胞,快速演变成大量细胞的死亡[136-139]。这些细胞群体也许不能被目前已知的方法测量到,需要更进一步的调查研究。

$CD4^+$ T 细胞受 HIV 感染后,细胞的死亡有各种各样的机制(表 44.3)。在病毒生活的早期,如胞浆中反转录病毒 DNA 的积聚,同其他反转录病毒系统细胞死亡相关连[421,422],并可能导致 HIV 感染的细胞死亡[146]。然而非整合 DNA 的积聚很显然不是单个受感染细胞死亡的惟一机制[423]。高水平病毒 RNA 和异常 RNA 分子在感染细胞胞浆中的出现,可能干扰了正常细胞 RNA 的处理[424,425]。

表 44.3　$CD4^+$ T 细胞耗竭-失调的机制

直接机制	间接机制
未整合病毒 DNA 的积聚	多核体形成
干扰细胞 RNA 的加工	自体免疫
细胞内 gp120 和 CD4 的自动融合	超抗原刺激
病毒芽生引起胞质膜	HIV 特异性的免疫因子清除 gp120 包被细胞
丧失其完整性	(如杀伤旁观者细胞)
HIV 特异性免疫反应引起	凋亡
感染细胞的清除	感染祖细胞、抑制血细胞生成

在 HIV 感染的细胞病毒复制装配的过程中,细胞内病毒包膜 gp120 分子的浓度很高。一些研究提示,细胞内 gp120 可能与胞内 CD4 分子相互作用,而这种相互作用导致细胞死亡[415,426]。这个机制可能是破坏了细胞膜的完整性发生了细胞自溶[427]。细胞膜完整性还受到病毒的出胞活动[428,429]和 HIV 介导的胞内单价阳离子浓度增高的危害[430]。

HIV 感染的细胞死亡也可能是与病毒引起的特异性免疫反应有关,这发生在细胞直接受病毒感染之前。各种作用机制可能都参与了 HIV 感染细胞死亡,包括细胞毒 T 淋巴细胞反应、ADCC、NK 细胞反应(图 44.10)(见下文"免疫应答")。

间接机制

多核体形成

鉴于一些分子之间的相互作用是维持正常免疫功能所必需的,HIV-1 包膜糖蛋白是重要的致病因子。HIV 包膜糖蛋白分子在病毒装配过程中嵌入宿主细胞细胞膜上,与外界接触受宿主细胞保护。这些 HIV 包膜糖蛋白分子与非感染细胞的相互作用可能造成大量细胞死亡。

病毒的侵入、病毒和细胞膜的融合,可使得 HIV 包膜糖蛋白、CD4 和共同受体分子产生相互作用。当表面带有 HIV 包膜糖蛋白的细胞通过适当的共同受体与非感染的 CD4 细胞相结合,类似的现象发生了。感染病毒的细胞与未感染的细胞融合,产生了多核巨细胞或合胞体,这在离体实验中早就被观察到[414,416,417,431-433]。其他参与多核体形成的分子有白细胞功能相关抗原(LFA)-1、CD7、HLA Ⅰ类分子[437]。多核体在 HIV 感染者的组织中很少发现[192,253,438-442],所以多核体的形成可能不是 $CD4^+$ T 细胞耗竭的主要致病因子。

自体免疫

在 HIV 感染的个体中，有自身免疫现象发生，而且这可能与 $CD4^+$ T 细胞耗竭有关。自身免疫是病毒成分和细胞凋亡过程中异常核抗原释放的结果。HIV-1 包膜糖蛋白的羧基末端和不同的 HLA-DR、DQ 等位基因的 N 端存在高度同源性区域[443]。用 HIV 包膜多肽作为免疫原产生的单克隆抗体能识别自身的 gp160 和 MHC Ⅱ类分子[444]。从 1/3 的 HIV 感染者中分离获得的丝氨酸可以和 gp41 和 MHCⅡ类分子的决定簇反应。这些丝氨酸能抑制正常的特异性抗原增生反应，也能通过 ADCC 作用清除Ⅱ类耐受细胞[444]。HIV 包膜成分和宿主蛋白都能导致致病性自身免疫反应，包括补体 C1q-A 的胶原样区域[445]，MHC1 类分子重链[446]，HLA-DR4 和 DR2 等位基因，T 细胞受体 α、β、γ 链的可变区域，Fas、IgG 和 IgA 的结域[447]，变性胶原[448]和许多核抗原[449,450]。

1480

超抗原

超抗原能与 T 细胞受体 V_β 链和 MHC Ⅱ类分子结合，能够激活具有独特的 V_β 链的细胞。超抗原刺激的结果干扰了具有特殊 T 细胞 V_β 家族细胞，导致细胞膨胀、缺失及功能障碍。能与一系列 T 细胞受体 V_β 家族成员相结合的超抗原可介导许多致病因子，包括葡萄球菌、支原体、弓形体和鼠乳腺肿瘤病毒[451~454]。

鼠白血病病毒介导的鼠免疫缺陷综合征的发病机制与病毒编码的超抗原表达有关，这一发现使得人们在 HIV 感染中进行了同样的研究[455]。HIV 感染患者外周血各种 T 细胞 V_β 家族成员的缺失进一步提示 HIV 可能编码超抗原[456]。HIV 感染者的 V_β^+ T 细胞的易感性及 $CD4^+$ $V_\beta2^+$ T 细胞对 HIV 的易感性，提示可能是超抗原在起作用[457~460]。然而，后来的研究显示这归因于 CMV 编码的超抗原，而不是 HIV 自身编码的超抗原[461]。HIV 感染中超抗原介导的发病机制假说依据是不足的。大量的研究发现 HIV 患者体内无超抗原样作用。一些研究发现在 HIV 感染过程中没有 T 细胞 V_β 族选择性的丧失[462,463]。另一些研究发现 T 细胞受体 V_β 家族混乱，这与超抗原介导的作用是不一致的[143,175,193,464]。

无辜旁观者现象

针对感染细胞的 HIV 决定簇的免疫反应可能同时也清除了携带 HIV 蛋白（如 gp120）在细胞膜表面的非感染细胞，通过抗体和细胞免疫反应攻击这些无辜旁观者细胞的现象已有所描述[465~467]。

凋亡

凋亡是程序性细胞死亡的形态学描述，它是每一个器官系统维持生理稳态所必须的[405,468]。凋亡细胞死亡特征是胞膜皱缩、核固缩、DNA 裂解、细胞内容物以小而致密的凋亡小体形式释放。凋亡小体被吞噬细胞摄入，这是细胞凋亡的最后一步。在细胞非生理性坏死过程中不伴有由细胞内容物溢出而产生的炎症反应。一系列生理刺激是凋亡的正向或反向调节者。重要的凋亡抑制剂有生长因子、细胞外基质、CD40 配体；重要的凋亡激活剂有 CD95 配体、TNF、转移生长因子（TGF）-β、神经递质和生长因子抑制剂。Bcl-2 基因在淋巴瘤中是个重要的致病因子，它能阻止细胞进入凋亡[469~471]，而 p53 基因则可激活细胞死亡[472~474]，这些发现阐明了与细胞存活时间延长或缩短相关的机制是与凋亡正常通路的调节障碍有关。

1990 年 Ascher 和 Sheppard 指出，HIV 发病机制主要是由于 HIV 包膜分子向 T 细胞传递了不适当的信号[475]。随后，1991 年 Ameisen 和 Capron 推测，细胞凋亡是 HIV 感染过程中 $CD4^+$ T 细胞耗竭的致病机制[476]。离体实验 HIV 急性感染 T 细胞介导了 T 细胞的凋亡[408,477]。而从 HIV 患者分离的 T 细胞较正常 T 细胞发生凋亡的比例增高，尤其是在激活后[407,478]。与病毒蛋白交叉结合的 $CD4^+$ T 细胞能诱发细胞凋亡，提示非感染的 $CD4^+$ T 细胞遇到抗原后能被不适当地清除，如果 CD4 分子交叉结合了 gp120[387,479]。病毒 Tat 蛋白也能促使细胞凋亡，这种效应可能与上调 CD95 配体或激活细胞周期蛋白依赖酶有关[388,389]。

HIV 介导的细胞凋亡是否在 $CD4^+$ T 细胞耗竭中扮演重要角色仍不得而知。较非感染个体，HIV 感染者淋巴组织的 $CD4^+$、$CD8^+$ T 细胞和 B 细胞凋亡比例增高[480]。凋亡发生的程度与免疫活性程度有关，主要是在非感染的旁观细胞中观察到[480,481]。一些研究支持 HIV 疾病与外周血 T 细胞凋亡易感性呈正相关[482]，另一些研究认为二者无正相关[483]。MuroCacho 等认为，淋巴组织中凋亡发生的强度与外周血 $CD4^+$ T 细胞数目及病毒血症水平无关[480]。认为凋亡在 HIV 感染的发病过程中起作用是根据在 HIV 患者和致病性 SIV 感染

的猿类均发现 CD4⁺ T 细胞凋亡频率增高，而感染非致病性 SIV 的猿类 CD4⁺ T 细胞凋亡频率未增高而得出的结论[406]。

感染祖细胞，抑制血细胞生成

正常的造血功能障碍显然是 HIV 感染过程中 CD4⁺ T 细胞耗竭的可能机制。CD34⁺ 祖细胞亚群表达 CD4，并且离体实验能感染 HIV-1[484-486]。是否 CD34⁺ 祖细胞是体内 HIV 的储库还是有争议的。大量研究显示，在多数 HIV 感染个体没有发现感染 HIV 的 CD34⁺ 祖细胞[487-490]；然而，Stanley 等研究显示，少数伴严重 CD4⁺ T 细胞缺乏的 HIV 患者有感染 HIVCD34⁺ 祖细胞库[491]。最近报道发现，CD34⁺ 祖细胞表达 CXCR4[492]，提示这些细胞的 CD4⁺ 亚群易感染 T 型 HIV 病毒株（该细胞株在 HIV 晚期阶段占优势），进一步证实了早期 Stanley 及同事们的发现。

1481

虽然 CD34⁺ 祖细胞直接受感染在 HIV 发病机制中的作用仍有争议，但大量证据显示，病毒蛋白和 HIV 介导的细胞因子能阻碍这些细胞生存和繁殖增生的能力。HIV 感染后 CD34⁺ 祖细胞表现无克隆生成能力[493]；由 HIV 患者骨髓中提取的未感染的 CD34⁺ 细胞也无克隆生成能力[490,494,495]，而且在培养中也发生凋亡，HIV 包膜 gp120 和 Tat 蛋白与 CD34⁺ 祖细胞的这些效应有关[497,498]，也许是因为 gp120 和 Tat 介导了 TGF-β 的上调[498,499]，或 gp120 介导了 TNF-α 的上调[500]。

胸腺微环境的破坏[501]和 HIV 介导的胸腺细胞的缺失可能使得 CD4⁺ T 细胞不能及时得到补充。胸腺上皮细胞正常分泌 IL-6，后者反过来增加已感染细胞 HIV 的复制[502]。离体实验胸腺 CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ 细胞亚群是易感染 HIV 的[503]，HIV 患者体内的胸腺 CD3⁻ CD4⁺ CD8⁻ 祖细胞也易受 HIV 感染的。HIV 感染者的胸腺细胞大部分最终发生凋亡，提示淋巴细胞生成障碍的间接机制也是可能的[504]。

CD8⁺ T 细胞

在 HIV 疾病全过程中，CD8⁺ T 细胞水平是可变的。急性初期感染之后，CD8⁺ T 细胞数目通常要反弹超过正常水平，而且可能持续升高较长时间。在疾病晚期，CD8⁺ T 细胞数目的增加部分反映了 HIV 特异性 CD8⁺ CTL 效应的增强。

HIV 特异性 CD8⁺ CTL 细胞已在 HIV 感染者疾病初期被发现，它们的活性能在外周血淋巴细胞中检测，而不需预先体外刺激处理[212,213]。HIV 疾病进程中，CD8⁺ T 细胞出现一个异常表型，它特征表达一些活性标志物，且 CD25、IL-2 受体表达缺失。改变 HIV 感染者 CD8⁺ T 细胞表型可能有前瞻性意义。尤其是那些 CD8⁺ T 细胞表达 HLA-DR 而不是 CD38 的个体在进行血清转化实验之后，他们 CD4⁺ T 细胞的数目会稳定且预后较好，而那些 CD8⁺ T 细胞同时表达 HLA-DR 和 CD38⁺ 的个体经历了血清转化后，CD4⁺ T 细胞耗竭更快和预后更糟[290,505,506]。缺乏 CD28 表达的 CD8⁺ T 细胞数目在 HIV 疾病中的增加，可能反映了 CD8⁺ CD28⁻ CD57⁺ T 细胞亚群在体内激活了 CTL 细胞[507,508]。疾病进程中 CTL 活性的丧失不仅局限于 HIV 特异性 CTL，因为观察到对其他一般的抗原包括 EBV、结核分枝杆菌的细胞毒活性也丧失了[509,510]。

除了 CTL 活性，CD8⁺ T 细胞的其他功能在 HIV 疾病进程中也受损，包括非溶细胞的非 MHC 限制的 CD8⁺ T 细胞性抑制 HIV 作用的丧失。对 CD8⁺ T 细胞释放的因子进行分析，随着病程进展，CD8⁺ T 细胞相关抑制因子活性（又名 CD8 抗病毒因子，CAF）减少了。相反，MIP-1α、MIP-1β 和 RANTES 水平（CD8⁺ T 细胞分泌的可以抑制 HIV 复制的因子）等[79]，在 HIV 疾病进程中却未减少[511~518]。

树突细胞

树突细胞（dendritic cells，DC）是通过阴道黏膜感染 SIV 的第一类细胞（见上"HIV 感染和发病过程"），已有研究表明，可能是由于病毒通过转移至淋巴器官，引起 CD4⁺ T 细胞感染和病毒传播。由于树突细胞的多谱系和用于不同研究中离体测定系统的差别。树突细胞在 HIV 感染中的作用是有争议的。

DC 对 HIV 的体外非易感性和体内的易感性

最初发现，从正常志愿者外周血中分离的 DC 在体外对 HIV 表现出高度不易感性；而源于 HIV 感染者分

离的 DC 在体内对 HIV 却有易感性,不过这些早期实验使用细胞并非纯细胞系[519~522]。在以后的研究中出现不同的结果:一些研究小组发现,通过阴性选择从外周血中分离出的 DC 很容易被多种 HIV 病毒株感染[523-527];与此同时,其他小组采用相似方法分离的外周血 DC 对 HIV 没有感染性[190,528,529]。根据树突形态鉴别外周血中的多细胞系可能是产生这种差别的原因[190,530,531]。分析外周血中不同树突细胞对 HIV 的易感性,仅有一种细胞对在体外易感染 HIV[190]。在对感染 HIV 个体中分离出的树突细胞的研究中得出相矛盾的结果:有人发现树突细胞感染性极强[520],而有人发现该细胞不会感染 HIV[532,533]。

大量研究已证实,树突细胞发生生产性感染 HIV 病毒的可能性很小。对于来源于感染 HIV 患者皮肤的 LC(DC resident in the epidermis,位于表皮的 DC)偶尔会发生感染;但是,这种感染的发生率极低,很少接近外周血 $CD4^+$ T 细胞的感染水平,通常低 10~100 倍[534~543]。淋巴器官中树突细胞的感染研究受到诸多限制。有研究发现,相同个体脾 DC 感染 HIV 的发生率大约较 $CD4^+$ T 细胞的发生率低 2 个数量级[543]。利用淋巴结活检技术,从感染 HIV 患者的不同阶段进行组织切片,以 DC 标记物作免疫组化和 HIV RNA 的原位杂交检测[130]。未发现 DC 和 HIV 皆染色的细胞,说明这些器官中 DC 在疾病的各个阶段的树突细胞很少感染 HIV。上述结果揭示树突细胞在组织中获得抗原,在淋巴器官中激活 T 淋巴细胞,且树突细胞很少感染 HIV。

来源于正常皮肤的 LC 容易感染 HIV,尽管病毒的增殖能力很低[535,536,544,545]。HIV B 型病毒,常见于欧洲和美国,在体外 LC 中复制能力差,而 E 型病毒常见于东南亚,复制能力却很强[546]。以上发现可以部分解释 HIV 感染在美国、欧洲、非洲、亚洲及印度与非洲亚撒哈拉地区的流行病学差异。在美国和欧洲,大部分 HIV 感染者主要是同性恋者和注射吸毒者,而非洲、亚洲和印度大于 90%HIV 感染主要通过异性接触[547-556]。因此,一种能在 LC 中良好复制的 HIV 病毒亚型,就如通过黏膜接触启动的病毒感染可以十分有效地在异性间传播[189]。这些发现具有争议,对于不同 HIV 病毒的细胞趋化优先性是否在 HIV 传播的世界流行病学中起作用还需进一步的研究。 1482

HIV 感染的 DC 的耗竭和功能紊乱

HIV 疾病中树突细胞的损伤和功能紊乱如上述感染性一样具有争议。感染 HIV 的外周血 DC 的数目与未感染个体相比较,有的降低[520],有的升高[557]或没有变化[558]。众多研究表明,感染与未感染 HIV 者的各个阶段,LC 在皮肤细胞中的百分率没有变化[542]。HIV 感染者各病程阶段的淋巴结组织,用 DC 标记染色和光镜检查以分析淋巴器官的改变。病毒分析并未揭示淋巴结副皮质区 DC 的选择性损失;而 DC 的损失与淋巴样结构的破坏及纤维样变程度相一致[130]。

至于 HIV 感染对 DC 激活 T 细胞功能的影响,也出现相矛盾的结果。有研究显示,HIV 感染者外周血树突细胞较未感染者的树突细胞,激活 T 细胞的能力有所下降[520,525,559,560],而另有研究却发现二者激活同源 $CD4^+$ T 细胞没有差别[558]。以上所有的实验使用的 DC 均不同程度存在体外培养,冗长的纯化程序及多种血细胞均存在干扰。在研究单卵双双生子 HIV 感染的非协调性的实验中,从两个人体内分离树突细胞,而后分别与各自的 $CD4^+$ T 细胞、同胞的 $CD4^+$ T 细胞及异源性 $CD4^+$ T 细胞共同培养。与未感染 HIV 的同胞相比,并未发现 HIV 感染者 DC 抗原呈递给未感染的 T 细胞的能力的缺陷。仅发现感染 HIV 者的 DC 激活异源 T 细胞的能力下降[542]。树突细胞损伤和功能紊乱是否参与了 HIV 病理过程,仍需进一步研究证实。

B 淋巴细胞

HIV 感染可导致 B 淋巴细胞数量减少[561],但通常持续时间较短,也可能至少部分反映了细胞进入淋巴组织中的再分布。急性 HIV 感染后,出现高丙种球蛋白血症和淋巴细胞过度激活。所有的抗体类型均表现出免疫球蛋白升高。大部分免疫球蛋白至少在感染早期可特异性地对抗 HIV 抗原。有研究认为,在感染早期多数激活的 B 淋巴细胞产生抗体对抗 HIV[562]。B 细胞对初级或次级损害的包括蛋白或多糖抗原反应能力的减弱,一定程度上可能源于 $CD4^+$ T 细胞的缺失。B 细胞激活的失调和对抗原反应能力的下降,可能是 HIV 感染者易出现细菌感染的原因之一,同时由于感染 HIV 的儿童对常见病原体的缺乏充分的体液免疫应

答,其发病率和死亡率与细菌感染密切相关,

HIV 患者的 B 细胞分泌 TNF-α 和 IL-6 增多,这些细胞因子可加强 HIV 的复制[563-565],结合在细胞表面的 TNF-α 可诱导 HIV 在感染的 $CD4^+$ T 细胞中的增殖[566]。淋巴微环境中 B 细胞致炎细胞因子的分泌和 TNF-α 的表达可导致这些组织中 T 细胞的激活和 HIV 的增殖。

HIV gp120 蛋白可直接结合免疫球蛋白链(VH3),以超抗原的特性激活 B 细胞[567,568]。这种非抗原依赖性多元活化作用,可能是导致 HIV 感染高丙种球蛋白血症和淋巴细胞过度激活的原因之一。HIV 的其他部分,包括 gp41,通过非抗原介导的方式直接活化 B 细胞[569]。HIV 感染者 B 细胞功能失调可导致体外 EB 病毒的自发转变,这可能与 EB 病毒诱导的淋巴瘤发生率增加有关[570-572]。

有研究发现 HIV 感染者中 IgE 水平全面升高,可能是 IgE 调节功能失调的反映。IgE 升高的原因现在并不清楚,但 B 淋巴细胞的过度激活和细胞因子的功能失调可能是原因之一。随着病情加重,IgE 升高更为明显[573,574]。研究表明,花粉特异性 IgE 的升高与总 IgE 的变化无关,变态反应原特异性 IgE 随疾病的进程而降低[573]。感染 HIV 的小儿体内总 IgE 水平升高,而变态反应特异性 IgE 未出现改变,表明 IgE 的水平是多克隆激活型。有研究发现 IgE 的升高与 SI 病毒的感染程度相关[575]。在 HIV 感染的儿童体内,增殖的 B 淋巴细胞不表达 CD23(IgE 受体)和 CD62L(L 选择蛋白),可能是产生 IgE 失调的原因之一[576]。

多形核白细胞

HIV 感染的各阶段均可检测中性粒细胞功能缺失。从无症状的 HIV 感染患者体内分离的中性粒细胞四唑氮蓝(nitroblue tetrazolium,NBT)染色密度升高,表明细胞激活作用的增强[577]。从这些 HIV 患者体内分离的血浆可激活健康人体内的中性粒细胞,证实血浆中有中性粒细胞刺激因子的存在。此外,发现来自相同个体血浆中的 *N*-乙酰半胱氨酸低,证明由于氧自由基产物的增加可导致抗氧化效应的耗损[578]。在 $CD4^+$ T 细胞数远远多于 200/μl 的 HIV 感染个体中,GM-CSF 刺激后中性粒细胞的氧化能力也增强[579]。HIV 感染过程中中性粒细胞的缺陷有许多争议,可能是由于体外细胞的制备和分析有差异。在不需纯化的情况下用流式细胞分析中性粒细胞,来自 HIV 感染个体的人中性粒的细胞呈现了黏附分子表达的增加,CD62L 的表达下降及肌动蛋白聚合作用和 H_2O_2 产物的增加[577],提示中性粒细胞已活化。中性粒细胞受调理素作用的活化是明显不平衡的,并与疾病进展相关[580]。与正常对照组相比,来源于 AIDS 患者的中性粒细胞凋亡频率明显增高。HIV 感染个体的血清不能转变来源于健康、未感染个体的中性粒细胞增长凋亡活性[581]。GM-CSF 加入到鉴定系统明显降低了 AIDS 患者的中性粒细胞凋亡[581],与来源于正常捐献者的中性粒细胞相比,脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)或念珠菌(candida)抗原能刺激来自 HIV 感染者的中性粒细胞产生更多的 TNF-α 和 IL-6[582]。

HIV 感染者的中性粒细胞功能失调有多种临床意义。HIV 感染,尤其对于女性,是以念珠菌感染的发病率和严重性增加为特征的。有研究比较了来自 HIV 感染者和正常对照个体的中性粒细胞吞噬和杀伤白色念珠菌(candida albicans)的能力,AIDS 患者的中性粒细胞显示了吞噬病原体的能力增强,产生活性氧的能力相似,杀伤念珠菌的能力却降低,提示非氧化作用杀伤的一种缺陷[583],中性粒细胞杀伤念珠菌能力下降的一种可能机制认为,在 HIV 疾病中 IL-10 增加,抑制中性粒细胞杀伤念珠菌[584]。

HIV 感染时也可看到嗜酸性粒细胞异常。HIV 感染个体嗜酸性粒细胞数不同于其他血细胞维持的降低状态。但是,它们在患者亚群中也可增加[525],体外嗜酸性粒细胞表达低水平 CD4 并受 HIV 感染,导致了生产性感染和凋亡[586],即便事实是如此的话,体内嗜酸性粒细胞感染的意义目前还不清楚。

单核细胞与巨噬细胞

单核细胞在 HIV 感染中起着重要作用,它是感染的储库、组织中某种病理过程的介质、细胞内病原体破坏的免疫调节者和其他细胞的活化剂。HIV 感染个体外周血单核细胞数一般是正常的,因为在单核细胞表面表达 CD4 和多种 HIV 共同受体,包括 CCR5、CXCR4 和 CCR3,成为 HIV 感染的靶分子[129]。不同于 HIV 导

1483

致 CD4⁺ T 细胞溶解，HIV 对于单核细胞致病效应较弱，并且 HIV 在这些细胞中能大量复制[587,588]。实验发现体循环中单核细胞很少被感染，在体外也难以感染[188,588,589]；但是，在组织的巨噬细胞包括大脑中的小神经胶质细胞、肺泡巨噬细胞和单核细胞来源的成熟巨噬细胞，则容易感染[213,590~592]。此外骨髓的单核前体细胞可能与 HIV 感染个体某些血液学异常有直接或间接的联系。

在体外给予正常的单核细胞 HIVgp120 或 Tat 可导致这些细胞的异常激活[593]。体外感染源于健康者的单核细胞可使其 ADCC 效应减弱并杀灭细胞内的 *Candida pseudotropicalis*[594]，还可抑制 Fc 及 C3 介导的吞噬作用[595]。源于 HIV 感染者的单核细胞显示出诸多功能上的异常，在 HIV 疾病的早期及晚期可见其氧化能力的降低[596,597]。另外可见细胞趋化作用和移行能力的减弱[44,598,599]。

自然杀伤细胞

NK 细胞推测的作用可能是对同种异体细胞、病毒感染细胞和某些肿瘤细胞起免疫监视作用(第 17 章)。HIV 疾病过程中可见到 NK 细胞异常，并且这些异常随着疾病的进展而增加。大多研究报道在 HIV 感染的个体 NK 细胞的数量和表型是正常的；但是，也有报道随着一种相关活性标记物的增加，NK 细胞 CD16⁺/CD56⁺ 亚型数量下降[600,601]。从 HIV 感染个体来源的 NK 细胞失去了对靶细胞的杀伤能力下降。NK 细胞溶解细胞功能的异常发生在 NK 细胞与靶细胞结合后[602]。而且 NK 溶解机制是其正常功能的表现，因为 HIV 感染个体来源的 NK 细胞能介导 ADCC[603]。NK 活性缺陷的可能机制包括缺失维持最适功能所必要的细胞因子。此外，无论是 IL-2、IL-12 还是 IFN-α 均有助于 HIV 感染个体的 NK 细胞体外功能缺陷增加[604]。

细胞活化在 HIV 发病过程中的作用

免疫系统的主要功能是识别异体抗原，发动对致病原的反应并清除它们，然后回到一种休眠状态，对其他抗原能产生有效应答和对相同抗原的再次侵入有更强的效应。对于 HIV 感染，免疫系统对于持续 HIV 复制的应答是逐渐被激活的。HIV 通过诱导免疫活化并利用这种有利于自身复制的优势环境来破坏免疫系统[166,376,381,475]。一些免疫系统激活的表现包括 B 细胞的功能亢进导致的高丙种球蛋白血症、自发淋巴细胞增殖、单核细胞活化、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的活化标记物表达增加、尤其是疾病早期的淋巴增生、炎症细胞因子分泌增加，新蝶呤水平增加，β2 微球蛋白、酸性稳定干扰素、可溶性 IL-2 受体的增加以及自身免疫现象。

1484

大量实验表明，体内 HIV 复制依赖于抗原诱导的 CD4⁺ T 细胞活化。间接感染或各种疫苗免疫的 HIV 感染个体都有血浆病毒血症的暂时增加，并且与诱导产生的免疫活性程度相关；类似的发现也可见于 SIV 感染的恒河猴中[605~610]。在流感疫苗或破伤风类毒素接种后或结核分枝杆菌感染活化期间，病毒复制的数量与 HIV 疾病程度呈负相关[607,609,610]。HIV 疾病晚期的个体其病毒复制轻度增加，而疾病早期个体血浆病毒大大升高，由此认为免疫系统对抗原应答能力与病毒的数量有关[609,610]。而且，来自破伤风病毒免疫的 HIV 感染个体的 PBMC 体外用破伤风抗原刺激，或者来自纯化蛋白衍生物(purified protein derivate, PPD)阳性的 HIV 感染个体的 PBMC 体外用 PPD 或活的结核分枝杆菌刺激，疾病早期的个体比疾病晚期个体表现出对各种抗原更强的增生反应，并且其病毒复制也明显增加[607,609,611]。这些研究说明，病毒复制的水平与免疫系统对一种抗原的应答程度相关。其他试验还分析了 HIV 感染个体的淋巴组织，在脾白髓中，抗原特异性免疫应答受限(根据 T 细胞受体 Vβ 基因分析)，并且每种免疫应答包括一种或几种 HIV[157]。这些资料表明在抗原特异性免疫应答中，反应开始时存在一种 HIV 病毒，在 T 细胞活化过程中传播扩散，因此随着特异性抗原激活 CD4⁺ T 细胞，HIV 也在不断的产生是非常可能的。

缓慢的免疫活化其潜在的有害效应是巨大的。从免疫学的角度看，免疫系统对抗原刺激的活化是维持正常的免疫功能所必需的，但是，免疫系统长期缓慢持续的暴露于一种特殊抗原也可能导致对抗原免疫应答能力的下降，此外，免疫系统对某种广谱抗原的应答能力也可能受损。从病毒学角度看，虽然静止期 CD4⁺ T 细胞能被 HIV 感染，但 HIV 的反转录、整合和传播在活化 T 细胞中更有效率[40,41]。此外，细胞活化可诱导

HIV 在静息期的 CD4⁺ T 细胞中表达[218]。这些现象表明 HTV 诱导免疫活化能有效促进 HIV 复制。

细胞因子与 HIV

细胞因子(第 21 和 22 章)是炎症、激活、分化及趋化的可溶性介质,对 HIV 复制有复杂的效应[166,612,613](图 44.16);某些细胞因子(如 TNF-α)通过激活 NF-κB 直接诱导 HIV 表达,而其他则通过改变靶细胞的激活或分化状态来发挥作用。HIV 感染可诱导 TNF-α 和 IL-6 以及其他细胞因子的产生,它们以自分泌和旁分泌的方式上调 HIV 的复制。HIV 包膜蛋白也能直接诱导许多细胞因子的释放,提示一种细胞的 HIV 感染并不是只导致某一种细胞因子的释放。许多模型系统的体外研究把整个 HIV 调节性活化归因于个别细胞因子;这些细胞因子是诱导还是抑制 HIV 依赖于所用的体外系统。一种细胞因子对 HIV 复制的体内作用难于预测,因为多数体外系统只反应了整个免疫系统内可能的相互作用中的一小部分。但是细胞因子可能是体内 HIV 复制的重要调节者,在 HIV 感染个体,HIV 诱导细胞因子和 HIV 抑制性细胞因子之间的平衡对于决定感染个体的病毒复制状态起着重要作用[166,612,613](图 44.17)。细胞活性的改变、细胞因子环境的变化以及抗炎症细胞因子的参与都会对 HIV 复制起着重要作用。

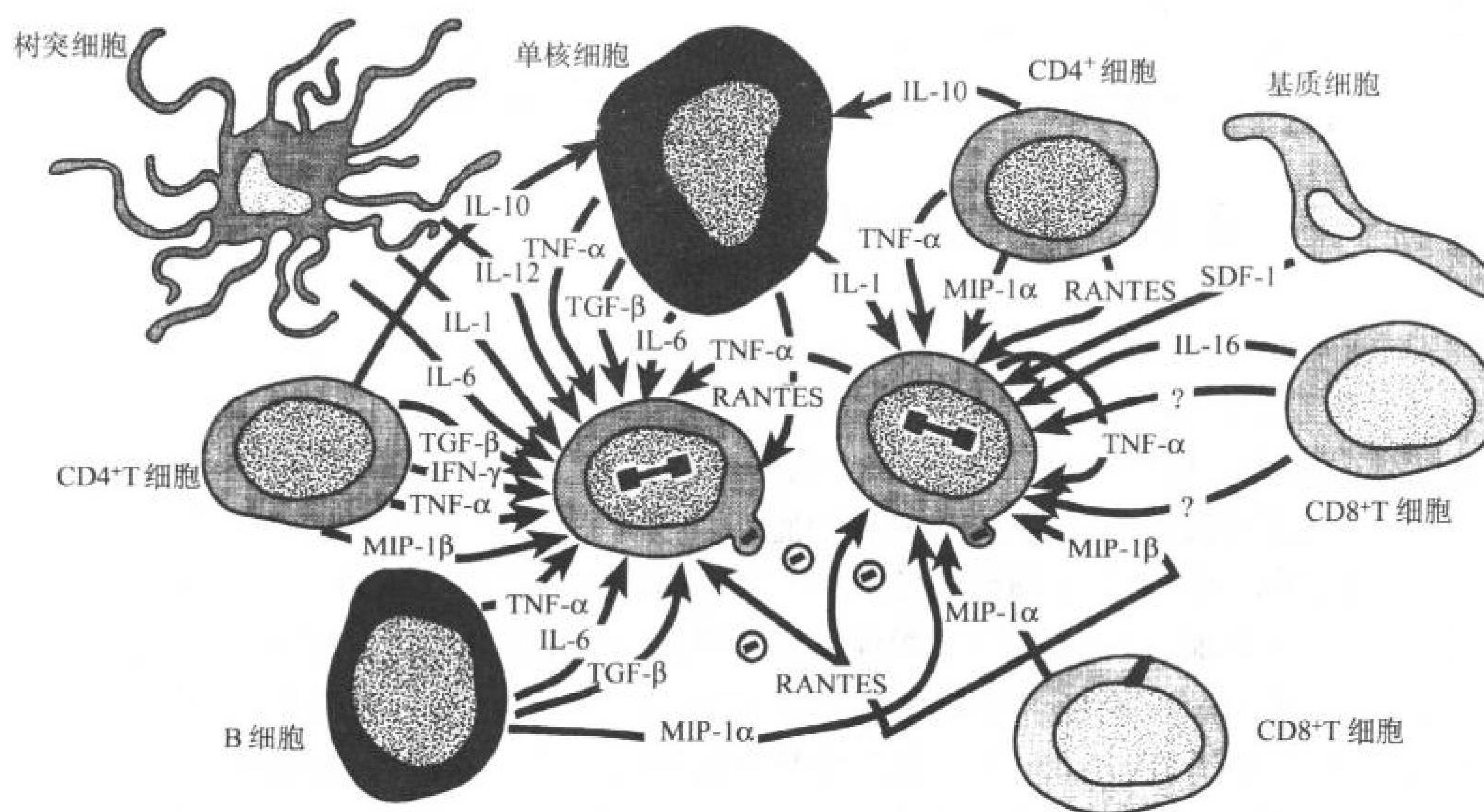


图 44.16 影响 HIV 的细胞因子网络。内源性细胞因子调节 CD4⁺ T 细胞内的病毒复制。许多细胞因子尤其是原炎性细胞因子如 TNF-α、IL-1β、IL-6 对病毒复制有明显的上调效应;TGF-β 和 IL-10 则可下调病毒复制,而对 IL-10,其效应部分与下调前炎性细胞因子的作用有关,β 趋化因子(包括 CD8⁺ 及 CD8⁻ 单核细胞在内的许多类型的细胞均可分泌)可强烈抑制 M 型 HIV-1 病毒株的感染;而 SDF-1 则抑制 T 型病毒株的感染。

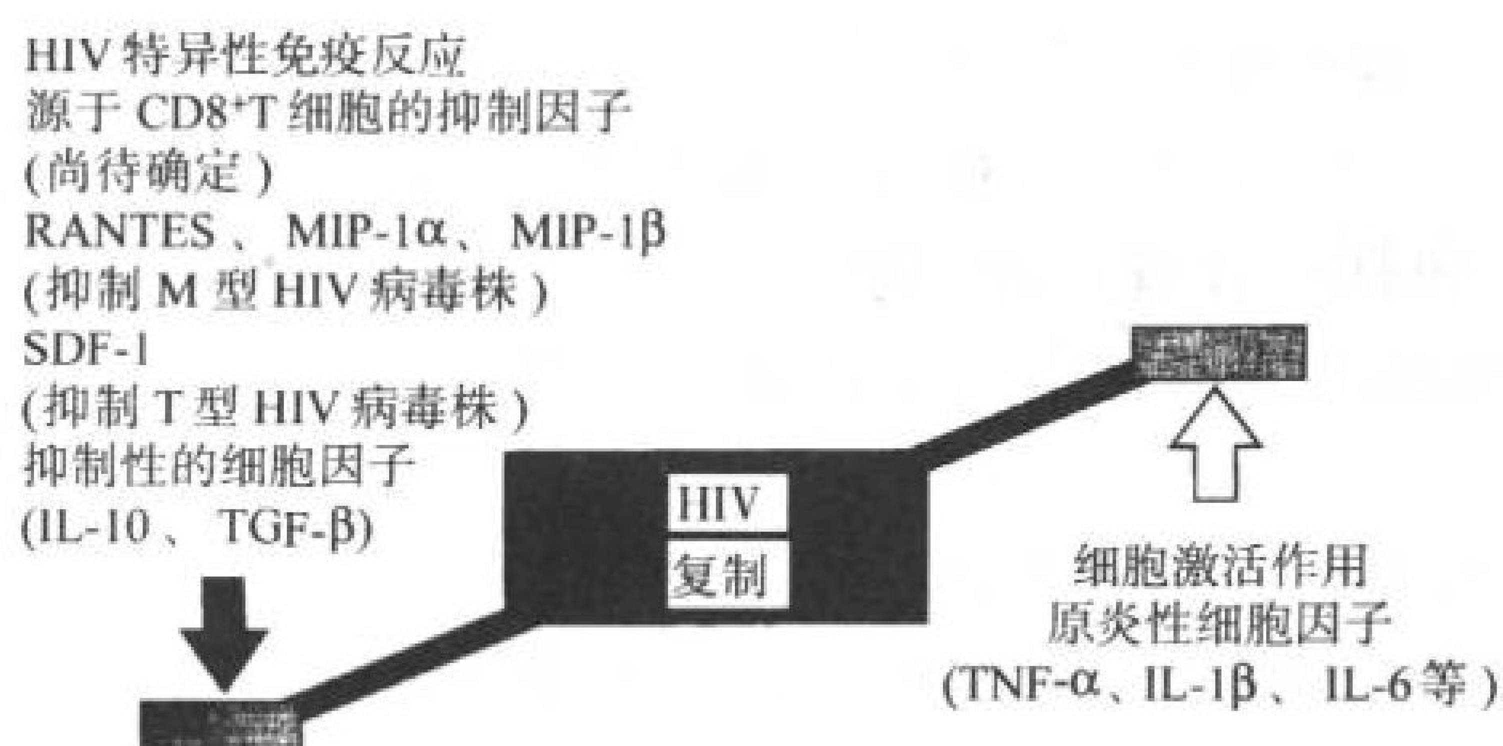


图 44.17 宿主因子决定 HIV 复制净比率的精巧平衡。

细胞因子对 HIV 复制的影响

多种细胞因子包括 IL-1β、IL-2、IL-6、IL-12、TNF-α 和 β、M-CSF 和 GM-CSF 体外诱导 HIV 复制。其他细胞因子包括 IL-4、TGF-β、IL-10 和 IFN-γ 则有双重的作用,某些细胞因子包括 IFN-α 和 β,IL-13 只有抑制 HIV 复制的作用[614](表 44.4)。α、β 趋化因子对于病毒复制也有作用,这些作用大部分是抑制性的,但是在某些情况下,这些细胞因子能上调病毒

复制[166]。细胞因子调节的培养细胞大体分为转化细胞系和原代细胞，进一步又可分为急性感染系统和内源性感染系统，前者HIV分别加入未感染过的细胞系或来自健康、未感染个体的细胞；后者为来自HIV感染个体的长期感染细胞系或细胞，感染细胞已产生复制病毒。慢性感染的单核细胞或T细胞系，来自HIV感染个体外周血或淋巴结单核细胞的原代培养细胞，以及急性感染的原代培养细胞的大量体外模型系统，均显示细胞因子对HIV表达的调节作用。此外，通过利用内源性细胞因子或把外源性细胞因子加入培养细胞，也证明了细胞因子在HIV表达中的调节作用。

表 44.4　细胞因子及细胞因子相关的分子对 HIV 复制的调节作用

细胞因子	效应	
	对T细胞	对巨噬细胞
IL-1β	↑	↑
IL-2	↑	nd
IL-3	nd	↑
IL-4	↑	↑↓
IL-6	nd	↑
IL-10	↓	↑↓
IL-12	↑	nd
IL-13	nd	↓
IL-15	↑	nd
IFN-α	↓	↓
IFN-γ	↑↓	↑↓
TGF-β	↑↓	↑↓
GM-CSF	nd	↑
M-CSF	nd	↑
TNF-α/β	↑	↑
CD30	↑	↑

↑，促进病毒复制；↓，抑制病毒复制；nd，未有检测资料或无明显效应。

研究最多的HIV复制激活因子是炎症细胞因子如INF-α、IL-1β和IL-6。体外HIV感染直接上调TNF-α的产生，而且TNF-α体外可增加HIV的复制[614]。TNF-α可引起病毒RNA、蛋白质和病毒颗粒的产生增加[279,615]，并发现HIV复制的提高是由于NF-κB蛋白活化，后者结合病毒LTR的NF-κB位点而增加了转录[49,616,617]。外源性TNF-α刺激单核细胞来源的巨噬细胞(monocyte-derived macrophage，MDM)或活化的PBMCS，导致HIV复制提高；而通过加入中和抗体或可溶性受体抑制内源性TNF-α产生则导致HIV复制下降[618,619]。TNF受体家族的另一成员，CD30，能在慢性感染的T细胞系以一种NF-κB依赖、TNF非依赖方式刺激HIV复制[620,621]。

1485

单核细胞系中IL-1β通过不依赖于NF-κB的转录和转录后机制直接激活HIV复制。IL-1β与各种细胞因子包括IL-4、IL-6起协同作用，在慢性HIV感染的前单核细胞U1细胞系中诱导HIV表达；此效应能被IL-1受体拮抗剂抑制[587,622,623]。加入中和抗体或IL-1拮抗剂抑制活化PBMC内源性IL-1β产生，导致病毒复制的抑制[619]，在慢性感染的单核细胞系IL-6诱导HIV复制并与其他细胞因子包括TNF-α起协同作用。在U1前单核细胞系，IL-6对HIV活化作用似乎主要是转录后；但是，当IL-6加入到TNF-α刺激的细胞中，可以观察到转录作用增强[622]，在培养的活化PBMC中内源性IL-6产生下降也导致了病毒复制的减少[619]。

IL-2对于活化的CD4⁺T细胞是HIV复制最有效的刺激因子，因为HIV复制依赖于T细胞增殖[1,3]，在缺乏T细胞增殖情况下IL-2对于HIV复制没有增强作用[624]。把IL-2加入到急性感染的PBMC或来自HIV感染个体的CD8⁺T细胞缺失的PBMC中导致多种细胞因子，包括IL-1β、IL-6、TNF-α和IFN-γ的产生，这些内源性细胞因子的中和作用阻碍了病毒复制，提示IL-2能诱发HIV引起的一种自分泌和旁分泌细胞因子环[618,619,625]。但是，在炎症性细胞因子相对独立的系统，IL-2也能增加HIV复制，提示IL-2诱导HIV复制有多种机制[626]。虽然IL-2能增加M型HIV共同受体CCR5在CD4⁺T细胞上的表达，但如后面将要讨论的那样，IL-2加入到HIV感染的个体并没有导致血浆病毒血症水平的增高。

1486

抗原呈递细胞包括单核巨噬细胞和DC，产生的IL-15利用IL-2受体(β链)部分传递信号。无论在HIV⁺还是HIV⁻的个体中，IL-15像IL-2一样诱导许多相似的LAK活化和IFN-γ增强的活化。同样地，二者诱导PBMC中HIV复制，虽然许多报道认为与IL-2相比，IL-15诱导产生的p24更少[627,628]。同时也认为IL-15与HIV感染个体的高γ球蛋白血症有关[629]。

IL-4、IL-10、IL-13、TGF-β和IL-1拮抗剂均有抗炎症活性，因为它们抑制了炎症介质IL-1β、IL-6和TNFα的产生或效应。此外，除了抗炎效应，每种细胞因子都有不同的或部分交叠的免疫活性(第21章)，并且每种都能调节HIV的表达。IL-4根据培养条件不同可诱导或抑制对MDM的感染性[587,630,632]。IL-4无论是单独还是与IL-2协同作用，在CD4⁺T细胞中都是一种对HIV复制非常有效的刺激因子，可能是通过其T细胞生长因

子活性来增加这些细胞的生长速率[624]。IL-10 在 CD4$^+$ T 细胞急性和内源性感染系统有效地抑制 HIV 复制，其机制之一是抑制 T 细胞活化和增殖[626]。IL-10 也在 MDM 中抑制 HIV 复制[633~639]。IL-10 浓度高时，抑制 HIV 诱导的 TNF-α 和 IL-6 的释放；这些细胞因子（IL-6、TNF-α）外源性补充可恢复病毒复制[639]。低浓度的 IL-10对于 INF-α 和 IL-6 的抑制是不完全的，可以观察到 HIV 复制并没有被抑制，并且还轻度升高[639]。在慢性 HIV 感染的 U1 细胞系，单独使用 IL-10 对于 HIV 复制无效，但是与许多细胞因子如 IL-1β、IL-4、IL-6、TNF-α 和 GM-CSF 可协同增加病毒产生[640~642]。IL-13 以未知的机制抑制 HIV 感染 MDM[630,643]；这种作用可能依赖于感染细胞的不同成熟阶段[644]。TGF-β 对急性感染 HIV 的 MDM 病毒复制有不同效应，依赖于细胞因子加入时间与感染时间的关系[645,646]。在慢性感染的单核细胞系，TGF-β 阻碍 PMA 或 IL-6 诱导的 HIV 产生[645]。IL-1 拮抗剂通过阻抗 IL-1β 抑制 IL-2 刺激的 PBMC 中 HIV 的复制[619]。此外，LPS 和 GM-CSF 刺激的慢性感染的单核细胞系，IL-4、IL-13 和 TGF-β 通过增加内源性 IL-1 拮抗剂与 IL-1β 比率来抑制 HIV 表达[647]。因此，虽然这些抗炎症细胞因子的每一种对 HIV 复制在不同系统都有多种效应，但相同的是它们至少都能抑制炎症细胞因子部分效应，抑制 HIV 的产生。

在 MDM 中，集落刺激因子 GM-CSF 和 M-CSF 都是 HIV 复制的有效刺激因子。HIV 感染 MDM 的最初研究就是在体外用 GM-CSF 和 M-CSF 促进巨噬细胞的成熟并获得 HIV 有效感染[648~652]。GM-CSF 用于 HIV 疾病晚期白细胞减少症的临床试验，结果 GM-CSF 使总细胞数、单核细胞和中性粒细胞增加 2 倍，并在整个治疗过程得以维持，没有检测到副作用或血液中病毒升高[653,654]。同样地，用 GM-CSF 治疗 HIV 感染儿童的研究中也发现白细胞和中性细胞数有相似的增加[655]。因此，虽然中 GM-CSF 是体外 MDM 中 HIV 复制的一个有效诱导因子，但是接受该种细胞因子的成人或儿童没有发现病毒复制增加，这可能是由于大多数患者同时接受了抗逆转录治疗。

干扰素在多种体外系统对 HIV 复制有作用。活化的 CD4$^+$ T 细胞和 MDM 中 IFN-α 和 IFN-β 从病毒生长周期的多个环节抑制 HIV 复制。急性感染的活化 T 细胞和单核细胞，阻碍作用主要发生在原病毒形成和整合之前[656]。在慢性感染的细胞系，至少鉴定了两种抑制机制，一种是阻碍病毒的装配和释放[657]，第二种是抑制病毒转录[656]。IFN-γ 以自分泌形式增强 CD4$^+$ T 细胞中 HIV 复制[619]。MDM 和慢性感染单核细胞系中，当在感染前加入 IFN-γ，提高病毒复制；而感染后加入则抑制病毒复制[659]。抑制病毒的机制类似于 IFN-α[657]。以前普遍用 IFN-α 治疗卡波西肉瘤，但其临床试验在 HIV 病方面至今还未取得可喜的进展[660]。

MIP-1α、MIP-1β 和 RANTES 通过阻止 gp160 与 CCR5 相互作用和随后病毒与细胞膜的融合，抑制 M 型 HIV 感染 CD4$^+$ T 细胞[79]。但是，这些化学因子也能利用 CXCR4 进入细胞而增强 T 型病毒的复制（A. Kinfer and A. S. Famci；未发表资料）。它们也增强 MDM 中 M 型病毒的复制[661]。在大多数研究中，MIP-1α，MIP-1β 和 RANTES 的水平在不同个体间有差异，但是在 HIV 感染个体疾病的各个时期血浆和有丝分裂原刺激 PMCS 中没有明显差异[511~518]。SDF-1（CXCR4 的配体）被证明是通过阻碍病毒融合和进入细胞而干扰 T 型病毒的感染。

1487

HIV 对细胞因子产生及网络的影响

HIV 对细胞因子的产生影响体内外均有多种作用，包括由于感染细胞或病毒与细胞表面结合的直接作用，以及通过应答病毒感染介导的间接作用，可溶性病毒蛋白也能直接诱导某些细胞因子。HIV 导致细胞因子网络失调的作用是多因素的，细胞因子产物的改变，如炎症细胞因子增加有利于 HIV 复制，而其他如 IL-2 产物减少，则作用不清楚[613]。

如上所述，HIV 感染细胞体外诱导 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 分泌。这些炎症细胞因子作用于细胞，增加 HIV 复制，形成一个自分泌/旁分泌回路[618,619,620]。它们的产生并不依赖于病毒感染，因为单独加入 HIV 包膜蛋白，通过与单核细胞和 MDM 细胞表面 CD4 的连接，就诱导产生这些细胞因子[629,662]。人类 HIV 和恒河猴 SIV 的急性感染期，可观察到 TNF-α 和 IL-6 的水平升高。在疾病后期，TNF-α、IL-1β、INF-γ 和 IL-6 水平升高可在某些研究中观察到[564,618,662~664]。来源于 HIV 感染个体的 PBMC、CD4$^+$ T 细胞、单核细胞/巨噬细胞和肺泡巨

噬细胞体外与来源于健康的未感染个体相比，可产生更多 TNF-α[665~667]。某些研究显示，随着疾病进展，TNF-α水平升高，表明这种细胞因子可能有致病作用。

长期以来，IL-2 产生失调被认为是 HIV 感染的特征[668]。HIV 感染的 $CD4^+$ T 细胞体外产生 IL-2 的能力下降；的确，从 HIV 感染个体分离出来的 $CD4^+$ T 细胞产生低水平的 IL-2 来应答促有丝分裂或抗原性的刺激[383]。IL-2 的产生减少和抗原特异性 T 细胞的丢失是 HIV 感染免疫缺陷的特点。来自 HIV 感染个体的 PBMC 和淋巴结细胞，IL-2 蛋白和 mRNA 水平与健康的未感染个体的相比下降[383,665]。IL-2 分泌的缺失及 $CD4^+$ T 细胞缺失和疾病进展平行相关，导致 $CD4^+$ T 细胞对丝裂原、异型抗原和记忆性抗原应答能力的减弱[669~771]。

Th1 细胞以分泌 IL-2 和 IFN-γ 以及有利于细胞免疫为特征，而 Th2 细胞分泌 IL-4，IL-5，IL-6 并有利于体液免疫为特征。虽然在 HIV 感染期间，Th1 的细胞免疫应答不平衡是众所周知的[669,672~674]，但是在 HIV 疾病的进程中，类似 Th2 的应答（如 IL-4、IL-5 和 IL-10 的分泌）占优势还有争议。Clerti 等的研究表明，HIV 感染者来源的受到刺激的 PBMC，随着疾病进展显示了有利于 Th2 形式的细胞因子分泌[669,672,675,676]；而其他研究者发现，HIV 感染者来源的 T 细胞其细胞因子的分泌是偏移的，朝着一种 Th0 状态发展，即以分泌具有 Th1 和 Th2 两种形式的细胞因子为特征，而不是向 Th2 发展[383,673,674]。二者均发现 HIV 复制在 Th0 比 Th1 更有效[673,677]，突出了 Th1 应答的失衡在 HIV 病的致病机制中潜在的重要性[678]。

关于各种细胞因子在 HIV 复制中作用的体外研究提供了理解 HIV 致病机制的模型；但是体内细胞因子网络的复杂性，使理解各个细胞因子在 HIV 致病机理中的作用相当困难。在这一点上，许多细胞因子用于 HIV 感染者的治疗，包括 IL-2、IL-4、IL-10、IFN-α 和 GM-CSF。

目前在临床试验中 IL-2 被用于持续静脉注射或每日皮下给药 3-5 天，休息大约 8 周。在Ⅰ和Ⅱ期研究中，许多研究对象的 $CD4^+$ T 细胞数明显增加，高达 800 ~ 1000 个/ml[679,680]（图 44.18），IL-2 的使用分别导致了许多暂时的不良反应，部分不良反应与 IL-2 诱导的 TNF-α 分泌有关。也有报道使用 IL-2 后血液中病毒暂时增加又回到基础水平。接受 IL-2 治疗的所有患者同时接受抗反转录病毒治疗，其血浆病毒的基础水平与接受抗反转录病毒治疗而没有接受 IL-2 治疗的对照患者无差别。$CD4^+$ T 细胞数低的患者（如 < 200 细胞/μl）接受 IL-2 后，$CD4^+$ T 细胞计数没有增加而血浆病毒的水平在增加[679,680]，后者可能与较低 $CD4^+$ T 细胞计数的患者更容易整合 HIV 导致对抗反转录药物治疗耐受有关。此外，晚期 HIV 患者中尚有大量多种 $CD4^+$ T 细胞克隆的缺陷，通过 IL-2 治疗好像也不能逆转这种状态（见关于 HIV 感染和 HIV 疾病进展的内容）[143]。在轻度免疫缺陷患者分离来的细胞中，IL-2 如以前讨论的那样，具有选择性、优先诱导非溶细胞性 CD8 抑制因子作用，而不是增加病毒复制[681]。抗病毒药物包括蛋白酶抑制剂与 IL-2 的联合用药，导致了 $CD4^+$ T 细胞数更加持久的增多，血液中病毒缓慢暂时的增加，并使最初少于 200 细胞/μl $CD4^+$ T 细胞数的患者 $CD4^+$ T 细胞的增加。IL-2 治疗期间 $CD4^+$ T 细胞的增加来源于 $CD4^+$ T 细胞库在胸腺外的扩增，因为 T 细胞受体库的 PCR 分析证明缺失的克隆不能再生，扩增时受体库仍是偏斜的[143]。

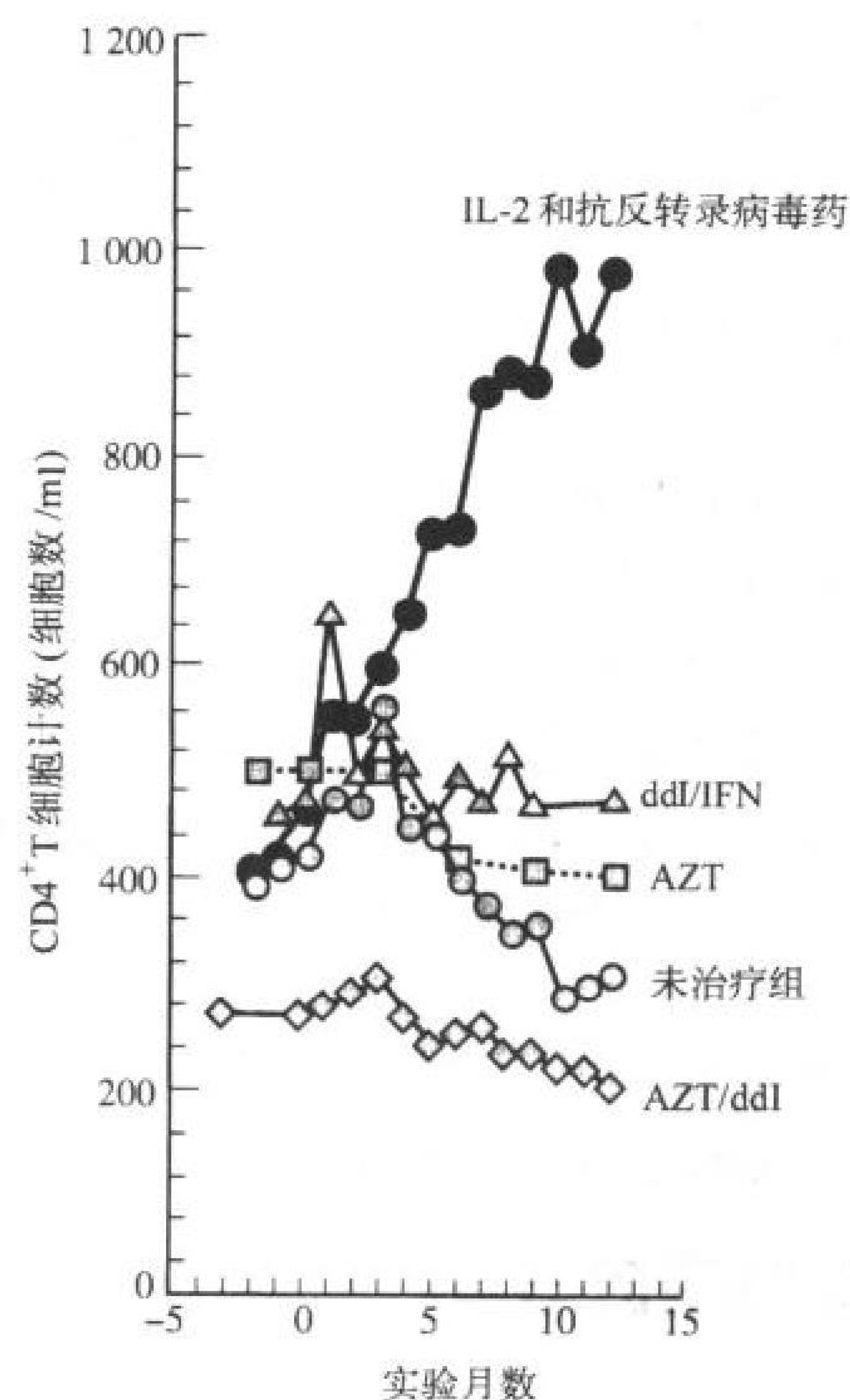


图 44.18　与单独用抗反转录病毒药或不治疗相比，IL-2 和抗反转录病毒药的联合应用可使 $CD4^+$ T 细胞计数明显升高。

IL-10 已经用于 HIV 感染的Ⅰ期临床试验。一次静脉注射 1μg/kg 的个体，血浆病毒血症短暂下降是显著的（平均减少 70%），24 ~ 48h 后又回到基础水平。此外，体外也可观察到 LPS 诱导的原炎症细胞因子（如

1488 TNF-α,IL-1β,IL-6)的抑制。IL-10诱导血浆病毒血症水平下降的可能机制包括抑制HIV诱导炎症细胞因子,减少细胞活化及增加血液中病毒清除。

IL-4已经用于治疗卡波西肉瘤,治疗期间未见血浆病毒载量增加,又一次显示了在体外与体内治疗之间的差异。

中枢神经系统中HIV感染与细胞因子网络

细胞因子网络相互作用及HIV感染靶细胞(包括小胶质细胞)活化可能是HIV造成中枢神经系统疾病的原因。脑小胶质细胞源于单核细胞系,HIV感染后可能导致某些HIV神经系统疾病的症状。与$CD4^+$ T细胞相似,小胶质细胞感染也导致了较巨噬细胞严重的细胞病变[682],包括脑病、神经疾病[214]、星形细胞炎[215]及脑血管炎[216,217]。HIV诱导产生的IL-1β和TNF-α,具有神经毒活性[683~686],而抗炎细胞因子TGF-β则具有神经保护和神经毒的双重效应[688]。IL-10使巨噬细胞失活并对CNS小胶质细胞有抗炎效应,可降低神经毒素的释放[689]。

目前对AIDS相关的CMV脑炎的发病机制研究着重于细胞因子、HIV共同受体和HIV间复杂的相互作用。Bernasconi等报道,有CMV脑炎的AIDS患者脑脊液中单核细胞趋化蛋白(monocyte chemotactic protein,MCP)-1水平显著升高[690]。接着发现CMV编码一种趋化因子受体US28,与CCR2有同源性[691]。这个受体可被MCP-1触发,同时亦可被HIV作为进入细胞的共同受体。因而CMV脑炎患病期,脑脊液中高水平的MCP-1可能趋化并活化单核细胞,这些细胞可提高炎症细胞因子水平,进而增加HIV复制并诱发神经系统疾病,US28在CMV感染细胞上表达可能使HIV感染靶细胞范围扩大。

免疫应答

由于对与HIV感染相关的保护性免疫反应知之甚少,阻碍了有效免疫治疗和疫苗的开发。有资料显示,HIV相关的特异性免疫应答可能对宿主是有害的。HIV感染个体血清中出现的某种抗包膜蛋白gP41抗体在体外促进而非抑制HIV复制[692,693];而出现这些促进HIV复制的抗体与AIDS进展相关[694]。此外,针对gp120C端特异性表位(残基503~528)的抗体反应与疾病进展相关[695]。抗HIV的CTL应答可能是HIV相关的炎性反应综合征如淋巴细胞浸润性牙周炎的致病因素[696,697]。同时有资料提示,HIV特异性CTL可能通过杀伤淋巴结、骨髓及胸腺中HIV感染的抗原呈递细胞而抑制产生免疫应答,在HIV发病机制中发挥关键作用[698]。

大量证据证明了多数HIV特异性免疫应答的有益作用。急性HIV感染后病毒血症的明显减轻即与HIV特异性细胞[194,197]与体液免疫[198,699~701]应答相关,HIV特异的免疫应答与疾病进程缓慢的相关性表明这些免疫应答发挥了有益的作用(见下文"病情长期稳定者")。

体液免疫应答

抗p24抗体

急性HIV感染后数周即可产生针对病毒核心蛋白p24的抗体,对最初感染后病毒血症减轻可能发挥作用[198,700,702,703]。而抗体的丢失与疾病进展相关[198,700,702~705]。

中和抗体

体外中和HIV感染性的抗体可能是重要的宿主反应机制,至少在一定程度上控制病毒的体内复制[700,705,709]。中和抗体可能是型特异性的(如分离的一种病毒)或群特异性的(如分离获得的一群病毒)。大1489 多数型特异性的中和抗体是识别HIV包膜蛋白gp120 V3环[710~715]。这些抗V3环的中和抗体可阻止HIV进入细胞或与细胞融合所必需的gp120的裂解或构象改变[713,716~719]。而群特异性抗体则可识别HIV包膜蛋白

gp41 内的表位[720~722]、gp120 上的 CD4 结合位点周围的非连续性的构象表位[723~726]或碳水化合物决定簇[727]。无论型特异性还是群特异性中和抗体,其中和效应对生长于 T 细胞群中的实验性病毒株中比对生长在 PBMC 中原发性病毒更为有效;这一差异可能是 V3 环和 CD4 结合区域表位暴露不同所造成的[728~731]。有些中和抗体还要干扰 HIV 包膜和 CCR5 之间的相互作用,因而抑制了 M 型病毒株进入细胞[35,36]。

但是围绕 HIV 中和抗体的出现和疾病过程之间可能的关系,亦有不同意见。这可能主要由以下原因造成:可检测到多种不同型的中和抗体,同时中和作用的测定方法变化也较大。然而,较广特异性的中和抗体的出现可能预示预后较好[199、204、699、709、739、740]。

介导 ADCC 效应的抗体

一些抗 HIV 抗体与 IgG Fc 受体阳性细胞结合,使之对介导针对 HIV 感染或 HIV 包膜 gp120 或 gp41 蛋白的的 ADCC 作用更为敏感[741~744]。这些抗体大多数是直接针对 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp41[741、743~747]。$CD16^+$ NK 细胞是重要的 ADCC 效应的介导者[744、748],虽然单核细胞也具备这种作用[749]。抗 HIV 的 ADCC 抗体可在原发性感染后很快出现,并可在整个 HIV 疾病过程中都可检测到,仅在 AIDS 发病初期的效价有所降低[750~752]。

细胞免疫应答

细胞毒 T 淋巴细胞

HIV 感染个体中,可以见到针对 HIV 靶蛋白的[754]经典的 MHC Ⅰ类分子限制性、HIV 特异性的 $CD8^+$ CTL 应答[212、213、753]。这些靶蛋白包括核心蛋白[755、756]、RT[757~759]、包膜蛋白[759~762]以及调控蛋白[763]。无症状 HIV 感染患者中,可观察到较高比例的 HIV 特异性的 CTL 及 CTL 前体细胞(可高达外周血 T 细胞的 1%)[764、765]。

HIV 感染的个体中,CTL 对抑制病毒复制起着关键作用:出现 HIV 特异性 CTL 反应可下调急性感染后病毒血症的水平[194、197];HIV 特异性的 CTL 活性下降则与疾病的恶化有关[212、764];HIV 特异性的 CTL 活性的增强则可延缓疾病进程[199、766~769]。外周血中出现 HIV 特异性 CTL 的个体常暴露于 HIV 时仍不被感染[770],而淋巴结中缺乏此类细胞者则表现出 HIV 病情的恶化[771],这提示 HIV 特异性 CTL 的有益作用。这些研究结果与 HIV 疾病中 CTL 有免疫致病作用[698]的观点相悖,尽管 CTL 反应可能与 HIV 相关的炎性综合征的发病相关[696、697]。

HIV 特异性 CTL 反应的性质也是决定控制病毒复制功能的有效性的重要因素。针对病毒核心蛋白 CTL 与降低疾病恶化的危险性有关[769、772];但是针对病毒其他蛋白的 CTL 却未观察到类似现象。CTL 对特定 MHC Ⅰ类等位基因呈递的免疫优势 HIV 表位的识别可能与其较强的抗 HIV 活性有关[774~776]。同时这一识别可在一定程度上解释特定 MHC Ⅰ类等位基因与延缓 HIV 疾病进程间的关系。对感染个体中 $CD8^+$ T 细胞受体 V_β 库偏移的检测提示:初次感染期间,与源自 1~2 个 V_β 家族的限制性 CTL 应答相比,源自由不同 V_β 家族组成的 HIV 特异性 CTL 应答能更好地控制病毒复制,预后也更好[175](见前"HIV 感染和发病过程")。

HIV 疾病渐进型患者 HIV 特异性 CTL 活性的丢失可能是若干因素作用的结果。病毒辅助蛋白 Tat、Net 及 vpu 可以下调细胞 MHC Ⅰ类分子的表达,而 MHC Ⅰ类分子对 CTL 识别感染细胞是必需的[386、390、391]。另一机制是缺乏 IL-2 受体及克隆潜力的 $CD8^+$ DR^+ HIV 特异性 CTL 的积累[756、777、778]。最后,由于病毒突变或高浓度抗原造成 CTL 克隆耗竭,导致了 HIV 逃避 CTL 反应,而这也是造成 CTL 介导的控制病毒复制作用丢失的因素[207]。

宿主抗 HIV CTL 效应受 MHC Ⅰ类等位基因与不同病毒表位结合能力的限制,而病毒也受到逃避性突变损害病毒适应性的限制。MHC I 类等位基因的排列方式极多,使宿主与病毒相互作用的动力学极端复杂。病毒 CTL 识别表位之内的突变(例如逃避性突变)与病毒复制水平的增高及疾病恶化有关[779~782]。CTL 对病

毒复制控制的减弱可能导致大量的病毒逃避性突变，而这些突变可能抑制针对逃避性突变前病毒表位的CTL反应[783,784]。Itescu等的研究显示，对于病毒适应性，一些逃避性突变代价是昂贵的。这些学者发现，HIV感染中，弥散性浸润CD8淋巴细胞增多症同特定HLA表型相关，而这些表型又明显抑制了包膜蛋白V3环中病毒序列多样性的发展[785]。其他研究则着重强调了MHCⅠ类等位基因对宿主CTL反应的限制。Kalams等证实HIV感染个体中，针对HLA-B14限制性gp41表位的特异性CTL克隆显示出T细胞受体利用的有限多样性[786]。进一步研究则发现有病毒逃避性突变的个体中，特定CTL反应的可塑性是有限的，优势CTL反应可能仍保持针对逃避突变前的病毒表位的应答（而非突变产生的新表位）[787,788]。其他研究则证实CTL反应可塑性增强，例如，活跃的、针对逃避突变后特异性CTL的出现可使宿主对病毒复制产生持续有效的控制。Nowak等提出了CTL与病毒间动力学的数学模型，他们指出，导致逃避免疫优势表位CTL反应使宿主反应转向针对较弱表位的病毒序列，终将使疾病恶化[173]。这一过程中，病毒逃避性突变的适应性较宿主CTL反应的可变性发展要快，导致疾病恶化；反之，疾病进展则相对缓慢。

CTL对病毒复制控制作用丧失的进一步的机制可能是克隆耗竭。这可能是某些其他病毒长期持续存在的原因，例如，淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒能够迅速而完全地动员活化宿主CTL反应，使CTL耗竭（如大范围的耐受性）[790]。HIV感染中可见CTL一定程度的耗竭；未出现病毒逃避突变时可检测到某些CTL克隆型的消失，这可能是这种现象的另外一种解释[207]。

CD8可溶性抑制因子

$CD8^+$ T细胞可产生多种可溶性抗病毒因子，CD8抗病毒因子（CD8 antiviral factor，CAF）[791~793]以非溶细胞、非MHC限制的方式，在HIV的LTR转录水平发挥抑制病毒复制的作用[794~796]，与已知的细胞因子缺乏同一性[797]。CAF活性下降，疾病恶化，而维持CAF活性则可使疾病长期相对稳定[517,739,798]。RANTES、MIP-1α及MIP-1β（CCR5的天然配体，CCR5是M型病毒株的主要共同受体），也是重要的可溶性抗病毒因子，由$CD8^+$ T细胞和其他细胞分泌[79,681]。这些趋化因子主要在病毒进入细胞过程中抑制其复制。但亦有相反资料报道这些趋化因子与HIV疾病恶化存在相关性[511~518]。然而最近有报道认为β趋化因子可能与对暴露于HIV的个体有抗HIV感染作用有关。HIV抗原的刺激作用使这些个体的$CD4^+$ T细胞分泌高水平的β趋化因子，可在体外抑制M型HIV株的复制[799]。IL-16也是一种可溶性抗病毒因子[800]；然而，IL-16产生量与疾病进展间的关系尚待确立[515,517]。

$CD4^+$ T细胞反应

HIV蛋白含有可被MHC Ⅱ类等位基因呈递的辅助T细胞表位[801~803]。$CD4^+$ T细胞对这些表位的识别可导致IL-2分泌及细胞增殖。这些反应随HIV疾病的进程而下降[804]；然而，在HIV特异性免疫应答中，尚不清楚$CD4^+$ T细胞针对其自身HIV的特异性免疫应答是否发挥了限制性保护或破坏作用。依此观点，似乎在这些反应期间IL-2的产生有助于增强HIV特异性CTL应答；而IL-2可通过诱导原炎性细胞因子的分泌而间接增加HIV的复制[619,625]。

HIV发病过程中的遗传因素

宿主基因因素对HIV感染疾病恶化存在影响。有众多研究报告了MHC等位基因，包括Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类及其他宿主因素可能影响HIV疾病的致病过程及病程。对特定等位基因与HIV相关疾病如卡波西肉瘤及临床疾病的恶化之间的联系，已有报道[774~776,805]。某些MHC单体型（如DQ2、DR3、B8、Cw7、A1）与儿童感染后AIDS的恶化有关[806]。此外，儿科HIV感染中DR3单体型DRB1*0301，DQAI*0501及DQB1*0201与脑病危险性增加、严重的$CD4^+$ T细胞缺失及2岁前死亡相关[807]。成人HIV感染中，HLA-B27、B57及B51与较慢的疾病进程显著相关，而HLA-A23，B37及B49则与疾病的迅速进展有关[776]。在对血友病双生子的研究中发

现,特定Ⅱ单体型出现亦同疾病恶化显著相关[808]。与转运相关的抗原呈递(transporter-associated with antigen-*presenting*,TAP)基因,属于等位基因MHCⅢ家族成员,亦可见其在HIV感染中对疾病进展发挥一定作用。特定MHC编码TAP基因及MHCⅠ类、Ⅱ类基因的HLA构成与HIV疾病的进展显著相关。在暴露于HIV-1但却未发生感染的个体中,可见到TAP1.4及TAP1.4和2.3等TAP基因的组合显著增加[809]。

某种HLA单体型与不同HIV疾病进展间的相关性可能是一系列不同机制发挥作用的结果[774~776,805]。某些HLA分子与较慢的疾病发展相关,可能是由于其在细胞介导的抗病毒免疫应答过程中有效呈递免疫优势表位。而另一些HLA分子则可能启动免疫致病反应,与更快的疾病恶化相关。

在某些具有少见MHC单倍型个体中,异型抗原特异性免疫应答可能保护其不受HIV感染。实验显示,异型抗原刺激淋巴细胞可在体外抑制HIV复制[810];因而某种少数MHCⅠ类和Ⅱ类等位基因可在HIV感染发生之前快速识别HIV感染细胞,并通过异源反应排斥这些细胞。与些相似,共享MHC等位基因可导致HIV感染的同基因细胞不能有效清除,使感染机会增加。

如前讨论所及,CCR5是M型HIV-1病毒株的主要共同受体[88~92](见前文"HIV共同受体")。CCR5基因的一个包含内部32个碱基对缺失的突变等位基因,可产生截短的非功能性HIV融合性共同受体[100,103,811]同HIV疾病发展较为缓慢相关,CCR5纯合子突变能完全保护个体免于HIV感染。同野生型CCR5个体细胞相比,CCR5突变的杂合体可降低细胞表面CCR5表达,并降低亲M型HIV病毒株感染T细胞的能力[108]。虽然CCR5杂合体似乎并不能保护个体免遭HIV-1感染,但其可能一定程度上通过延缓疾病进展保护感染个体[101、103、167、812、813]。同野生型个体相比,CCR5杂合体的这种保护效应一定程度上与以下作用有关:降低HIV血清转化后病毒载量调定点、减慢$CD4^+$ T细胞的耗竭[102]。CCR5杂合子突变在病情长期稳定患者中更为常见[103、167、812、813]。

1491

其他遗传多态性可能影响HIV易感性及疾病进展。如已证实的其他病原体、细胞因子基因多态性可能影响对HIV的反应。因此,某系小鼠对病原体是Th2应答,而其他系的小鼠则是Th1应答,对病原体的Th1或Th2应答可能产生保护效应也可能是致死效应(第38章)。其他可能影响HIV疾病进程的细胞因子包括维生素D结合因子Gc的等位基因形式[814]、甘露糖结合的植物血凝素可变等位基因[815]以及TNF-C2微卫星等位基因[816]。

病情长期稳定者

HIV感染到AIDS发病平均时间大约是10年;但不同个体之间疾病发展速率变化很大。近年研究中,有一点很清楚,即小部分HIV感染者可以长期稳定[199、516、739、817、823]。对疾病长期稳定的现象进行研究有助于我们认识疾病发展的机制并使我们乐观地认识到HIV感染中可能存在某种保护性免疫反应。

所谓"病情长期稳定"的定义变化很大,但是,一个合理的共识应包括证实HIV感染已达7年,$CD4^+$ T细胞计数>600/ml而无显著下降;没有HIV疾病症状,并且没有抗反转录病毒治疗史[824]。由于"病情长期稳定"的概念主要是依赖经验建立的,因此对这些个体组成一个异基因群体,我们并不应感到惊讶。在各种HIV危险人群中,均可见到所谓"病情长期稳定"者,而且没有人口统计学特征可以使之与病程渐进型相区别。决定HIV疾病相对稳定的机制包括宿主基因因素、病毒复制有效的免疫控制、以及HIV减毒株的感染(表44.5)等。同缺陷型CCR5基因杂合体一样,特定HLA单倍体同较慢的疾病进展相关;然而这些因素似乎不占优势。同病程渐进者相比,病情稳定者的病毒载量水平较低、循环$CD8^+$ T细胞的数量较高及机体有效的体液及细胞免疫应答。据此推测,"病情长期稳定"可能与多因素相关。目前尚不能确定是否"病情长期稳定"只是疾病进展速率正态分布一侧的"尾部"(缓慢进展者),或是否某些个体疾病确实"静止未发展"(即真正的静止者)。

表 44.5　HIV 感染后病情长期稳定可能的机制

宿主遗传因子	宿主免疫反应因子	病毒学因素
病情稳定者 HLA 的特征 CCR5 32bp 缺失的杂合体甘露糖结合的植物血凝素等位基因 TNF-2c 微卫星等位基因 Gc 结合因子的等位基因	有效的 CTL 应答 CD8 抗病毒因子的分泌 抑制 HIV 结合共同受体的趋化因子的分泌如(MIP-1α、MIP-1β、RANTES)CCR5 及 CXCR4(SDF-1) IL-16 的分泌 有效的体液免疫应答	HIV 减毒株的感染

宿主遗传因子

如前所述,HIV 感染个体的 MHC 单体型在确定其疾病进展方面有重要作用,此外,CCR5 基因型对 HIV 疾病进展亦有影响;整合有突变 CCR5-Δ32 等位基因一个拷贝的个体,与遗传了野生型等位基因的个体相比,疾病进展较慢的概率更大(见前文“HIV 致病机制中宿主因子的作用”)[101~103、167、812、813]。尽管 CCR5 基因同 HIV 感染后的“病情长期稳定”相关,但其似乎并非决定长期稳定状态的主要因素。可以认为,在 HIV 感染者中,尽管与对照者相比,“病情长期稳定”中 CCR5 杂合体出现频率增加了 2 倍,但这一频率仍 < 50%[103]。在最低病毒载量和最多 $CD4^+$ T 细胞计数的“病情长期稳定”者中,CCR5 杂合体可能只是构成了一个亚组,对此,亦有研究;然而野生型 CCR5 和“病情长期稳定”者的 CCR5 杂合体的免疫学和病毒学特征间并无区别[812]。这些资料表明,尽管 CCR5 杂合体增加了疾病稳定的机会,但 CCR5 野生型的个体可能通过其他机制获得了同样的表型。

宿主免疫反应因子

与疾病渐进性患者相比,疾病长期稳定者 HIV 特异性 CTL 的特异性更广,其前体细胞的频率更高[199、766、769]。这一现象对 HIV 疾病进展机制提供了一系列的线索。在较低水平或未检测到血浆病毒的情况下,较高 HIV 特异性 CTL 前体细胞频率的维持提示,在病情长期稳定者中病毒复制活跃(如在淋巴组织)[199]。“病情长期稳定”者中 CTL 的出现,驳斥了 HIV 疾病中 CTL 有免疫致病作用的推测[698]。HIV 特异性 CTL 有可能至少在维持低病毒载量和稳定静息状态的中发挥了一定作用。已证实 CTL 在 HIV 最初感染期间有降低血浆病毒水平的作用[194、197],同时,疾病发展为 AIDS 与后期病毒逃避免疫优势 CTL 反应(已经长期存在的 9~12 年)之间有所联系[782]。前述推测即源于有研究进一步证实 CTL 的有益作用:HIV Gag 特异性 CTL 前体细胞的维持与疾病长期稳定有关,而 CTL 的缺失则与病毒负载增加和 $CD4^+$ T 细胞消耗相关[769]。

1492

前已述及(见前文“免疫应答”),$CD8^+$ T 细胞产生的可溶性抗病毒因子亦在 HIV 感染的稳定静止状态中发挥一定作用。据此可认为 CAF 活性与疾病分期有关[798],与疾病渐进性患者相比,病情长期稳定者源于 $CD8^+$ T 细胞的可溶性抗病毒反应更为有效[517、739]。

RANTES、MIP-1α 及 MIP-1β 亦为 $CD8^+$ T 细胞及其他细胞分泌重要的可溶性抗病毒因子[76、68]。这些趋化因子是 CCR5 的天然配体,而 CCR5 是 M 型 HIV 病毒株的共同受体;这些因子可在病毒进入细胞的水平抑制其复制。然而亦有其他研究显示这些细胞因子同 HIV 疾病进展恶化之间存在联系[511~518]。IL-16 也是可溶性抗病毒因子[800];IL-16 的产生与疾病进程间的相关性有待确定[515、517]。

针对 HIV 的体液免疫应答与疾病发展间的关系尚不确定[825]。非渐进性的 HIV 感染与以下因素相关:对 gp120C 端表位(氨基酸残基 503~528)的抗体缺乏反应能力[695],而 p24 特异性抗体[704]及中和性抗体[199、204、739]维持较高水平。Sei 等的研究显示,HIV ⅢB 中和抗体的出现同良好的预后有关[699]。随后的研究证实,无论是针对原发性还是自体同源的 HIV,中和抗体的出现都同疾病的稳定有关[205、737]。而且,病毒逃避中和抗体反应与 SI 型 HIV 的出现及疾病的渐进有关[735、737]。虽然病情长期稳定 HIV 感染者能够维持中和较大范围的原发性及自体同源病毒的抗体反应,但就中和抗体而言,病毒是异源性的[204、205]。是否在病情长期

稳定者中,中和抗体的维持仅是相对完整的免疫系统的一个标志或这些抗体在决定病情稳定状态中发挥了积极作用,目前尚不明确。

同 HIV 病情进展相关的淋巴组织形态学异常是免疫缺陷的重要决定因素[249,256]。病情长期稳定的患者 HIV 感染时间较长,淋巴结活组织病理检查只显示出度较轻的 HIV 相关的异常表现,如滤泡增生[199,826],而滤泡退化、纤维化及淋巴细胞耗竭等同渐进恶化的 HIV 病情相关的变化则难以见到。病情稳定者滤泡增生水平显著低于进展者,定性区别亦是如此,且没有证据表明有大范围的生发中心向淋巴结髓质扩展[199,826]。可能在病情稳定者中淋巴组织正常结构的保留是长期病毒复制水平较低的反映。病情稳定者无论对病毒低水平复制的控制机制如何,淋巴组织结构的保留都是免疫能力的关键。这一点进一步表明,有必要了解 HIV 病情进展中淋巴组织结构破坏的机制。如果免疫恢复治疗将成功的话,产生免疫应答的基础如完整的淋巴组织必须具备,必须阻止或逆转与病情进展相关的淋巴组织组织病理学异常。

病毒学因子

在一小部分人中,感染 HIV 减毒株,可能使病情稳定而不发生进展。这方面最有力的证据来自于澳大利亚的一组病情稳定患者,他们由于接受了同一个人的血液而感染,此人系一病情稳定者[827,828]。由这些个体分离的病毒常可见在病毒 LTR 内 NF-κB/SP-1 位点复制和重排中,在 *nef* 基因和 *nef*/U3LTR 折叠区内均有缺陷存在[828]。Kirdhhoff 等报告,由另一个病情稳定者分离的病毒在 *nef* 基因内存在缺陷[829]。尽管这些例子强烈表明病情稳定可能是由于感染了含有减毒 nef 基因的病毒株,但即使在长期稳定患者中,这一现象似乎并不普遍[830~832]。另有研究表明,病情稳定者的发病机制中涉及到 *rev*、*vif*、*vpr*、*vpu* 的基因缺陷。然而,这些例子似乎并非常现而系例外情况[835,836]。近来针对病情长期稳定者的 HIV env 基因的研究提示在 V3 区中有一些独特的突变,同时在一些个体中可见介导病毒进入细胞的能力上存在功能性缺陷[837]。

疫苗

目前全球 HIV 流行极为严重(HIV 感染者有 2264 万),预计至 2000 年将有超过 4000 万的感染者,因而研制安全有效的预防疫苗非常必要,但遇到的挑战也是极其艰巨的。其中最重要的一点是缺少明确相关的保护性免疫[838]。病毒由于 RT 反转录过程有很高的差错率,因而抗原有较高的变化水平,此外,感染可由无细胞参与或与细胞相关的途径传播。

尽管 HIV 感染中保护性免疫的关系尚不完全清楚,仍有一系更研究提示保护性免疫应答可能存在。如前述及,可见到多次暴露于 HIV 而未感染,其血清病毒检测为阴性的个体,提示有保护性免疫因素的参与,但使用常规的免疫检测方法可能并不容易检测到。关于抗 HIV 感染的机制,这些人群可能是异质性的[839]。

理想的预防性 HIV 疫苗将能够阻止感染;然而某种疫苗显著改变了 HIV 病程并降低了预防接种后感染者的感染性,这种疫苗无论对个人还是感染在社会中的传播都有影响[840]。目前,预防性疫苗产生了多种类型的免疫反应。目前认为可以发挥一定保护作用的疫苗应能诱导以下几方面的效应:较强的 CTL 反应;特异性中和抗体;黏膜免疫[838]。

1493

SIV 感染是一种对开发疫苗有价值的动物模型。SIV 与 HIV-2 关系密切,可引起易感动物急性感染,导致 $CD4^+$ T 细胞耗竭、免疫缺陷、机会性感染直至死亡。对一系列不同制剂 SIV 疫苗的研究显示,尽管保护作用的机制仍不明确,而且也并不一定直接针对病毒的组成部分,但还是证实了疫苗保护作用的存在。缺少 *nef* 基因的恒河猴感染 SIV 后,产生无症状感染状态,继而对含有活性 nef 基因的致病性 SIV 的侵袭亦产生保护作用[841]。关于减毒 nef 缺陷 SIV 保护作用的机制尚不明确。文献报告,减毒 nef 缺陷病毒感染新生恒河猴便会产生致病作用[842],提示减毒病毒在某种条件下亦有致病作用,而关于这一点亦有不同意见,有研究人员已将减毒 SIV 安全地给予了新生动物[843]。

使用不同载体释放的灭活 SIV 或病毒蛋白的疫苗对致病性病毒的感染发挥了保护性作用。一些抗原并

不能对感染发挥完全的保护作用，但对这些抗原的研究显示，感染后疾病的进程似乎有所延缓[844,845]。此外，免疫接种后动物对感染保护作用的机制亦不明确。在一些关于灭活病毒疫苗的研究中，免疫应答的保护性因素并非直接针对病毒本身，而是针对病毒繁殖生长所在细胞的组成部份（如当病毒以出芽方式由细胞释放时与病毒包膜相结合的细胞蛋白）[846~848]。这些资料提示：针对参与 SIV 结合的某种细胞表面蛋白的抗体或免疫应答可能对感染提供良好的保护作用[847,848]。此外，针对具有致病作用的细胞的同种异体反应可发挥避免感染的保护性作用[810]。以表达包膜蛋白的重组疫苗作为初次免疫刺激，而以重组包膜作为追加免疫，相关研究提示针对包膜蛋白的免疫应答可能具有一定保护作用[841~851]。

HIV 感染最适合的动物模型是大猩猩；然而却具有一定危险性，除价格昂贵外，大猩猩 HIV 诱导的各种疾病的表现，除非有可供选择的疾苗阻止感染，否则其对疾病进程的全部影响不易测定。所以无论利用完整灭活病毒并以蛋白或肽增强免疫，还是以重组包膜蛋白免疫大猩猩，均可对随后 HIV-Ⅰ感染产生保护作用[852,853]。给予大猩猩包含 HIV-Ⅰ env，rev 及 gag/pol 基因的 DNA 疫苗可对异源性 HIV-1 感染产生保护作用[854]。这些资料提示在人类应用疫苗至少一定程度上诱导保护作用的产生。

已对未感染及 HIV 感染进行了 HIV 疫苗的临床试验[855~857]。重组包膜蛋白和重组非 HIV 病毒表达的 HIV 包膜蛋白对未感染健康志愿者已证明是安全的并具有免疫刺激性。这些方法中有些已被作为对已感染者进行积极免疫治疗的方法而进行测评。特定疫苗所诱生的免疫应答的类型取决开多种特性，包括其组成、释放（给药）途径、剂量以及佐剂等。使用活病毒疫苗（金丝雀痘或牛痘病毒经基因修饰表达的 HIV 蛋白）或 DNA 疫苗，病毒抗原在宿主细胞内合成，通常导致细胞毒性 T 细胞反应。虽然似乎呈剂量依赖性，但灭活病毒疫苗和重组蛋白能启动抗体反应。

第一个有希望的 HIV 疫苗由来源于 HIV-LAV 的重组包膜蛋白构成，HIV-LAV 属于 T 型 HIV 病毒株。在未感染个体中，这些免疫刺激所产生的优势免疫反应是体液反应[858]，这些免疫原诱生的抗体中和活性水平有一定变化。这些最初的待筛选疫苗最主要的缺点在于所诱志的抗体仅能中和亲 T 细胞病毒。如前文所述原代分离的 M 病毒和实验分离适应 T 细胞株的病毒间的主要不同，另外对其所利用而进入细胞的共同受体而言，是 T 型病毒易被抗体中和，而 M 型病毒则不易中和[857]。更为不明确的问题是世界各地出现的 HIV 有不同亚型。亚型 B 主要分布在北美、西欧，而并非分布在非洲、印度或亚洲这些 HIV 感染者最多、流行传播最快的地区。以亚型 B 病毒为基础的疫苗可能并不一定能产生针对其他亚型的有效免疫应答。在一项实验中，使用一种以亚型 B 为基础的疫苗对大猩猩进行免疫可产生针对 HIV B 亚型病毒的保护作用[859]。

关于长期稳定者的研究提示活跃的 CTL 反应有助于阻止疾病进展[199、766~769]。已证明蛋白抗原不能诱导强有力的 CTL 反应，因而采用了一系列替代方法以产生有利于 HIV 特异性的 CTL。这些替代方法中最前沿、最重要的是 DNA 疫苗，即将 HIV 基因直接注射给受者。另一方法是使用病毒载体，如金丝雀痘载体，这些载体携带部分 HIV 基因组进入宿主细胞，产生 HIV 抗原。表达 HIV gp160 的病毒载体带有或不带有 HIV 其他组成部份，多次给药。随后使用不纯化 gp160 促进免疫，在人体试验中诱导了 CTL 活性。产生的 CTL 能够溶解 HIV 感染的自身细胞[850,860~862]，提示了具有诱导保护性反应的可能性，以金丝雀痘为载体的 B 型 HIV gp160 疫苗可溶解多种非 B 亚型病毒感染的靶细胞[861]。

前述疫苗可通过宿细胞产生或表达 HIV 蛋白，引起体液反应的同时导致优势 CTL 反应。。CTL 反应依赖于个体的 HLA 单体型，在这种 HLA 单体型中，所应用蛋白的不同肽将依据Ⅰ类 HLA 表型的不同而被识别[861,863]。

1494 裸 DNA 可被细胞迅速吸收并转录，表达的蛋白经过处理被呈递给 MHCⅠ类分子，从而诱导 $CD8^+$ CTL 效应。初期的研究表明这些疫苗可产生一种有效的细胞介导的中和性抗体反应[864,865]。对大猩猩的试验显示，DNA 免疫后可产生对 HIV 感染的保护作用[854]。

结论

对 HIV 疾病的临床治疗已取得了许多进展，尽管这些进展可极大地改善许多 HIV 感染者的生活质量，

但目前对 HIV 感染的免疫发病机制仍需作深入的研究。其中 HIV 可与某些趋化因子受体结合并进入细胞内，这使可供治疗干预的范围大为扩展。趋化因子受体的表达和调节以及这些受体的配体可能在 HIV 疾病的发病机制中起着关键的作用。在 HIV 疾病进程中及抗反转录病毒药治疗后 $CD4^+$ T 细胞的产生、游走及死亡的动力学仍是个谜。对常暴露于 HIV 却仍未被病毒感染的个体及对 HIV 病毒感染后病情长期稳定者的研究，或许能洞察 HIV 感染后保护性免疫的本质。寻求 HIV 感染的关键问题的答案将推动疫苗、抗反转录病毒药及免疫功能再恢复等研究的理性发展。

（魏 斌 何凤田 译）

参 考 文 献

1. Gallo R, Salahuddin S, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984;224:500–503.
2. Levy J, Hoffman A, Kramer S, Landis J, Shimabukuro J, Oshiro L. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984;225:840–842.
3. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:868–871.
4. Fauci AS, Lane HC. Human immunodeficiency virus (HIV) disease: AIDS and related disorders. In: Fauci AS, Isselbacher KJ, Wilson JD, et al., eds. *Harrison's principles of internal medicine.* 14th ed. New York: McGraw-Hill, 1998: 1791–1856.
5. World Health Organization. *Wkly Epidemiol Rec* 1997;72:17–24.
6. Karon J, Rosenberg P, McQuillan G, Khare M, Gwinn M, Petersen L. Prevalence of HIV infection in the United States, 1984 to 1992. *JAMA* 1996;276:126–131.
7. Centers for Disease Control amd Prevention. *HIV/AIDS Surveillance Rep* 1997; 9:1 37.
8. Curran JW, Jaffe HW, Hardy AM, Morgan WM, Selik RM, Dondero TJ. Epidemiology of HIV infection and AIDS in the United States. *Science* 1988;239: 610–616.
9. George S, Jacob M, John TJ, et al. A case-control analysis of risk factors in HIV transmission in South India. *J AIDS Hum Retrovir* 1997;14:290–293.
10. Dickerson MC, Johnston J, Delea TE, White A, Andrews E. The causal role for genital ulcer disease as a risk factor for transmission of human immunodeficiency virus. An application of the Bradford Hill criteria. *Sex Transm Dis* 1996; 23:429–440.
11. Tyndall MW, Ronald AR, Agoki E, et al. Increased risk of infection with human immunodeficiency virus type 1 among uncircumcised men presenting with genital ulcer disease in Kenya. *Clin Infect Dis* 1996;23:449–453.
12. Bassett MT, McFarland WC, Ray S, et al. Risk factors for HIV infection at enrollment in an urban male factory cohort in Harare, Zimbabwe. *J AIDS Hum Retrovir* 1996;13:287–293.
13. Rodrigues JJ, Mehendale SM, Shepherd ME, et al. Risk factors for HIV infection in people attending clinics for sexually transmitted diseases in India. *Br Med J* 1995;311:283–286.
14. Hayes RJ, Schulz KF, Plummer FA, et al. The cofactor effect of genital ulcers on the per-exposure risk of HIV transmission in sub-Saharan Africa HIV-1 seroconversion in patients with and without genital ulcer disease. A prospective study. *J Trop Med Hyg* 1995;98:1–8.
15. Tindall B, Cooper DA. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* 1991;5:1–14.
16. Gaines H, von Sydow MA, von Stedingk LV, et al. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* 1990;4:995–999.
17. Tindall B, Hing M, Edwards P, Barnes T, Mackie A, Cooper DA. Severe clinical manifestations of primary HIV infection. *AIDS* 1989;3:747–749.
18. Lemp GF, Payne SF, Rutherford GW, et al. Projections of AIDS morbidity and mortality in San Francisco. *JAMA* 1990;263:1497–1501.
19. Masur H, Ognibene F, Yarchoan R, et al. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1989;111:223–231.
20. Price RW, Brew B, Sidtis J, Rosenblum M, Scheck AC, Cleary P. The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science* 1988;239:586–592.
21. Leitner T. Genetic subtypes of HIV-1. In: Myers G, Foley B, Mellors J, Korber B, Jeang K, Wain-Hobson S, eds. *Human retroviruses and AIDS 1996.* Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory, 1996:28–40.
22. Kostrikis LG, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, Ho DD. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. *J Virol* 1995;69: 6122–6130.
23. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970;226:1209–1211.
24. Temin H, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970;226:1211–1213.
25. McDougal J, Kennedy M, Sligh J, Cort S, Mawle A, Nicholson J. Binding of HTLV-III/LAV to $T4^+$ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* 1986;231:382–385.
26. Dalgleish AG, Beverly PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4(T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984;312:763–767.
27. Klatzmann D, Barre-Sinoussi F, Nugeyre MT, et al. Selective tropism of lymphadenopathy-associated virus (LAV) for helper-inducer T-lymphocytes. *Science* 1984;225:59–63.
28. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984;312:767–768.
29. Moore J. Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science* 1997;276:51–52.
30. Hunter E, Swanstrom R. Retrovirus envelope glycoproteins. In: Swanstrom RVP, ed. *Retroviruses: strategies of replication.* Berlin: Springer-Verlag, 1990:187.
31. Maddon PJ, McDougal JS, Clapham PR, et al. HIV infection does not require endocytosis of its receptor, CD4. *Cell* 1988;54:865–874.
32. Bukrinsky MI, Sharova N, Dempsey MP, et al. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:6580–6584.
33. Arthur L, Bess JJ, Sowder RN, et al. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 1992;258: 1935–1938.
34. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel RA. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 1986;47:333–348.
35. Wu L, Gerard N, Wyatt R, et al. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 1996;384: 179–183.
36. Trkola A, Dragic T, Arthos J, et al. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 1996;384:184–187.
37. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997;89:263–273.
38. Roberts JD, Benbenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 1988;242:1171–1173.
39. Takeuchi Y, Nagumo T, Hoshino H. Low fidelity of cell-free DNA synthesis by reverse transcriptase of human immunodeficiency virus. *J Virol* 1989;62: 3900–3902.
40. Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 1990;61:213–222.
41. Bukrinsky M, Stanwick T, Dempsey M, Stevenson M. Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* 1991;254:423–427.
42. Stevenson M. Identification of factors that govern HIV-1 replication in nondividing host cells. *AIDS Res Hum Retrovir* 1994;10(suppl 1):11–15.
43. Myers G, Foley B, Mellors J, Korber B, Jeang K, Wain-Hobson S. *Human retroviruses and AIDS 1996.* Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory, 1996.
44. Pauza CD, Galindo J. Persistent human immunodeficiency virus type 1 infection of monoblastoid cells lead to accumulation of self-integrated viral DNA and to production of defective virions. *J Virol* 1989;63:3700–3707.
45. Peterson MG, Tanese N, Pugh BF, Tijan R. Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding protein. *Science* 1990;248: 1625–1630.
46. Maldonado E, Ha I, Cortes P, Weis L, Reinberg D. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors IIA, IID, IIB during formation of a transcription-competent complex. *Mol Cell*

Biol 1990;10:6335–6347.

47. Kieran M, Blank V, Logeat F, et al. The DNA binding subunit of NFkB is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. *Cell* 1990;62: 1007–1018.
48. Bours V, Villalobos J, Burd PR, Kelly K, Siebenlist U. Cloning of mitogen-inducible gene encoding a kB DNA-binding protein with homology to the rel oncogene and to cell-cycle motifs. *Nature* 1990;348:76–80.
49. Nabel G, Baltimore D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* 1987;326:711–713.
50. Franza BR, Josephs SF, Gilman MZ, Ryan W, Clarkson B. Characterization of cellular proteins recognizing the HIV enhancer using a microscale DNA-affinity precipitation assay. *Nature* 1987;330:391–395.
51. Kawakami K, Scheidereit C, Roeder RG. Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NFκB) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type I promotor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:4700–4704.
52. Trono D, Feinberg MG, Baltimore D. HIV-1 Gag mutants can dominantly interfere with the replication of the wild-type virus. *Cell* 1989;59:113–120.
53. South TL, Blake PR, Sowder RC, Arthur LO, Henderson LE, Summers MF. The nucleocapsid protein isolated from HIV-1 particles binds zinc and forms retroviral-type zinc fingers. *Biochemistry* 1990;29:7786–7789.
54. Dorfman T, Burkovsky A, Ohagen A, Hoglund S, Gottlinger HG. Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1994;68:8180–8187.
55. Levy J, Shimabukuro J, McHugh T, Casavant C, Stites D, Oshiro L. AIDS-associated retroviruses (ARV) can productively infect other cells besides human T helper cells. *Virology* 1985;147:441–448.
56. Sakai K, Dewhurst S, Ma XY, Volsky DJ. Differences in cytopathogenicity and host cell range among infectious molecular clones of human immunodeficiency virus type 1 simultaneously isolated from an individual. *J Virol* 1988;62: 4078–4085.
57. Cheng-Mayer C, Levy JA. Distinct biological and serological properties of human immunodeficiency viruses from the brain. *Ann Neurol* 1988;23(suppl): 58–61.
58. Fenyo EM, Albert J, Asjo B. Replicative capacity, cytopathic effect and cell tropism of HIV. *AIDS* 1989;3(suppl 1):5–12.
59. York-Higgins D, Cheng-Mayer C, Bauer D, Levy JA, Dina D. Human immunodeficiency virus type 1 cellular host range, replication, cytopathicity are linked to the envelope region of the viral genome. *J Virol* 1990;64:4016–4020.
60. deJong JJ, Goudsmit J, Keulen W, et al. Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *J Virol* 1992;66:757–765.
61. Kuiken CL, deJong JJ, Baan E, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. Evolution of the V3 envelope domain in proviral sequences and isolates of human immunodeficiency virus type 1 during transition of the viral biological phenotype. *J Virol* 1992;66:4622–4627.
62. Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 1991;253:71–74.
63. Takeuchi Y, Akutsu M, Murayama K, Shimuzu N, Hoshino H. Host range mutant of human immunodeficiency virus type 1: modification of cell tropism by a single point mutation at the neutralization epitope in the env gene. *J Virol* 1991;65: 1710–1718.
64. Cheng-Mayer C, Shioda T, Levy JA. Host range, replicative, and cytopathic properties of human immunodeficiency virus type 1 are determined by a very few amino acid changes in tat and gp120. *J Virol* 1991;65:6931–6941.
65. Fouchier RA, Groenink M, Koostra NA, et al. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* 1992;66:3183–3187.
66. Gu R, Westervelt P, Ratner L. Role of HIV-1 envelope V3 loop cleavage in cell tropism. *AIDS Res Hum Retrovir* 1993;9:1007–1015.
67. Ebenbichler C, Westervelt P, Carrillo A, Henkel T, Johnson D, Ratner L. Structure-function relationships of the HIV-1 envelope V3 loop tropism determinant: evidence for two distinct conformations. *AIDS* 1993;7:639–646.
68. Bhattacharyya D, Brooks BR, Callahan L. Positioning of positively charged residues in the V3 loop correlates with HIV type 1 syncytium-inducing phenotype. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996;12:83–90.
69. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* 1996;2:1244–1247.
70. Zhang LQ, Mackenzie P, Cleland A, Holmes EC, Leigh-Brown AJ, Simmonds P. Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection. *J Virol* 1993;67: 3345–3356.
71. Zhu T, Mo H, Wang N, et al. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 in patients with primary infection. *Science* 1993;261:1179–1181.
72. Tersmette M, Lange JMA, DeGoede REY, et al. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* 1989;1:983–985.
73. Tersmette M, Gruters RA, DeWolf F, et al. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J Virol* 1989;63: 2118–2125.
74. Cheng-Mayer C, Seto D, Tateno M, Levy JA. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science* 1988;240:80–82.
75. Koot M, Keet IPM, Vos AHV, et al. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993;118:681–688.
76. Richman DD, Bozzette SA. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis* 1994;169: 968–974.
77. Alkhatib G, Broder CC, Berger EA. Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages. *J Virol* 1996;70:5487–5494.
78. Broder CC, Berger EA. Fusogenic selectivity of the envelope glycoprotein is a major determinant of human immunodeficiency virus type 1 tropism for CD4-T-cell lines vs. primary macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92: 9004–9008.
79. Cocchi F, DeVico A, Garzino-Demo A, Arya S, Gallo R, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1α, and MIP-1β as the major HIV suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995;270:1811–1815.
80. Feng Y, Broder C, Kennedy P, Berger E. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane domain, G-protein coupled receptor. *Science* 1996;272:872–877.
81. Berson J, Long D, Doranz B, Rucker J, Jirik F, Doms R. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* 1996;70:6288–6295.
82. Bleul CC, Farzan M, Choe H, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996;382:829–833.
83. Oberlin E, Amara A, Bachelerie F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996;382:833–835.
84. Paxton WA, Martin SR, Tse D, et al. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposures. *Nat Med* 1996;2:412–417.
85. Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 1996;35:3362–3367.
86. Combadiere C, Ahuja SK, Tiffany HL, Murphy PM. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES. *J Leukoc Biol* 1996;60:147–152.
87. Raport C, Gosling J, Schweickart V, Gray P, Charo I. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J Biol Chem* 1996;271:17161–17166.
88. Deng H, Liu R, Ellmeier W, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;381:661–666.
89. Dragic T, Litwin V, Allaway G, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996;381:667–673.
90. Alkhatib G, Combadiere C, Broder C, et al. CC CKR5: A RANTES, MIP-1α, MIP-1β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996;272:1955–1958.
91. Choe H, Farzan M, Sun Y, et al. The β-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996;85:1135–1138.
92. Doranz B, Rucker J, Yi Y, et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2β as fusion cofactors. *Cell* 1996;85:1149–1158.
93. Alkhatib G, Liao F, Berger EA, Farber JM, Peden KW. A new SIV co-receptor, STRL33. *Nature* 1997;388:238.
94. Liao F, Alkhatib G, Peden KW, Sharma G, Berger EA, Farber JM. STRL33, a novel chemokine receptor–like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J Exp Med* 1997;185:2015–2023.
95. Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 1997;388:296–300.
96. Simmons G, Wilkinson D, Reeves J, et al. Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry. *J Virol* 1996;70:8355–8360.
97. Chen Z, Zhou P, Ho DD, Landau NR, Marx PA. Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as a coreceptor for entry. *J Virol* 1997;71:2705–2714.
98. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1–infected individuals. *J Exp Med* 1997;185:621–628.
99. Liu R, Paxton WA, Choe S, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996;86:367–378.
100. Samson M, Libert F, Doranz B, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996;382:722–725.
101. Dean M, Carrington M, Winkler C, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science* 1996;273:1856–1862.
102. Huang Y, Paxton W, Wolinsky S, et al. *The role of a mutant CCR5 allele in HIV-*

1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1996;2:1240–1243.
103. Zimmerman P, Buckler-White A, Alkhatib G, et al. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial backgrounds and quantified risks. *Mol Med* 1997;3:23–36.
104. Biti R, French R, Young J, Bennetts B, Stewart G, Liang T. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med* 1997;3:252–253.
105. Theodorou I, Meyer L, Magierowska M, Katlama C, Rouzioux C. HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5Δ32. *Lancet* 1997;349:1219–1220.
106. O'Brien T, Winkler C, Dean M, et al. HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5Δ32. *Lancet* 1997;349:1219.
107. Bleul C, Wu L, Hoxie J, Springer T, MacKay C. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1925–1930.
108. Wu L, Paxton WA, Kassam N, et al. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J Exp Med* 1997; 185:1681–1692.
109. Atchison RE, Gosling J, Monteclaro FS, et al. Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: dissociation from response to chemokines. *Science* 1996;274:1924–1926.
110. Oravecz T, Pall M, Norcross MA. B-chemokine inhibition of monocytotropic HIV-1 infection. Interference with a postbinding fusion step. *J Immunol* 1996; 157:1329–1332.
111. Simmons G, Clapham PR, Picard L, et al. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* 1997; 276:276–279.
112. Lapham C, Ouyang J, Chadrasekhar B, Nguyen N, Dimitrov D, Golding H. Evidence for cell-surface association between fusin and CD4 gp120 complex in human cell lines. *Science* 1996;274:602–605.
113. Ugolini S, Moulard M, Mondor I, et al. HIV-1 gp120 from T cell line tropic viruses induces and association between CD4 and the chemokine receptor CXCR4. *J Immunol* 1997;159:3000–3008.
114. Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, et al. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* 1996;87:745–756.
115. Kozak SL, Platt EJ, Madani N, Ferro FE Jr, Peden K, Kabat D. CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1997;71: 873–882.
116. Zhang L, Huang Y, He T, Cao Y, Ho D. HIV-1 subtype and second receptor use. *Nature* 1996;383:768.
117. Marcon L, Choe H, Martin KA, et al. Utilization of C-C chemokine receptor 5 by the envelope glycoproteins of a pathogenic simian immunodeficiency virus, SIVmac239. *J Virol* 1997;71:2522–2527.
118. Rucker J, Samson M, Doranz BJ, et al. Regions in β-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. *Cell* 1996;87:437–446.
119. Bieniasz PD, Fridell RA, Aramori I, Ferguson SSG, Caron MG, Cullen BR. HIV-1 induced cell fusion is mediated by multiple regions within both the viral envelope and the CCR-5 co-receptor. *EMBO J* 1997;16:2599–2609.
120. Edinger AL, Amedee A, Miller K, et al. Differential utilization of CCR5 by macrophage and T cell tropic simian immunodeficiency virus strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4005–4010.
121. Wu L, Ruffing N, Shi X, et al. Discrete steps in binding and signaling of interleukin-8 with its receptor. *J Biol Chem* 1996;271:31202–31209.
122. Ahuja SK, Lee JC, Murphy PM. CXC chemokines bind to unique sets of selectivity determinants that can function independently and are broadly distributed on multiple domains of human interleukin-8 receptor B. Determinants of high affinity binding and receptor activation are distinct. *J Biol Chem* 1996;271:225–232.
123. Mori K, Ringler DJ, Desrosiers RC. Restricted replication of simian immunodeficiency virus strain 239 in macrophages is determined by env but is not due to restricted entry. *J Virol* 1993;67:2807–2814.
124. Connor RI, Paxton WA, Sheridan KE, Koup RA. Macrophages and CD4⁺ T-lymphocytes from two multiply exposed, uninfected individuals resist infection with primary non-syncytium-inducing isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1996;70:8758–8764.
125. Rana S, Besson G, Cook DG, et al. Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of HIV: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta CCR5 mutation. *J Virol* 1997;71:3219–3227.
126. Moriuchi M, Moriuchi H, Combadiere C, Murphy PM, Fauci AS. CD8⁺ T-cell–derived factor(s), but not β-chemokines RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta, suppress HIV-1 replication in monocyte/macrophages. *Proc Natl Acad Aci U S A* 1996;93:15341–15345.
127. Hirsch I, de Mareuil J, Salaun D, Chermann JC. Genetic control of infection of primary macrophages with T-cell–tropic strains of HIV-1. *Virology* 1996;219: 257–261.
128. McKnight A, Wilkinson D, Simmons G, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus fusion by a monoclonal antibody to a coreceptor (CXCR4) is both cell type and virus strain dependent. *J Virol* 1997;71:1692–1696.
129. He J, Chen Y, Farzan M, et al. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* 1997;385:645–649.
130. Weissman D, Fauci AS. Role of dendritic cells in immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:358–367.
131. Granelli-Piperno A, Moser B, Pope M, et al. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J Exp Med* 1996; 184:2433–2438.
132. Piatak M, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993;259:1749–1754.
133. Winters MA, Tan LB, Katzenstein DA, Merigan TC. Biological variation and quality control of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA quantitation by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2960–2966.
134. Cohen OJ, Pantaleo G, Holodniy M, et al. Decreased HIV-1 plasma viremia during antiretroviral therapy reflects downregulation of viral replication in lymphoid tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6017–6021.
135. Cohen O, Pantaleo G, Holodniy M, et al. Antiretroviral monotherapy in early stage human immunodeficiency virus disease has no detectable effect on virus load in peripheral blood and lymph nodes. *J Infect Dis* 1996;173:849–856.
136. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995;373:123–126.
137. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995;373:117–122.
138. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996;271:1582–1586.
139. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, et al. Decay characteristics of HIV-1 infected compartments during combination therapy. *Nature* 1997;387:188–191.
140. Heath SL, Tew JG, Tew JG, Szakal AK, Burton GF. Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity. *Nature* 1995;377:740–744.
141. Bonhoeffer S, Coffin JM, Nowak MA. Human immunodeficiency virus drug therapy and virus load. *J Virol* 1997;71:3275–3278.
142. Westermann J, Pabst R. Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunol Today* 1990;11:406–410.
143. Connors M, Kovacs JA, Krevat S, et al. HIV infection induces changes in CD4⁺ T-cell phenotype and depletions within the CD4⁺ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies. *Nat Med* 1997;3: 533–540.
144. Wolthers KC, Wisman GBA, Otto SA, et al. T cell telomere length in HIV-1 infection: no evidence for increased CD4⁺ T cell turnover. *Science* 1996;274: 1543–1547.
145. Palmer LD, Weng N, Levine BL, June CH, Lane HC, Hodes RJ. Telomere length, telomerase activity, and replicative potential in HIV infection: analysis of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from HIV-discordant monozygotic twins. *J Exp Med* 1997;185: 1381–1386.
146. Shaw GM, Hahn BH, Arya SK, Groopman JE, Gallo RC, Wong-Staal F. Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science* 1984;226:1165–1171.
147. Wong-Staal F, Shaw GM, Hahn BH, et al. Genomic diversity of human T-lymphotropic virus type III. *Science* 1985;229:759–762.
148. Hahn BH, Gonda MA, Shaw GM, et al. Genomic diversity of the acquired immune deficiency syndrome virus HTLV-III: different viruses exhibit greatest divergence in their envelope genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:4813–4817.
149. Benn S, Rutledge R, Folks T, et al. Genomic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. *Science* 1985;230:949–951.
150. Ratner L, Haseltine W, Patarca R, et al. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 1985;313:277–284.
151. Rabson AB, Martin MA. Molecular organization of the AIDS retrovirus. *Cell* 1985;40:477–480.
152. Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, et al. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 1986;45:637–648.
153. Hahn BH, Shaw GM, Taylor ME, et al. Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. *Science* 1986;232:1548–1553.
154. Temin HW. Is HIV unique or merely different? J AIDS 1989;2:1–9.
155. Gojobori T, Moriyama EN, Kimura M. Molecular clock of viral evolution, and the neutral theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:10015–10018.
156. Delassus S, Cheynier R, Wain-Hobson S. Nonhomogeneous distribution of human immunodeficiency virus type 1 proviruses in the spleen. *J Virol* 1992;66: 5642–5645.
157. Cheynier R, Henrichwark S, Hadida F, et al. HIV and T cell expansion in splenic white pulps is accompanied by infiltration of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cell* 1994;78:373–387.
158. Fisher AG, Ensoli B, Looney D, et al. Biologically diverse molecular variants within a single HIV-1 isolate. *Nature* 1988;334:444–447.
159. Bonhoeffer S, Holmes EC, Nowak MA. Causes of HIV diversity. *Nature* 1995; 376:125.
160. Larder B, Kemp S. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* 1989;246:1155–1158.
161. Simmonds P, Balfe P, Ludlam CA, Bishop JO, Brown AJ. Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1990;64:5840–5850.
162. Kliks SC, Shioda T, Haigwood NL, Levy JA. V3 variability can influence the

ability of an antibody to neutralize or enhance infection by diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90: 11518–11522.

163. Jansson M, Popovic M, Karlsson A, et al. Sensitivity to inhibition by β-chemokines correlates with biological phenotypes of primary HIV-1 isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:15382–15387.
164. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995;267:483–489.
165. Zhang L, Diaz RS, Ho DD, Mosley JW, Busch MP, Mayer A. Host-specific driving force in human immunodeficiency virus type 1 evolution in vivo. *J Virol* 1997;71:2555–2561.
166. Fauci A. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 1996;384:529–534.
167. Michael N, Chang G, Louie L, et al. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1997;3:338–340.
168. Delwart EL, Sheppard HW, Walker BD, Goudsmit J, Mullins JI. Human immunodeficiency virus type 1 evolution in vivo tracked by DNA heteroduplex mobility assays. *J Virol* 1994;68:6672–6683.
169. Lukashov VV, Kuiken CL, Goudsmit J. Intrahost human immunodeficiency virus type 1 evolution is related to length of the immunocompetent period. *J Virol* 1995;69:6911–6916.
170. Wolinsky SM, Korber BTM, Neumann AU, et al. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* 1996;272:537–542.
171. McDonald RA, Mayers DL, Chung RC-Y, et al. Evolution of human immunodeficiency virus type 1 env sequence variation in patients with diverse rates of disease progression and T-cell function. *J Virol* 1997;71:1871–1879.
172. Nowak MA, Anderson RM, McLean AR, Wolfs TF, Goudsmit J, May RM. Antigenic diversity thresholds and the development of AIDS. *Science* 1991;254: 963–941.
173. Nowak MA, May RM, Phillips RE, et al. Antigenic oscillations and shifting immunodominance in HIV-1 infections. *Nature* 1995;375:606–611.
174. Nowak MA, Bangham CRM. Population dynamics of immune responses to persistent viruses. *Science* 1996;272:74–79.
175. Pantaleo G, Demarest JF, Schacker T, et al. The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:254–258.
176. Simmonds P, Zhang LQ, McOmish F, Balfe P, Ludlam CA, Brown AJL. Discontinuous sequence change of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 env sequences in plasma viral and lymphocyte-associated proviral populations in vivo: implications for models of HIV pathogenesis. *J Virol* 1991;65:6266–6276.
177. Zhang Y-M, Dawson SC, Landsman D, Lane HC, Salzman NP. Persistence of four related human immunodeficiency virus subtypes during the course of zidovudine therapy: relationship between virion RNA and proviral DNA. *J Virol* 1994;68:425–432.
178. Michael NL, Chang G, Ehrenberg PK, Vahey MT, Redfield RR. HIV-1 proviral genotypes from the peripheral blood mononuclear cells of an infected patient are differentially represented in expressed sequences. *J AIDS* 1993;6:1073–1085.
179. Ball JK, Holmes EC, Whitwell H, Desselberger U. Genomic variation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): molecular analyses of HIV-1 in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. *J Gen Virol* 1994;75: 867–879.
180. Cheng-Mayer C, Weiss C, Seto D, Levy JA. Isolates of human immunodeficiency virus type 1 from the brain may constitute a special group of the AIDS virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;80:8575–8579.
181. Epstein LG, Kuiken C, Blumberg BM, et al. HIV-1 V3 domain variation in brain and spleen of children with AIDS: tissue-specific evolution within host-determined quasispecies. *Virology* 1991;180:583–590.
182. Pang S, Vinters HV, Akashi T, O'Brien WA, Chen ISY. HIV-1 Env sequence variation in brain tissue of patients with AIDS-related neurologic disease. *J AIDS* 1991;4:1082–1092.
183. Ait-Khaled M, McLaughlin JE, Johnson MA, Emery VC. Distinct HIV-1 long terminal repeat quasispecies present in nervous tissues compared to that in lung, blood and lymphoid tissues of an AIDS patients. *AIDS* 1995;9:675–683.
184. Wong JK, Ignacio CC, Torriani F, Havlir D, Fitch NJS, Richman DD. In vivo compartmentalization of human immunodeficiency virus: evidence from the examination of pol sequences from autopsy tissues. *J Virol* 1997;71:2059–2071.
185. Itescu S, Simonelli PF, Winchester RJ, Ginsberg HS. Human immunodeficiency virus type 1 strains in the lungs of infected individuals evolve independently from those in peripheral blood and are highly conserved in the C-terminal region of the envelope V3 loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91: 11378–11382.
186. Zhu T, Wang N, Carr A, et al. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J Virol* 1996;70: 3098–3107.
187. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci A. Virologic and immunologic events in primary HIV infection. *Springer Semin Immunopathol* 1997;18:257–266.
188. Schnittman SM, Psallidopoulos MC, Lane HC, et al. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* 1989;245:305–308.
189. Spira AI, Marx PA, Patterson BK, et al. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J Exp Med* 1996;183:215–225.
190. Weissman D, Li Y, Ananworanich J, et al. Three populations of cells with dendritic morphology exist in peripheral blood, only one of which is infectable with human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92: 826–830.
191. Pope M, Betjes MG, Romani N, et al. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 1994; 78:389–398.
192. Frankel SS, Wenig BM, Burke AP, et al. Replication of HIV-1 in dendritic cell–derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* 1996; 272:115 117.
193. Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, et al. Major expansion of $CD8^+$ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* 1994;370:463–467.
194. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MBA. Virus-specific $CD8^+$ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994;68:6103–6110.
195. Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1991;324:961–964.
196. Moore JP, Cao Y, Ho DD, Koup RA. Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1994;68:5142–5155.
197. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994;68:4650–4655.
198. Clark SJ, Saag MS, Decker WD, et al. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1991;324: 954–960.
199. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, et al. Studies in subject with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995; 332:209–216.
200. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest J, et al. Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunol Rev* 1994; 140:105–130.
201. Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, et al. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:9838–9842.
202. Chakrabarti L, Isola P, Cumont M, Claessens-Maire M, Hurtrel M, Montagnier L. Early stages of simian immunodeficiency virus infection in lymph nodes. Evidence for high viral load and successive populations of target cells. *Am J Pathol* 1994;144:1226–1237.
203. Reimann KA, Tenner-Racz K, Racz P. Immunopathogenic events in acute infection of Rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J Virol* 1994;68:2362–2370.
204. Montefiori DC, Pantaleo G, Fink LM, et al. Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors. *J Infect Dis* 1996;173:60–67.
205. Pilgrim A, Pantaleo G, Cohen O, et al. Neutralizing antibody responses at various stages of infection with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1997;176:924–932.
206. Mackewicz CE, Yang LC, Lifson JD, Levy JA. Non-cytolytic CD8 T-cell anti-HIV responses in primary HIV-1 infection. *Lancet* 1994;344:1671–1673.
207. Pantaleo G, Soudeyns H, Demarest J, et al. Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific $CD8^+$ T cell clones during primary HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:9848–9853.
208. Graziosi C, Pantaleo G, Butini L, et al. Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DNA and RNA synthesis during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:6405–6409.
209. Clayette P, Le Grand R, Noack O, et al. Tumor necrosis factor-alpha in serum of macaques during SIVmac251 acute infection. *J Med Primatol* 1995;24:94–100.
210. Cheret A, Le Grand R, Caufour P, et al. Cytokine mRNA expression in mononuclear cells from different tissues during acute SIVmac251 infection of macaques. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996;12:1263 1272.
211. Benveniste O, Vaslin B, Le Grand R, et al. Interleukin 1 beta, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha, and interleukin 10 responses in peripheral blood mononuclear cells of cynomolgus macaques during acute infection with SIVmac251. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996;12:241–250.
212. Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, et al. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 1987;328:345–348.
213. Plata F, Autran B, Martins LP, et al. AIDS virus–specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. *Nature* 1987;328:348–351.
214. Britton CB, Miller JR. Neurological complications in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Neurol Clin* 1984;2:315–339.
215. Neilson SL, Petito CK, Urmacher CD, Posner JB. Subacute encephalitis in acquired immune deficiency syndrome: a postmortem study. *Am J Clin Pathol* 1984;82:678–682.
216. Faulstich M. Acquired immune deficiency syndrome: an overview of central nervous system complications and neuropsychological sequelae. *Int J Neurosci*

1986;30:249–254.
217. Gabuza DH, Ho DD, de la Monte SM, Hirsch MS, Rota TR, Sobel RA. Immunohistochemical identification of HTLV-III antigen in brains of patients with AIDS. *Ann Neurol* 1986;20:289–295.
218. Chun T-W, Carruth L, Finzi D, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV infection. *Nature* 1997;387:183–187.
219. Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR* 1992;41:1–19.
220. Albrecht H. Redefining AIDS: towards a modification of the current AIDS case definition. *Clin Infect Dis* 1997;24:64–74.
221. Cinque P, Brytting M, Vago L, et al. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet* 1993;342:398–401.
222. Laga M, Icenogle J, Marsella R, et al. Genital papillomavirus infection and cervical dysplasia—opportunistic complications of HIV infection. *Int J Cancer* 1992;50:45–48.
223. Schrager L, Friedland G, Maude D, et al. Cervical and vaginal squamous cell abnormalities in women infected with human immunodeficiency virus. *J AIDS* 1989;2:570–575.
224. Moore PS, Chang Y. Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection. *N Engl J Med* 1995;332: 1181–1185.
225. Schalling M, Ekman M, Kaaya EE, Linde A, Biberfeld P. A role for a new herpes virus (KSHV) in different forms of Kaposi's sarcoma. *Nat Med* 1995;1: 707–708.
226. Crowe S, Carlin J, Stewart K, Lucas C, Hoy J. Predicitve value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. *J AIDS* 1991;4:770–776.
227. Moore R, Chaisson R. Natural history of opportunistic disease in an HIV-infected urban clinical cohort. *Ann Intern Med* 1996;124:633–642.
228. Enger C, Graham N, Peng Y, et al. Survival from early, intermediate, and late stages of HIV infection. *JAMA* 1996;275:1329–1334.
229. Chiasson M, Berenson L, Li W, Schwartz S, Mojica B, Hamburg M. Declining AIDS mortality in New York City [Abstract 376]. Fourth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington, DC, 1997.
230. Graham N, Zeger S, Park L, et al. The effects on survival of early treatment of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1992;326:1037–1042.
231. Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, et al. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus–seropositive patients independent of CD4⁺ cell numbers and clinical settings. *J Clin Invest* 1989;84:1892–1899.
232. Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:825–854.
233. Stevenson M, Meier C, Mann AM, Chapman N, Wasiak A. Envelope glycoprotein of HIV induces interference and cytolysis resistance in CD4⁺ cells: mechanisms for persistence in AIDS. *Cell* 1988;53:483–496.
234. Garcia JV, Miller AD. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 1991;350:508–511.
235. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* 1992;66: 7193–7200.
236. Yao XJ, Friborg J, Checroune F, et al. Degradation of CD4 induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: a predicted alpha-helix structure in the proximal cytoplasmic regin of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *Virology* 1995;209:615–623.
237. Schnittman SM, Lane HC, Greenhouse J, Justement JS, Baseler M, Fauci AS. Preferential infection of CD4⁺ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:6058–6062.
238. Chun T-W, Chadwick K, Margolick J, Siliciano R. Differential susceptibility of naive and memory CD4⁺ T cells to the cytopathic effects of infection with human immunodeficiency virus type 1 strain LAI. *J Virol* 1997;71:4436–4444.
239. Gupta S, Vayuvegula B. Human immunodeficiency virus–associated changes in signal transduction. *J Clin Immunol* 1987;7:486–489.
240. Linette GP, Hartzman RJ, Ledbetter JA, June CH. HIV-1–infected T cells show a selective signaling defect after perturbation of CD3/antigen receptor. *Science* 1988;241:573–576.
241. Cefai D, Debre P, Kaczorek M, Idziorek T, Autran B, Bismuth G. Human immunodeficiency virus-1 glycoproteins gp120 and gp160 specifically inhibit the CD3/T cell-antigen receptor phosphoinositide transduction pathway. *J Clin Invest* 1990;86:2117–2124.
242. Gaulton GN, Brass LF, Kozbor D, Pletcher CH, Hoxie JA. Inhibition of T cell antigen receptor–dependent phosphorylation of CD4 in human immunodeficiency virus type 1 infected cells. *J Biol Chem* 1992;267:4102–4109.
243. Cohen DI, Tani Y, Tian H, Boone E, Samelson LE, Lane HC. Participation of tyrosine phosphorylation in the cytopathic effect of human immunodeficiency virus-1. *Science* 1992;256:542–545.
244. Cefai D, Ferrer M, Serpente N, et al. Internalization of HIV glycoprotein gp120 is associated with down-modulation of membrane CD4 and p56lck together with impairment of T cell activation. *J Immunol* 1992;149:285–294.
245. Hivroz C, Mazerolles F, Soula M, et al. Human immunodeficiency virus gp120 and derived peptides activate protein tyrosine kinase p56lck in human CD4 T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1993;23:600–607.
246. Goldman F, Jensen W, Johnson G, Heasley L, Cambier J. gp120 ligation of CD4 induces p56lck activation and TCR desensitization independent of TCR tyrosine phosphorylation. *J Immunol* 1994;153:2905–2917.
247. Chirmule N, McCloskey TW, Hu R, Kalyanaraman VS, Pahwa S. HIV gp120 inhibits T cell activation by interfering with expression of costimulatory molecules CD40 ligand and CD80 (B7-1). *J Immunol* 1995;155:917–924.
248. Guntermann C, Dye J, Nye KE. Human immunodeficiency virus infection abolishes CD4-dependent activation of ZAP-70 by inhibition of p56lck. *J AIDS Hum Retrovir* 1997;14:204–212.
249. Ioachim HL, Lerner CW, Tapper ML. The lymphoid lesions associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Surg Pathol* 1983;7:543–553.
250. Fernandez R, Mouradian J, Metroka C, Davies J. The prognostic value of histopathology in persistent generalized lymphadenopathy in homosexual men. *N Engl J Med* 1983;309:185–186.
251. Janossy G, Pinching AJ, Bofill M, et al. An immunohistological approach to persistent lymphadenopathy and its relevance to AIDS. *Clin Exp Immunol* 1985;59: 257–266.
252. Biberfeld P, Chayt K, Marselle L, Biberfeld G, Gallo R, Harper M. HTLV-III expression in infected lymph nodes and relevance to pathogenesis of lymphadenopathy. *Am J Pathol* 1986;125:436–442.
253. Racz P, Tenner-Racz K, Kahl C, Feller AC, Kern P, Dietrich M. Spectrum of morphologic changes of lymph nodes from patients with AIDS or AIDS-related complexes. *Prog Allergy* 1986;37:81–181.
254. Pallesen G, Gerstoft J, Mathiesen L. Stages in LAV/HTLV-III lymphadenitis: I. Histological and immunohistological classification. *Scand J Immunol* 1987;25: 83–91.
255. Turner R, Levine A, Gill P, Parker J, Meyer P. Progressive histopathologic abnormalities in the persistent generalized lymphadenopathy syndrome. *Am J Surg Pathol* 1987;11:625–632.
256. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; 362:355–358.
257. Tew JG, Burton GF, Kupp LI, Szakal A. Follicular dendritic cells in germinal center reactions. *Adv Exp Med Biol* 1993;329:461–465.
258. Fleming TR, DeMets DL. Surrogate endpoints in clinical trials: are we being misled? *Ann Intern Med* 1996;125:605–613.
259. Moss A, Bacchetti P, Osmond D, et al. Seropositivity for HIV and the development of AIDS or AIDS related condition: three year follow up of the San Francisco General Hospital cohort. *Br Med J* 1988;296:745–750.
260. MacDonnell K, Chmiel J, Poggensee L, Wu S, Phair J. Predicting progression to AIDS: combined usefulness of CD4 lymphocyte counts and p24 antigenemia. *Am J Med* 1990;89:706–712.
261. Fahey J, Taylor J, Detels R, et al. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1990;322:166–172.
262. Eyster M, Gail M, Ballard J, Al-Mondhiry H, Goedert J. Natural history of human immunodeficiency virus infections in hemophiliacs: effects of T-cell subsets, platelet counts, and age. *Ann Intern Med* 1987;107:1–6.
263. Goedert J, Kessler C, Aledort L, et al. A prospective study of human immunodeficiency virus type 1 infection and the development of AIDS in subjects with hemophilia. *N Engl J Med* 1989;321:1141–1148.
264. Munoz A, Vlahov D, Solomon L, et al. Prognostic indicators for development of AIDS among intravenous drug users. *J AIDS* 1992;5:694–700.
265. Taylor J, Fahey J, Detels R, Giorgi J. CD4 percentage, CD4 number, and CD4:CD8 ratio in HIV infection: which to choose and how to use. *J AIDS* 1989; 2:114–124.
266. Stein D, Korvick J, Vermund S. CD4⁺ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. *J Infect Dis* 1992;165:352–363.
267. Phillips A, Lee C, Elford J, et al. Serial CD4 lymphocyte counts and the development of AIDS. *Lancet* 1991;337:389–392.
268. Yarchoan R, Weinhold K, Lyerly H, et al. Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex. *Lancet* 1986;1:575–580.
269. Fischl M, Richman D, Grieco M, et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 1987;317:185–191.
270. Fischl M, Richman D, Hansen N, et al. The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1990;112:727–737.
271. Volberding P, Lagakos S, Koch M, et al. Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter. *N Engl J Med* 1990;322:941–949.
272. Choi S, Lagakos S, Schooley R, Volberding P. CD4⁺ lymphocytes are an incomplete surrogate marker for clinical progression in persons with asymptomatic HIV infection taking zidovudine. *Ann Intern Med* 1993;118:674–680.
273. Concorde Coordinating Commitee. Concorde: MRC/ANRS randomised double-

blind controlled trial of immediate and deferred zidovudine in symptom-free HIV infection. *Lancet* 1994;343:871–881.

274. Volberding P, Lagakos S, Grimes J, et al. A comparison of immediate with deferred zidovudine therapy for asymptomatic HIV-infected adults with CD4 cell counts of 500 or more per cubic millimeter. *N Engl J Med* 1995;333: 401–407.
275. Anderson R, Lang W, Shiboski S, Royce R, Jewell N, Winkelstein W. Use of β_2-microglobulin level and CD4 lymphocyte count to predict development of acquired immunodeficiency syndrome in persons with human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 1990;150:73–77.
276. Lifson A, Hessol N, Buchbinder S, et al. Serum β_2-microglobulin and prediction of progression to AIDS in HIV infection. *Lancet* 1992;339:1436–1440.
277. Kramer A, Wiktor S, Fuchs D, et al. Neopterin: a predictive marker of acquired immune deficiency syndrome in human immunodeficiency virus infection. *J AIDS* 1989;2:291–296.
278. Melmed R, Taylor J, Detels R, Bozorgmehri M, Fahey J. Serum neopterin changes in HIV-infected subjects: indicator of significant pathology, CD4 T cell changes, and the development of AIDS. *J AIDS* 1989;2:70–76.
279. Folks TM, Clouse KA, Justement J, et al. Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:2365–2368.
280. Poli G, Kinter A, Justement JS, et al. Tumor necrosis factor alpha functions in an autocrine manner in the induction of human immunodeficiency virus expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:782–785.
281. Godfried MH, vanderPoll T, Weverling GJ, et al. Soluble receptors for tumor necrosis factor as predictors of progression to AIDS in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1994;169:739–745.
282. Bilello JA, Stellrecht K, Drusano GL, Stein DS. Soluble tumor necrosis factor-alpha receptor type II (sTNF alpha RII) correlates with human immunodeficiency virus (HIV) RNA copy number in HIV-infected patients. *J Infect Dis* 1996;173:464–467.
283. Frissen PH, Weverling GJ, Endert E, Jansen J, Sauerwein HP, Lange JM. Predictive value for survival of soluble tumor necrosis factor receptors p55 and p75 during zidovudine-containing treatment in symptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J AIDS Hum Retrovir* 1996;15:482–488.
284. Miedema F, Petit AJ, Terpstra FG, et al. Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4+ T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest* 1988;82:1908–1914.
285. Gruters RA, Terpstra FG, DeJong R, Noesel CJV, Lier RAV, Miedema F. Selective loss of T cell functions in different stages of HIV infection. Early loss of anti-CD3–induced T cell proliferation followed by decreased anti-CD3–induced cytotoxic T lymphocyte generation in AIDS-related complex and AIDS. *Eur J Immunol* 1990;20:1039–1044.
286. Blatt SP, Hendrix CW, Butzin CA, et al. Delayed-type hypersensitivity skin testing predicts progression to AIDS in HIV-infected patients. *Ann Intern Med* 1993; 119:177–184.
287. Dolan MJ, Clerici M, Blatt SP, et al. In vitro T cell function, delayed-type hypersensitivity skin testing, and CD4+ T cell subset phenotyping independently predict survival time in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1995;172:79–87.
288. Gordin FM, Hartigan PM, Klimas NG, Zolla-Pazner SB, Simberkoff MS, Hamilton JD. Delayed-type hypersensitivity skin tests are an independent predictor of human immunodeficiency virus disease progression. *J Infect Dis* 1994; 169:893–897.
289. Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R. Elevated levels of CD38+CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. *J AIDS* 1993;6:904–912.
290. Giorgi JV, Ho H-N, Hirji K, et al. CD8+ lymphocyte activation at human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: development of HLA-DR+ CD38- CD8+ cells is associated with subsequent stable CD4+ cell levels. *J Infect Dis* 1994;170:775–781.
291. Haug C, Muller F, Aukrust P, Froland SS. Subnormal serum concentration of 1,25-vitamin D in human immunodeficiency virus infection: correlation with degree of immune deficiency and survival. *J Infect Dis* 1994;169:889–893.
292. Polis MA, Masur H. Predicting the progression to AIDS. *Am J Med* 1990;89: 701–705.
293. Ho D, Moudgil T, Alam M. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N Engl J Med* 1989;321:1621–1625.
294. Coombs R, Collier A, Allain J, et al. Plasma viremia in human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1989;321:1626–1631.
295. Saag M, Crain M, Decker W, et al. High-level viremia in adults and children infected with human immunodeficiency virus: relation to disease stage and CD4+ lymphocyte levels. *J Infect Dis* 1991;164:72–80.
296. Davey RT, Dewar RL, Reed GF, et al. Plasma viremia as a sensitive indicator of the antiretroviral activity of L-697,661. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90: 5608–5612.
297. DeGruttola V, Beckett L, Coombs R, et al. Serum p24 antigen level as an intermediate end point in clinical trials of zidovudine in people infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1994;169:713–721.
298. Schnittman SM, Greenhouse JJ, Psallidopoulos MC, et al. Increasing viral burden in CD4+ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Ann Intern Med* 1990;113:438–443.
299. Bagnarelli P, Menzo S, Valenza A, et al. Molecular profile of human immunodeficiency virus type 1 infection in symptomless patients and in patients with AIDS. *J Virol* 1992;66:7328–7335.
300. Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1–infected individuals. *J Virol* 1993;67: 1772–1777.
301. Chevret S, Kirsteter M, Mariotti M, Lefrere F, Frottier J, Lefrere J-J. Provirus copy number to predict disease progression in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1994;169:882–885.
302. Aoki S, Yarchoan R, Thomas RV, et al. Quantitative analysis of HIV-1 proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells from patients with AIDS or ARC: decrease of proviral DNA content following treatment with 2′,3′-dideoxyinosine (ddI). *AIDS Res Hum Retrovir* 1990;6:1331–1339.
303. Clark AGB, Holodniy M, Schwartz DH, Katzenstein DA, Merigan TC. Decrease in HIV provirus in peripheral blood mononuclear cells during zidovudine and human rIL-2 administration. *J AIDS* 1992;5:52–59.
304. Edlin BR, Weinstein RA, Whaling SM, et al. Zidovudine–interferon-alpha combination therapy in patients with advanced human immunodeficiency virus type 1 infection: biphasic response of p24 anigen and quantitative polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1992;165:793–798.
305. Donovan RM, Dickover RE, Goldstein E, Huth RG, Carlson JR. HIV-1 proviral copy number in blood mononuclear cells from AIDS patients on zidovudine therapy. *J AIDS* 1991;4:766–769.
306. Furtado MR, Murphy R, Wolinsky SM. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 tat mRNA as a marker for assessing the efficacy of antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 1993;167:213–216.
307. Katzenstein DA, Winters M, Bubp J, Israelski D, Winger E, Merigan TC. Quantitation of human immunodeficiency virus by culture and polymerase chain reaction in response to didanosine after long-term therapy with zidovudine. *J Infect Dis* 1994;169:416–419.
308. Bagnarelli P, Menzo S, Valenza A, et al. Quantitative molecular monitoring of human immunodeficiency virus type 1 activity during therapy with specific antiretroviral compounds. *J Clin Microbiol* 1995;33:16–23.
309. Donovan RM, Bush CE, Smereck SM, Baxa DM, Markowitz NP, Saravolatz LD. Rapid decrease in unintegrated human immunodeficiency virus DNA after the initiation of nucleoside therapy. *J Infect Dis* 1994;170:202–205.
310. Saksela K, Stevens CE, Rubinstein P, Taylor PE, Baltimore D. HIV-1 messenger RNA in peripheral blood mononuclear cells as an early marker of risk for progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1995;123:726–727.
311. Michael NL, Vahey M, Burke RS, Redfield RR. Viral DNA and mRNA expression correlate with the stage of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection in humans: evidence for viral replication in all stages of HIV disease. *J Virol* 1992;66:310–316.
312. Seshamma T, Bagasra O, Trono D, Baltimore D, Pomerantz RJ. Blocked early-stage latency in the peripheral blood cells of certain individuals infected with human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89: 10663–10667.
313. Gupta P, Kingsley L, Armstrong J, Ding M, Cottrill M, Rinaldo C. Enhanced expression of human immunodeficiency virus type 1 correlates with development of AIDS. *Virology* 1993;196:586–595.
314. Michael NL, Mo T, Merzouki A, et al. Human immunodeficiency virus type 1 cellular RNA load and splicing patterns predict disease progression in a longitudinally studied cohort. *J Virol* 1995;69:1868–1877.
315. Furtado MR, Kingsley LA, Wolinsky SM. Changes in the viral mRNA expression pattern correlate with a rapid rate of CD4- T-cell number decline in human immunodeficiency virus type 1- infected individuals. *J Virol* 1995;69:2092–2100.
316. Lafeuillade A, Poggi C, Profizi N, Tamalet C, Costes O. Human immunodeficiency virus type 1 kinetics in lymph nodes compared with plasma. *J Infect Dis* 1996;174:404–407.
317. Haase AT, Henry K, Zupancic M, et al. Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science* 1996;274:985–989.
318. Hewlett I, Gregg R, Ou C, et al. Detection in plasma of HIV-1 specific DNA and RNA by polymerase chain reaction before and after seroconversion. *J Clin Immunoassay* 1988;11:161–164.
319. Kievits T, vanGemen B, vanStrijp D, et al. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J Virol Methods* 1991;35:273–286.
320. Urdea MS, Wilber JC, Yeghiazarian T, et al. Direct and quantitative detection of HIV-1 RNA in human plasma with a branched DNA signal amplification assay. *AIDS* 1993;7(suppl 2):11–14.
321. Embretson J, Zupancic M, Ribas J, et al. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993;362:359–362.
322. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272:1167–1170.
323. Coombs RW, Welles SL, Hooper C, et al. Association of plasma human immun-

odeficiency virus type 1 RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. *J Infect Dis* 1996;174:704–712.

324. Welles SL, Jackson JB, Yen-Lieberman B, et al. Prognostic value of plasma human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA levels in patients with advanced HIV-1 disease and with little or no prior zidovudine therapy. *J Infect Dis* 1996;174:696–703.
325. O'Brien WA, Hartigan PM, Martin D, et al. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. *N Engl J Med* 1996;334:426–431.
326. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, et al. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 1995;122: 573–579.
327. Schacker TW, Hughes J, Shea T, Corey L. Virologic course of primary HIV infection [Abstract 480]. 3rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 1996.
328. Jurriaans S, vanGemen B, Weverling GJ, et al. The natural history of HIV-1 infection: virus load and virus phenotype independent determinants of clinical course? *Virology* 1994;204:223–233.
329. Phillips AN. Reduction of HIV concentration during acute infection: independence from a specific immune response. *Science* 1996;271:497–499.
330. Carpenter CCJ, Fischl MA, Hammer SM, et al. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1996. *JAMA* 1996;276:146–154.
331. Carpenter C, Fischl M, Hammer S, et al. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997—updated recommendations of the International AIDS Society USA panel. *JAMA* 1997;277:1962–1969.
332. Department of Health and Human Services/Henry J. Kaiser Family Foundation Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. *MMWR* 1998;47(RR-5):43–82.
333. Collier AC, Coombs RW, Schoenfeld DA, et al. Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. *N Engl J Med* 1996;334:1011–1017.
334. Markowitz M, Cao Y, Hurley A, et al. Triple therapy with AZT, 3TC, and ritonavir in 12 subjects newly infected with HIV-1 [Abstract Th.B.933]. Eleventh International Conference on AIDS, 1996.
335. Cavert W, Notermans DW, Staskus K, et al. Kinetics of response in lymphoid tissuses to antiretroviral therapy of HIV-1 infection. *Science* 1997;276:960–963.
336. Gulick R, Mellors J, Havlir D, et al. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1997;337:734–739.
337. Hammer S, Squires K, Hughes M, et al. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. *N Engl J Med* 1997;337: 725–733.
338. Kahn J, Allan J, Hodges T, et al. The safety and pharmacokinetics of recombinant soluble CD4 (rCD4) in subjects with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. A phase 1 study. *Ann Intern Med* 1990;112: 254–261.
339. Schooley R, Merigan T, Gaut P, et al. Recombinant soluble CD4 therapy in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. A phase I–II escalating dosage trial. *Ann Intern Med* 1990;112: 247–253.
340. Arenzana-Seisdedos F, Virelizier J-L, Rousset D, et al. HIV blocked by chemokine antagonist. *Nature* 1996;383:400.
341. Schols D, Cabrera C, Henson G, Clotet B, DeClerq E. Inhibition of HIV-1 replication by the bicyclam AMD3100, a CXCR4 antagonist. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997 (Abstract I-66.)
342. Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, et al. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85: 4686–4690.
343. Navia MA, Fitzgerald PM, McKeever BM, et al. Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* 1989;337: 615–620.
344. Wlodawer A, Miller M, Jaskolski M, et al. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* 1989;245:616–621.
345. Dyda F, Hickman AB, Jenkins TM, Engelman A, Craigie R, Davies DR. Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science* 1994;266:1981–1986.
346. Farnet CM, Bushman FD. HIV cDNA integration: molecular biology and inhibitor development. *AIDS* 1996;10(suppl A):3–11.
347. Haubrich RH, Flexner C, Lederman MM, et al. A randomized trial of the acitivity and safety of Ro 24-7429 (Tat antagonist) versus nucleoside for human immunodeficiency virus infection. The AIDS Clinical Trials Group 213 Team. *J Infect Dis* 1995;172:1246–1252.
348. Kinloch-DeLoes S, Hirschel BJ, Hoen B, et al. A controlled trial of zidovudine in primary human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995;333: 408–413.
349. Volberding P, Lagakos S, Grimes J, et al. The duration of zidovudine benefit in persons with asymptomatic HIV infection. *JAMA* 1994;272:437–442.
350. Kahn J, Lagakos S, Richman D, et al. A controlled trial comparing continued zidovudine with didanosine in human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1992;327:581–587.
351. Spruance SL, Pavia AT, Peterson D, et al. Didanosine compared with continuation of zidovudine in HIV-infected patients with signs of clinical deterioration while receiving zidovudine. *Ann Intern Med* 1994;120:360–368.
352. Abrams DI, Goldman AI, Launer C, et al. A comparative trial of didanosine or zalcitabine after treatment with zidovudine in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1994;330:657–662.
353. Montaner JSG, Schechter MT, Rachlis A, et al. Didanosine compared with continued zidovudine therapy for HIV-infected patients with 200 to 500 CD4 cells/mm^3. *Ann Intern Med* 1995;123:561–571.
354. Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, et al. A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. *N Engl J Med* 1996;335:1081–1090.
355. Collier AC, Coombs RW, Fischl MA, et al. Combination therapy with zidovudine and didanosine compared with zidovudine alone in HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1993;119:786–793.
356. Graham NMH, Hoover DR, Park LP, et al. Survival in HIV-infected patients who have received zidovudine: comparison of combination therapy with sequential monotherapy and continued zidovudine monotherapy. *Ann Intern Med* 1996;124: 1031–1038.
357. D'Aquila RT, Hughes MD, Johnson VA, et al. Nevirapine, zidovudine, and didanosine compared with zidovudine and didanosine in patients with HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1996;124:1019–1030.
358. Delta Coordinating Committee. Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. *Lancet* 1996;348:283–291.
359. Eron JJ, Benoit SL, Jemsek J, et al. Treatment with lamivudine, zidovudine, or both in HIV-positive patients with 200 to 500 CD4+ cells per cubic millimeter. North American HIV working party. *N Engl J Med* 1995;333:1662–1669.
360. Staszewski S, Loveday C, Picazo JJ, et al. Safety and efficacy of lamivudine–zidovudine combination therapy in zidovudine-experienced patients. A randomized controlled comparison with zidovudine monotherapy. Lamivudine European HIV Working Group. *JAMA* 1996;276:111–117.
361. Katlama C, Ingrand D, Loveday C, et al. Safety and efficacy of lamivudine–zidovudine combination therapy in antiretroviral-naive patients. A randomized controlled comparison with zidovudine monotherapy. Lamivudine European HIV Working Group. *JAMA* 1996;276:118–125.
362. Bartlett JA, Benoit SL, Johnson VA, et al. Lamivudine plus zidovudine compared with zalcitabine plus zidovudine in patients with HIV infection. *Ann Intern Med* 1996;125:161–172.
363. Larder B, Kemp S, Harrigan R. Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT–3TC combination therapy. *Science* 1995;269:696–699.
364. Markowitz M, Saag M, Powderly WG, et al. A preliminary study of ritonavir, an inhibitor of HIV-1 protease, to treat HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1995;333: 1534–1539.
365. Danner SA, Carr A, Leonard JM, et al. A short-term of the safety, pharmacokinetics, and efficacy of ritonavir, an inhibitor of HIV-1 protease. European–Australian Collaborative Ritonavir Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1528–1533.
366. Schapiro JA, Winters MA, Stewart F, et al. The effect of high-dose saquinavir on viral load and CD4+ T-cell counts in HIV-infected patients. *Ann Intern Med* 1996;124:1039–1050.
367. Stein DS, Fish DG, Bilello JA, Preston SL, Martineau GL, Drusano GL. A 24-week open-label phase I/II evaluation of the HIV protease inhibitor MK-639 (indinavir). *AIDS* 1996;10:485–492.
368. Deeks SG, Smith M, Holodniy M, Kahn JO. HIV-1 protease inhibitors. A review for clinicians. *JAMA* 1997;277:145–153.
369. Cameron D, Heath-Chiozzi M, Kravick S, Mills R, Potthoff A, Henry D. Prolongation of life and prevention of AIDS complications in advanced HIV immunodeficiency with Ritonavir [Abstract MoB411]. Eleventh International Conference on AIDS, 1996.
370. Stellbrink HJ, Zoller B, Fenner T, et al. Rapid plasma virus and CD4+ T-cell turnover in HIV-1 infection: evidence for an only transient interruption by treatment. *AIDS* 1996;10:849–857.
371. Autran B, Carcelain G, Li T, et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997;277:112–116.
372. Fox C, Tenner-Rácz K, Rácz P, Firpo A, Pizzo P, Fauci A. Lymphoid germinal centers are reservoirs of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Infect Dis* 1991;164:1051–1057.
373. Spiegel H, Herbst H, Niedobitek G, Foss H, Stein H. Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T-helper cells. *Am J Pathol* 1992;140:15–22.
374. Joling P, Bakker L, Van Strijp J, et al. Binding of human immunodeficiency virus type-1 to follicular dendritic cells in vitro is complement dependent. *J Immunol* 1993;150:1065–1073.
375. Hufert FT, vanLunzen J, Janossy G, et al. Germinal center CD4+ T cells are an important site of HIV replication in vivo. *AIDS* 1997;11:849–857.
376. Ascher M, Sheppard H. AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 1988;73:165–167.
377. Sheppard HW, Ascher MS, McRae B, Anderson RE, Lang W, Allain JP. The ini-

tial immune response to HIV and immune system activation determine the outcome of HIV disease. *J AIDS* 1991;4:704–712.

378. Bass H, Nishanian P, Hardy W, et al. Immune changes in HIV infection: significant correlations and differences in serum markers and lymphoid phenotypic antigens. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;64:63–70.
379. Weissman D, Barker TD, Fauci AS. The efficiency of acute infection of CD4⁺ T cells is markedly enhanced in the setting of antigen-specific immune activation. *J Exp Med* 1996;183:687–692.
380. Ott M, Emiliani S, VanLint C, et al. Immune hyperactivation of HIV-1–infected T cells mediated by tat and the CD28 pathway. *Science* 1997;275:1481–1485.
381. Fauci A. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 1988;239:617–622.
382. Fauci A. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus diseases: implications for therapy. *Science* 1993;262:1011–1018.
383. Graziosi C, Pantaleo G, Gantt KR, et al. Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. *Science* 1994;265: 248–252.
384. Westermann J, Persin S, Matyas J, van der Meide P, Pabst R. Migration of so-called naive and memory T lymphocytes from blood to lymph in the rat. The influence of IFN-gamma on the circulation pattern. *J Immunol* 1994;152: 1744–1750.
385. Sprenger R, Toellner KM, Schmetz C, et al. Follicular dendritic cells productively infected with immunodeficiency viruses transmit infection to T cells. *Med Microbiol Immunol* 1995;184:129–134.
386. Schmitz J, van Lunzen J, Tenner-Racz K, et al. Follicular dendritic cells retain HIV-1 particles on their plasma membrane, but are not productively infected in asymptomatic patients with follicular hyperplasia. *J Immunol* 1994;153:1352–1359.
387. Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, et al. Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med* 1992;176:1099–1106.
388. Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Metelev V, Pardee AB. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 tat protein. *Science* 1995;268:429–431.
389. Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, et al. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 tat and gp120. *Nature* 1995;375:497–500.
390. Howcroft T, Strebel K, Martin M, Singer D. Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon tat of HIV. *Science* 1993;260:1320–1322.
391. Kerkau T, Bacik I, Bennink JR, et al. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J Exp Med* 1997;185: 1295–1305.
392. Dawson V, Dawson T, Uhl G, Snyder S. Human immunodeficiency virus type 1 coat protein neurotoxicity mediated by nitric oxide in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3256–3259.
393. Pietraforte D, Tritarelli E, Testa U, Minetti M. gp120 HIV envelope glycoprotein increases the production of nitric oxide in human monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol* 1994;55:175–182.
394. Bukrinsky M, Nottet H, Schmidtmayerova H, et al. Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)–infected monocytes: Implications for HIV-associated neurological disease. *J Exp Med* 1995;181:735–745.
395. Weeks B, Klotman M, Holloway E, Stetler-Stevenson W, Kleinman H, Klotman P. HIV-1 infection stimulates T cell invasiveness and synthesis of the 92-kDa type IV collagenase. *AIDS Res Hum Retrovir* 1993;9:513–518.
396. Lafrenie R, Wahl L, Epstein J, Hewlett I, Yamada K, Dhawan S. HIV-1 tat modulates the function of monocytes and alters their interactions with microvessel endothelial cells. *J Immunol* 1996;156:1638–1645.
397. Margolick JB, Munoz A, Donnenberg AD, et al. Failure of T-cell homeostasis preceding AIDS in HIV-1 infection. The Multicenter AIDS Cohort Study. *Nat Med* 1995;1:674–680.
398. Stanley SK, Fauci AS. T-cell homeostasis in HIV infection: part of the solution, or part of the problem? J AIDS 1993;6:142–143.
399. Grossman Z, Herberman RB, Adleman LM, Wofsy D. T-cell homeostasis in HIV infection is neither failing nor blind: modified cell counts reflect an adaptive response of the host. *Nat Med* 1997;3:486–490.
400. Adleman LM, Wofsy D. T-cell homeostasis: implications in HIV infection. *J AIDS* 1993;6:144–152.
401. Chen YH, Christiansen A, Dierich MP. HIV-1 gp41 selectively inhibits spontaneous cell proliferation of human cell lines and mitogen- and recall antigen-induced lymphocyte proliferation. *Immunol Lett* 1995;48:39–44.
402. Tuosto L, Piazza C, Moretti S, et al. Ligation of either CD2 or CD28 rescues CD4⁺ T cells from HIV-gp120–induced apoptosis. *Eur J Immunol* 1995;25: 2917–2922.
403. Tian H, Lempicki R, King L, Donoghue E, Samelson LE, Cohen DI. HIV envelope–directed signaling aberrancies and cell death of CD4⁺ T cells in the absence of TCR co-stimulation. *Int Immunol* 1996;8:65–74.
404. Faith A, Yssel H, O'Hehir RE, Lamb JR. Reversal of the inhibitory effects of HIV-gp120 on CD4⁺ T cells by stimulation through the CD28 pathway. *Clin Exp Immunol* 1996;105:225–230.
405. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:126–130.
406. Estaquier J, Idziorek T, DeBels F, et al. Programmed cell death and AIDS: signficance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9431–9435.
407. Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC. Activation-induced death by apoptosis in CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus–infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 1992;175:331–340.
408. Laurent-Crawford AG, Krust B, Muller S, et al. The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology* 1991;185:829–839.
409. Choremi-Papadopoulou H, Viglis V, Gargalianos P, Kordossis T, Iniotaki-Theodoraki A, Kosmidis J. Downregulation of CD28 surface antigen on CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes during HIV-1 infection. *J AIDS* 1994;7:245–253.
410. Borthwick NJ, Bofill M, Gombert WM, et al. Lymphocyte activation in HIV-1 infection. II. Functional defects of CD28⁻ T cells. *AIDS* 1994;8:431–441.
411. Spina CA, Prince HE, Richman DD. Preferential replication of HIV-1 in the CD45RO memory cell subset of primary CD4 lymphocytes in vitro. *J Clin Invest* 1997;99:1774–1785.
412. Psallidopoulos MC, Schnittman SM, Thompson LM, et al. Integrated proviral human immunodeficiency virus type is present in CD4- peripheral blood lymphocytes in healthy seropositive individuals. *J Virol* 1989;63:4626–4631.
413. Popovic M, Sarngadharan M, Read E, Gallo R. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984;224:497–500.
414. Sodroski J, Goh WC, Rosen K, Campbell K, Haseltine WA. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 1986;322: 470–474.
415. DeRossi A, Franchini G, Aldovini A, et al. Differential response to the cytopathic effects of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III) superinfection in T4⁺ (helper) and T8⁺ (suppressor) T-cell clones transformed by HTLV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:4297–4301.
416. Lifson JD, Reyes GR, McGrath MS, Stein BS, Engleman EG. AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* 1986;232:1123–1127.
417. Lifson JD, Feinberg MB, Reyes GR, et al. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* 1986;323:725–728.
418. Poznansky MC, Walker B, Haseltine WA, Sodroski J, Langhoff E. A rapid method for quantitating the frequency of peripheral blood cells containing HIV-1 DNA. *J AIDS* 1991;4:368–373.
419. Brinchmann JE, Albert J, Vartdal F. Few infected CD4⁺ T cells but a high proportion of replication-competent provirus copies in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1991;65:2019–2023.
420. Harper ME, Marselle LM, Gallo RC, Wong-Staal F. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:772–776.
421. Weller SK, Joy AE, Temin HM. Correlation between cell killing and massive second round superinfecton by members of some subgroups of avian leukosis virus. *J Virol* 1980;33:494–506.
422. Keshet E, Temin HM. Cell killing by spleen necrosis virus is correlated with a transient accumulation of spleen necrosis virus DNA. *J Virol* 1979;31:376–388.
423. Bergeron L, Sodroski J. Dissociation of unintegrated viral DNA accumulation from single-cell lysis induced by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1992;66:5777–5787.
424. Somasundaran M, Robinson HL. Unexpectedly high levels of HIV-1 RNA and protein synthesis in a cytocidal infection. *Science* 1988;242:1554–1557.
425. Koga Y, Lindstrom E, Fenyo EM, Wigzell H, Mak TW. High levels of heterodisperse RNAs accumulate in T cells infected with human immunodeficiency virus and in normal thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:4521–4525.
426. Koga Y, Sasaki M, Yoshida H, Wigzell H, Kimura G, Nomoto K. Cytopathic effect determined by the amount of CD4 molecules in human cell lines expressing envelope glycoprotein of HIV. *J Immunol* 1990;144:94–102.
427. Cao J, Park IW, Cooper A, Sodroski J. Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1996;70:1340–1354.
428. Leonard R, Zagury D, Desportes I, Bernard J, Zagury JF, Gallo RC. Cytopathic effect of human immunodeficiency virus in T4 cells is linked to the last stage of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:3357–3574.
429. Lynn WS, Tweedale A, Cloyd MW. Human immunodeficiency virus (HIV-1) cytotoxicity: perturbation of the cell membrane and depression of phospholipid synthesis. *Virol* 1988;163:43–51.
430. Voss TG, Fermin CD, Levy JA, Vigh S, Choi B, Garry RF. Alteration of intracellular potassium and sodium concentrations correlates with induction of cytopathic effects by human immunodeficiency virus. *J Virol* 1996;70:5447–5454.
431. Yoffe B, Lewis DE, Petrie BL, Noonan CA, Melnick JL, Hollinger FB. Fusion as a mediator of cytolysis in mixtures of uninfected CD4⁺ lymphocytes and cells infected by human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84: 1429–1433.
432. Crowe S, Mills J, Elbeik T, et al. Human immunodeficiency virus–infected monocyte-derived macrophages express surface gp120 and fuse with CD4 lymphoid cells in vitro: a possible mechanism of T lymphocyte depletion in vivo. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;65:143–151.
433. Hart TK, Truneh A, Bugelski PJ. Characterization of CD4-gp120 activation intermediates during human immunodeficiency virus type 1 syncytium formation. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996;12:1305–1313.
434. Hildreth JE, Orentas RJ. Involvement of a leukocyte adhesion receptor (*LFA-1*)

in HIV-induced syncytium formation. *Science* 1989;244:1075–1078.
435. Pantaleo G, Butini L, Graziosi C, et al. Human immunodeficiency virus (HIV) infection in CD4⁺ T lymphocytes genetically deficient in LFA-1: LFA-1 is required form HIV-mediated cell fusion but not for viral transmission. *J Exp Med* 1991;173:511–514.
436. Sato AI, Balamuth FB, Ugen KE, Williams WV, Weiner DB. Identification of CD7 glycoprotein as an accessory molecule in HIV-1–mediated syncytium formation and cell-free infection. *J Immunol* 1994;152:5142–5152.
437. deSantis C, Robbioni P, Longhi R, Carrow E, Siccardi AG, Beretta A. Role of HLA class I in HIV type 1–induced syncytium formation. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996;12:1031–1040.
438. Burke AP, Benson W, Ribas JL, et al. Postmortem localization of HIV-1 RNA by in situ hybridization in lymphoid tissues of intravenous drug addicts who died unexpectedly. *Am J Pathol* 1993;142:1701–1713.
439. Burke AP, Anderson D, Mannan P, et al. Systemic lymphadenopathic histology in human immunodeficiency virus-1–seropositive drug addicts without apparent acquired immunodeficiency syndrome. *Hum Pathol* 1994;25:248–256.
440. Sharer LR, Cho ES, Epstein LG. Multinucleated giant cells and HTLV-III in AIDS encephalopathy. *Hum Pathol* 1985;16:760.
441. Maier H, Budka H, Lassmann H, Pohl P. Vacuolar myelopathy with multinucleated giant cells in the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Light and electron microscopic distribution of human immunodeficiency virus (HIV) antigens. *Acta Neuropathol* 1989;78:497–503.
442. Teo I, Veryard C, Barnes H, et al. Circular forms of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA and high levels of viral protein expression: association with dementia and multinucleated giant cells in the brains of patients with AIDS. *J Virol* 1997;71:2928–2933.
443. Golding H, Robey FA, Gates FT, et al. Identification of homologous regions in human immunodeficiency virus I gp41 and human MHC class II beta 1 domain. I. Monoclonal antibodies against the gp41-derived peptide and patient's sera react with native HLA class II antigens, suggesting a role for autoimmunity in the pathogenesis of acquired immune deficiency syndrome. *J Exp Med* 1988; 167:914–923.
444. Golding H, Shearer G, Hillman K, et al. Common epitope in human immunodeficiency virus (HIV)I gp41 and HLA class II elicits immunosuppressive autoantibodies capable of contributing to immune dysfunction in HIV 1–infected individuals. *J Clin Invest* 1989;83:1430–1435.
445. Metlas R, Skerl V, Veljkovic V, Colombatti A, Pongor S. Immunoglobulin-like domain of HIV-1 envelope glycoprotein gp120 encodes putative internal image of some common human proteins. *Viral Immunol* 1994;7:215–219.
446. Grassi F, Meneveri R, Gullberg M, et al. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 mimics a hidden monomorphic epitope borne by class I major histocompatibility complex heavy chains. *J Exp Med* 1991;174:53–62.
447. Silvestris F, Williams RC, Dammacco F. Autoreactivity in HIV-1 infections: the role of molecular mimicry. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;75:197–205.
448. Grant MD, Weaver MS, Tsoukas C, Hoffmann GW. Distribution of antibodies against denatured collagen in AIDS risk groups and homosexual AIDS patients suggests a link between autoimmunity and the immunopathogenesis of AIDS. *J Immunol* 1990;144:1241–1250.
449. Muller S, Richalet P, Laurent-Crawford A, et al. Autoantibodies typical of non–organ-specific autoimmune diseases in HIV-seropositive patients. *AIDS* 1992;6:933–942.
450. Cassani F, Baffoni L, Raise E, et al. Serum non-organ specific autoantibodies in human immunodeficiency virus 1 infection. *J Clin Pathol* 1991;44:64–68.
451. Kappler J, Kotzin B, Gelfand LHW, et al. V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 1989;244:811–813.
452. Cole BC, Kartchner DR, Wells DJ. Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis* (MAM). VII. Selective activation of T cells expressing distinct V beta T cell receptors from various strains of mice by the "superantigen" MAM. *J Immunol* 1990;144:425–431.
453. Denkers EY, Caspar P, Sher A. *Toxoplasma gondii* possesses a superantigen activity that selectively expands murine T cell receptor V beta 5-bearing CD8⁺ lymphocytes. *J Exp Med* 1994;180:985–994.
454. Choi Y, Kappler JW, Marrack P. A superantigen encoded in the open reading frame of the 3′ long terminal repeat of mouse mammary tumour virus. *Nature* 1991;350:203–207.
455. Hugin AW, Vacchio MS, Morse HC. A virus-encoded "superantigen" in a retrovirus-induced immunodeficiency syndrome of mice. *Science* 1991;252:424–427.
456. Imberti L, Sottini A, Bettinardi A, Puoti M, Primi D. Selective depletion in HIV infection of T cells that bear specific T cell receptor V beta sequences. *Science* 1991;254:860–862.
457. Garcia S, Dadaglio G, Cilote V, Chenal H, Bondurand A, Gougeon ML. Evidence for an in vivo superantigenic activity in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Blood* 1996;88:2151–2161.
458. Laurence J, Hodtsev AS, Posnett DN. Superantigen implicated in dependence of HIV-1 replication in T cells on TCR V beta expression. *Nature* 1992;358: 255–259.
459. Posnett DN, Kabak S, Dobrescu D, Hodtsev AS. The HIV-1 reservoir in distinct V beta subsets of CD4 T cells: evidence for a putative superantigen. *J Clin Immunol* 1995;15(suppl):18–21.
460. Dobrescu D, Kabak S, Mehta K, et al. Human immunodeficiency virus 1 reservoir in CD4⁺ T cells is restricted to certian V beta subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5563–5567.
461. Dobrescu D, Ursea B, Pope M, Asch AS, Posnett DN. Enhanced HIV-1 replication in V beta 12 T cells due to human cytomegalovirus in monocytes: evidence for a putative herpesvirus superantigen. *Cell* 1995;82:753–763.
462. Boyer V, Smith LR, Ferre F, et al. T cell receptor V beta repertoire in HIV-infected individuals: lack of evidence for selective V beta deletion. *Clin Exp Immunol* 1993;92:437–441.
463. Posnett DN, Kabak S, Hodtsev A, Goldberg EA, Asch A. T-cell antigen receptor V beta subsets are not perferentially deleted in AIDS. *AIDS* 1993;7:625–631.
464. Boldt-Houle DM, Rinaldo CR, Ehrlich GD. Random depletion of T cells that bear specific T cell receptor V beta sequences in AIDS patients. *J Leukoc Biol* 1993;54:486–491.
465. Weinhold KJ, Lyerly HK, Stanley SD, Austin AA, Matthews TJ, Bolognesi DP. HIV-1 GP120-mediated immune suppression and lymphocyte destruction in the absence of viral infection. *J Immunol* 1989;142:3091–3097.
466. Zarling JM, Ledbetter JA, Sias J, et al. HIV-infected humans, but not chimpanzees, have circulating cytotoxic T lymphocytes that lyse uninfected CD4⁺ cells. *J Immunol* 1990;144:2992–2998.
467. Manca F, Habeshaw JA, Dalgleish AG. HIV envelope glycoprotein, antigen specific T-cell responses, and soluble CD4. *Lancet* 1990;335:811–815.
468. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456–1462.
469. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. Nature 1988;335:440–442.
470. Nunez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer SJ. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor–deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol 1990;144:3602–3610.*
471. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schrieber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334–336.
472. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993;362:847–849.
473. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993;362:849–852.
474. Lee JM, Bernstein A. p53 mutatons increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:5742–5746.
475. Ascher MS, Sheppard HW. AIDS as immune system activation. II. The panergic imnesia hypothesis. *J AIDS* 1990;3:177–191.
476. Ameisen JC, Capron A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol Today* 1991;12:102–105.
477. Terai C, Kornbluth RS, Pauza CD, Richman DD, Carson DA. Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J Clin Invest* 1991;87:1700–1705.
478. Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijnster MJ, Keet RPM, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science 1992;257:217–219.*
479. Oyaizu N, McCloskey TW, Coronesi M, Chirmule N, Kalyanaraman VS, Pahwa S. Accelerated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from human immunodeficiency virus type-1 infected patients and in CD4 cross-linked PBMCs from normal individuals. *Blood* 1993;82:3392–3400.
480. Muro-Cacho CA, Pantaleo G, Fauci AS. Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. *J Immunol* 1995;154:5555–5566.
481. Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med* 1995;1:129–134.
482. Gougeon M-L, Lecoeur H, Dulioust A, et al. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons. *J Immunol* 1996;156:3509–3520.
483. Meyaard L, Otto SA, Keet IP, Roos MT, Miedema F. Programmed death of T cells in human immunodeficiency virus infection. No correlation with progression to disease. *J Clin Invest* 1994;93:982–988.
484. Folks TM, Kessler SW, Orenstein JM, Justement JS, Jaffe ES, Fauci AS. Infection and replication of HIV-1 in purified progenitor cells of normal human bone marrow. *Science* 1988;242:919–922.
485. Steinberg HN, Crumpacker CS, Chatis PA. In vitro suppression of normal human bone marrow progenitor cells by human immunodeficiency virus. *J Virol* 1991; 65:1765–1769.
486. Chelucci C, Hassan JH, Locardi C, et al. In vitro human immunodeficiency virus-1 infection of purified hematopoietic progenitors in single-cell culture. *Blood* 1995;85:1181–1187.
487. vonLaer D, Hufert FT, Fenner TE, et al. CD34⁺ hematopoietic progenitor cells are not a major reservoir of the human immunodeficiency virus. *Blood* 1990;76: 1281–1286.
488. Davis BR, Schwartz DH, Marx JC, et al. Absent or rare human immunodeficiency virus infection of bone marrow stem/progenitor cells in vivo. *J Virol* 1991;65:1985–1990.
489. Neal TF, Holland HK, Baum CM, et al. CD34⁺ progenitor cells from asymptomatic patients are not a major reservoir for human immunodeficiency virus-1. *Blood* 1995;86:1749–1756.
490. Marandin A, Katz A, Oksenhendler E, et al. Loss of primitive hematopoietic progenitors in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1996;88:4568–4578.

491. Stanley SK, Kessler SW, Justement JS, et al. CD34⁺ bone marrow cells are infected with HIV in a subset of seropositive individuals. *J Immunol* 1992;149:689–697.
492. Deichmann M, Kronenwett R, Haas R. Expression of the human immunodeficiency virus type-1 coreceptors CXCR-4 (fusin, LESTR) and CKR-5 in CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1997;89:3522–3528.
493. Zauli G, Re MC, Furlini G, Giovannini M, LaPlaca M. Evidence for an HIV-1 mediated suppression of in vitro growth of enriched (CD34⁺) hematopoietic progenitors. *J AIDS* 1991;4:1251–1253.
494. Louache F, Henri A, Bettaieb A, et al. Role of human immunodeficiency virus replication in defective in vitro growth of hematopoietic progenitors. *Blood* 1992;80:2991–2999.
495. DeLuca A, Teofili L, Antinori A, et al. Haemopoietic CD34⁺ progenitor cells are not infected by HIV-1 in vivo but show impaired clonogenesis. *Br J Haematol* 1993;85:20–24.
496. Re MC, Zauli G, Gibellini D, et al. Uninfected haematopoietic progenitor (CD34⁺) cells purified from the bone marrow of AIDS patients are committed to apoptotic cell death in culture. *AIDS* 1993;7:1049–1055.
497. Zauli G, Re MC, Furlini G, Giovannini M, LaPlaca M. Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120-mediated killing of human haematopoietic progenitors (CD34⁺ cells). *J Gen Virol* 1992;73:417–421.
498. Zauli G, Davis BR, Re MC, Visani G, Furlini G, LaPlaca M. Tat protein stimulates production of transforming growth factor-β1 by marrow macrophages: a potential mechanism for human immunodeficiency virus-1–induced hematopoietic suppression. *Blood* 1992;80:3036–3043.
499. Zauli G, Vitale M, Gibellini D, Capitani S. Inhibition of purified CD34⁺ hematopoietic progenitor cells by human immunodeficiency virus 1 or gp120 mediated by endogenous transforming growth factor beta 1. *J Exp Med* 1996; 183:99–108.
500. Maciejewski JP, Weichold FF, Young NS. HIV-1 suppression of hematopoiesis in vitro mediated by envelope glycoprotein and TNF-α. *J Immunol* 1994;153: 4303–4310.
501. Stanley S, McCune J, Kaneshima H, et al. Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse. *J Exp Med* 1993;178:1151–1163.
502. Schnittman SM, Singer KH, Greenhouse JJ, et al. Thymic microenvironment induces HIV expression. Physiologic secretion of IL-6 by thymic epithelial cells up-regulates virus expression in chronically infected cells. *J Immunol* 1991; 147: 2553–2558.
503. Valentin H, Nugeyre MT, Vuillier F, et al. Two subpopulations of human triple-negative thymic cells are susceptible to infection by human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *J Virol* 1994;68:3041–3050.
504. Su L, Kaneshima H, Bonyhadi M, et al. HIV-1–induced thymocyte depletion is associated with indirect cytopathogenicity and infection of progenitor cells in vivo. *Immunity* 1995;2:25–36.
505. Mocroft A, Bofill M, Lipman M, et al. CD8⁺,CD38⁺ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring HIV-1–infected patients. *J AIDS Hum Retrovir* 1997;14:158–162.
506. Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, et al. Elevated relative fluorescence intensity of CD38 antigen expression on CD8⁺ T cells is a marker of poor prognosis in HIV infection: results of 6 years of follow-up. *Cytometry* 1996;26:1–7.
507. Kammerer R, Iten A, Frei PC, Burgisser P. Expansion of T cells negative for CD28 expression in HIV infection. Relation to activation markers and cell adhesion molecules, and correlation with prognostic markers. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1996;185:19–25.
508. Vingerhoets JH, Vanham GL, Kestens LL, et al. Increased cytolytic T lymphocyte activity and decreased B7 responsiveness are associated with CD28 down-regulation on CD8⁺ T cells from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol* 1995; 100:425–433.
509. Carmichael A, Jin X, Sissons P, Borysiewicz L. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. *J Exp Med* 1993;177:249–256.
510. Forte M, Maartens G, Rahelu M, et al. Cytolytic T-cell activity against mycobacterial antigens in HIV. *AIDS* 1992;6:407–411.
511. McKenzie S, Dallalio G, North M, Frame P, Means R. Serum chemokine levels in patients with non-progressing HIV infection. *AIDS* 1996;10:29–33.
512. Zanussi S, D'Andrea M, Simonelli C, Tirelli U, DePaoli P. Serum levels of RANTES and MIP-1a in HIV-positive long-term survivors and progressor patients. *AIDS* 1996;10:1431–1432.
513. Clerici M, Balotta C, Trabattoni D, et al. Chemokine production in HIV-seropositive long-term asymptomatic individuals. *AIDS* 1996;10:1432–1433.
514. Chen Y, Gupta P. CD8⁺ T-cell–mediated suppression of HIV-1 infection may not be due to chemokines RANTES, MIP-1α, and MIP-1β. *AIDS* 1996;10:1434–1435.
515. Blazevic V, Heino M, Ranki A, Jussila T, Krohn K. RANTES, MIP, and interleukin-16 in HIV infection. *AIDS* 1996;10:1435–1436.
516. Vicenzi E, Bagnarelli P, Santagostino E, et al. Hemophilia and nonprogressing human immunodeficiency virus type 1 infection. *Blood* 1997;89:191–200.
517. Scala E, D'Offizi G, Rosso R, et al. C-C chemokines, IL-16, and soluble antiviral factor activity are increased in cloned T cells from subjects with long-term nonprogressive HIV infection. *J Immunol* 1997;158:4485–4492.
518. Rubbert A, Weissman D, Combadiere C, et al. Multifactorial nature of noncytolytic CD8⁺ T cell–mediated suppression of HIV replication: beta-chemokine–dependent and –independent effects. *AIDS Res Hum Retrovir* 1997;13:63–69.
519. Knight SC, Macatonia SE. Dendritic cells and viruses. *Immunol Lett* 1988;19: 177–181.
520. Macatonia SE, Lau R, Patterson S, Pinching AJ, Knight SC. Dendritic cell infection, depletion and dysfunction in HIV-infected individuals. *Immunology* 1990; 71:38–45.
521. Knight SC, Macatonia SE, Patterson S. HIV-1 infection of dendritic cells. *Int Rev Immunol* 1990;6:163–175.
522. Patterson S, Knight SC. Susceptibility of human peripheral blood dendritic cells to infection by human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 1987;68:1177–1181.
523. Langhoff E, Terwilliger EF, Bos HJ, et al. Replication of human immunodeficiency virus type 1 in primary dendritic cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7998–8002.
524. Langhoff E, Haseltine WA. Infection of accessory dendritic cells by human immunodeficiency virus type 1. *J Invest Dermatol* 1992;99:89S–94S.
525. Chehimi J, Prakash K, Shanmugam V, Jackson SJ, Bandyopadhyay S, Starr SE. In-vitro infection of peripheral blood dendritic cells with human immunodeficiency virus-1 causes impairment of accessory functions. *Adv Exp Med Biol* 1993;329:521–526.
526. Chehimi J, Prakash K, Shanmugam V, et al. CD4-independent infection of human peripheral blood dendritic cells with isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 1993;74:1277–1285.
527. Knight SC. Infection of dendritic cells with HIV type 1. *AIDS Res Hum Retrovir* 1994;10:1591–1592.
528. Cameron PU, Freudenthal PS, Barker JM, Gezelter S, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4⁺ T cells. *Science* 1992;257:383–387.
529. Pinchuk LM, Polacino PS, Agy MB, Klaus SJ, Clark EA. The Role Of CD40 and CD80 accessory cell molecules in dendritic cell– dependent HIV-1 infection. *Immunity* 1994;1:317–325.
530. O'Doherty U, Steinman RM, Peng M, et al. Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J Exp Med* 1993;178: 1067–1076.
531. Thomas R, Lipsky PE. Human peripheral blood dendritic cell subsets—isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. *J Immunol* 1994;153:4016–4028.
532. Karhumaki E, Viljanen ME, Cottler-Fox M, Ranki A, Fox CH, Krohn KJ. An improved enrichment method for functionally competent, highly purified peripheral blood dendritic cells and its application to HIV-infected blood samples. *Clin Exp Immunol* 1993;91:482–488.
533. Hsia K, Tsai V, Zvaifler NJ, Spector SA. Low prevalence of HIV-1 proviral DNA in peripheral blood monocytes and dendritic cells from HIV-1–infected individuals. *AIDS* 1995;9:398–399.
534. Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D. Epidermal Langerhans cells and HIV-1 infection. *Immunol Lett* 1993;39:33–37.
535. Dezutter-Dambuyant C, Charbonnier AS, Schmitt D. In vivo and in vitro HIV-1 infection of epithelial dendritic cells. *Pathol Biol* 1995;43:882–888.
536. Zambruno G, Giannetti A, Bertazzoni U, Girolomoni G. Langerhans cells and HIV infection. *Immunol Today* 1995;16:520–524.
537. Charbonnier AS, Mallet F, Fiers MM, Desgranges C, Dezutterdambuyant C, Schmitt D. Detection of HIV-specific DNA sequences in epidermal Langerhans cells infected in vitro by means of a cell-free system. *Arch Dermatol Res* 1994; 287:36–41.
538. Schmitt D, Dezutterdambuyant C. Epidermal and mucosal dendritic cells and HIV1 infection. *Pathol Res Pract* 1994;190:955–959.
539. Giannetti A, Zambruno G, Cimarelli A, et al. Direct detection of HIV-1 RNA in epidermal Langerhans cells of HIV-infected patients. *J AIDS* 1993;6:329–333.
540. Muller H, Weier S, Kojouharoff G, et al. Distribution and infection of Langerhans cells in the skin of HIV-infected healthy subjects and AIDS patients. *Res Virol* 1993;144:59–67.
541. Sala M, Zambruno G, Vartanian J-P, et al. Discontinuous distribution of HIV-1 quasispecies in epidermal Langerhans cells of an AIDS patient and evidence for double infection. In: Banchereau J, Schmitt D, eds. *Dendritic cells in fundamental and clinical immunology.* Vol. 2. New York: Plenum Publishing, 1995.
542. Blauvelt A, Katz SI. The skin as target, vector, and effector organ in human immunodeficiency virus disease. *J Invest Dermatol* 1995;105:122S–126S.
543. McIlroy D, Autran B, Cheynier R, et al. Infection frequency of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus–positive patients. *J Virol* 1995;69:4737–4745.
544. Ayehunie S, Groves RW, Bruzzese AM, Ruprecht RM, Kupper TS, Langhoff E. Acutely infected Langerhans cells are more efficient than T cells in disseminating HIV type 1 to activated T cells following a short cell–cell contact. *AIDS Res Hum Retrovir* 1995;11:877–884.
545. Ramazzotti E, Marconi A, Re MC, et al. In vitro infection of human epidermal Langerhans' cells with HIV-1. *Immunology* 1995;85:94–98.
546. Soto-Ramirez LE, Renjifo B, McLane MF, et al. HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* 1996;271:1291–1293.
547. Bollinger RC, Tripathy SP, Quinn TC. The human immunodeficiency virus epidemic in India. Current magnitude and future projections. *Medicine (Baltimore)*

1995;74:97–106.
548. Cassol S, Weniger BG, Babu PG, et al. Detection of HIV type 1 env subtypes A, B, C, and E in Asia using dried blood spots: a new surveillance tool for molecular epidemiology. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996;12:1435–1441.
549. Hu DJ, Dondero TJ, Rayfield MA, et al. The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research, and prevention. *JAMA* 1996;275:210–216.
550. Janssens W, Heyndrickx L, Fransen K, et al. Genetic variability of HIV type 1 in Kenya. *AIDS Res Hum Retrovir* 1994;10:1577–1579.
551. Nkengasong JN, Janssens W, Heyndrickx L, et al. Genotypic subtypes of HIV-1 in Cameroon. *AIDS* 1994;8:1405–1412.
552. Quinn TC. Population migration and the spread of types 1 and 2 human immunodeficiency viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2407–2414.
553. Quinn TC. The epidemiology of the acquired immunodeficiency syndrome in the 1990s. *Emerg Med Clin North Am* 1995;13:1–25.
554. Quinn TC. Global burden of the HIV pandemic. The epidemiology of the acquired immunodeficiency syndrome in the 1990s. *Lancet* 1996;348:99–106.
555. Schechter MT, Laga M. AIDS 1995. Epidemiology: overview. *AIDS* 1995; 9(suppl A):55–57.
556. Weniger BG, Takebe Y, Ou CY, Yamazaki S. The molecular epidemiology of HIV in Asia. *AIDS* 1994;8(suppl 2):13–28.
557. Ree HJ, Liau S, Yancovitz SR, Qureshi MN, Khan AA, Teplitz C. The number of CD1a⁻ large low-density cells with dendritic cell features is increased in the peripheral blood of HIV⁺ patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;70: 190–197.
558. Cameron PU, Forsum U, Teppler H, Granelli-Piperno A, Steinman RM. During HIV-1 infection most blood dendritic cells are not productively infected and can induce allogeneic CD4⁺ T cells clonal expansion. *Clin Exp Immunol* 1992;88: 226–236.
559. Roberts M, Gompels M, Pinching AJ, Knight SC. Dendritic cells from HIV-1 infected individuals show reduced capacity to stimulate autologous T-cell proliferation. *Immunol Lett* 1994;43:39–43.
560. Macatonia SE, Gompels M, Pinching AJ, Patterson S, Knight SC. Antigen-presentation by macrophages but not by dendritic cells in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunology* 1992;75:576–581.
561. Reddy M, Goetz R, Gorman J, Grieco M, Chess L, Lederman S. Human immunodeficiency virus type-1 infection of homosexual men is accompanied by a decrease in circulating B cells. *J AIDS* 1991;4:428–434.
562. Amadori A, Chieco-Bianchi L. B-cell activation and HIV-1 infection: deeds and misdeeds. *Immunol Today* 1990;11:374–379.
563. Kehrl JH, Rieckmann P, Kozlow E, Fauci AS. Lymphokine production by B cells from normal and HIV-infected individuals. *Ann N Y Acad Sci* 1992;651:220–227.
564. Rieckmann P, Poli G, Fox CH, Kehrl JH, Fauci AS. Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor-alpha production and Ig secretion in B lymphocytes from HIV-infected individuals but not from seronegative donors. *J Immunol* 1991;147:2922–2927.
565. Rieckmann P, Poli G, Kehrl JH, Fauci AS. Activated B lymphocytes from human immunodeficiency virus–infected individuals induce virus expression in infected T cells and a promonocytic cell line, U1. *J Exp Med* 1991;173:1–5.
566. Macchia D, Almerigogna F, Parronchi P, Ravina A, Maggi E, Romagnani S. Membrane tumour necrosis factor-alpha is involved in the polyclonal B-cell activation induced by HIV-infected human T cells. *Nature* 1993;363:464–466.
567. Goodglick L, Zevit N, Neshat MS, Braun J. Mapping the Ig superantigen-binding site of HIV-1 gp120. *J Immunol* 1995;155:5151–5159.
568. Berberian L, Goodglick L, Kipps TJ, Braun J. Immunoglobulin VH3 gene products: natural ligands for HIV gp120. *Science* 1993;261:1588–1591.
569. Chirmule N, Kalyanaraman VS, Saxinger C, Wong-Staal F, Ghrayeb J, Pahwa S. Localization of B-cell stimulatory activity of HIV-1 to the carboxyl terminus of gp41. *AIDS Res Hum Retrovir* 1990;6:299–305.
570. Dolcetti R, Gloghini A, De Vita S, et al. Characteristics of EBV-infected cells in HIV-related lymphadenopathy: implications for the pathogenesis of EBV-associated and EBV-unrelated lymphomas of HIV-seropositive individuals. *Int J Cancer* 1995;63:652–659.
571. Monroe JG, Silberstein LE. HIV-mediated B-lymphocyte activation and lymphomagenesis. *J Clin Immunol* 1995;15:61–68.
572. Yao QY, Tierney RJ, Croom-Carter D, et al. Frequency of multiple Epstein-Barr virus infections in T-cell–immunocompromised individuals. *J Virol* 1996;70: 4884–4894.
573. Goetz DW, Webb EL Jr, Whisman BA, Freeman TM. Aeroallergen-specific IgE changes in individuals with rapid human immunodeficiency virus disease progression. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;78:301–306.
574. Mazza DS, Grieco MH, Reddy MM, Meriney D. Serum IgE in patients with human immunodeficiency virus infection. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995; 74:411–414.
575. Vigano A, Balotta C, Trabattoni D, et al. Virologic and immunologic markers of disease progression in pediatric HIV infection. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996;12: 1255–1262.
576. Rodriguez C, Thomas JK, O'Rourke S, Stiehm ER, Plaeger S. HIV disease in children is associated with a selective decrease in CD23⁺ and CD62L⁺ B cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;81:191–199.
577. Elbim C, Prevot MH, Bouscarat F, et al. Impairment of polymorphonuclear neutrophil function in HIV-infected patients. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25(suppl 2):66–70.
578. Jarstrand C, Akerlund B. Oxygen radical release by neutrophils of HIV-infected patients. *Chem Biol Interact* 1994;91:141–146.
579. Meyer CN, Nielsen H. Priming of neutrophil and monocyte activation in human immunodeficiency virus infection. Comparison of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma. *APMIS* 1996;104:640–646.
580. Tachavanich K, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Suwannagool S, Suvattee V. Opsonophagocytosis and intracellular killing activity of neutrophils in patients with human immunodeficiency virus infection. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1996;14:49–56.
581. Pitrak DL, Tsai HC, Mullane KM, Sutton SH, Stevens P. Accelerated neutrophil apoptosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Invest* 1996;98: 2714–2719.
582. Torosantucci A, Chiani P, Quinti I, Ausiello CM, Mezzaroma I, Cassone A. Responsiveness of human polymorphonuclear cells (PMNL) to stimulation by a mannoprotein fraction (MP-F2) of *Candida albicans*: enhanced production of IL-6 and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by MP-F2 stimulated PMNL from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol* 1997;107:451–457.
583. Wenisch C, Parschalk B, Zedwitz-Liebenstein K, Graninger W, Rieger A. Dysregulation of the polymorphonuclear leukocyte—*Candida* spp. interaction in HIV-positive patients. *AIDS* 1996;10:983–987.
584. Tascini C, Baldelli F, Monari C, et al. Inhibition of fungicidal activity of polymorphonuclear leukocytes from HIV-infected patients by interleukin (IL)-4 and IL-10. *AIDS* 1996;10:477–483.
585. Cohen AJ, Steigbigel RT. Eosinophilia in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1996;174:615–618.
586. Weller PF, Marshall WL, Lucey DR, Rand TH, Dvorak AM, Finberg RW. Infection, apoptosis, and killing of mature human eosinophils by human immunodeficiency virus-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:610–620.
587. Schuitemaker H, Kootstra NA, Koppelman MHGM, et al. Proliferation-dependent HIV-1 infection of monocytes occurs during differentiation into macrophages. *J Clin Invest* 1992;89:1154–1160.
588. Weinberg JB, Mathhews TJ, Cullen BR, Malim MH. Productive human immunodeficiency virus type1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1477–1482.
589. Valentin A, Gegerfelt AV, Matsuda S, Nilsson K, Asjo B. In vitro maturation of mononuclear phagocytes and susceptibility to HIV-1 infection. *J AIDS Syndr Hum Retrovir* 1991;4:751–759.
590. Collman R, Hassan NF, Walker R, et al. Infection of monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *J Exp Med* 1989;170.
591. Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, et al. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 1986;233:1089–1093.
592. Armstrong J, Horne R. Follicular dendritic cells and virus-like particles in AIDS-related lymphadenopathy. *Lancet* 1984;2:370–372.
593. Lafrenie RM, Wahl LM, Epstein JS, Hewlett IK, Yamada KM, Dhawan S. HIV-1-Tat protein promotes chemotaxis and invasive behavior by monocytes. *J Immunol* 1996;157:974–977.
594. Baldwin GC, Fleischmann J, Chung Y, Koyanagi Y, Chen IS, Golde DW. Human immunodeficiency virus causes mononuclear phagocyte dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:3933–3937.
595. Bender BS, Augor FA, Quinn TC, Redfield R, Gold J, Folks TM. Impaired antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Exp Immunol* 1986;64:166–172.
596. Muller F, Rollag H, Froland SS. Reduced oxidative burst responses in monocytes and monocyte-derived macrophages from HIV-infected individuals. *Clin Immunol Immunopathol* 1990;82:10–15.
597. Spear GT, Kessler HA, Rothberg L, Phair J, Landay AL. Decreased oxidative burst activity of monocytes from asymptomatic HIV-infected individuals. *Clin Immunol Immunopathol* 1990;54:184–191.
598. Poli G, Botazzi B, Acero R, et al. Monocyte function in intravenous drug abusers with lymphadenopathy syndrome and in patients with acquired immunodeficiency syndrome: selective impairment of chemotaxis. *Clin Exp Immunol* 1985; 62:136–142.
599. Gendelman HE, Freidman RM, Joe S, et al. A selective defect of IFN-α production in HIV-infected monocytes. *J Exp Med* 1990;172:1433–1442.
600. Hu PF, Hultin LE, Hultin P, et al. Natural killer cell immunodeficiency in HIV disease is manifest by profoundly decreased numbers of CD16⁺CD56⁺ cells and expansion of a population of CD16dimCD56⁺ cells with low lytic activity. *J AIDS Hum Retrovir* 1995;10:331–340.
601. Lucia B, Jennings C, Cauda R, Ortona L, Landay AL. Evidence of a selective depletion of a CD16⁺ CD56⁺ CD8⁺ natural killer cell subset during HIV infection. *Cytometry* 1995;22:10–15.
602. Ahmad A, Menezes J. Defective killing activity against gp120/41-expressing human erythroleukaemic K562 cell line by monocytes and natural killer cells from HIV-infected individuals. *AIDS* 1996;10:143–149.
603. Ahmad A, Menezes J. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. *FASEB J* 1996;10:258–266.
604. Ullum H, Gotzsche PC, Victor J, Dickmeiss E, Skinhoj P, Pedersen BK. Defec-

tive natural immunity: an early manifestation of human immunodeficiency virus infection. *J Exp Med* 1995;182:789–799.

605. Claydon EJ, Bennett J, Gor D, Forster SM. Transient elevation of serum HIV antigen levels associated with intercurrent infection. *AIDS* 1991;5:11311–11314.
606. Fultz PN, Gluckman JC, Muchmore E, Girard M. Transient increases in numbers of infectious cells in an HIV-infected chimpanzee following immune stimulation. *AIDS Res Hum Retrovir* 1992;8:313–317.
607. Goletti D, Weissman D, Jackson RW, et al. Effect of Mycobacterium tuberculosis on HIV replication. Role of immune activation. *J Immunol* 1996;157: 1271–1278.
608. Ho DD. HIV-1 viremia and influenza. *Lancet* 1992;339:1549.
609. Stanley S, Ostrowski MA, Justement JS, et al. Effect of immunization with a common recall antigen on viral expression in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1996;334:1222–1230.
610. O'Brien WA, Grovit-Ferbas K, Namazi A, et al. Human immunodeficiency virus-type 1 replication can be increased in peripheral blood of seropositive patients after influenza vaccination. *Blood* 1995;86:1082–1089.
611. Ostrowski MA, Stanley SK, Justement JS, Gantt K, Goletti D, Fauci AS. Increased in vitro tetanus-induced production of HIV type 1 following in vivo immunization of HIV type 1–infected individuals with tetanus toxoid. *AIDS Res Hum Retrovir* 1997;13:473–480.
612. Poli G, Fauci A. Role of cytokines in the pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. In: Aggarwal B, Puri R, eds. *Human cytokines: their role in disease and therapy.* Cambridge, MA: Blackwell Science, 1995:421–449.
613. Cohen O, Kinter A, Fauci A. Host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Immunol Rev* 1997;159:31–48.
614. Poli G, Kinter AL, Vicenzi E, Fauci AS. Cytokine regulation of acute and chronic HIV infection in vitro: from cell lines to primary mononuclear cells. *Res Immunol* 1994;145:578–582.
615. Clouse KA, Powell D, Washington I, et al. Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone. *J Immunol* 1989;142:431–438.
616. Duh EJ, Maury WJ, Folks TM, Fauci AS, Rabson AB. Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:5974–5978.
617. Israel N, Hazan U, Alcami J, et al. Tumor necrosis factor stimulates transcription of HIV-1 in human T lymphocytes, independently and synergistically with mitogens. *J Immunol* 1989;143:3956–3960.
618. Vyakarnam A, McKeating J, Meager A, Beverley PC. Tumour necrosis factors (alpha, beta) induced by HIV-1 in peripheral blood mononuclear cells potentiate virus replication. *AIDS* 1990;4:21–27.
619. Kinter AL, Poli G, Fox L, Hardy E, Fauci AS. HIV replication in IL-2–stimulated peripheral blood mononuclear cells is driven in an autocrine/paracrine manner by endogenous cytokines. *J Immunol* 1995;154:2448–2459.
620. Biswas P, Smith CA, Goletti D, Hardy EC, Jackson RW, Fauci AS. Cross-linking of CD30 induces HIV expression in chronically infected T cells. *Immunity* 1995; 2:587–596.
621. Maggi E, Annunziato F, Manetti R, et al. Activation of HIV expression by CD30 triggering in $CD4^+$ T cells from HIV-infected individuals. *Immunity* 1995;3: 251–255.
622. Poli G, Bressler P, Kinter A, et al. Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Exp Med* 1990;172:151–158.
623. Poli G, Kinter AL, Vicenzi E, Fauci AS. Cytokine regulation of acute and chronic HIV infection in vitro: from cell lines to primary mononuclear cells. 60th Forum in Immunology. 1994:578–582.
624. Hazan U, Thomas D, Alcami J, et al. Stimulation of a human T-cell clone with anti-CD3 or tumor necrosis factor induces NF-kappa B translocation but not human immunodeficiency virus 1 enhancer-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:7861–7865.
625. Ramilo O, Bell KD, Uhr JW, Vitetta ES. Role of $CD25^+$ and $CD25^-$ T cells in acute HIV infection in vitro. *J Immunol* 1993;150:5202–5208.
626. Weissman D, Daucher J, Barker T, Adelsberger J, Baseler M, Fauci AS. Cytokine regulation of HIV replication induced by dendritic cell–CD4-positive T cell interactions. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996;12:759–767.
627. Lucey DR, Pinto LA, Bethke FR, et al. In vitro immunologic and virologic effects of interleukin 15 on peripheral blood mononuclear cells from normal donors and human immunodeficiency virus type 1–infected patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:43–48.
628. Bayard-McNeeley M, Doo H, He S, Hafner A, Johnson WD Jr, Ho JL. Differential effects of interleukin-12, interleukin-15, and interleukin-2 on human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:547–553.
629. Kacani L, Stoiber H, Dierich MP. Role of IL-15 in HIV-1–associated hypergammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 1997;108:14–18.
630. Mikovits JA, Meyers AM, Ortaldo JR, et al. IL-4 and IL-13 have overlapping but distinct effects on HIV production in monocytes. *J Leukoc Biol* 1994;56: 340–346.
631. Kazazi F, Mathijs JM, Chang J, et al. Recombinant interleukin 4 stimulates human immunodeficiency virus production by infected monocytes and macrophages. *J Gen Virol* 1992:73:941–949.
632. Novak RM, Holzer TJ, Kennedy MM, Heynen CA, Dawson G. The effect of interleukin 4 (BSF-1) on infection of peripheral blood monocyte–derived macrophages with HIV-1. *AIDS Res Hum Retrovir* 1990;6:973–976.
633. Akridge RE, Oyafuso LK, Reed SG. IL-10 is induced during HIV-1 infection and is capable of decreasing viral replication in human macrophages. *J Immunol* 1994;153:5782–5789.
634. Kollmann TR, Pettoello-Mantovani M, Katopodis NF, et al. Inhibition of acute in vivo human immunodeficiency virus infection by human interleukin 10 treatment of SCID mice implanted with human fetal thymus and liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3126–3131.
635. Kootstra NA, van't Wout A, Huisman HG, Miedema F, Schuitemaker H. Interference of interleukin-10 with human immunodeficiency virus type 1 replication in primary monocyte-derived macrophages. *J Virol* 1994;68:6967–6975.
636. Masood R, Lunardi-Iskandar Y, Moudgil T, et al. IL-10 inhibits HIV-1 replication and is induced by tat. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202:374–383.
637. Montaner LJ, Griffin P, Gordon S. Interleukin-10 inhibits initial reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and mediates a virostatic latent state in primary blood-derived human macrophages in vitro. *J Gen Virol* 1994;75:3393–3400.
638. Saville MW, Taga K, Foli A, Broder S, Tosato G, Yarchoan R. Interleukin-10 suppresses human immunodeficiency virus-1 replication in vitro in cells of the monocyte/macrophage lineage. *Blood* 1994;83:3591–3599.
639. Weissman D, Poli G, Fauci AS. Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 induction of virus. *AIDS Res Hum Retrovir* 1994;10:1199–1206.
640. Weissman D, Poli G, Fauci AS. IL-10 synergizes with multiple cytokines in enhancing HIV production in cells of monocytic lineage. *J AIDS Hum Retrovir* 1995;9:442–449.
641. Finnegan A, Roebuck KA, Nakai BE, et al. IL-10 cooperates with TNF-alpha to activate HIV-1 from latently and acutely infected cells of monocyte/macrophage lineage. *J Immunol* 1996;156:841–851.
642. Angel JB, Saget BM, Wang MZ, Wang A, Dinarello CA, Skolnik PR. Interleukin-10 enhances human immunodeficiency virus type 1 expression in a chronically infected promonocytic cell line (U1) by a tumor necrosis factor alpha-independent mechanism. *J Interferon Cytokine Res* 1995;15:575–584.
643. Montaner LJ, Gordon S. Th2-mediated HIV1 virostatic state: macrophage-specific regulation in vitro. *Res Immunol* 1994;145:583–587.
644. Naif HM, Li S, Ho-Shon M, Mathijs JM, Williamson P, Cunningham AL. The state of maturation of monocytes into macrophages determines the effects of IL-4 and IL-13 on HIV replication. *J Immunol* 1997;158:501–511.
645. Poli G, Kinter AL, Justement JS, Bressler P, Kehrl JH, Fauci AS. Transforming growth factor beta suppresses human immunodeficiency virus expression and replication in infected cells of the monocyte/macrophage lineage. *J Exp Med* 1991;173:589–597.
646. Lazdins JK, Klimkait T, Alteri E, et al. TGF-beta: upregulator of HIV replication in macrophages. *Res Virol* 1991;142:239–242.
647. Goletti D, Kinter AL, Hardy EC, Poli G, Fauci AS. Modulation of endogenous IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist results in opposing effects on HIV expression in chronically infected monocytic cells. *J Immunol* 1996;156:3501–3508.
648. Perno CF, Yarchoan R, Cooney DA, et al. Replication of human immunodeficiency virus in monocytes. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) potentiates viral production yet enhances the antiviral effect mediated by 3′-azido-2′3′-dideoxythymidine (AZT) and other dideoxynucleoside congeners of thymidine. *J Exp Med* 1989;169:933–951.
649. Koyanagi Y, O'Brien WA, Zhao JQ, Golde DW, Gasson JC, Chen IS. Cytokines alter production of HIV-1 from primary mononuclear phagocytes. *Science* 1988; 241:1673–1675.
650. Meltzer MS, Gendelman HE. Effects of colony stimulating factors on the interaction of monocytes and the human immunodeficiency virus. *Immunol Lett* 1988;19:193–198.
651. Gendelman HE, Orenstein JM, Martin MA, et al. Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1–treated monocytes. *J Exp Med* 1988;167:1428–1441.
652. Gruber MF, Weih KA, Boone EJ, Smith PD, Clouse KA. Endogenous macrophage CSF production is associated with viral replication in HIV-1–infected human monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 1995;154: 5528–5535.
653. Manfredi R, Mastroianni A, Coronado O, Chiodo F. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rHuGM-CSF) in leukopenic patients with advanced HIV disease. *J Chemother* 1996;8:214–220.
654. Manfredi R, Cariani T, Latini F, Chiodo F. Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the treatment of HIV-related leucopenia. *Acta Paediatr* 1995;84:943–944.
655. Zuccotti GV, Plebani A, Biasucci G, et al. Granulocyte-colony stimulating factor and erythropoietin therapy in children with human immunodeficiency virus infection. *J Int Med Res* 1996;24:115–121.
656. Shirazi Y, Pitha PM. Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle. *J Virol* 1992;66:1321–1328.
657. Poli G, Orenstein JM, Kinter A, Folks TM, Fauci AS. *Interferon-alpha but not*

AZT suppresses HIV expression in chronically infected cell lines. *Science* 1989; 244:575–577.
658. Shirazi Y, Pitha PM. Interferon alpha-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 provirus synthesis in T-cells. *Virology* 1993;193:303–312.
659. Poli G, Biswas P, Fauci AS. Interferons in the pathogenesis and treatment of human immunodeficiency virus infection. *Antiviral Res* 1994;24:221–233.
660. Kovacs J, Bechtel C, Davey RJ, et al. Combination therapy with didanosine and interferon-alpha in human immunodeficiency virus–infected patients: results of a phase I/II trial. *J Infect Dis* 1996;173:840–848.
661. Schmidtmayerova H, Sherry B, Bukrinsky M. Chemokines and HIV replication. *Nature* 1996;382:767.
662. Merrill JE, Koyanagi Y, Chen ISY. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha can be induced from mononuclear phagocytes by human immunodeficiency virus type 1 binding to the CD4 receptor. *J Virol* 1989;63:4404–4408.
663. von Sydow M, Sonnerborg A, Gaines H, Strannegard O. Interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients in various stages of HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retrovir* 1991;7:375–380.
664. Rautonen J, Rautonen N, Martin NL, Philip R, Wara DW. Serum interleukin-6 concentrations are elevated and associated with elevated tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G and A concentrations in children with HIV infection. *AIDS* 1991;5:1319–1325.
665. Graziosi C, Pantaleo G, Fauci AS. Comparative analysis of constitutive cytokine expression in peripheral blood and lymph nodes of HIV-infected individuals. *Res Immunol* 1994;145:602–605.
666. Israel-Biet D, Cadranel J, Beldjord K, Andrieu JM, Jeffrey A, Even P. Tumor necrosis factor production in HIV-seropositive subjects. Relationship with lung opportunistic infections and HIV expression in alveolar macrophages. *J Immunol* 1991;147:490–494.
667. Millar AB, Miller RF, Foley NM, Meager A, Semple SJ, Rook GA. Production of tumor necrosis factor-alpha by blood and lung mononuclear phagocytes from patients with human immunodeficiency virus–related lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;5:144–148.
668. Lane HC, Depper JM, Greene WC, Whalen G, Waldmann TA, Fauci AS. Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Evidence for a selective defect in soluble antigen recognition. *N Engl J Med* 1985;313:79–84.
669. Clerici M, Hakim FT, Venzon DJ, et al. Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest* 1993;91:759–765.
670. Clerici M, Sarin A, Coffman RL, et al. Type 1/type 2 cytokine modulation of T-cell programmed cell death as a model for human immunodeficiency virus pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11811–11815.
671. Clerici M, Shearer GM. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today* 1994;15:575–581.
672. Clerici M, Shearer G. A TH1-TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 1993;14:107–111.
673. Maggi E, Mazzetti M, Ravina A, et al. Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. *Science* 1994;265: 244–248.
674. Meyaard L, Otto S, Keet I, vanLier R, Miedema F. Changes in cytokine secretion patterns of CD4+ T-cell clones in human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1994;84:4262–4268.
675. Clerici M, Lucey D, Berzofsky J, et al. Restoration of HIV-specific cell-mediated immune responses by interleukin-12 in vitro. *Science* 1993;262:1721–1724.
676. Clerici M, Wynn T, Berzofsky J, et al. Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest* 1994;93:768–775.
677. Vyakarnam A, Matear P, Martin S, Wagstaff M. Th1 cells specific for HIV-1 gag p24 are less efficient than Th0 cells in supporting HIV replication, and inhibit virus replication in Th0 cells. *Immunology* 1995;86:85–96.
678. Clerici M, Balotta C, Meroni L, et al. Type 1 cytokine production and low prevalence of viral isolation correlate with long-term non-progression in HIV infection. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996;12:1053–1061.
679. Kovacs JA, Baseler M, Dewar RJ, et al. Increases in CD4 T lymphocytes with intermittent courses of interleukin-2 in patients with human immunodeficiency virus infection. A preliminary study. *N Engl J Med* 1995;332:567–575.
680. Kovacs JA, Vogel S, Albert JM, et al. Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1996;335:1350–1356.
681. Kinter AL, Ostrowski M, Goletti D, et al. HIV replication in CD4+ T cells of HIV-infected individuals is regulated by a balance between the viral suppressive effects of endogenous beta-chemokines and the viral inductive effects of other endogenous cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14076–14081.
682. Watkins BA, Dorn HH, Kelly W, et al. Specific tropism of HIV-1 for microglial cells in primary human brain cultures. *Science* 1990;249:549–553.
683. Selmaj KW, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 1988;23:339–346.
684. Rutka JT, Giblin JRT, Berens ME, et al. The effects of human recombinant tumor necrosis factor on glioma-derived cell lines: cellular proliferation, cytotoxicity, morphological and radioreceptor studies. *Int J Cancer* 1988;41:573–582.
685. Mastroianni CM, Paoletti F, Valenti C, Vullo V, Jirillo E, Delia S. Tumour necrosis factor (TNF-α) and neurological disorder in HIV infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:219–221.
686. Giulian D, Vaca K, Noonan CA. Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science* 1990;250:1593–1596.
687. Meucci O, Miller RJ. gp120-induced neurotoxicity in hippocampal pyramidal neuron cultures: protective action of TGF-beta1. *J Neurosci* 1996;16: 4080–4088.
688. da Cunha A, Jackson RW, Vitkovic L. HIV-1 non-specifically stimulates production of transforming growth factor-beta 1 transfer in primary astrocytes. *J Neuroimmunol* 1995;60:125–133.
689. Benveniste EN. Cytokine circuits in brain. Implications for AIDS dementia complex. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 1994;72:71–88.
690. Bernasconi S, Cinque P, Peri G, et al. Selective elevation of monocyte chemotactic protein-1 in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with cytomegalovirus encephalitis. *J Infect Dis* 1996;174:1098–1101.
691. Pleskoff O, Treboute C, Brelot A, Heveker N, Seman M, Alizon M. Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science* 1997;276:1874–1878.
692. Robinson WE, Montefiori DC, Mitchell WM. Antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Lancet* 1988;1:790–794.
693. Robinson WE, Kawamura T, Gorny MK, et al. Human monoclonal antibodies to the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein gp41 enhance HIV-1 infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 3185–3189.
694. Homsy J, Meyer M, Levy JA. Serum enhancement of human immunodeficiency virus (HIV) infection correlates with disease in HIV-infected individuals. *J Virol* 1990;64:1437–1440.
695. Wong MT, Warren RQ, Anderson SA, et al. Longitudinal analysis of the humoral immune response to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp160 epitopes in rapidly progressing and nonprogressing HIV-1-uninfected subjects. *J Infect Dis* 1993;168:1523–1527.
696. Autran B, Mayaud CM, Raphael M, et al. Evidence for a cytotoxic T-lymphocyte alveolitis in human immunodeficiency virus–infected patients. *AIDS* 1988;2: 179–183.
697. Guillon JM, Autran B, Denis M, et al. Human immunodeficiency virus–related lymphocytic alveolitis. *Chest* 1988;94:1264–1270.
698. Zinkernagel RM, Hengartner H. T-cell–mediated immunopathology versus direct cytolysis by virus: implications for HIV and AIDS. *Immunol Today* 1994; 15:262–268.
699. Sei Y, Tsang PH, Roboz JP, Sarin PS, Wallace JI, Bekesi JG. Neutralizing antibodies as a prognostic indicator in the progression of acquired immune deficiency syndrome (AIDS)-related disorders: a double-blind study. *J Clin Immunol* 1988;8:464–472.
700. Sei Y, Tsang PH, Chu FN, et al. Inverse relationship between HIV-1 p24 antigenemia, anti-p24 antibody and neutralizing antibody response in all stages of HIV-1 infection. *Immunol Lett* 1989;20:223–230.
701. Lathey JL, Pratt RD, Spector SA. Appearance of autologous neutralizing antibody correlates with reduction in virus load and phenotype switch during primary infection with human immunodeficiency virus type I. *J Infect Dis* 1997; 175:231–232.
702. Allain JP, Laurian Y, Paul DA, Senn D. Serological markers in early stages of human immunodeficiency virus infection in haemophiliacs. *Lancet* 1986:2: 1233–1236.
703. Paul DA, Falk LA, Kessler HA, et al. Correlation of serum HIV antigen and antibody with clinical status in HIV-infected patients. *J Med Virol* 1987;22: 357–363.
704. Hogervorst E, Jurriaans S, deWolf F, et al. Predictors for non- and slow progression in human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection: low viral RNA copy numbers in serum and maintenance of high HIV-1 p24-specific but not V3-specific antibody levels. *J Infect Dis* 1995;171:811–821.
705. Weber JN, Clapham PR, Weiss RA, et al. Human immunodeficiency virus infection in two cohorts of homosexual men: neutralizing sera and association of anti-gag antibody with prognosis. *Lancet* 1987;1:119–122.
706. Weiss RA, Clapham PR, Cheingsong-Popov R, et al. Neutralization of human T-lymphotropic virus type III by sera of AIDS and AIDS-risk patients. *Nature* 1985;316:69–72.
707. Robert-Guroff M, Brown M, Gallo RC. HTLV-III–neutralizing antibodies in patients with AIDS and AIDS-related complex. Nature 1985;316:72–74.
708. Alesi DR, Ajello F, Lupo G, et al. Neutralizing antibody and clinical status of human immunodeficiency virus (HIV)–infected individuals. *J Med Virol* 1989; 27:7–12.
709. Fenyo EM, Putkonen P. Broad cross-neutralizing activity in serum is associated with slow progression and low risk of transmission in primate lentivirus infections. *Immunol Lett* 1996;51:95–99.
710. Matthews TJ, Langlois AJ, Robey WG, et al. Restricted neutralization of divergent human T-lymphotropic virus type III isolates by antibodies to the major envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:9709–9713.
711. Putney SD, Matthews TJ, Robey WG, et al. HTLV-III/LAV–neutralizing antibodies to an *E. coli*–produced fragment of the virus envelope. *Science* 1986;234: 1392–1395.

712. Palker TJ, Clark ME, Langlois AJ, et al. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:1932–1936.
713. Rusche JR, Javaherian K, McDanal C, et al. Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus–infected cells bind a 24–amino acid sequence of the viral envelope, gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:3198–3202.
714. Goudsmit J, Debouck C, Meloen RH, et al. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:4478–4482.
715. Javaherian K, Langlois AJ, McDanal C, et al. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:6768–6772.
716. Kido H, Fukutomi A, Katunuma N. A novel membrane-bound seirne esterase in human T4+ lymphocytes immunologically reactive with antibody inhibiting syncytia induced by HIV-1. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1990; 265:21979–21985.
717. Clements GJ, Price-Jones MJ, Stephens PE, et al. The V3 loops of the HIV-1 and HIV-2 surface glycoproteins contain proteolytic cleavage sites: a possible function in viral fusion? *AIDS Res Hum Retrovir* 1991;7:3–16.
718. Freed EO, Myers DJ, Risser R. Identification of the principal neutralizing determinant of human immunodeficiency virus type 1 as a fusion domain. *J Virol* 1991;65:190–194.
719. Niwa Y, Yano M, Futaki S, Okumura Y, Kido H. T-cell membrane–associated serine protease, tryptase TL2, binds human immunodeficiency virus type 1 gp120 and cleaves the third-variable-domain loop of gp120. Neutralizing antibodies of human immunodeficiency virus type 1 inhibit cleavage of gp120. *Eur J Biochem* 1996;237:64–70.
720. Muster T, Steindl F, Purtscher M, et al. A conserved neutralizing epitipe on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1993;67:6642–6647.
721. Conley AJ, Kessler JA, Boots LJ, et al. Neutralization of divergent human immunodeficiency virus type 1 variants and primary isolates by IAM-41-2F5, an anti-gp41 human monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91: 3348–3352.
722. Reitz MS, Wilson C, Naugle C, Gallo RC, Robert-Guroff M. Generation of a neutralization-resistant variant of HIV-1 is due to selection for a point mutation in the envelope gene. *Cell* 1988;54:57–63.
723. Back NK, Thiriart C, Delers A, Ramautarsing C, Bruck C, Goudsmit J. Association of antibodies blocking HIV1 gp160-sCD4 attachment with virus neutralizing activity in human sera. *J Med Virol* 1990;31:200–208.
724. Steimer KS, Scandella C, Skiles PV, Haigwood NL. Neutralization of divergent HIV-1 isolates by conformation-dependent human antibodies to Gp120. *Science* 1991;254:105–108.
725. Ho DD, Fung MS, Cao YZ, et al. Another discontinuous epitope on glycoprotein gp120 that is important in human immunodeficiency virus type 1 neutralization is identified by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88: 8949–8952.
726. Thali M, Olshevsky U, Furman C, Gabuzda D, Posner M, Sodroski J. Characterization of a discontinuous human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitope recognized by a broadly reactive neutralizing human monoclonal antibody. *J Virol* 1991;65:6188–6193.
727. Hansen JE, Clausen H, Nielsen C, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) infection in vitro by anticarbohydrate monoclonal antibodies: peripheral glycosylation of HIV envelope glycoprotein gp120 may be a target for virus neutralization. *J Virol* 1990;64:2833–2340.
728. Mascola JR, Snyder SW, Weislow OS, et al. Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *J Infect Dis* 1996;173:340–348.
729. Arendrup M, Akerblom L, Heegaard PM, Nielsen JO, Hansen JE. The HIV-1 V3 domain on field isolates: participation in generation of escape virus in vivo and accessibility to neutralizing antibodies. *Arch Virol* 1995;140:655–670.
730. Sullivan N, Sun Y, Li J, Hofmann W, Sodroski J. Replicative function and neutralization sensitivity of envelope glycoproteins from primary and T-cell line–passaged human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* 1995;69: 4413–4422.
731. Bou-Habib DC, Roderiquez G, Oravecz T, Berman PW, Lusso P, Norcross MA. Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary monocytopropic human imunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. *J Virol* 1994; 68:6006–6013.
732. Albert J, Abrahamsson B, Nagy K, et al. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* 1990;4: 107–112.
733. VonGegerfelt A, Albert J, Morfeldt-Manson L, Broliden K, Fenyo EM. Isolate-specific neutralizing antibodies in patients with progressive HIV-1–related disease. *Virology* 1991;185:162–168.
734. Lu W, Shih JW, Tourani JM, Eme D, Alter HJ, Andrieu JM. Lack of isolate-specific neutralizing activity is correlated with an increased viral burden in rapidly progressing HIV-1–infected patients. *AIDS* 1993;7(suppl 2):91–99.
735. Arendrup M, Nielsen C, Hansen J-ES, Pedersen C, Mathiesen L, Nielsen JO. Autologous HIV-1 neutralizing antibodies: emergence of neutralization-resistant escape virus and subsequent development of escape virus neutralizing antibodies. *J AIDS* 1992;5:303–307.
736. Tremblay M, Wainberg MA. Neutralization of multiple HIV-1 isolates from a single subject by autologous sequential sera. *J Infect Dis* 1990;162:735–737.
737. Tsang ML, Evans LA, McQueen P, et al. Neutralizing antibodies against sequential autologous human immunodeficiency virus type 1 isolates after seroconversion. *J Infect Dis* 1994;170:1141–1147.
738. Wrin T, Crawford L, Sawyer L, Weber P, Sheppard HW, Hanson CV. Neutralizing antibody responses to autologous and heterologous isolates of human immunodeficiency virus. *J AIDS* 1994;7:211–219.
739. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995;332:201–208.
740. Scarlatti G, Leitner T, Hodara V, et al. Interplay of HIV-1 phenotype and neutralizing antibody response in pathogenesis of AIDS. *Immunol Lett* 1996;51: 23–28.
741. Lyerly HK, Matthews TJ, Langlois AJ, Bolognesi DP, Weinhold KJ. Human T-cell lymphotropic virus IIIB glycoprotein (gp120) bound to CD4 determinants on normal lymphocytes and expressed by infected cells serves as target for immune attack. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:4601–4605.
742. Ojo-Amaize EA, Nishanian P, Keith DE, et al. Antibodies to human immunodeficiency virus in human sera induce cell-mediated lysis of human immunodeficiency virus–infected cells. *J Immunol* 1987;139:2458–2463.
743. Weinhold KJ, Lyerly HK, Matthews TJ, et al. Cellular anti-GP120 cytolytic reactivites in HIV-1 seropositive individuals. *Lancet* 1988;1:902–905.
744. Tyler DS, Nastala CL, Stanley SD, et al. GP120 specific cellular cytotoxicity in HIV-1 seropositive individuals. Evidence for circulating CD16+ effector cells armed in vivo and cytophilic antibody. *J Immunol* 1989;142:1177–1182.
745. Tyler DS, Stanley SD, Zolla-Pazner S, et al. Identification of sites within gp41 that serve as targets for antibody-dependent cellular cytotoxicity by using human monoclonal antibodies. *J Immunol* 1990;145:3276–3282.
746. Koup RA, Sullivan JL, Levine PH, et al. Antigenic specificity of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity directed against human immunodeficiency virus in antibody-positive sera. *J Virol* 1989;63:584–590.
747. Tanneau F, McChesney M, Lopez O, Sansonetti P, Montagnier L, Riviere Y. Primary cytotoxicity against the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus-1: evidence for antibody-dependent cellular cytotoxicity in vivo. *J Infect Dis* 1990;162:837–843.
748. Murayama T, Cai Q, Rinaldo CR. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by CD16+ lymphocytes from HIV-seropositive homosexual men. *Clin Immunol Immunopathol* 1990;55:297–304.
749. Jewett A, Giorgi JV, Bonavida B. Antibody-dependent cellular cytoxicity against HIV-coated target cells by peripheral blood monocytes from HIV seropositive asymptomatic patients. *J Immunol* 1990;145:4065–4071.
750. Tyler DS, Stanley SD, Nastala CA, et al. Alterations in antibody-dependent cellular cytotoxicity during the course of HIV-1 infection. Humoral and cellular defects. *J Immunol* 1990;144:3375–3384.
751. Ljunggren K, Karlson A, Fenyo EM, Jondal J. Natural and antibody-dependent cytotoxicity in different clinical stage of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Exp Immunol* 1989;75:184–189.
752. Ojo-Amaize E, Nishanian PG, Heitjan DF, et al. Serum and effector-cell antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity remains high during human immunodeficiency virus (HIV) disease progression. *J Clin Immunol* 1989;9:454–461.
753. Koup RA, Sullivan JL, Levine PH, et al. Detection of major histocompatibility complex class I–resricted, HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in the blood of infected hemophiliacs. *Blood* 1989;73:1909–1914.
754. Riviere Y, Tanneau-Salvadori F, Regnault A, et al. Human immunodeficiency virus–specific cytotoxic responses of seropositive individuals: distinct types of effector cells mediate killing of targets expressing gag and env proteins. *J Virol* 1989;63:2270–2277.
755. Nixon DF, Townsend AR, Elvin JG, Rizza CR, Gallwey J, McMichael AJ. HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes defined with recombinant vaccinia virus and synthetic peptides. *Nature* 1988;336:484–487.
756. Gotch FM, Nixon DF, Alp N, McMichael AJ, Borysiewicz LK. High frequency of memory and effector gag specific cytotoxic T lymphocytes in HIV seropositive individuals. *Int Immunol* 1990;2:707–712.
757. Walker BD, Flexner C, Paradis TJ, et al. HIV-1 reverse transcriptase is a target for cytotoxic T lymphocytes in infected individuals. *Science* 1988;240:64–66.
758. Hosmalin A, Clerici M, Houghten R, et al. An epitope in human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase recognized by both mouse and human cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2344–2348.
759. Lieberman J, Fabry JA, Kuo MC, Earl P, Moss B, Skolnik PR. Cytotoxic T lymphocytes from HIV-1 seropositive individuals recognize immunodominant epitopes in Gp160 and reverse transcriptase. *J Immunol* 1992;148:2738–2747.
760. Koenig S, Earl P, Powell D, et al. Group-specific, major histocompatibility complex class I–restricted cytotoxic responses to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope proteins by cloned peripheral blood T cells from an HIV-1–infected individual. *Proc Natl Acad Sci U S A 1988;85:8638–8642.*

761. Hammond SA, Obah E, Stanhope P, et al. Characterization of a conserved T cell epitope in HIV-1 gp41 recognized by vaccine-induced human cytolytic T cells. *J Immunol* 1991;146:1470–1477.
762. Clerici M, Lucey DR, Zajac RA, et al. Detection of cytotoxic T lymphocytes specific for synthetic peptides of gp160 in HIV-seropositive individuals. *J Immunol* 1991;146:2214–2219.
763. Koenig S, Fuerst TR, Wood LV, et al. Mapping the fine specificity of a cytolytic T cell response to HIV-1 nef protein. *J Immunol* 1990;145:127–135.
764. Hoffenbach A, Langlade-Demoyen P, Dadaglio G, et al. Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans. *J Immunol* 1989; 142:452–462.
765. Moss PA, Rowland-Jones SL, Frodsham PM, et al. Persistent high frequency of human immunodeficiency virus–specific cytotoxic T cells in peripheral blood of infected donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5773–5777.
766. Harrer T, Harrer E, Kalams SA, et al. Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasispecies in a person with prolonged infection and low viral load. *J Immunol* 1996;156:2616–2623.
767. Harrer T, Harrer E, Kalams SA, et al. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996;12:585–592.
768. Rinaldo C, Huang X-L, Fan Z, et al. High levels of anti–human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1–infected long-term nonprogressors. *J Virol* 1995;69:5838–5842.
769. Klein MR, vanBaalen CA, Holwerda AM, et al. Kinetics of gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med* 1995;181:1365–1372.
770. Rowland-Jones S, Sutton J, Ariyoshi K, et al. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat Med* 1995;1:59–64.
771. Tenner-Racz K, Racz P, Thome C, et al. Cytotoxic effector cell granules recognized by the monoclonal antibody TIA-1 are present in CD8+ lymphocytes in lymph nodes of human immunodeficiency virus-1–infected patients. *Am J Pathol* 1993;142:1750–1758.
772. Riviere Y, McChesney MB, Porrot F, et al. Gag-specific cytotoxic responses to HIV type 1 are associated with a decreased risk of progression to AIDS-related complex or AIDS. *AIDS Res Hum Retrovir* 1995;11:903–907.
773. Goulder PJ, Bunce M, Krausa P, et al. Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996;12:1691–1698.
774. Klein MR, Keet IPM, D'Amaro J, et al. Associations between HLA frequencies and pathogenic features of human immunodeficiency virus type 1 infection in seroconverters from the Amsterdam Cohort of Homosexual Men. *J Infect Dis* 1994;169:1244–1249.
775. Keet IP, Klein MR, Just JJ, Kaslow RA. The role of host genetics in the natural history of HIV-1 infection: the needles in the haystack. *AIDS* 1996;10(suppl A): 59–67.
776. Kaslow RA, Carrington M, Apple R, et al. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* 1996;2:405–411.
777. Pantaleo G, DeMaria A, Koenig S, et al. CD8+ T lymphocytes of patients with AIDS maintain normal broad cytolytic function despite the loss of human immunodeficiency virus–specific cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:4818–4822.
778. Pantaleo G, Koenig S, Baseler M, Lane HC, Fauci AS. Defective clonogenic potential of CD8+ T lymphocytes in patients with AIDS. *J Immunol* 1990;144: 1696–1704.
779. Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, et al. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 1991;354: 433–434.
780. Koenig S, Conley AJ, Brewah YA, et al. Transfer of HIV-1–specific cytotoxic T lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression. *Nat Med* 1995;1:330–336.
781. Borrow P, Lewicki H, Wei X, et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1–specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 1997;3:205–211.
782. Goulder PJR, Phillips RE, Colbert RA, et al. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* 1997;3:212–217.
783. Klenerman P, Rowland-Jones S, McAdam S, et al. Cytotoxic T-cell activity antagonized by naturally occurring HIV-1 Gag variants. *Nature* 1994;369:403–407.
784. Meier U-C, Klenerman P, Griffin P, et al. Cytotoxic T lymphocyte lysis inhibited by viable HIV mutants. *Science* 1995;270:1360–1362.
785. Itescu S, Rose S, Dwyer E, Winchester R. Certain HLA-DR5 and-DR6 major histocompatibility complex class II alleles are associated with a CD8 lymphocytic host response to human immunodeficiency virus type 1 characterized by low lymphocyte viral strain heterogeneity and slow disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11472–11476.
786. Kalams SA, Johnson RP, Trocha AK, et al. Longitudinal analysis of T cell receptor (TCR) gene usage by human immunodeficiency virus 1 envelope-specific cytotoxic T lymphocyte clone reveals a limited TCR repertoire. *J Exp Med* 1994; 179:1261–1271.
787. Kalams SA, Johnson RP, Dynan MJ, et al. T cell receptor usage and fine specificity of human immunodeficiency virus 1–specific cytotoxic T lymphocyte clones: analysis of quasispecies recognition reveals a dominant response directed against a minor in vivo variant. *J Exp Med* 1996;183:1669–1679.
788. Wilson CC, Kalams SA, Wilkes BM, et al. Overlapping epitopes in human immunodeficiency virus type 1 gp120 presented by HLA A, B, and C molecules: effects of viral variation on cytotoxic T-lymphocyte recognition. *J Virol* 1997;71: 1256–1264.
789. Haas G, Plikat U, Debre P, et al. Dynamics of viral variants in HIV-1 Nef and specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Immunol* 1996;157:4212–4221.
790. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 1993;362:758–761.
791. Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 1986;234:1563–1566.
792. Walker CM, Levy JA. A diffusible lymphokine produced by CD8+ T lymphocytes suppresses HIV replication. *Immunology* 1989;66:628–630.
793. Walker CM, Erickson AL, Hsueh FC, Levy JA. Inhibition of human immunodeficiency virus replication in acutely infected CD4+ cells by CD8+ cells involves a noncytotoxic mechanism. *J Virol* 1991;65:5921–5927.
794. Chen CH, Weinhold KJ, Bartlett JA, Bolognesi DP, Greenberg ML. CD8+ T lymphocyte-mediated inhibition of HIV-1 long terminal repeat transcription: a novel antiviral mechanism. *AIDS Res Hum Retrovir* 1993;9:1079–1086.
795. Copeland KF, McKay PJ, Rosenthal KL. Suppression of activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by CD8+ T cells is not lentivirus specific. *AIDS Res Hum Retrovir* 1995;11:1321–1326.
796. Mackewicz C, Balckbourn DJ, Levy JA. CD8+ T cells suppress human immunodeficiency virus replicaton by inhibiting viral transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2308–2312.
797. Mackewicz CE, Oretega H, Levy JA. Effect of cytokines on HIV replication in CD4+ lymphocytes: lack of identity with the CD8+ cell antiviral factor. *Cell Immunol* 1994;153:329–343.
798. Mackewicz CE, Ortega HW, Levy JA. CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J Clin Invest* 1991;87:1462–1466.
799. Furci L, Scarlatti G, Burastero S, et al. Antigen-driven C-C chemokine-mediated HIV-1 suppression by CD4(+) T cells from exposed uninfected individuals expressing the wild-type CCR-5 allele. *J Exp Med* 1997;186:455–460.
800. Baier M, Werner A, Bannert N, Metzner K, Kurth R. HIV suppression by interleukin-16. *Nature* 1995;378:563.
801. Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, et al. Interleukin-2 production used to detect antigenic peptide recognition by T-helper lymphocytes from asymptomatic HIV-seropositive individuals. *Nature* 1989;339:383–385.
802. Schrier RD, Gnann JW, Landes R, et al. T cell recognition of HIV synthetic peptides in a natural infection. *J Immunol* 1989;142:1166–1176.
803. Cease KB, Margalit H, Cornette JL, et al. Helper T-cell antigenic site identification in the acquired immunodeficiency syndrome virus gp120 envelope protein and induction of immunity in mice to the native protein using a 16-residue synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:4249–4253.
804. Torseth JW, Berman PW, Merigan TC. Recombinant HIV structural proteins detect specific cellular immunity in vitro in infected individuals. *AIDS Res Hum Retrovir* 1988;4:23–30.
805. Kaslow RA, Duquesnoy R, VanRaden M, et al. A1, Cw7, B8, DR3 HLA antigen combination associated with rapid decline of T-helper lymphocytes in HIV-1 infection. *Lancet* 1990;335:927–930.
806. Just JJ, Abrams E, Louie LG, et al. Influence of host genotype on progression to acquired immunodeficiency syndrome among children infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Pediatr* 1995;127:544–549.
807. Just JJ, Casabona J, Bertran J, et al. MHC class II alleles associated with clinical and immunological manifestations of HIV-1 infection among children in Catalonia, Spain. *Tissue Antigens* 1996;47:313–318.
808. Kroner BL, Rosenberg PS, Aledort LM, Alvord WG, Goedert JJ. HIV-1 infection incidence among persons with hemophilia in the United States and western Europe, 1978–1990. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *J AIDS* 1994;7: 279–286.
809. Detels R, Mann D, Carrington M, et al. Resistance to HIV infection may be genetically mediated. *AIDS* 1996;10:102–104.
810. Bruhl P, Kerschbaum A, Zimmermann K, Eibl MM, Mannhalter JW. Allostimulated lymphocytes inhibit replication of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996;12:31–37.
811. Liu R, Paxton W, Choe S, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996;86:367–377.
812. Cohen O, Vaccarezza M, Lam G, et al. Heterozygosity for a defective gene for CC chemokine receptor 5 is not the sole determinant for the immunologic and virologic phenotype of HIV-infected long term non-progressors. *J Clin Invest* 1997;100:1581–1589.
813. Eugen-Olsen J, Iversen AKN, Garred P, et al. Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged AIDS free survival and slower CD4 T cell fall in a cohort of HIV seropositive individuals. *AIDS* 1997;11:305–310.

814. Eales L-J, Nye KE, Parkin JM, et al. Association of different allelic forms of group specific component with susceptibility to and clinical manifestation of human immunodeficiency virus infection. *Lancet* 1987;1:999–1002.

815. Garred P, Madsen HO, Balslev U, et al. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant allels of mannose-binding lectin. *Lancet* 1997;349:236–240.

816. Khoo SH, Pepper L, Snowdon N, et al. The TNF c2 microsatellite allele is associated with the rate of HIV disease progression. *AIDS* 1997;11:423–428.

817. Lifson AR, Buchbinder SP, Sheppard HW, et al. Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: immunologic and virologic characteristics. *J Infect Dis* 1991;163:959–965.

818. Sheppard HW, Lang W, Ascher MS, Vittinghoff E, Winkelstein W. The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels. *AIDS* 1993;7:1159–1166.

819. Levy JA. HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS* 1993;7:1401–1410.

820. Buchbinder SP, Katz MH, Hessol NA, O'Malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 1994;8:1123–1128.

821. Keet IP, Krol A, Klein MR, et al. Characteristics of long-term asymptomatic infection with human immunodeficiency virus type 1 in men with normal and low CD4+ cell counts. *J Infect Dis* 1994;169:1236–1243.

822. Munoz A, Kirby AJ, He YD, et al. Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD4+ lymphocytes. *J AIDS Hum Retrovir* 1995;8:496–505.

823. Balotta C, Bagnarelli P, Riva C, et al. Comparable biological and molecular determinants in HIV type 1–infected long-term nonprogressors and recently infected individuals. *AIDS Res Hum Retrovir* 1997;13:337–341.

824. Schrager L, Young J, Fowler M, Mathieson B, Vermund S. Long-term survivors of HIV-1 infection: definitions and research challenges. *AIDS* 1994;8(suppl 1): 95–108.

825. Zwart G, VanderHoek L, Valk M, et al. Antibody responses to HIV-1 envelope and gag epitopes in HIV-1 seroconverters with rapid versus slow disease progression. *Virology* 1994;201:285–293.

826. Pantaleo G, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Fauci AS. Antiviral immunity in HIV-1 infected long-term non-progressors (LTNPs). *Semin Virol* 1996;7:131–138.

827. Learmont J, Tindall B, Evans L, et al. Long-term symptomless HIV-1 infection in recipients of blood products from a single donor. *Lancet* 1992;340:863–867.

828. Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, et al. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 1995;270:988–991.

829. Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1995;332:228–232.

830. Michael NL, Chang G, D'arcy LA, Tseng CJ, Birx DL, Sheppard HW. Functional characterization of human immunodeficiency virus type 1 nef genes in patients with divergent rates of disease progression. *J Virol* 1995;69:6758–6769.

831. Huang Y, Zhang L, Ho DD. Characterization of nef sequences in long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1995;69: 93–100.

832. Huang Y, Zhang L, Ho D. Biological characterization of nef in long term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1995;69: 8142 8146.

833. Iversen AKN, Shpaer EG, Rodrigo AG, et al. Persistence of attenuated rev genes in a human immunodeficiency virus type 1–infected asymptomatic individual. *J Virol* 1995;69:5743–5753.

834. Michael NL, Chang G, D'arcy LA, et al. Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1–infected long-term survivor lacking recoverable virus. *J Virol* 1995;69:4228–4236.

835. Cornelissen M, Kuiken C, Zorgdrager F, Hartman S, Goudsmit J. Gross defects in the vpr and vpu genes of HIV type 1 cannot explain the differences in RNA copy number between long-term asymptomatics and progressors. *AIDS Res Hum Retrovir* 1997;13:247–252.

836. Zhang LQ, Huang YX, Yuan HN, Tuttleton S, Ho DD. Genetic characterization of vif, vpr, and vpu sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology* 1997;228:340–349.

837. Connor RI, Sheridan KE, Lai C, Zhang L, Ho DD. Characterization of the functional properties of env genes from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1996;70:5306–5311.

838. Haynes B, Pantaleo G, Fauci A. Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science* 1996;271:324–328.

839. Shearer GM, Clerici M, Clerici M, et al. Protective immunity against HIV infection: has nature done the experiment for us? HIV-specific T-helper activity in seronegative health care workers exposed to contaminated blood. *Immunol Today* 1996;17:21–24.

840. Rida WN. Assessing the effect of HIV vaccination on infectiousness. *Stat Med* 1996;15:2393–2404.

841. Daniel MD, Kirchhoff F, Czajak SC, Sehgal PK, Desrosiers RC. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 1992;258:1938–1941.

842. Ruprecht RM, Baba TW, Liska V. Attenuated HIV vaccine: caveats. *Science* 1996;271:1790–1792.

843. Wyand MS, Manson KH, Lackner AA, Desrosiers RC. Resistance of neonatal monkeys to live attenuated vaccine strains of simian immunodeficiency virus. *Nat Med* 1997;3:32–36.

844. Shafferman A, Lewis MG, McCutchan FE, et al. Prevention of transmission of simian immunodeficiency virus from vaccinated macaques that developed transient virus infection following challenge. *Vaccine* 1993;11:848–852.

845. Lewis MG, Bellah S, McKinnon K, et al. Titration and characterization of two rhesus-derived SIVmac challenge stocks. *AIDS Res Hum Retrovir* 1994;10: 213–220.

846. Stott E, Chan W, Mills K, et al. Preliminary report: protection of cynomolgus macaques against simian immunodeficiency virus by fixed infected-cell vaccine. *Lancet* 1990;336:1538–1541.

847. Stott E. Anti-cell antibodies in macaques. *Nature* 1991;353:393.

848. Chan WL, Rodgers A, Grief C, et al. Immunization with class I human histocompatibility leukocyte antigen can protect macaques against challenge infection with SIVmac-32H. *AIDS* 1995;9:223–228.

849. Abimiku AG, Franchini G, Tartaglia J, et al. HIV-1 recombinant poxvirus vaccine induces cross-protection against HIV-2 challenge in rhesus macaques. *Nat Med* 1995;1:321–329.

850. Egan MA, Pavlat WA, Tartaglia J, et al. Induction of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)–specific cytolytic T lymphocyte responses in seronegative adults by a nonreplicating, host-range–restricted canarypox vector (ALVAC) carrying the HIV-1MN env gene. *J Infect Dis* 1995;171:1623–1627.

851. Cole K, Rowles J, Jagerski B, et al. Evolution of envelope-specific antibody responses in monkeys experimentally infected or immunized with simian immunodeficiency virus and its association with the development of protective immunity. *J Virol* 1997;71:5069–5079.

852. Girard M, Meignier B, Barre-Sinoussi F, et al. Vaccine-induced protection of chimpanzees against infection by a heterologous human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1995;69:6239–6248.

853. el-Amad Z, Murthy KK, Higgins K, et al. Resistance of chimpanzees immunized with recombinant gp120SF2 to challenge by HIV-1SF2. *AIDS* 1995;9: 1313–1322.

854. Boyer JD, Ugen KE, Wang B, et al. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med* 1997;3:526–532.

855. Bolognesi D. Overview of HIV vaccine development. *Antibiot Chemother* 1996; 48:63–67.

856. Esparza J, Heyward W, Osmanov S. HIV vaccine development: from basic research to human trials. *AIDS* 1996;10(suppl A):123–132.

857. Haynes BF. HIV vaccines: where we are and where we are going. *Lancet* 1996; 348:933–937.

858. Pincus SH, Messer KG, Cole R, et al. Vaccine-specific antibody responses induced by HIV-1 envelope subunit vaccines. *J Immunol* 1997;158:3511–3520.

859. Girard M, Yue L, Barre-Sinoussi F, et al. Failure of a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype B–derived vaccine to prevent infection of chimpanzees by an HIV-1 subtype E strain. *J Virol* 1996;70:8229–8233.

860. Fleury B, Janvier G, Pialoux G, et al. Memory cytotoxic T lymphocyte responses in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)–negative volunteers immunized with a recombinant canarypox expressing gp 160 of HIV-1 and boosted with a recombinant gp160. *J Infect Dis* 1996;174:734–738.

861. Ferrari G, Humphrey W, McElrath MJ, et al. Clade B–based HIV-1 vaccines elicit cross-clade cytotoxic T lymphocyte reactivities in uninfected volunteers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1396–1401.

862. Perales MA, Schwartz DH, Fabry JA, Lieberman J. A vaccinia-gp160–based vaccine but not a gp160 protein vaccine elicits anti-gp160 cytotoxic T lymphocytes in some HIV-1 seronegative vaccinees. *J AIDS Hum Retrovir* 1995;10:27–35.

863. Gorse GJ, Patel GB, Newman FK, Mandava M, Belshe RB. Recombinant gp160 vaccination schedule and MHC HLA type as factors influencing cellular responses to HIV-1 envelope glycoprotein. NIAID AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *Vaccine* 1995;13:1170 1179.

864. Tsuji T, Fukushima J, Hamajima K, et al. HIV-1–specific cell-mediated immunity is enhanced by co-inoculation of TCA3 expression plasmid with DNA vaccine. *Immunology* 1997;90:1–6.

865. Okuda K, Bukawa H, Hamajima K, et al. Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses following direct injection of DNA encoding the HIV type 1 env and rev gene products. *AIDS Res Hum Retrovir* 1995;11:933–943.

第45章　免疫治疗

Herman Waldmann, Lisa K. Gilliland, Stephen P. Cobbold, and Geoffrey Hale[①]

引言

1511

免疫系统已经进化成了一个最为灵活的防御体系,用以抵抗病原微生物的侵袭。对这些免疫反应中细胞和分子组成成分的了解,为我们开辟新型治疗提供了良机,其中包括源自免疫系统本身的生物学因素。新型免疫治疗的主要目标是那些采用传统低分子质量药物不能治疗或长期控制的疾病,主要包括移植、自身免疫性疾病、癌症、心血管疾病、炎性肠疾病等。生物学治疗又分为三个方面:①细胞学产物,如同种异体骨髓移植和肿瘤侵润了淋巴细胞;②蛋白质,如抗体和细胞因子;③基因治疗,如增强肿瘤的免疫原性。基因治疗仍处于实验阶段,使用范围仍然受限。

生物治疗在以下四个方面上有用的。

第一,对所谓的急性事件:①由于放疗、化疗所致的细胞功能障碍,但可施以干细胞重建来增加成活率,或施以生长因子来增加目的造血细胞系的自然重建率;②急性炎症疾病,如缺血再灌注损伤,(可致心肌梗

① H. Waldmann, L. K. Gilliland, S. P. Cobbold, and G. Hale: Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, OX1 3RE Oxford, United Kingdom.

死、卒中、器官移植中的不可避免的血管损伤),革兰氏阴性菌感染所致脓毒症休克的控制,以及器官移植中急性排斥反应的逆转。

1512 第二,该方法已用于暴露肿瘤抗原,或者对清除外科手术切除、化疗、放疗后残存癌细胞的辅助治疗,该过程不可能清除每个单一的癌细胞。不言而喻,长期的缓解可能出现任何残存的肿瘤细胞处于静息状态,或者处于宿主自然进化的生长控制之下。

第三,该方法已用于各种有临床表现的慢性炎症性疾病的控制,如类风湿性关节炎。尽管在软骨毁坏变化过程中尚无证据,但许多疾病体征和症状都可通过中和肿瘤坏死因子(TNF-α)等生物学方法予以控制;对多发性硬化症施以β干扰素(IFN-β)可以减少急性炎症损害的发病率。如果不能给予必要的治疗,就会耽误病人的疾病过程。

第四,免疫治疗最有希望的前景也许就是通过短期的治疗诱导免疫耐受,在大多数器官移植和自身免疫性疾病的啮齿类动物模型中已经得到证实,随着对该机制更多的了解,必将应用于人类。

为什么要做免疫治疗?

无庸置疑,最初对免疫系统治疗调理产物感兴趣,还是与完成实质性的特异性目的,即对于特定靶向结构的治疗指数有关。此外,造血系统和淋巴系统的细胞便于分散在单一的细胞悬液中,因此便于控制,而且在体外操作(包括膨胀细胞)比在体内治疗更容易控制。

为什么强调抗体的作用?

针对每一个细胞表面分子的每一个新型抗体都代表一种潜在的治疗性药物,这比采用其他方法获取药物要重要得多。另外,用于人类疾病的单克隆抗体和相关蛋白产物已起到检测和治疗的双重作用。作为检测用试剂,它们可以提供有效的证据。通过治疗效果的例证,可以发现哪些细胞或哪些细胞因子参与特定的病理过程,所以将此定义为未来的治疗制剂。

抗体能从短期的治疗中带来长期的效果

溶膜性抗体作为治疗性工具,魔弹的概念为抗体作为治疗、调理作用提供了推动力量,很明显,在免疫抑制的治疗过程中,非溶膜性抗体也可以引导(guide)或极化对各种非入侵式抗原的免疫应答。后一种策略我们定义为重编程序(reprogramming)[1]。短期使用非溶膜性抗体来阻断T细胞对特定抗原的应答,就整体而言,将导致T细胞群长期对这些抗原无应答。此外,在各种不同的机制中,决定治疗耐受性的还是优势耐受的产生,为何调节性T细胞可以预防对靶抗原的攻击反应。其实很明显,有许多方式可以使免疫系统获得重编程序,例如,黏膜免疫性抗原和一些衍生肽能够改善实验性自身免疫性疾病,这为我们开展抗原特异性和组织特异性治疗提供了良机,这种特异性治疗方法风险小,疗效确切。通过对细胞自杀信号支配控制细胞成活的机制,对肿瘤细胞和淋巴细胞的认识绝对不能排除细胞凋亡的概念,根据细胞凋亡又为我们清除特定类型细胞提供了更多的机会[2~4]。

最后,一篇研究报告发现,组织的成活受到免疫系统的攻击,而免疫系统自身的改变是为了对免疫性攻击有更好的稳定性[5]。一般而言,从异种器官移植和感染耐受的机制中,我们发现了许多基本原理,这为控制免疫介导的组织损伤提供了更广泛的应用范围。

单克隆抗体为治疗铺平了道路

单克隆抗体的应用使人们对生物治疗有了更新的兴趣,在这本基础免疫学第四版的有关章节中我们必然会重点强调治疗性抗体。为了使抗体在体内达到预期的效果以及降低其免疫原性,人们设计发明了工程抗体技术,并使该领域得以迅速发展。然而,针对生物制剂和治疗策略具体想法要比用于临床的重要得多。在下一节的内容中,我们将向读者提供这方面的内容,在本章的最后部分,我们还将讨论为什么这方面的创

意会这么少,怎样使之进入临床实践。

免疫治疗的主要目的:短期治疗达到长期的效果

短期施予抗原能够防止自身免疫性疾病

毫无疑问,解决自身免疫性疾病和器官移植对治疗耐受性的理想策略是要鉴定出关键的目标抗原,并使其处于致耐受性状态。目前集中关注以下几个方面:
①可能对任何疾病过程中的所有靶抗原予以鉴定,尤其是器官移植;
②不可能分离每个抗原大量的致耐受性基因片段,也不可能都合成这些多肽;
③耐受原分子的半衰期短,难以持续维持其生物效应。

通过黏膜耐受使这些问题有了部分的缓解,因为源自组织中的少量抗原或多肽就可以导致同一组织中对其他抗原的耐受[6~8]。该种形式的耐受依赖于T细胞的活化。将某个组织中许多抗原中的一个作为致耐受性疫苗,就可以对全部组织发生耐受,这样就很有意义了。由于抗原剂量会影响耐受是以调节性的方式或是使耐受消失,所以,在施以治疗时应该考虑这些组织。 1513

其他的全身接种路线也可以达到同样的效果,例如,在小鼠糖尿病模型中,热激蛋白(HSP)就是很好的靶点,已经成功地用于致耐受性。HSP衍生肽可防止NOD小鼠糖尿病的发展[9]。

从外部施以抗原的另一个途径是利用抗原的内在性特点,通过处理宿主,以便改变机体免疫系统识别该抗原的途径。用抗体施以短期治疗已能达到这样的效果。下一节中,我们将讨论其作用机制。

短期的抗体治疗能够产生长期的耐受效果

耗尽抗体

自从Medawar、Brent和Billingham等报道通过输入异体骨髓来诱导新生小鼠产生耐受以来,人们试图发展一种低损伤的操作程序,这样可以在成年小鼠中获得耐受。在1986年,对啮齿类动物可以做到,施以非致死剂量辐射(600 rad)后[10],配以可溶性抗CD4、抗CD8抗体,就可以将供体骨髓移植到受者体内,还可防止移植物抗宿主反应(GVHD)和排斥移植物的发生。耐受与供体嵌合体有关,辐射需要对宿主脊髓予以分离以产生造血微环境,用非免疫抑制剂量的烷化剂——二甲基马利兰(di methyl myeleran, DMM)完全可以替代辐射[11]。为了保证更多的供体干细胞能够植入受者体内,并能产生足够的供体干细胞来克服宿主抗性,就需要造血微环境。辐射剂量最低可以为300 rad①,如果应用在胸腺,剂量需要加至700 rad[12,13],或者增加抑制性抗体的水平,或者用抗LFA-1抗体并加入抗CD4、抗CD8抗体[14],或者延长使用抗体的作用时间[15]。

虽然以消除抗体诱导机体耐受形成看起来可行,但是,用于人体的一个主要问题还是CD4T细胞不能有效地在成人中重建,可能是因为其胸腺已经退化。为此,不通过缺失T细胞以获取免疫耐受就愈来愈受到重视。

非耗尽抗体

在20世纪80年代中期,对啮齿动物短期地施以非溶性抗CD4抗体就导致T细胞对外来抗原长期的耐受[16~22],短期施以抗体来阻断CD4分子的功能以获得长期的免疫耐受,这种可能性更大了[21~24]。这种方法可以应用于骨髓、心脏、皮肤移植模型中,这不仅可以诱导天然个体的耐受形成,还可诱导事先已经致敏化的受体,如图45.1所示[25,26]。在自身免疫性疾病中,如果施以抗CD4抗体治疗,可以防止NOD小鼠糖尿病的发展[27~29]。

---

① rad(拉德),吸收剂量单位,非法定。1rad = 100erg/g = 10^{-2}Gy。

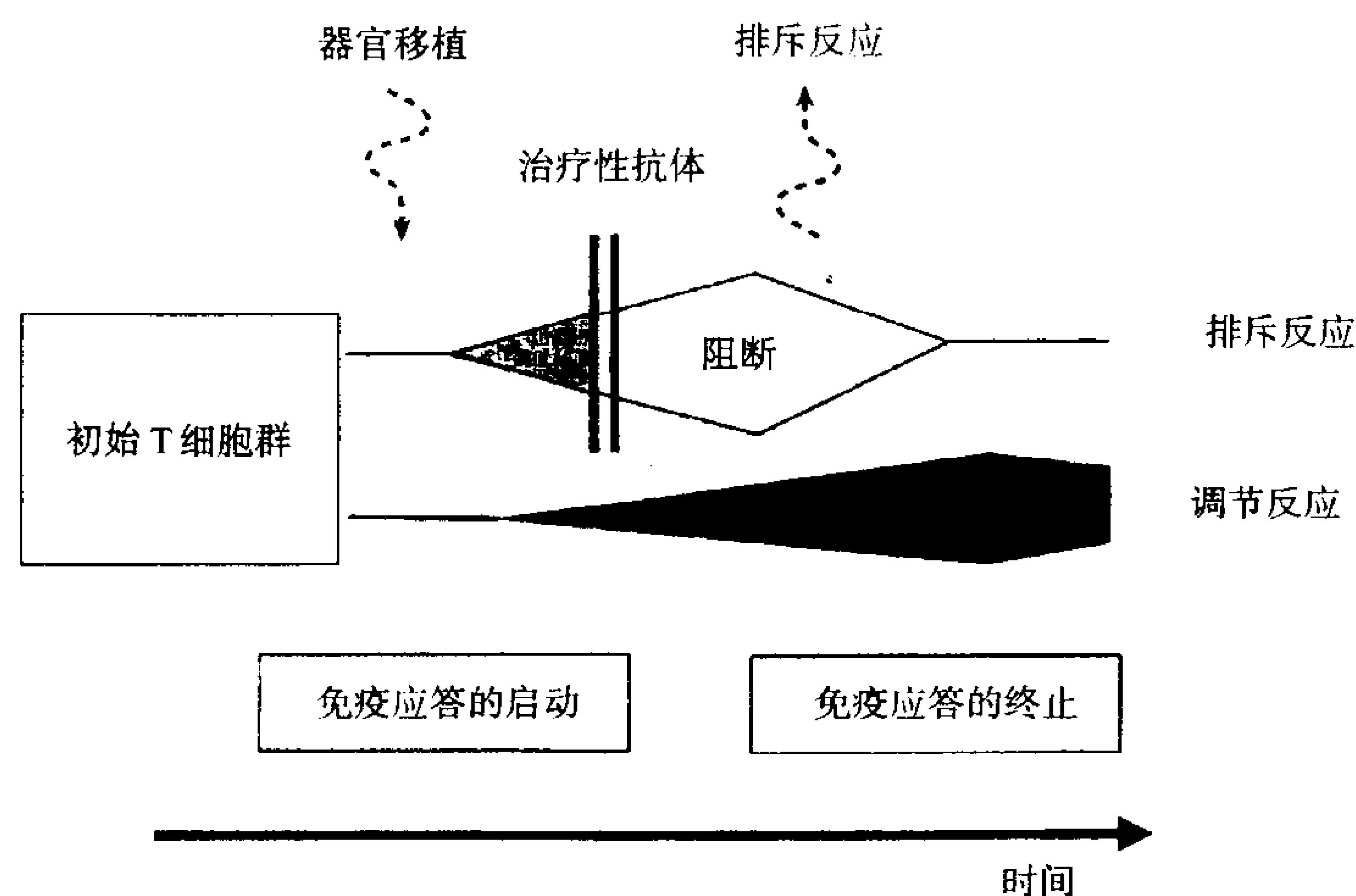


图 45.1 抗体治疗的两个阶段,在调节性T细胞发育期间,CD4抗体能够中断对抗原的反应性。一旦停止使用CD4抗体,调节性T细胞的优势就处于耐受状态,需要持久的抗原刺激来维持该耐受过程。

由于有了这些初步的发现,许多能够阻断别的抗体或免疫球蛋白的试剂已能诱导移植耐受的产生,或对自身免疫性疾病予以长期调节,包括CTLA4-免疫球蛋白、抗CD11a、CD2、CD25、CD3、CD40配体(CD40L)等分子的抗体[30~42],其中最明显的是抗CD3抗体,在小鼠胰岛细胞完全丧失之前给予短期治疗,可以逆转小鼠糖尿病的病情[36]。

通过阻断抗体来决定耐受的作用机制是什么?

由于能诱导成年麝香鼠(ATx)抗CD4抗体,所以绝大多数诱导模型都通过外周作用机制来实现。大多数模型系统的一个共同特征就是:耐受一旦形成,即使有足够的处于最佳生长期的细胞能够阻断,但是初始淋巴细胞却难以阻断[43,44]。由于耐受动物的 $CD4^+$ T细胞能防止初始细胞在过继转移中免受排斥,宿主 $CD4^+$ T细胞可以消除这种耐受状态[26,43]。这是优势耐受的作用证据[26,45~50]。

能够耐受某类移植抗原的动物常常有连锁抑制现象[49,51],换言之,当另外的抗原在同一个细胞以耐受源的方式刺激动物时,它们对另外的移植物会出现损害性免疫应答。连锁抑制现象提示:局部微环境会发生调节作用,该微环境中抗原能使初始抗原特异性T细胞进入近似激化状态并影响调节性T细胞。

1514

激发性耐受

始终控制生命的整个过程,要么第一类调节性T细胞必须成活下来,要么后来发育而成的新一类T细胞能参与调节行为。后者说明初始T细胞由于与耐受性T细胞在一起,其自身也演化成了耐受性细胞,初始T细胞不仅能演化成耐受细胞,而且获得了调节更多的初始T细胞的能力。在包括心血管移植物的有关研究中,至少有10例受体动物产生了激发性耐受现象,说明这是可靠的。

用非溶解性抗体也能诱导形成消失性耐受

对啮齿类动物做骨髓移植的研究发现:移植骨髓的数量能够决定耐受消失或者调节,大剂量的骨髓可以产生消失性耐受的形成,低剂量的骨髓产生形成优势性和激发性耐受[50]。

短期阻断抗体导致耐受的形成,有这样的假设吗?

越来越多的证据表明[52]:不同的抗体能够产生一种停息状态,这可以防止(机体)受到进一步的攻击,在处于停息状态期间,抗原特异性T细胞仍能识别抗原,并能成为无反应性T细胞、或者调节性T细胞甚至死亡,这取决于其所处的前后状态和所经历的抗原剂量(图45.3)。如果结果是促进调节性T细胞的形成,那么,这些细胞在数量上占优势,并能与抗原持续地作用,以保证个体应答能力保持激化状态。有些情况是针对Th2细胞的激化状态,另一些情形则以调节性T细胞的其他形式存在,但至今尚未认识到这种形式的遗传特征。其实,在不同的生物种类中,已经能够分离到调节性T细胞的其他形式,如Th3细胞[7]。

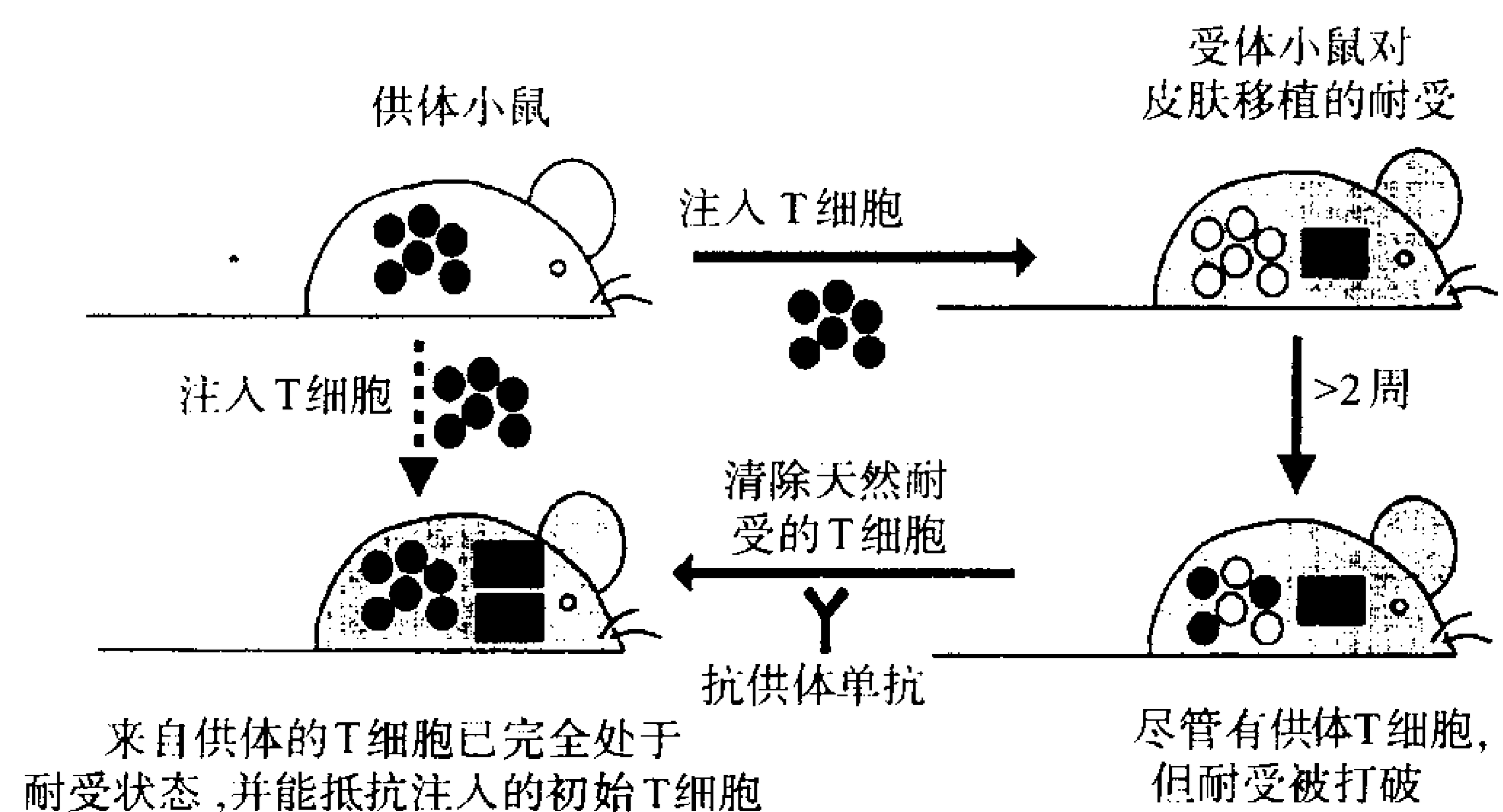


图 45.2 继发性耐受的说明，其中耐受型 T 细胞使初始 T 细胞进入耐受状态，因此，第二群 T 细胞就能够阻止其他的初始 T 细胞攻击移植物。

我们预计：要了解外周耐受机制和 T 细胞抑制标记的不同表现，鉴定各类调节性 CD4 T 细胞将成为本研究的热点问题。

二阶段耐受

以上讨论了抗体对器官移植耐受的影响，在此情况下，由于植入器官或组织不断提供耐受原，所以最容易受到损害。为了对植入器官或组织予以最大限度的保护，采用二阶段法引起了人们更大的兴趣，先用无活性细胞启动耐受，随后植入供体器官以加强耐受。Wood 和同事们[53,54]开创了器官移植中的二阶段预防性治疗法，通过输血并使用抗 CD4 抗体来增强致耐受能力。该研究小组将表达 MHC Ⅰ 或 MHC Ⅱ 类分子的转染体与抗 CD4 单克隆抗体联用，诱导耐受和连锁抑制的形成，使受者的 MHC 分子发生错配。

使用抗体诱导免疫耐受的兴趣所在是因为人们不需要知道暴露在免疫系统中的所有抗原的完全同一性，阻断抗体的治疗方法可以简单地改变免疫系统的某些方面，加深对反应性抗体的认识，以便成为程序化。在抗体保护伞存在的情况下，只有抗原能够诱导耐受的形成，宿主体内抗体存在的时间与免疫抑制的全过程同步。当抗体消失，免疫系统恢复对所有抗原的应答能力，免疫活性对已经形成的耐受除外(图 45.4)。就临床应用而言，在早期，诱导优势性耐受和激发性耐受也许不需要建立对所有抗原多肽的耐受，如果建立了优势调节机制，靶组织中有限的一些抗原就启动了连锁免疫抑制、激发性耐受，并对同一组织的其他抗原产生耐受。 1517

最后，临床医师在努力寻找免疫抑制药物之前，他们首先将寻找耐受的诊断标志。如果调节性细胞存在某种标志，而且在血液中是惟一的，那么，这对预诊断和诊断是很有帮助的。没有调节性细胞参与的耐受就不适合做这类分析，只有依靠免疫抑制的情况来作出判断。为此，由于诱导该种耐受不需要高损伤性的治疗，所以，在 21 世纪，调节性机制将是诱导免疫抑制的最具有吸引力的目标。

细胞治疗

在细胞移植以控制白血病和实体瘤生长方面有许多好的创意和动物模型，我们将讨论同种异体骨髓移植(BMT)以阐述细胞治疗存在的问题和复杂性。

同种异体骨髓移植

骨髓移植是已建立的最好的细胞治疗方式，但仍存在其复杂性和操作粗糙等问题。近二十年来，为了克服临床应用中受到限制的一些问题，建立了许多实验方法，其主要目的就是减少并发症的发生，使用细胞因子、单克隆抗体等可以控制骨髓移植物的组成，或者控制受者的免疫环境(图 45.5)。

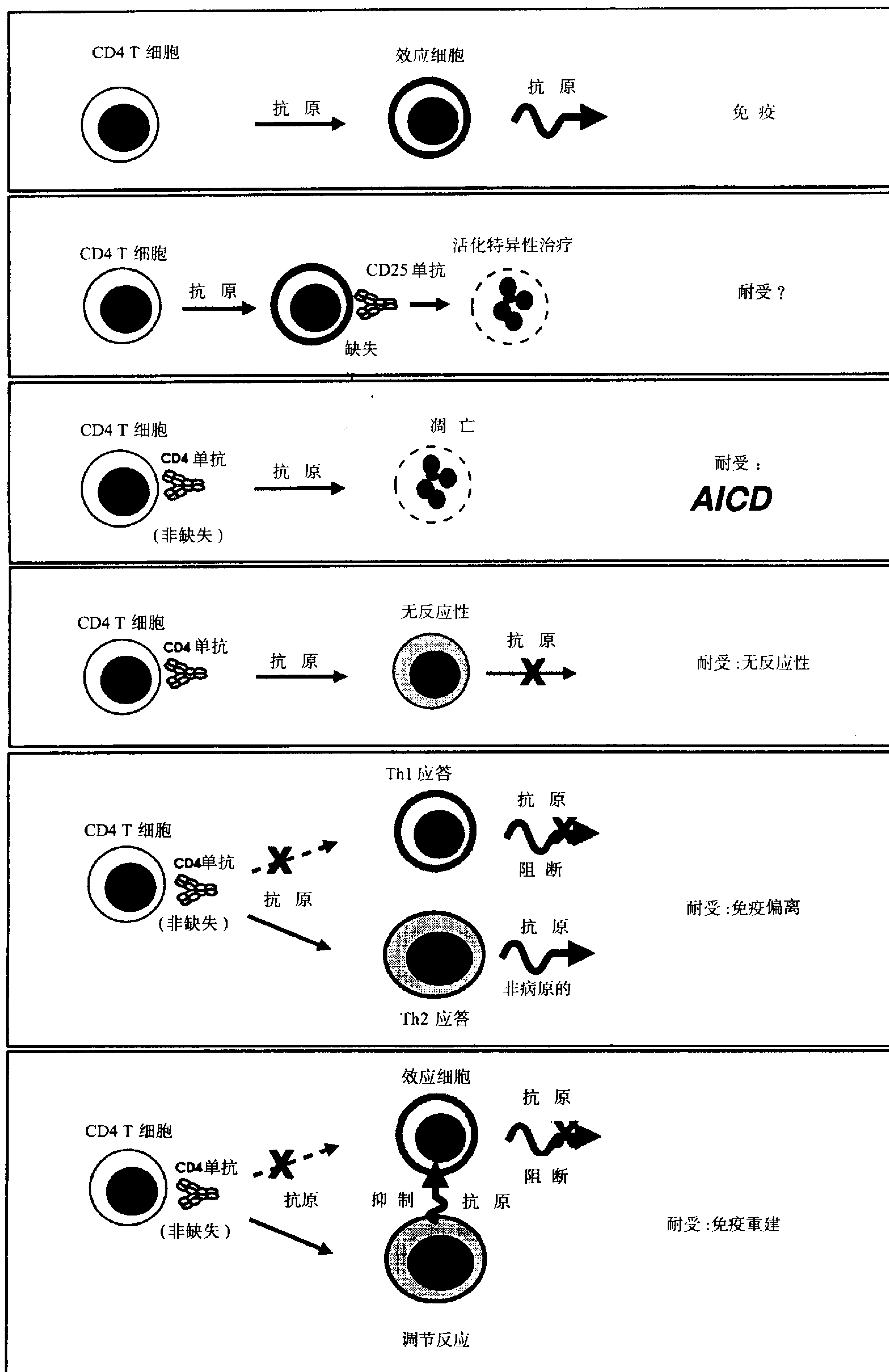


图 45.3 抗体诱导特异性耐受的可能机制。一些抗体能选择性地清除已被抗原活化的 T 细胞克隆,未消失的 CD4 抗体能够阻止 T 细胞得到完整的受到攻击的信号。因此,T 细胞可能通过以下任何一种机制而成为耐受状态,这些机制包括:缺失、无反应性、活化诱导的细胞死亡(AICD)、免疫偏离以及感染性耐受等。

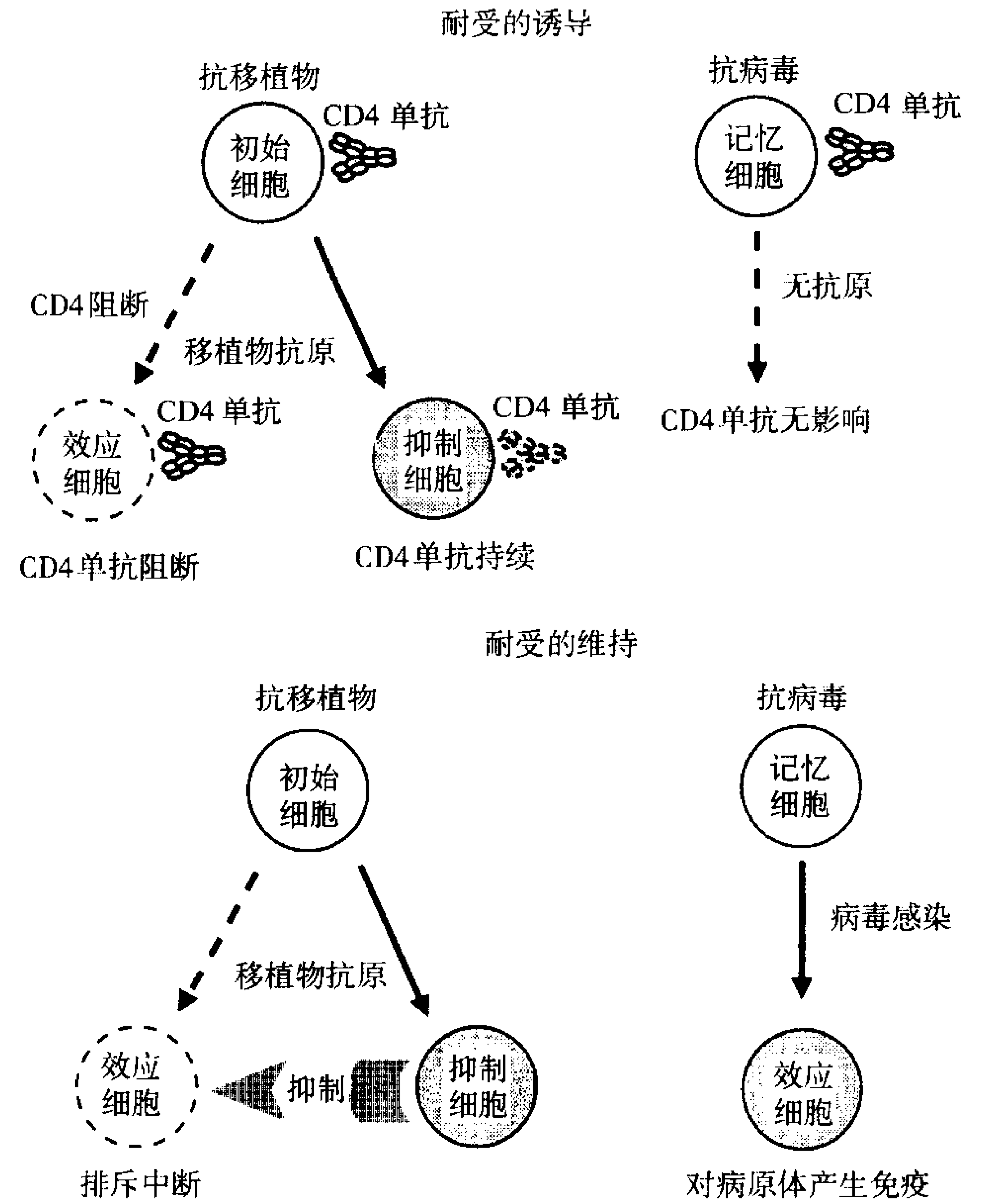
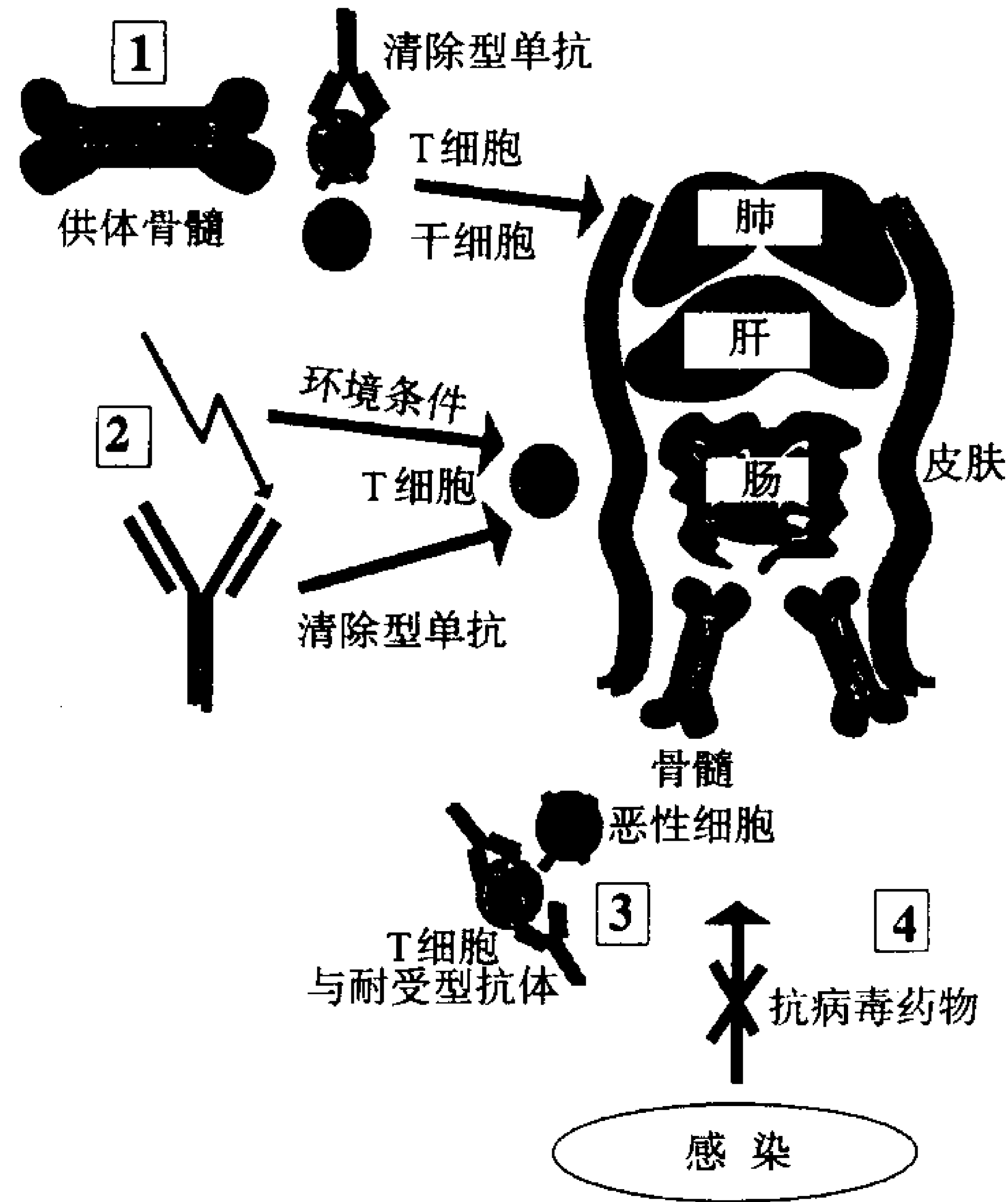


图 45.4 通过免疫重建,怎样选择抗原来维持耐受。在诱导阶段,施与少量抗体会抑制整个免疫系统,但是,在抗体的存在下,施与抗原才能诱导耐受,一旦抗体消失,优势耐受就发挥作用,为什么调节性 T 细胞能以任何方式来干涉记忆细胞对抗原的反应,原因仍不清楚。



第 1 阶段：最好的办法
问　　题：移植物抗宿主疾病
解决路线：清除 T 细胞的骨髓
第 2 阶段：第二办法
问　　题：骨髓排斥
解决路线：改善环境、清除受体 T 细胞
增强免疫抑制
第 3 阶段：第三办法
问　　题：清除移植物抗白细胞效应
解决路线：控制回输的 T 细胞(能否用耐受的单抗?)
改善抗白细胞的治疗
第 4 阶段：如果需要的话
问　　题：感染并发症
解决路线：治疗感染,新型抗病毒药物、细胞因子等

图 45.5 同种骨髓移植:问题与可能的解决路线。

研究同种异体骨髓移植的原始动力还是为了拯救那些受到辐射损害的人,因为造血干细胞在所有组织中最容易受到损害。目前,骨髓移植(BMT)已经常规性的应用于患有严重先天性疾病患者或造血系统有缺陷的患者,如免疫缺陷、贫血等,也可拯救白血病和曾经接受过大剂量化疗、放疗的癌症患者。但是,这会出现三方面的并发症,在第 36 章中有详细描述:①移植物抗宿主病 GVHD,由供者 T 细胞攻击宿主组织细胞引

起;②排斥反应,主要由受者残余的T细胞引起;③免疫功能恢复减慢或异常,主要是由于成人胸腺处理新的T细胞的能力受限的缘故。所有这些问题都与供受者组织匹配程度有关。同卵双生例外,最好的供体是同胞的HLA配型,但对少数病人还是受到限制,许多病人即使给予长期的免疫抑制药物,还会死于移植物抗宿主病。如果能够防止以上问题的发生,骨髓移植将应用得更为广泛,但还是不能用于像thalassaemia、镰状细胞性贫血、大多数自身免疫性疾病等。

清除骨髓移植物中的T细胞可以预防移植物抗宿主病(GVHD)

1518

清除骨髓移植物中的T细胞可以预防移植物抗宿主病(GVHD)的发生,人们在这方面已经做了许多努力。早在20世纪80年代初期,人们首先将单克隆抗体应用于治疗,对于保守的造血系统,也以各种方式应用抗T细胞抗原,诸如:抗CD2、CD3、CD5、CD7的抗体,以及能识别T、B细胞CD52的抗体,以消耗供体的T细胞。有些技术还不能清除足够的T细胞,发现不到1%的供体T细胞就足以引起明显的GVHD。大鼠抗CD52抗原的IgM单克隆抗体,由于其简单、有效,所以被广泛应用[55,56],它与其他的抗人细胞的单抗不同,它在人的补体的参与下,特别能溶破细胞,所以,不用别的技术,就可以清除T细胞,而不用加供体的血清。正常情况下,人的细胞能够逃避同源补体的攻击(第29章),抗CD52抗体也许能够克服这种限制,因为这种抗原极为丰富,而且紧靠细胞膜。

如果在移植后不施以免疫抑制,发生GVHD的危险率大约在80%以上,即使使用最好的药物,其危险率仍然高达40%。通过有效地清除T细胞,可以将危险率降至10%以下。但是,到目前为止,尚未发现行之有效的能清除T细胞的方法,原因何在,将在以后讨论。

应用免疫抑制剂克服骨髓移植排斥反应

应用免疫抑制剂可以克服骨髓移植排斥反应的发生,同种异体骨髓移植所发生的排斥反应通常较低,因为受者经大剂量的化疗和放疗药物处理后,其自身免疫系统已被清除,然而,在GVHD和排斥反应之间,还有彼此相反的相互作用[10](见第36章),以至于供体的T细胞被清除以后,仍会出现明显的排斥反应。已有实验表明:受者残留的T细胞可能会引起这类排斥反应。在某种程度上,发生该类的排斥反应可以通过增加干细胞的数量来予以克服[57]。另一方面,可以用一些能够作用供体骨髓的单克隆抗体来清除宿主的T细胞,以避免排斥反应的发生[10]。单独应用补体溶破的方法不能有效地清除体内的细胞,部分原因是由于存在高浓度的补体调节因子。但是,其他影响因子可能发挥作用,比如发生抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC),所谓ADCC,就是抗体与NK细胞和巨噬细胞等效应细胞上的Fc受体的结合。大鼠的IgG2b型的抗CD52抗体,就能够与人的FcR相互作用,它能够在体内明显地溶破残留的淋巴细胞,如果这些试剂没有副作用的话,其活性完全可以与马或兔的抗淋巴细胞球蛋白(ALG)的多克隆抗体相比。通过对抗CD52抗体的研究发现:它可以降低GVHD和发生排斥反应的危险率,可以明显降低移植发病率和死亡率。

同种异体T细胞抗白血病效应

对于非恶性病症的病人,如先天性代谢缺陷或者先天性血细胞生成缺陷的病人,一个较好而且长远的办法应该是排除骨髓移植后并发症的发生。但不幸的是,却不能保证恶性病症患者,因为供体T细胞有时对移植的治疗效果有重要影响,可能是其难以清除逃逸的残留的肿瘤细胞[58,59]。由干细胞介导的、而且由将导致GVHD的同一T细胞群都对骨髓移植有免疫治疗作用,而且效果是肯定的。尽管许多学者认为T细胞的抗肿瘤作用对其他的白血病有重要作用,但是比较肯定的效果还是在慢性髓样白血病(chronic myeloid leukemia, CML)和Epstein-Barr病毒(EBV)所致的B淋巴瘤恶性增生性疾病(B-cell lymphoproliferative disease, BLPD)。

CML是造血干细胞自身的恶性病变,而且只能通过同种异体骨髓移植予以治疗。清除供体T细胞将导致复发感染率大大增加[59],该病与惟一的同源细胞重排基因bcr-abl的缺失密切相关,如果在复发感染的早

期注入供体淋巴细胞,恶性克隆可被清除,当然,要付出的代价是再次引起 GVHD 的危险率大大增加。在探索 T 细胞怎样引起移植物抗白血病(graft-versus-leukemia ,GVL)进而引起 GVHD 方面曾做了大量努力,但对于临床应用仍缺乏理论性指导[60]。

BLPD 的情况不同,它几乎是特有的医源性疾病,由 T 淋巴细胞的广泛性缺失和选择性缺失所引起。EB 病毒潜在于大多数成年人的 B 淋巴细胞中,T 细胞缺乏此病毒,它能使单个克隆快速增殖,导致恶性转化和致死性淋巴瘤,如果及时注入供体 T 细胞,可以使该病得到完全控制。

同种异体骨髓移植后的免疫重建

在化疗和(或)放疗后的 2~4 周,整个造血系统受到严重抑制,一直要到供者干细胞形成新的成分,可以通过输血来维持红细胞和血小板的数量,但由于缺乏粒细胞而增加了细菌感染的危险性,由于细胞寿命短暂,几乎不采用输血来解决该问题,施以重组生长因子、中性粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor,G-CSF)等,可以加快新的粒细胞的生成,而且还能刺激前体粒细胞的分化和增殖。骨髓移植对免疫系统的长期影响仍未很好地理解,只知道血液淋巴细胞恢复到正常水平是很缓慢的,特别是当供者淋巴细胞被清除以后。可能是成人胸腺产生新的 T 细胞不那么有效,但无论如何,可以从供者的残留 T 细胞中获得免疫记忆。如果 T 细胞的起始数量很少,T 细胞库容受到限制,使感染和发生自身免疫性疾病的危险率大大上升。毫无疑问,骨髓移植的受者与正常个体相比较,发生这些长期并发症的危险率会大大增加。值得注意的是,所报道的案例可能不真实,而且绝大多数长期存活者依然保持健康状态。最易发生感染的时期是移植后的头 6 个月,期间,时常发生像 EB 病毒、巨细胞病毒(CMV)的反复活化。如果不引起 GVHD 的话,近期主要的研究目的就是要提供能在体外刺激抗病毒抗原(如 CMV)的供者 T 细胞,以此作为特异性免疫治疗。

1519

自体骨髓移植

要避免同种异体骨髓移植所面临的所有免疫学问题,其中一个方法就是用病人自己的骨髓做自体骨髓移植,这样可以解决其他方法所致的致死性打击。显然,这不适宜能影响干细胞、重症再生障碍性贫血(severe aplastic anemia)或 CML 患者,但对其他的恶性肿瘤或自身免疫性疾病,这是极有吸引力的主张,尤其对于先天性的,可以通过基因治疗来改变这些缺陷。现在的问题是,要从输入的骨髓细胞中清除不良的细胞,清除那些对自身免疫性疾病有重要影响的肿瘤细胞或淋巴细胞。使用特异性单克隆抗体,以不同的方法来清除肿瘤细胞,也可以用同样的方法来清除 T 细胞。然而,从表面上看,一些更具吸引力的技术已经出现,用抗 CD34 抗体对干细胞做阳性选择[61],CD34 抗原可选择性地表达于 1% 的骨髓细胞、全能造血干细胞、定向干细胞等,在绝大多数肿瘤细胞和成熟的血细胞中尚未发现此抗原。在作者撰稿期间,已有三个产品获得批准,主要做法是将 CD34 以多种方式偶联在富含骨髓干细胞的载体上,将投入使用。虽然已能清除大量的肿瘤细胞,但是还不知道输入被清除的骨髓的做法与不清除骨髓的做法相比,是否能够改善病人的生存质量。我们面临的主要困难是,不能区别从输入的肿瘤细胞或正常细胞所致的复发性感染。

应用这种方法治疗自身免疫性疾病仍处于实验研究中,我们怀疑骨髓替代治疗(marrow ablative therapy)是否真的那么必要吗? 使用单克隆抗体或其他生物制剂可以在体外选择性地清除或调节淋巴细胞的功能。

骨髓移植新进展

正常情况下,骨髓中可发现造血干细胞,从骨盆骨抽出的干细胞可以用于移植,这是一个痛苦的操作过程,需要对病人施以全身麻醉。近年来发现,用细胞毒素药物或 G-CSF 等造血生长因子处理后,可以动员大量的干细胞进入外周血,用细胞提取法大量收集这些细胞,在将来的几年内,可能代替骨髓抽出法[62,63]。获得大量的干细胞,可以更加快速而安全地移植,目前常用的操作程序是对病人的自体骨髓移植,对于同种异体移植来说,由于大量 T 细胞的存在,使其还存在许多问题。然而,GVHD 的危险率不会上升,清除 T 细胞仍

然是可能的。人们依然关心的问题是:任何长期的危害是否与对供者施以生长因子有关,但还不是一个严重的问题,特别是当我们考虑到已知的感觉缺失的危害性的时候。

基因治疗

由于骨髓干细胞的易接近性,已将其列为基因治疗的首选目标之一。重症免疫缺陷的一个型别中缺乏腺苷脱氨酶基因(adenosine deaminase,ADA)(见第43章),则是置换的候选基因。但由于基因转化方法的相对无效性,以及可用于本方法治疗的病例数太少,该领域仍受到很大的限制。

结论

就单克隆抗体和细胞因子的新型治疗策略而言,干细胞移植具有广阔的前景,在移植过程中,许多首要克服的目标是防止发生医源性感染并发症,而不是针对疾病本身,这也许不甚合理,因为并发症可以预计,而且对单个的原因已有相当的了解。在及时解决一个问题之前,必须解决GVHD、排斥反应、复发感染以及感染之间复杂的相互关系,并对整个结果予以改善[60]。相应地,这将意味着能为更多的病人提供治疗性的移植,包括那些很难配对的病人和患有慢性疾病但尚未立刻威胁生命的疾病。再者,通过对这些生物治疗的了解,可以将之直接用于白血病、癌症和一些免疫性疾病。

抗体治疗

正如前一节所讨论的那样,由于单克隆抗体具有良好的特异性,可用于大量的针对癌症和免疫应答调节的研究。无论其配体在恒定区还是可变区,抗体能与其产生高度特异的相互作用,因此,可以设计恰当的治疗方案,以治疗不同的疾病。在重组DNA技术领域,正用于设计治疗性抗体,其中包括:①降低免疫原性以便长时间应用抗体治疗(比如对自身免疫性疾病的治疗);②增加外部的效应功能以治疗、排除或者修饰内部的效应功能;③用噬菌体抗体库技术来提供抗体的亲和力,或者产生新的特异性;④高水平地生产稳定的重组抗体。

具有潜力的“简朴”治疗法

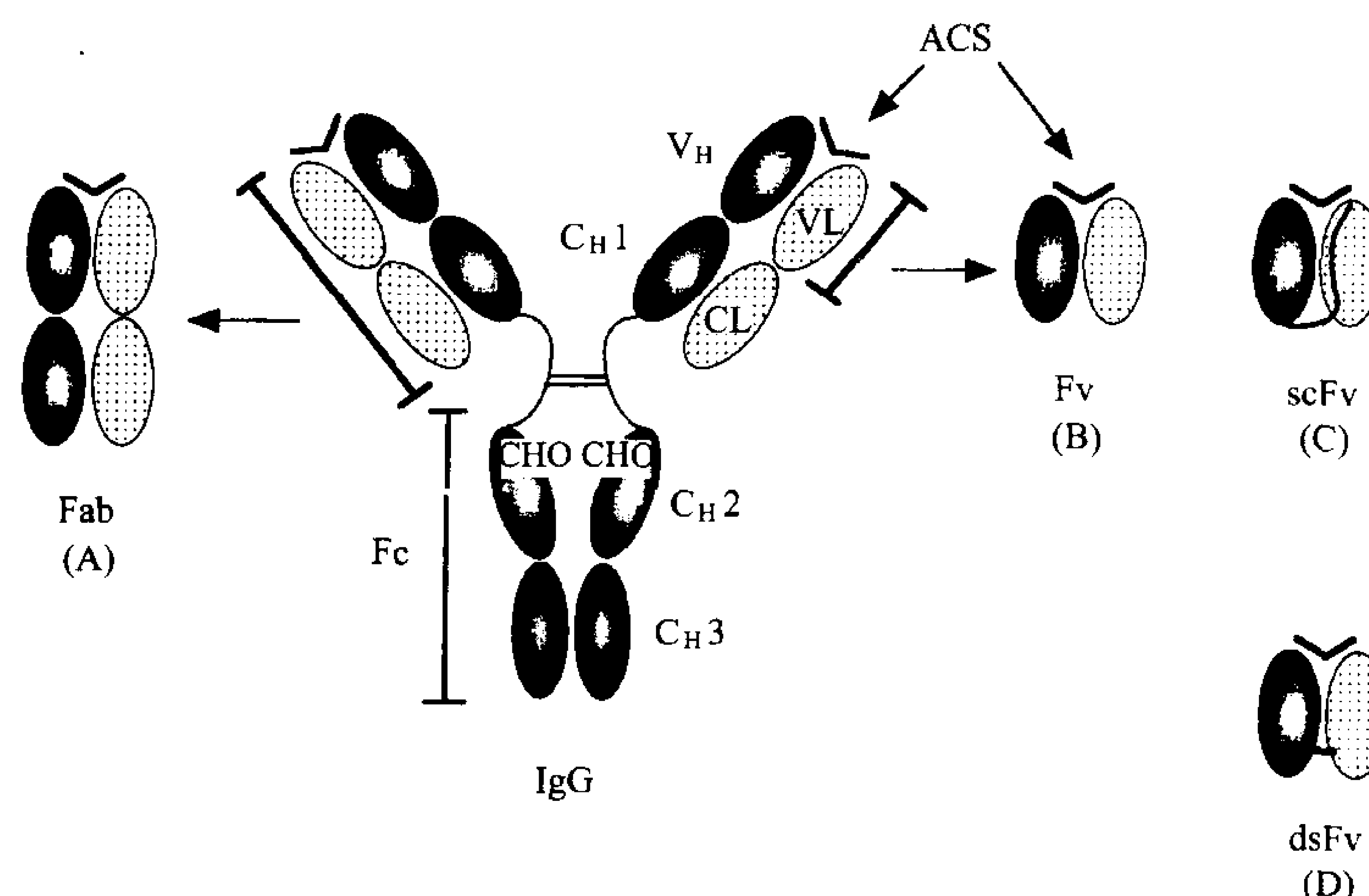
1520

抗体是由明显不同的结构域组成,它们具有不同的功能,抗体工程可以“设计”治疗方法,最适宜应用的就是简朴治疗法。当从整个抗体分子中分离单个的免疫球蛋白功能结构域后,它们仍保留其天然结构,而且能够恢复与每个结构域相关的功能。再者,每个抗体结构域由不同的外显子基因编码,通过遗传学的方法将想得到的外显子融合在一起,就可产生重组抗体。抗体结构域的排列(如 V_H 和 V_L 区结合抗原,Fc区介导效应功能等)使人们自然考虑到可以将其基因予以“混合与匹配”,从而设计出基于抗体的治疗方案(图45.6)。因此,功能结构域能特异性结合抗原,效应结构域可以在抗体之间互相转换,它们的生物活性单元是分开表达的,以此来构建天然的融合蛋白。应用大量不同的方法,通过PCR获得编码目的抗体的外显子,由疏水表面电荷作用,表达 V_L 和 V_H 结构域。

可变区:结合抗原的区域

在抗体的每个支臂上都有重链可变区和轻链可变区,各自又有三个超变区环状结构,它们控制了抗体的特异性和亲和力,这些环状结构的长度变化和氨基酸序列变化构成了抗体结合位点(antibody-combining site,ACS),能结合较小半抗原的抗体有一个典型的结构特征,其结合位点形如凹槽或口袋,能结合蛋白质的抗体也有一个典型的结构特征,有一个大而平坦的表面以形成抗体结合位点ACS。与此相反,在环状结构中发现了可变的区域,支撑环状结构的骨架则与不变的β片层结构有关。

图 45.6 抗体 IgG 分子及常用于结合抗原的衍生物。每个 Ig 分子的重链和轻链从结构上都分为可变区(V_L 和 V_H)和恒定区(C_L、C_H1、C_H2、C_H3),在 CH2 结构域内 Asn297 上有一个 *N*-糖基化位点。(A)Fab 区域由 V_L/C_L 和 V_H/C_H1 组成;(B)Fv 区域仅有 C_L 和 V_L,Fv 能以单链形式 scFv 与连接蛋白重组表达;(C)通过二硫键以双链形式 dsFv 表达;(D)ACS,抗体结合位点。



恒定区:抗体效应功能和分解代谢

恒定区包括 Fc 区,它能介导抗体的效应功能,抗体的效应功能分以下几种:①在抗原——抗体结合以后能够控制并能负责募集其他细胞或分子将抗原移去;②不依赖抗原的结合,包括对抗体的分解代谢和胞吞转运作用[64]。可变区赋予抗体对抗原的亲和性和特异性,抗原依赖性 Fc 片段的效应功能主要通过募集 Fc 受体阳性细胞和随抗原结合后的补体成分来提高宿主的防御功能,发挥抗体的保护作用,通过调理作用、ADCC、补体介导的细胞毒作用(complement-mediated cytotoxicity,CMC)等移去和(或)清除抗原。抗原非依赖性的补救受体 FcRn 涉及调节血清中抗体的半衰期[65~68]。此外,利用 Fc 结构域在整个抗体中的功能,也可以通过遗传学方法将其与配体相连接,以产生融合抗体蛋白。例如,将人 CD4 分子与人 IgG1 的 C_H2/C_H3 区域的铰链区融合在一起,所表达的 CD4-免疫球蛋白二聚体在兔血清中的半衰期为 48 小时,明显高于单个 CD4 分子的半衰期 25 分钟[69]。

治疗方法的应用

使用抗体进行的被动免疫治疗可以保护对感染源敏感的病人,已成功应用了许多年。来自未经免疫和已接受免疫志愿者的 γ 球蛋白可以转移患有先天性和继发性免疫缺陷病人的免疫能力。单克隆抗体正开始取代 γ 球蛋白的使用,而且单抗还有可重复生产、污染最小等优点,发展潜力大。将来,单克隆抗体将取代多克隆血清 来预防新生儿的 Rh 血型疾病。

在癌症和免疫抑制性疾病领域,抗体的潜在治疗作用加速了对蛋白质工程技术的应用,使这些抗体更能适合它们的需要。

溶解性抗体和封闭性抗体

治疗性抗体以两种方式中的一种发挥作用,消耗性抗体能在体内通过针对性地毁灭淋巴细胞来杀死这些细胞,这类抗体需要具备对靶抗原的高特异性和高亲和性,能有效募集 FcR 阳性细胞和补体的功能,而且在血清中的半衰期要长。非溶解性抗体主要以阻断靶抗原的功能而发挥作用,而不是杀灭所带抗原的靶细胞,通过基因工程可以获得这些抗体,在血清中停留时间较长,但丧失了抗原依赖的效应功能。由于分解代谢的位点在 C_H2 和 C_H3 结构域的交界处,其氨基酸残基与补体结合[70],或与位于 Fc 区域内的 FcγR 结合[71~74]。另外,效应功能差的同型抗体在没有缺失的情况下也能参与结合,例如,在 CMC 的开始阶段,人 IgG4 很少[75,76],而且证明与 FcγRI 的结合能力很弱,许多人的 IgG4 根本不能介导 ADCC 作用[77,78]。但是,有

些个体的 IgG4 与 IgG1 一样,可有效地介导 ADCC 作用[79]。因此,产生非消耗性抗体的一个可靠办法还是突变那些能介导 CMC 作用和能结合 FcR 的氨基酸残基。例如,移去 C_H2 的糖基化位点将对恒定区相关效应功能产生重要的影响[80~82]。

同种型抗体的作用

抗体的同种型对抗体的天然效应机制有重要影响,通过对杂交瘤细胞的型别转换,或者通过同一 V 区嵌合抗体的构建,在大鼠、小鼠和人的体内外均已经得到明确证实。第一个在体内说明抗体同种型对溶破肿瘤细胞具有重要作用归纳为图 45.7 所示。用抗 CD52 抗原的大鼠 IgM 和 IgG2a 都不能治疗患幼淋巴细胞白血病的病人。相反,将大鼠 IgG2a 转换为 IgG2b 类型,就能刺激产生有效的淋巴细胞增殖,并产生完全的治愈效果[83]。用特异性完全相同的一组抗体比较,人 IgG1 抗体的同种型对 CMC 和 ADCC 效应有重要的影响,但会随重链同种型的改变而改变[77]。对 CMC 作用,人 IgG1 结合的 C1q 要比人 IgG3 的少,但 IgG1 更能有效地沉积细胞表面的 C4b,这反映出有效溶破靶细胞的能力[75]。表 45.1 显示人 IgG 各亚型与 C1q 和不同 FcR 的相互作用。

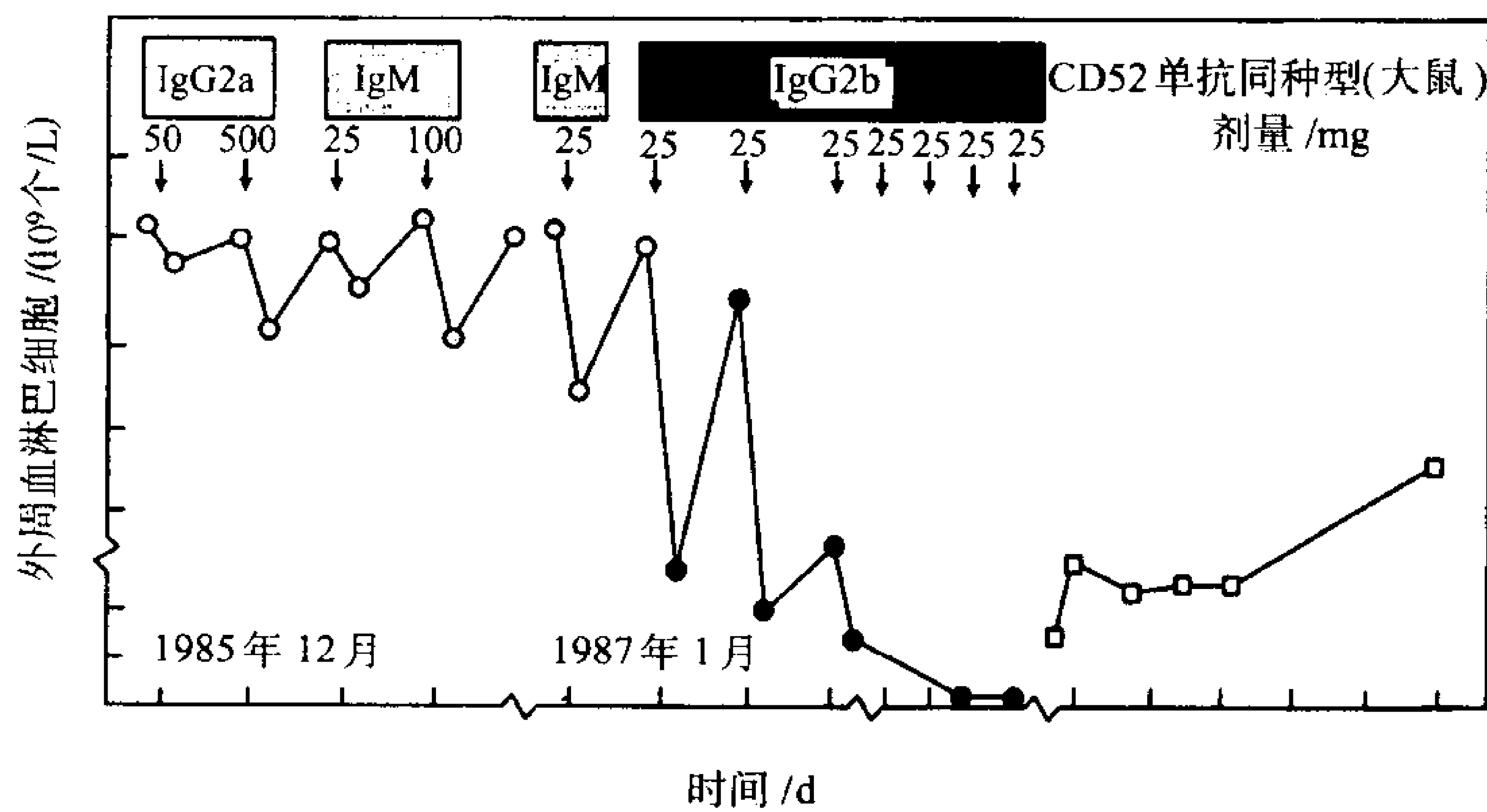


图 45.7 大鼠抗体同种型对清除慢性 B 细胞白血病患者外周淋巴细胞的影响。

表 45.1 人 IgG 同种型与人 C1q 和 Fcγ 受体的相互作用

同种型	C1q	FcγR Ⅰ	FcγR Ⅱ	FcγR Ⅲ
IgG1	+	+	+	+
IgG2	弱	–	–	–
IgG3	+	+	+	+
IgG4	–	弱	–	–

小鼠 IgG2a、大鼠 IgG2b 和人 IgG1、IgG3 被认为是最好的同种型,但是不能保证它们在体内有溶破能力,而且极大地依赖于靶抗原。补体与 FcR 依赖的作用机制也许不同,它主要依赖靶抗原而定,对各种突变分析和各同种型变异体的 Fc 区域进行分析,Fc 受体介导的溶细胞作用可能更具有普遍性[84]。

靶抗原的天然特性

细胞表面靶抗原的效应功能不是完全相同的,抗原密度和转换能力更重要。有些抗原是溶破作用的理想目标,如淋巴细胞上的 CD52、CD20 等抗原。

特异性

肿瘤治疗的特异性问题,理想的靶抗原是表达在肿瘤细胞表面,而不是表达在正常细胞表面。事实上,

现在几乎还没有发现肿瘤特异性抗原，也许在B淋巴瘤上存在最接近的独特型[85,86]。肿瘤相关抗原的表达使肿瘤细胞比正常组织更容易受到损伤，而且正常组织丧失了这类抗原对其本身也是个问题。例如，为了根除B淋巴瘤，可能会清除正常的B细胞，特别是从干细胞发育而来的新的B细胞。这自然会令人们想到：由于丧失了许多可能对靶细胞的生长不利。许多肿瘤细胞很难遇到这种情况，这也许与B细胞淋巴瘤上的目标独特型决定簇有关。后者也许是肿瘤靶抗原更有益的一种形式，而且以此可以进行肿瘤的免疫治疗[85,86]。

肿瘤相关抗原通常以下列的一种方式出现：

1522 ①癌胚抗原(oncofoetal antigen)：以不同的方式存在于发育的胎儿中；

②分化抗原：反映细胞发育的特定阶段的抗原；

③过表达的表面分子：如生长因子受体等；

④隐含的抗原：修改了糖基化作用后才暴露的抗原。

抗原的内在化与脱化

一些细胞表面抗原在与二价抗体结合后会迅速发生内在化，如CD3抗原分子，而有些抗原与在细胞表面的固定性有关，如CD52抗原分子[87]。对临床应用而言，要求裸露抗体的溶解功能，非调节性抗体为首选。有些人曾用化学工程单价抗体来增强对抗原的溶解作用，用来源于体细胞融合的单价抗体[88]和基因工程生产的抗体比野生型的调节性抗体更容易激活补体系统[89]。相反，给予最适剂量的毒素和化疗药物则得益于抗体的内在化作用。细胞表面的隐蔽抗原，如癌胚抗原或独特型，可能对癌细胞有影响，因为游离抗原能够完全结合癌细胞上的治疗试剂。

将不利抗原向优势抗原转化：协同溶破作用

有些很丰富的抗原与抗体的结合较差，有些同种型抗体能够彼此协同地溶解抗原，直接针对同一靶分子的不同表位，能够活化抗体难以活化的同源补体系统[90,91]。在体内，抗体的协同作用通过F_C受体介导的效应机制，比单独的抗体更快地消失。但是还没有利用抗体的协同作用进行临床应用的研究报告。

信号休眠与细胞死亡

某些双价抗体特异的细胞表面分子能够传递信号给那些能导致肿瘤休眠的细胞[92,93]。其他的则可以提供能导致细胞凋亡的死亡信号[2,4]。因此，有必要定义休眠信号的分子机制，并全面了解能使细胞抵抗“死亡信号”的“生存信号”。通过药物干预可以打破肿瘤细胞的生存信号，使之自行灭亡。

治疗用基因工程抗体

可变区的修饰

X射线晶体学揭示了抗原-抗体相互作用的一个重要侧面[94,95]。抗体的6个互补决定区(complementarity-determining region，CDR)直接与抗原结合[96]，但它们的作用不完全相等，一般情况下，有4个或更多的CDR能与抗原结合，V_H比V_L更容易埋藏在能结合抗原的表面区域内[97]，V_H的CDR3内的H3环是抗原结合所必需的，而且是结合抗原的主要改变位点[98]。H3存在序列差异性，这决定了抗体库的多样性，H3的氨基酸残基在2~26个之间[99]。每个CDR区都是一个与两个骨架相连的环，呈方向固定的β条带状，这些环状区域位于Fv的末端，由于CDR间靠得很紧，某个CDR突变所致的结构改变将会影响到相邻CDR区域，或者直接影响到骨架区自身的结构[100]。加之V_L/V_H界面的CDR/CDR之间的相互作用，可能会防止结构域的排列组合[101]，从而破坏抗体的表达，限制该抗体的大量生产。由于CDR环的定位对抗体的特异性和亲和力有极大地影响，设计能很好结合抗原又能大量生产的抗体模型就显得十分重要。尽管目前已经克隆到了大量V区的基因片段，但对其结构功能却知之甚少，它们中大多数是以非复合物的形式存在。已有抗体结构的分子模型，基于同源结构方法和空间构象研究的进步，预测抗体精确结构愈来愈多了[100,102]。

优化抗体用于治疗目的有两条路线：

①对成功应用于临床的啮齿动物抗体予以改造，通常借助计算机辅助的三维结构模型，来预测可引起ACS

的点突变位点对其的影响程度,或者估计在人源化过程中对 CDR 环位点的干扰程度。

②所产生的对靶抗原具有高特异性和高亲和力的新型人源抗体,在人体内可能没有了免疫原性。

值得注意的是:通过氨基酸残基替换的方法不能产生新的 ACS 的形态和化学结构,它们通过天然进化也是不能形成的,通过组合抗体库技术可以设计整个 CDR 区。

对鼠源抗体的改造

1523 目前能用于治疗的抗体都是通过常规的杂交瘤技术获得的鼠源性抗体,需要对这些鼠源性抗体进行基因操作,得到其可变区基因,应用 PCR 技术,可以十分方便地分离、扩增 V 区基因[103~105]。最具特别兴趣的还是从能够直接针对靶抗原而产生抗体的专一淋巴细胞中克隆到抗体 cDNA。

通过噬菌体展示技术产生新的特异性抗体并增加抗体的亲和力

杂交瘤技术产生的抗体,其特异性不很理想,或者抗体的亲和力太低,甚至在体内不能使用。噬菌体展示技术就可克服以上缺陷,是很有用的工具[107,108],从噬菌体库中能够筛选到最好的抗体,具有良好的结合活性和表位识别能力,也具有 V_L/V_H 的匹配功能。从庞大的抗体库中不仅能发现表达于单个 B 细胞上的重链、轻链的匹配,而且还能够分离得到高亲和力的抗体。例如,用常规杂交瘤技术难以产生针对雌二醇的特异性抗体,单从抗体库中就能够分离得到抗雌二醇的抗体,而且能结合纳摩尔级的抗原,只是一些类固醇相关抗原的结合能力较弱。用常规杂交瘤技术产生的抗体还会受到免疫系统的限制,正常情况下机体的一些毒素或免疫抑制剂,都可以从抗体库中得到其特异的抗体,如能得到抗阿霉素的高亲和力抗体。

利用噬菌体抗体库技术还可以在体外模拟许多体内免疫系统产生抗体的过程,因此,不经过事先的免疫或杂交瘤技术就可获得高亲和力的抗体。例如,从噬菌体抗体库获得的高亲和力抗体最适合于临床应用,在纳摩尔到皮摩尔的范围内都有效果[110~113]。通过对 CDR 区施以随机定向突变[115~117]、或错配 PCR 法(error-prone PCR)[118,119]移去重链或轻链[114]、或者通过突变基因[120]的方法反复抗体库循环来移去重链或轻链,这些技术很耗时,如果抗体库太大,也没有必要。Vaughan 等[109]建立了一个构建抗体库的新方法,库容可达 1.4×10^{10},可将人 sFv 片段展示在噬菌体表面。最高的解离常数(K_d 值)在亚纳摩尔的范围内,高于以前的报道,亲和力也高于杂交瘤技术产生的抗体。

恒定区的基因工程

功能位点的鉴定

有关功能结构域突变体的研究[121]认为 C_H2 结构域在决定 Fc 区域的功能起关键作用。在 C_H2 内的基因突变表明该结构域对抗体与 C1q 和 FcR 结合位点有重要贡献。为了适应不同的用途,在需要避免一个或其他的天然效应,以防细胞受损,使毒性减到最小(如减少 CD3 抗体引起细胞因子释放引起的并发症)。

一个抗体分子内多个功能结构域的诱导

一个抗体分子具有多个功能结构域,C_H3 中的半胱氨酸通过氧化还原在体外可以形成二聚体,[122,123]这样的二聚体在调节补体的杀伤作用更有效。但是现在尚未见到有关体内实验的报道。重链中其他串联的 C_H2 功能结构域没有这样的作用,但能起促进作用[123]。

单一突变产生一个无糖基的抗体以防止 C1q 与 FcR 的结合

在重链恒定区的保守部分,点突变产生的糖基化抗体能阻止与 C1q 和 FcR 的结合,不同组合的天冬酰胺糖基修饰能影响抗体的组装、分泌或功能[124]。人的 IgG 重链中埋藏在 2 个 C_H2 域之间的 Asn297,上面可以连接双天线糖链,从而与该区域的多个残基形成广泛的联系。[125]通过定点突变将 Asn297 糖基移动 Gln126

或 Ala82 不影响 Fc 区域和金葡菌素 A 的相互作用。但是,与 C1q 结合力明显减弱甚至检测不到,与 FcR 的结合力也明显降低。在体内,Gln297 IgG1 的半衰期不受糖圾化的缺乏影响[126];而 Ala297 IgG2a 的清除与野生型难以区分[127]。这些研究表明清除 Asn297 的糖基会使 IgG 丧失与 FcR 结合的能力,明显减弱其结合补体的能力,但是并不显著改变抗体结构和稳定性。现在抗 CD3 糖基化抗体已经进入治疗肾移植排斥反应[82]的临床前期实验,效果相当不错。与野生型抗体比较,由于细胞因子释放产生的毒性明显减弱。(细胞因子的释放与 FcR 的结合有关。)

基因工程抗体的半衰期

血液中抗体的持续时间包括两个相互重叠的阶段。开始,血浆中的抗体快速降解,在注射后在第一天达到平衡。随着抗体的自然分解,它从血浆中消失。IgG 在血液里面持续的时间同一种与它大小相似的蛋白质有关,这是一种特别的打捞受体,它能在内质网中捕获 IgG 并且再循环它回血浆[128]。新生的 FcR (FcRn)被认为是这种打捞受体的标志[68]。FcRn 与 IgG 分子的紧密结合可以使 IgG 免于在包涵体的酸性环境中分解,再循环回到中性的细胞外液中。作为一种治疗方法,自然意味着以下几个方面:①整个抗体在血浆中的作用持续性,这可以通过点突变确保抗体能与 FcRn 很好地结合;② 较小的抗体片段的半衰期 (如 sFv)可以带上 FcRn 交互作用位点而得到延长[129~131]。对于鼠 IgG1,在 CH2/CH3 两个功能域的界面中包裹的氨基酸 Ile253、His310、His435 以及 His436 等位点具有这样的作用。

1524

在本文即将完成时,Ghetie[67]等设计的重组鼠抗体半衰期明显延长,他们的成功在于增强了抗体与 FcRn 的亲和力。

人用初始抗体及抗体衍生物

编码 V_L 和 V_H 基因表达时由一段柔性肽在中间连接形成一个 ScFv 分子[132,133]。ScFv 只有一价结合力,分子质量约为 27kDa,表达时可以有 V_H - 连接 - V_L 或 V_L - 连接 - V_H 两个方向,是最小的能保持抗体结合功能的分子,scFv 抗体用途极为广泛。sFv 基因盒也能单独应用,可以表达一价抗原结合分子,或和其他基因重组成人工黏附受体[134]、免疫毒素[135,136]、双特异性抗体[137~144]、细胞间分子靶标[145~148],或与细胞因子融合[149]。

双特异性抗体

双特异性抗体(BsAb)[150]能定向或增强免疫效应,以非 MHC 方式诱导杀伤靶细胞[151,152]。BsAb 的一只手臂可以识别细胞毒性细胞的表面抗原 (如 CD3、CD16 或者 CD64),另一只手臂则识别特定的肿瘤抗原。最早的 BsAb 通过化学交联或杂交瘤细胞融合,抗体具有抗肿瘤特性。BsAb 募集的效应细胞有 CTL、LAK 、TIL、NK 以及单核巨噬细胞。BsAb 结合到上述细胞激发细胞因子的释放进一步增强了细胞毒效应。[153,154]临床前体内实验表明对 B 细胞独特型的 BsAb 有时能延长肿瘤耐受小鼠的生存时间。在若干小规模临床的试用结果中,已经观测到谨慎但是令人鼓舞的效果[155]。有些 BsAb 能同时结合单核细胞和巨噬细胞的 CD64 (FcγRI)和在胸、卵巢以及前列腺癌上高表达的 Her2/neu 原癌基因产物。结合 CD64 和 Her2BsAb 双特异性抗体的单核细胞和巨噬细胞,能穿过肿瘤并且劝诱短暂的炎症,例如 TNF-a、IL-6、IL-8、GM-CSF。应用 DNA 重组构建的 BsAb 片段便于进行更严格的临床鉴定[156],重组 BsAb 产生的形式有双特异性 scFv、微型抗体和多价 BsAb 等等[157~160](图 45.8,图 45.9)。

单链 BsAb 由人的 Fc 域和可变区[104,138,140]组成。微型抗体则由 scFv 通过接头连接成二聚体。而双抗体则利用 Fv 内 V_H 和 V_L 域的内在的天然配对。V_H/V_L 的聚合是自发的,亲和常数为 10 ~ 10mol/L[100]。这样高的结合系数原因在于功能域界面保守残基的密切互补。在 scFv 中用短的接头或不用,可以迫使[158] V_H 和 V_L 分子内配对。现在已有不用接头的双抗体噬菌体库[159]可以产生并且分析几千种不同的双特异性分子。除

了双抗体的内在配对,多聚化域也被用来制备多重特性抗体。这些域或标记包括两亲性螺旋[160]、C_H3[161,162]、Fc 二聚体、TNF 三聚体或 HTH 基序[163]。总的来说,上述制剂的临床应用仍需进一步的认识。

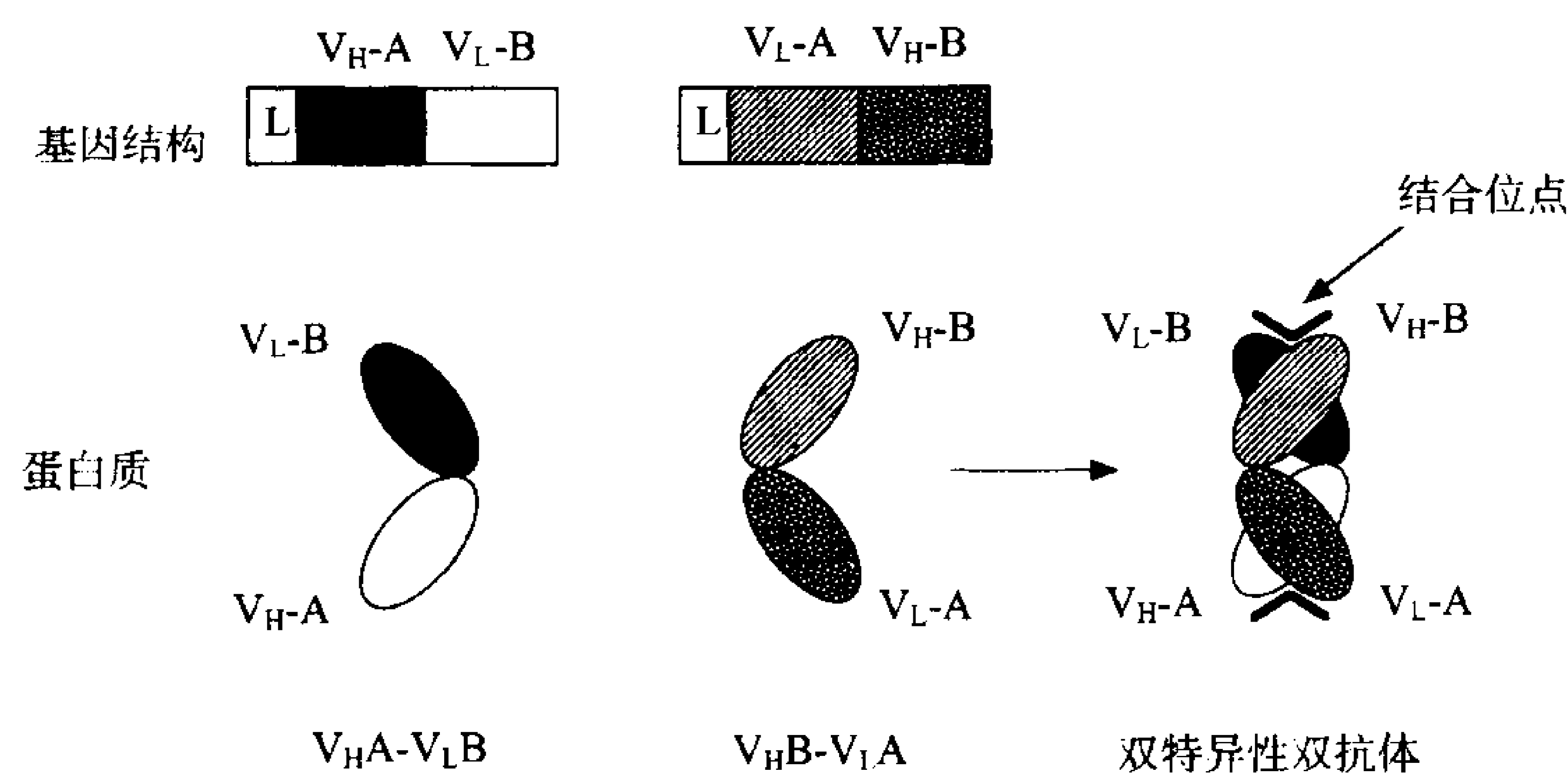


图 45.8 双特异性双抗体。

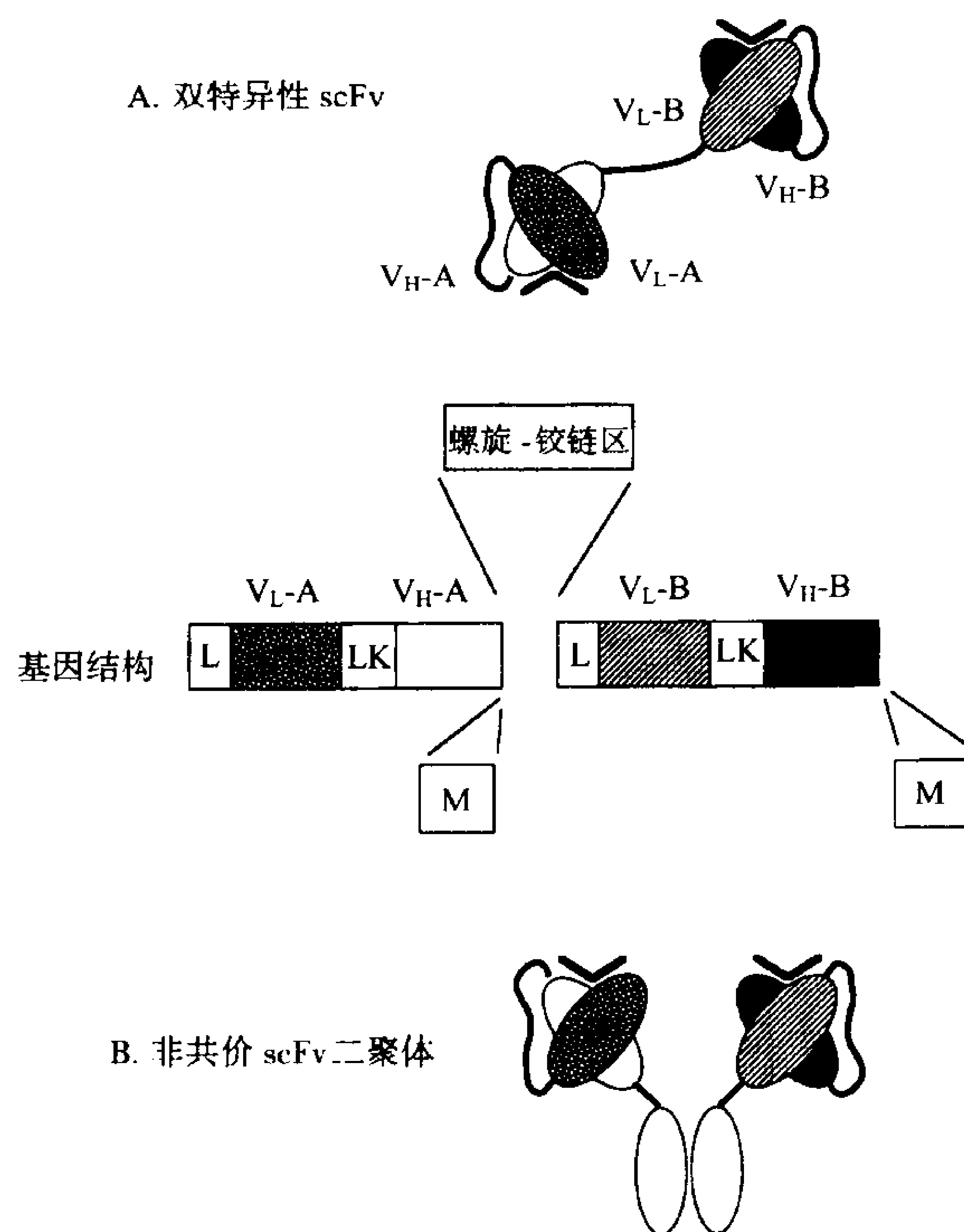


图 45.9 A:单链双特异性 scFv。由 2 个 scFv 基因组成,并由编码螺旋-铰链区的序列分开[220],该结构基因的表达将产生 1 个单链蛋白,并连接 2 条 scFv 链,抗体。B:非共价连接 scFv 二聚体。

工业化生产过程中的抗体表达

如果抗体不能大规模生产纯化并且去除污染,抗体工程的效益难以体现。因此需要高水平的表达。抗体链连接的顺序在抗体折叠、传送以及聚合上起主要作用。因此,好的工程应当始终努力提高产出。最初试图在大肠杆菌中表达抗体,但是功能性抗体的收获率太低[164,165]。这些蛋白质保持在包含体内,推测其原因可能是由于大肠杆菌中的高还原性环境,导致二硫键难以形成。要从包含体中获得功能抗体,在体外变性和再折叠[166,167]是不可避免的。另一可以选择的方式是使用信号序列 (ompA 和 pho) 引导表达的功能域进入胞外,这里的氧化环境可以促进二硫键的形成[166,168]。scFv 采用 Fv 域的表达来克服非共价结合的 V_H 和 V_L

1525

解离趋势[132,133]。

免疫原性问题

因为最先治疗用的单克隆抗体是鼠源性的,早期抗体治疗的一个主要缺点是患者的免疫系统认为抗体是外源异物,导致治疗用的抗体产生免疫应答。抗体球蛋白包括针对可变区的抗独特型抗体和针对稳定区的抗种属特异性抗体。抗体球蛋白引起的反应是抗体临床应用的主要障碍。一方面可以起中和作用,另一方面又必须从机体中将复合物清除出去,两相权衡,所起的治疗作用效果不大[169]。另外,如果连续治疗[170],一些病人可能经历致命的过敏反应。然而,如果先用血浆过滤法降低抗体水平,治疗仍然可以在有抗球蛋白抗体的一些病人中进行。这种现状距离理想的治疗方案还很远。如果我们设计出能避免被人的免疫系统"认出"的抗体,免疫原性的问题就能得到解决。已经有许多工作向这目标努力。相对而言,预防最初的抗免疫球蛋白抗体反应要比停止已经发动的抗免疫球蛋白抗体反应更容易。将治疗用抗体和免疫抑制药物同时注射[171],能降低抗免疫球蛋白抗体反应。然而,这些非特异性的免疫抑制在某种程度上打消了抗体治疗的天然选择性,除非抗体成为针对某种特别的疾病进程而合成的药品的一部分。

工程化抗体降低免疫原性

嵌合抗体与人源化抗体

在啮齿类动物抗体人源化这个问题上有多种尝试如嵌合抗体、人源化嵌合抗体和 CDR 移植。用已知的人的抗体的序列替换啮齿类动物抗体稳定区和可变区的框架,作为外源序列的数量在啮齿类动物抗体得以减少。第一个用于治疗的人源化抗体是鼠抗人 CD52 抗体,商品名为 CAMPATH-1H[172]。在这个例子中,老鼠 CDR 被移植到人 V_H 的 NEWM 和人 V_L 的 REI 框架中,因为这些 V 区的结构已经被解析出来了。尽管第一代的人源化抗体比原始的鼠抗体亲和力要低,当 V_H的两个框架残基突变回啮齿类动物的序列时[172],亲和力能得到恢复。合适的人源框架作为"受体"序列可以增加人源化抗体的抗原结合力,尽可能的接近啮齿类动物抗体[173,174]。啮齿类动物 V 区家族亚群可依据氨基酸的同源性进行划分,然后与一致序列进行比较,进而鉴定体内亲和力成熟过程中引入的特殊残基序列。这些残基可能为 CDR 的正确定位所要求,被引入人源化框架。人源化框架也同亚群中的一致性序列比较,鉴定并去除不常用的氨基酸。人和啮齿类动物抗体的序列比对可以消除由于种属差异而带来的电荷、大小或疏水性差异。其他的人源化途径有超级嵌合和表面重塑。超级嵌合用同源搜索方法找到与啮齿类动物抗体序列最相近的人的序列,作为受体序列使用。扫描受体序列,寻找并用一致性残基替换特异性残基以获得更通用的框架。用结构模建来找出需要替换以保留 CDR 环区构向的稳定性[175]。表面重塑涉及改变仅暴露在抗体表面的外源性氨基酸残基,而用最高同源性序列的等价残基替代。人和小鼠抗体可变区表面氨基酸的差异数量有限,这个策略可以保留在 V_L 和 V_H 区中包裹的氨基酸残基[176,177]。 1526

人源抗体

用传统的杂交瘤技术制备人源抗体极其困难[178]。很难获得稳定的人的杂交瘤能高水平的表达抗体。噬菌体展示技术和转基因方法能有效的解决这个问题。

噬菌体展示

在噬菌体显示技术中,抗体片段表达在丝状噬菌体表面(包括 V、D、J),可以在体外依据特异的抗原筛选所需的克隆。该系统模仿了人类免疫系统的关键特征。这样高亲和力抗体不用免疫或者常规的杂交瘤技术也可以得到。使用天然的[179]或合成的[111]的噬菌体库,有可能得到亲和力良好的针对多种不同抗原的人的抗体。当然最理想的情况是抗体库的容量足够大,能获得任何感兴趣的抗原的高亲和力抗体。应用噬菌体

展示库，从许多无症状的患者中也分离到抗 TT、乙肝、gp120 以及 RSV 的抗体。

转基因小鼠

转基因小鼠也被用来生产人源[180~182]。人的胚系基因 V 能在小鼠中重排并表达。将这样的转基因小鼠与重链敲除的小鼠杂交，子代中内源性的免疫球蛋白位点用基因打靶封闭，小鼠就可以产生人源抗体。人免疫球蛋白转基因接替了鼠 B 细胞的发育（由于膜表面免疫球蛋白的缺乏），因此，这些 B 细胞都表达人的免疫球蛋白链。

异种嵌合小鼠制备人源抗体

外源嵌合小鼠制备人源抗体还有一个独创的方法制备人源抗体，将人的淋巴细胞转移到幅射过的小鼠，然后用特定的抗原刺激，初级淋巴组织就可以与杂交瘤细胞融合[183]。

人源化抗体没有免疫原性吗？

从一些病例已经表明人源抗体是有免疫原性的[184,185]。治疗用的抗体具有免疫原性，即使是人源抗体，部分原因在于它们的细胞结合力[17]。没有细胞结合力的抗体免疫原性要弱得多。确定能否发生抗独特型抗体反应，对以后的工程抗体将非常关键。下面是一个新颖的方法，它用两个阶段诱导对治疗性抗体的免疫耐受。

预防治疗性抗体耐受的产生

这个新颖的方法是基于：①过去的研究表明解聚的免疫球蛋白如果在聚合形式的免疫球蛋白之前注射，可以在体内诱导产生对聚合免疫球蛋白的耐受；②抗免疫球蛋白反应是一个典型的 $CD4^+$ T 细胞依赖的 B 细胞反应[186]；③诱导非细胞结合抗体的耐受相对要容易些。已有研究表明小鼠更容易耐受不结合细胞的外源性 IgG。而结合细胞的抗体不能产生耐受。[17] 因而，在注射野生型的细胞结合抗体之前，通过非免疫原性的方式呈递可能的轻链和重链辅助表位，有可能诱导 T 细胞对治疗性抗体的耐受。[186] PCR 突变法可以用来改变 1 或 2 个 CAMPATH-1H 的残基产生一个非细胞结合的类型。如此小的变化可能破坏与抗原结合，但是仍然能保存野生性抗体中大部分的 T 细胞表位和依赖与重链正确匹配的 B 细胞表位。CAMPATH-1H 非细胞结合突变体的解聚形式，注射到表达 CDw52 的转基因小鼠，这些小鼠能耐受野生型抗体的任何反应。这个发现对需要长期注射治疗用蛋白的患者有重要意义。

用于癌症治疗的基因工程抗体

概述

基于抗体抗癌治疗进展一直比抗体在免疫抑制方面的应用进展更缓慢。原因之一是抗肿瘤免疫活性要求比仅仅封闭受体功能多得多，首要的目标就是靶细胞的死亡。抗体可以通过很多方式诱导细胞毒性，例如，通过 Fc 片段诱导机体的效应细胞活化，或传送毒性基团（放射性核素或毒素）到肿瘤局部。尽管这些杀伤机制在体外实验是很强大的，但是在体内实验经常由于肿瘤的可及性而受限制。总的来说，基于抗体的抗癌治疗在白血病和淋巴瘤是成功的，但是对于有血管生成的实体瘤效果就差的远。

实验策略的多样性

1527

Wawrzynczak 对实验策略的多样性进行了评述[187]。工程抗体能通过多种方法杀死肿瘤细胞：① 它们能被修饰以便更好的募集天然效应机制，或者引起凋亡，或者封闭一些必需生长因子；②修饰后的抗体能运载设计好的放射性核素、毒物或细胞毒性药物到肿瘤细胞；另外，双特异性抗体能募集效应细胞到肿瘤局部；③将来，也许可以用基因治疗的途径表达细胞内抗体结合关键靶点以抑制肿瘤生长。这些细胞内抗体能在哺乳细胞里精确定位，受经典的细胞内信号调节[145,188,189]。已经知道一些肿瘤生长依赖生长因子或激素了，所

对应的中和抗体能可以转移到肿瘤所在的部位。ErbB2 在许多人的肿瘤中高表达，包括乳癌和卵巢癌，且其表达与不良预后相关[190]。以内质网为靶标的 scFv 细胞内抗体可以抑制跨膜蛋白 ErbB2 的表达[146,190]，并且最终触发靶细胞的凋亡[146,147]。ScFv 也可以融入靶细胞，在细胞质中或细胞膜上发挥人工配体功能。多种细胞表面能表达 CD28 特异的 scFv，能诱导共刺激 $CD28^+$ T 细胞[104,134]。所有这些方法设计得都很好，但是最终在临床中得到认同的也许只是少数。

抗体大小和功能之间的权衡

虽然有些治疗用抗体在白血病和淋巴瘤的治疗上取得了良好的效果，但是在实体瘤治疗的应用还有较多的局限。主要原因是抗体的肿瘤特异性和穿透性不好，结果仅仅一小部分的抗体到达肿瘤[191]。使抗体分子变小能提高穿透性，但是不可能与小分子化学药物的扩散相比。sFv 比整个 IgG 能更快更深入的进入肿瘤组织[192]。然而，失去 Fc 片段及其相应的功能，也就意味着必须加上所需的效应细胞结合功能区域，这样缩小整个分子的优势有时在某种程度上就丧失了。在基于抗体的抗癌治疗中，一个重要的挑战就是构建具有良好肿瘤穿透性的小分子，同时还能很好的与抗原结合。如果分子大小这个问题解决好，IgG 二价结合带来的稳定性可以提高功能亲和力超过 Fab 的 1000 倍。有一个途径是应用两亲性螺旋标签制备多价 sFv[160]，这种标签可以通过共价键强制形成 sFv 二聚体的。但是这些蛋白质仍然缺乏 Fc 相关的功能。另一途径是将 sFv 与整个抗体或 F(ab)2 样分子融合[162]，生成四价的新型双特异性分子。

靶向性抗体的细胞毒性药物

许多细胞毒性药物疗效差（因为副作用大），剂量大能杀伤肿瘤细胞同时也杀伤正常组织。把它们（如放射性同位素、化疗药物、酶、毒素或二抗）加在抗体上，原则上可以到达局部病灶，因此增强治疗作用。

放射性同位素　最有效的放射性同位素是半衰期长且照射剂量高的那些；包括发射 α 射线和 β 射线的物质，如砹(211)、钇(90)和碘(125)等。

化疗药物　有效的化疗药物抗体共价复合物要求药物能进入靶细胞内。因此，共价复合物需要内吞然后在融酶体裂解释放。这样浓度限制成为靶向化疗药物的主要障碍。

免疫毒素　抗体与蛋白毒素共价相连，如蓖麻素、凝集素、白喉毒素、假单胞菌毒素等，可以将毒素定位在细胞表面，然后毒素内在化。进而释放毒性基团，干扰蛋白合成，引起细胞死亡。人们做了大量的修饰和分子工程以改进这些毒素用于治疗，经常采取消除毒素中“天然”的细胞结合部位同时稳定连接抗体以确保通过 ACS 作用与细胞。最初的免疫毒素(IT)由肿瘤特异性抗体与整个毒素偶联，这些免疫毒素有高度细胞毒性，但是仅有一些能到达细胞浆的分子能杀死细胞。由于分子量太大，复合物的肿瘤穿透力有限，而且对正常细胞有非特异毒性。肿瘤穿透力随着肿瘤特异的 scFv 的出现得以改进[193]。

后来毒素杀死细胞的机制得以阐明，改变这些毒素基团以增加杀伤特异性才有可能。以假单胞菌外毒素为例。假单胞菌外毒素由 3 个域组成：N 端域Ⅰ结合细胞表面的蛋白质，域Ⅱ可以移位通过包含体膜，域Ⅲ禁止蛋白质合成[194]。剪短的假单胞菌外毒素，如 PE40 缺乏域Ⅰ，则不能结合正常细胞[194]。重组免疫毒素由 scFv、dsFv（二硫键稳定 scFv）、或 Fab 与剪短的毒素融合而成。此外，小抗体分子可以优先穿入肿瘤细胞（与早期的免疫毒素比较），这些抗体衍生物除了分子质量小有较好的肿瘤穿透力，还因为它们缺乏 Fc 域可以避免杀死“无罪的旁观者”：FcR^+ 细胞如巨噬细胞和 B 细胞。重组免疫毒素已经开始在临床中发挥一些作用。重组免疫毒素的主要的限制之一是免疫原性。虽然可以用人源的 V 区构建抗体，但是毒素本身有自己的免疫原性，免疫毒素的有效性在注射后 10 天左右就可能被机体的免疫响应所消除[195]。对于细菌或植物毒素，人的酶例如核酸酶，可以作为免疫原性降低的一种选择[196,197]。可以说这些免疫毒素分子的前景令人鼓舞，但是至少在肿瘤治疗时有一个挑战，即如何在免疫原性引起免疫毒素无效之前，以较小的毒性更充分地杀伤肿瘤细胞，获得更高的治疗成功率。这也许还需要其他药物或佐剂的协同。

1528

两步策略

研究人员采取许多办法给抗体加上弹头以杀死靶细胞。在抗体导向性酶原药物治疗(antibody-directed enzyme prodrug therapy ,ADEPT)中,抗体将酶带到肿瘤部位,没有结合上去的就被清除;然后给予非毒性前体药物,受酶的活化产生细胞毒性药物[198,199]。这样在肿瘤部位转换前体药物,是一个能有效杀伤肿瘤细胞同时将全身性毒副作用最小化的好办法。但是它的另一个方面是杀伤邻近细胞。因为药物是在细胞外被抗体酶活化的,而小分子药物就会直接杀伤邻近细胞。相反,免疫毒素仅仅杀伤它们结合上去的细胞,效果还必须依赖细胞内吞和移位。

抗体的临床应用

为什么只有很少的抗体应用于临床

虽然单克隆抗体 1975 年就已经发现,但是应用于临床的进展非常缓慢,这可能有多种原因。

①抗体具有种属特异性,因此在小分子治疗中,临床前的毒性和有效性研究不可能总以同样的方式进行。

②早期试用发现抗体的免疫原性,因此长期应用成为一个让人担心的问题。在过去 9 年中,研究人员采取多种策略逐步克服了这个问题。

③常常在动物模型成功后,由于急切期待潜在的远景,我们的想法显得有点天真。我们现在知道在判断一个药物无效之前,反复进行药物改进是非常重要的。

④许多有治疗潜力的抗体不能应用与临床是因为所针对的疾病没有足够的吸引力让药品公司投资研发推广。

⑤由于部分小分子药物的成功,抗体难以在过度期进行大规模的临床应用实验,也就更难评价其有效性。

⑥与口服药品相比,抗体需要注射也是一个缺点。

⑦由于专利法案在抗体制备的获利空间上的冲击,药品公司不得不瞄准可能获得丰厚利润的领域。

⑧目前还没有掌握如何处理短期治疗带来的长期耐受问题。扣除开发费用后,治疗价格放在什么样的水平?甚至有个大公司的老总这样评价“他的公司永远不会涉足这个领域,因为很难有获得利润的空间”。

⑨最初生物技术领域在抗体上的失败对投资者的信心有很大的影响。但是新注册的治疗用抗体不断增加,这一局面现在已有很大的改观。

应用抗体的规则

所有的药品都遵循安全性、有效性、稳定性和一致性的原则。为了能够让药物获准使用,生产产商要在 GMP 条件下生产,临床研究的核心也要符合这个原则。遵循这些规则需要充足的经费支持,这一点约束了治疗用抗体能列入临床常规。

一个药品要获得产品认证,在临床研究中涉及三个阶段:阶段Ⅰ的研究要求提供初步的安全评估和确定一些有关的药理学参数。阶段Ⅱ的研究提供更进一步的安全数据,获得基于疾病活动参数的有效性评估信息,理想情况下,双盲随机分组实验提供的数据令人信服。阶段Ⅲ研究应当能证明适应症患者从药物中得到什么好处。重点放在安慰剂和药品组之间的对比。试用期间还评估长期功效和安全性。

作为药物使用的抗体应具备的生物学特征

上述各项因素可以得到一个明显的结论,任何新的生物产品进入临床都要求具备以下条件:

①无论是单独使用或与其他药物协同,都要在安全性和有效性上有确切的证据优于传统药物;

②在需要时,应有能控制效果和终止治疗的证据;

③生产应当简单而且经济;

④治疗有效的费用（这逐渐正在成为公众健康保护考虑的重要问题）；
⑤如果需要，应当消除任何免疫原性问题以便重复使用；
⑥有短期治疗能够保护患者的长期利益；
⑦抓住机会，忠实于结果并正确判断，加上好运气，产品最后终会获得注册；

一些临床上的突出问题

抗体临床应用的几个热点 本文的意图并非要回顾数量众多的抗体临床研究，而仅仅想强调几个主题而已。 1529

免疫抑制

自身免疫性疾病

脉管炎 某些自身免疫性疾病，如 Wegener 肉芽肿病，病情过程非常残酷，目前用抗炎和免疫抑制疗法治疗的难度相当大，如果不行，最后甚至不得不用细胞毒性药物进行控制。这类疾病的确非常不幸，但是也是评估免疫抑制性抗体的一个理想机会。Lockwood 和他的同事[200]研究表明，CD52 的抗体 CAMPATH-1H 对这个疾病，短期治疗能达到长期的效果，复发时可以进一步应用抗体治疗，能再次缓解。许多病人据报道除了肾维护剂量的类固醇以外，事实上不再用其他药物。能否将这看作治疗耐受仍需进一步探讨。在这个例子中使用多种淋巴细胞溶解方法，进入外周血的 CD4T 细胞恢复很慢，因此机体的免疫功能可能降低。但是，与这类患者高比例的感染率并不相称。

风湿性关节炎 风湿性关节炎一直是制药业的一个主要目标。几乎没有生物制剂，包括抗体，被证明具有常规小分子药物的功效，但是许多相关的实验是在患者使用其他药物后均无效才采用生物制品。目前已经知道 TNF-α 是一个主要的前炎症细胞因子，人们试图制备抗体或者免疫球蛋白与 TNF-α 受体的融合蛋白[201,202]来中和 TNF-α 的活性。疾病活动的表征说明患者可以在较长的一段时间内受益，即使复发也可以重复治疗。最突出的问题是抗 TNF 治疗能否控制该疾病进程中的侵蚀性症状。抗 TNF 治疗与其他生物制剂配伍，有可能针对该疾病病理生理学的不同方面对软骨腐蚀症状进行控制。也许其他生物制剂在疾病早期阶段的应用会更有效，但是伦理观念限制了对它们的评价。需要确定一个预后差的患者群体，他们可能得益于试验性的早期干预，甚至可能预防疾病。

多发性硬化症 多发性硬化症也是一个对治疗提出挑战的疾病。重要的问题是怎样才能证明，不必完成长周期的临床试用期就可以使患者受益。现代成像技术提供了评价治疗所引发的炎症的手段[203]。衡量临床治疗的进步也许不必体现在免疫抑制药物的效率上，特别是在疾病进展过程中，一方面是因为陈旧损伤不可逆转，难以修复；另一方面也可能是疾病的进程并非仅仅是由于免疫问题所致。因此，应用抗体或其他生物治疗策略难以取得突破性进展，给人留下深刻印象。

器官移植

抗体曾广泛用于器官移植研究，包括预防和治疗排斥反应。寻找新的免疫调节剂的原因在于目前现有的免疫移植药物虽然短期内有效，但是手术后长期存活率仍然很低。慢性排斥反应仍然是免疫抑制治疗中的一大挑战。

预防 改善预防措施的重要性在于它能影响受者的长期命运。这些早期事件可能从器官的移植定位开始，随着缺血再灌注损害和直接的血管损伤，排斥进程开始累积直到最后无法控制。抗体及其他策略试图阻止这样的早期损伤，对同种和异种器官移植具有重要意义。任何减少急性排斥反应早期事件的措施都是有益的，可以减少慢性排斥反应和类固醇的使用，也就消除了使用它们产生的不良反应。因为肾移植病人需要终生的免疫抑制治疗，费用变得很重要。新的生物疗法（例如抗 IL-2R 抗体）可以缩小急性排斥反应影响的范围，但是能够不需要其他药物的生物疗法会有明显的优势。

在灵长类动物的实验中有一个结果非常让人感兴趣，用抗 CD40L 的抗体短期治疗能使匹配不好的肾长

期存活，而且不需使用其他药物[204]。这个发现让未来变得有点乐观，它印证了从啮齿类动物实验中得到的结果：短期的治疗可以带来长期的耐受。

消除排斥反应　OKT3，是最先登记使用的鼠抗体，在消除排斥反应上很有效，甚至一些类固醇难以控制的病例。其主要缺点是细胞因子释放引起的症状，由许多细胞上的 FcR 与抗体 Fc 区域的交互作用，形成 T 细胞受体复合物激发引起。抗 CD3 抗体能消除细胞因子释放引起的症状，甚至在自身免疫性疾病领域也广泛使用。如上所述，一系列的抗 CD3 抗体正在进行人源化，去除 FcR 结合点，消除它们促进细胞因子释放的潜能。人源化以后可以减少免疫原性和毒性，现在正逐步取代临床应用的鼠源抗体[82,205]。

心血管疾病

在抗体治疗心血管疾病方面有一个成功范例。注射抗血小板 gpⅡb/Ⅲa 受体的嵌合抗体，可以减轻血管硬化和心肌梗塞引起的缺血再灌注损伤并发症[206,207]。如果合适的治疗需要多次重复，抗体的免疫原性就需要改进。

癌的治疗

1530

由于白血病和淋巴瘤的癌性靶细胞易于接近，许多抗体实验以这些癌细胞为靶标。应用非结合抗体进行治疗，已经获得一些重要进展。例如用人源化 CD52 抗体 CAMPATH-1H 治疗慢性 B 淋巴细胞白血病和原始 T 淋巴细胞白血病[208~210]；用 CD20 抗体治疗非霍奇金淋巴瘤[211,212]。为什么这些独特的抗体对它们杀死的 B 细胞白血病有选择性尚不清楚，因为目标抗原在所有 B 细胞上存在。可能除了天然效应机制外，这些抗体能在白血病 B 细胞中引起明显的凋亡。在成熟的白血病 T 细胞亚群，抗 CD25 抗体（anti-Tac）能在约 1/3的病人中引起凋亡[213]。

对实体瘤，一个主要的突破就是鼠源抗体 17-1A 的出现，它所针对的是结肠癌的相关抗原。通过对有轻微后遗症的病人进行进一步的研究，Riethmuller 和同事们[214]了解到患者的获益之处，掌握了微转移发生率降低的客观依据。他们的研究强调了在手术切除主要瘤体或放疗后应用抗体的重要性。

结合毒素的抗体也有疗效，但是毒性损坏内皮细胞，导致血管滴漏的症状也是一个重要的必须解决的问题[215,216]。到目前为止，免疫毒素的应用还限制在局部实体瘤中，除非毒性能被基因工程消除或阻止。

由于放射性能损伤造血系统，放射性核素的剂量受限制[217,218]。有些实体瘤，进行放射性核素局部注射或包裹在一个密闭空腔中也取得了引人注目的结果[219]。

结语

无疑，单克隆抗体在治疗中必将有一席之地。抗体与抗原的亲和力以及它们的半衰期，很难比得上化学合成的小分子药物。也许最重要的事实是单克隆抗体在研究许多疾病的病理生理学过程中一直起着很重要的作用。认识到这一点，更容易去定义最适当的目标进行理性的干预。用短期的治疗以达到对免疫系统的长期调节，始终是应用抗体治疗最激动人心和最具挑战性的工作之一。这对自身免疫性疾病和器官移植无疑会是一个强大的控制手段。在抗癌方面，正在进行的实验以其独特性和精巧给人们留下了深刻印象。在让肿瘤细胞死亡或停止生长仍有许多挑战，但是可以相信抗体肯定将成为癌症学家越来越重要的武器之一。

（吕凤林 译）

参考文献

1. Cobbold SP, Qin S, Leong LYW, Martin G, Waldmann H. Reprogramming the immune system for peripheral tolerance with CD4 and CD8 monoclonal antibodies. *Immunol Rev* 1992;129:165–201.
2. Coney LR, Daniel PT, Sanborn D, et al. Apoptotic cell death induced by a mouse-human anti-APO-1 chimeric antibody leads to tumor regression. *Int J Cancer* 1994;58;562–567.
3. Thome M, Schneider P, Hofmann K, et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 1997;386:517–521.
4. Matiba B, Mariani SM, Krammer PH. The CD95 system and the death of a lymphocytc. *Semin Immunol* 1997;9:59–68.
5. Bach FH, Ferran C, Hechenleitner P, et al. Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nat Med* 1997;3:196–204.
6. Weiner HL, Friedman A, Miller A, et al. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol* 1994;12:809–837.
7. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today* 1997;18:335–343.
8. Metzler B, Wraith DC. Mucosal tolerance in a murine model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann NY Acad Sci* 1996;778:228–242.
9. Elias D, Meilin OS, Carmi S, Konen-Waisman ?, Cohen IR. Hsp60 peptide therapy of NOD mouse diabetes induces a Th2 cytokine burst and downregulates autoimmunity to various β-cell antigens. *Diabetes* 1997;46:758–764.
10. Cobbold, SP, Martin G, Qin S, Waldmann H. Monoclonal antibodies to promote marrow engraftment and tissue graft tolerance. *Nature* 1986;323;164–166.
11. Leong LYW, Qin S, Cobbold SP, Waldmann H. Classical transplantation tolerance in the adult. The interaction between myeloablation and immunosuppression. *Eur J Immunol* 1992;22:2825–2830.
12. Sharabi Y, Sachs, DH. Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen. *J Exp Med* 1989;169:493.
13. Sharabi Y, Abraham VS, Sykes M, Sachs DH. Mixed allogeneic chimeras prepared by a non-myeloablative regimen: requirement for chimerism to maintain tolerance. *Bone Marrow Transplant* 1996;3:191–196.
14. Waldmann H, Hale G, Cobbold S, et al. Monoclonal antibody therapy for the prevention of graft-vs.-host disease. *Hematology* 1990;22:277–293.
15. Tomita Y, Sachs DH, Khan A, Sykes M. Additional monoclonal antibody (mAB) injections can replace thymic irradiation to allow induction of mixed chimerism and tolerance in mice receiving bone marrow transplantation after conditioning with anti-T cell mABs and 3-Gy whole body irradiation. *Transplantation* 1996; 61:469–475.
16. Benjamin RJ, Waldmann H. Induction of tolerance by monoclonal antibody therapy. *Nature* 1986;320:449–451.
17. Benjamin RJ, Cobbold SP, Clark MR, Waldmann H. Tolerance of rat monoclonal antibodies: implications for serotherapy. *J Exp Med* 1986;163:1539–1552.
18. Gutstein NL, Seaman WE, Scott JH, Wofsy D. Induction of immune tolerance by administration of monoclonal antibody to L3T4. *J Immunol* 1986;137:1127–1132.
19. Carteron NL, Wofsy D, Seaman WE. Induction of immune tolerance during administration of monoclonal antibody to L3T4 does not depend on depletion of L3T4+ cells. *J Immunol* 1988;140:713–716.
20. Carteron NL, Schimenti CL, Wofsy D. Treatment of murine lupus with F(ab')2 fragments of monoclonal antibody to L3T4. Suppression of autoimmunity does not depend on T helper cell depletion. *J Immunol* 1989;142:1470–1476.
21. Qin S, Wise MP, Cobbold SP, et al. Induction of tolerance in peripheral T cells with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1990;20:2737–2745.
22. Qin S, Cobbold SP, Tighe H, Benjamin R, Waldmann H. CD4 monoclonal antibody pairs for immunosuppression and tolerance induction. *Eur J Immunol* 1987;17:1159–1165.
23. Qin S, Cobbold S, Benjamin R, Waldmann H. Induction of classical transplantation tolerance in the adult. *J Exp Med* 1989;169:779–794.
24. Chen Z, Cobbold SP, Metcalfe S, Waldmann H. Tolerance in the mouse to MHC mismatched heart allografts, and to rat heart xenografts, using monoclonal antibodies to CD4 and CD8. *Eur J Immunol* 1992;22:805–810.
25. Cobbold SP, Martin G, Waldmann H. The induction of skin graft tolerance in MHC-mismatched or primed recipients: primed T-cells can be tolerized in the periphery with CD4 and CD8 antibodies. *Eur J Immunol* 1990:20:2747–2755.
26. Marshall SE, Cobbold SP, Davies JD, Martin GM, Phillips JM, Waldmann H. Tolerance and suppression in a primed immune system. *Transplantation* 1996;62:1614–1621.
27. Hayward AR, Shriber M, Cooke A, Waldmann H. Prevention of diabetes but not insulitis in NOD mice injected with antibody to CD4. *J Autoimmun* 1993;6: 301–310.
28. Hutchings P, O'Reilly L, Parish NM, Waldmann H, Cooke A. The use of a non-depleting anti-CD4 monoclonal antibody to re-establish tolerance to b cells in NOD mice. *Eur J Imunol* 1992;22:1913–1918.
29. Parish NM, Hutchings PR, Waldmann H, Cooke A. Tolerance to IDDM induced by CD4 antibodies in nonobese diabetic mice is reversed by cyclophosphamide. *Diabetes* 1993;42:1601–1605.
30. Benjamin RJ, Quin S, Wise MP, Cobbold SP, Waldmann H. Mechanisms of monoclonal antibody-facilitated tolerance induction: a possible role for the CD4 (L3T4) and CD11a (LFA-1) molecules in self-non-self discrimination. *Eur J Immunol* 1988;8:1079–1088.
31. Isobe M, Yagita H, Okumura K, Ihara A. Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* 1992;255: 1125–1127.
32. Isobe M, Suzuki J, Yamazaki S. Sekiguchi M. Acceptance of primary skin graft after treatment with anti-intercellular adhesion molecule-1 and anti-leukocyte function-associated antigen-1 monoclonal antibodies in mice. *Transplantation* 1996;62:411–413.
33. Tran HM, Nickerson PW, Restif AC, et al. Distinct mechanisms for the induction and maintenance of allograft tolerance with CTLA-4 Fc treatment. *J. Immunol.* 1997;159:2232–2239.
34. Chavin KD, Qin L, Lin J, Yagita H, Bromberg JS. Combined anti-CD2 and anti-CD3 receptor monoclonal antibodies induce donor-specific tolerance in a cardiac transplant model. *J Immunol* 1993;151:7249–7259.
35. Krieger NR, Most D, Bromberg JS, et al. Coexistence of Th1- and Th2-type cytokine profiles in anti-CD2 monoclonal antibody-induced tolerance. *Transplantation* 1996;62:1285–1292.
36. Chatenoud L, Thervett E, Primo J, Bach JF. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in non-obese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:123–127.
37. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science* 1992;57:789–792.
38. Pearson TC, Alexander DZ, Winn KJ, Linsley PS, Lowry RP, Larsen CP. Transplantation tolerance induced by CTLA4-Ig. *Transplantation* 1994;57:1701–1706.
39. Steurer W, Nickerson PW, Steele AW, Steiger J, Zheng XX, Strom TB. Ex vivo coating of islet cell allografts with murine CTLA4/Fc promotes graft tolerance. *J Immunol* 1995;155:1165–1174.
40. Bolling SF, Lin H, Wei RQ, Turka LA. Preventing allograft rejection with CTLA4IG: effect of donor-specific transfusion route or timing. *J Heart Lung Transplant* 1996;15:928–935.
41. Judge TA, Tang A, Spain LM, Deans Gratiot J, Sayegh MH, Turka LA. The in vivo mechanism of action of CTLA4lg. *J Immunol* 1996;156:2294–2299.
42. Pearson TC, Alexander DZ, Hendrix R, et al. CTLA4-Ig plus bone marrow induces long-term allograft survival and donor specific unresponsiveness in the murine model. Evidence for hematopoietic chimerism. *Transplantation* 1996;61:997–1002.
43. Wise MP, Benjamin R, Qin S, Cobbold S, Waldmann H. Tolerance induction in the peripheral immune system. In: Vogel H, Alt F, eds. *Molecular mechanisms of immunological self-recognition.* New York: Academic Press, 1992:149–155.
44. Scully R, Qin S, Cobbold SP, Waldmann H. Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 1994;27:2383–2392.
45. Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Waldmann H. Infectious transplantation tolerance. *Science* 1993;259:974–977.
46. Davies JD, Martin G, Phillips J, Marshall SE, Cobbold SP, Waldmann H. T cell regulation in adult transplantation tolerance. *J Immunol* 1996;157:529–533.
47. Yin D, Fathman GD. CD4+ suppressor cells block allotransplant rejection. *J Immunol* 1995;154:6339–6345.
48. Cobbold SP, Adams E, Marshall SE, Davies JD, Waldmann H. Mechanisms of peripheral tolerance and suppression induced by monoclonal antibodies to CD4 and CD8. *Immunol Rev* 1996;149:5–33.
49. Chen ZK, Cobbold SP, Waldmann H, Metcalfe S. Amplification of natural regulatory immune mechanisms for transplantation tolerance *Transplantation* 1996; 62:1200–1206.
50. Bemelman F, Honey K, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Bone marrow transplantation induces either clonal deletion or infectious disease tolerance depending on the dose. *J Immunol* 1998;160:2645–2648.
51. Davies JD, Leong LYW, Mellor A, Cobbold SP, Waldmann H. T-cell suppression in transplantation tolerance through linked recognition. *J Immunol* 1996;156: 3602–3607.
52. Waldmann H, Cobbold S. How may immunosuppression lead to tolerance? The war analogy. In: Banchereau J, Dodet B, Schwartz R, Trannoy E, eds. *Immune tolerance.* Paris: Elsevier Science, 1996:221–227.
53. Wood KJ. The induction of tolerance to alloantigens using MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 1993;5:759–762.
54. Saitovitch D, Morris PJ, Wood KJ. Recipient cells expressing single donor MHC locus products can substitute for donor-specific transfusion in the induction of transplantation tolerance when retreatment is combined with anti-CD4 monoclonal antibody. Evidence for a vital role of CD4+ T cells in the induction of tolerance to class I molecules. *Transplantation* 1996;61:1532–1536.
55. Waldmann H, Or R, Hale G, et al. Elimination of graft versus host disease by in vitro depletion of alloreactive lymphocytes using a monoclonal rat anti-human lymphocyte antibody (CAMPATH-1). *Lancet* 1984;2:483–486.
56. Hale G, Waldmann H. For CAMPATH users CAMPATH 1 monoclonal antibodies in bone marrow transplantation. *Hematotherapy* 1994;3:15–31.
57. Reisner Y, Martelli MF. Bone marrow transplantation across HLA barriers by increasing thenumber of transplanted cell. *Immunol Today* 1995;16:437–440.

58. O'Reilly RJ, Lacerda JF, Lucas KG, Rosenfield NS, Small TN, Papadopoulos EB. Adoptive cell therapy with donor lymphocytes for EBV-associated lymphomas developing after allogeneic marrow transplants. *Important Adv Oncol* 1996;149–161.
59. MacKinnon S, Papadopoulos EP, Carabasi MH, et al. Adoptive immunotherapy evaluating escalating dose of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukaemia following bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukaemia responses from graft-versus-host disease. *Blood* 1995;86:1261–1268.
60. Waldmann H, Cobbold S, Hale G. What can be done to prevent graft-versus-host disease? *Curr Opin Immunol* 1994;6:777–783.
61. Holyoake TL, Alcorn MJ. CD34+ positive haemopoietic cells: biology and clinical applications. *Blood Rev* 1994;8:113–124.
62. Korbling M. Autologous and allogeneic blood stem cell transplantation: potential advantage of blood-over marrow-derived stem cell grafts. *Cancer Invest* 15: 127–137.
63. Mielcarek M, Torok Storb B. Phenotype and engraftment potential of cytokine-mobilized peripheral blood mononuclear cells. *Curr Opin Hematol* 1997;16P: 437–440.
64. Ward ES, Ghetie V. The effector functions of immunoglobulins: implications for therapy. *Ther Immunol* 1995;2:77–94.
65. Clark MC. One IgG receptor, two different functions. *Lancet* 1996;347:1104.
66. Ghetie V, Hubbard JG, Kim JK, et al. Abnormally short serum half-lives of IgG in b2-microglobulin deficient mice. *Eur J Immunol* 1996;26:690–696.
67. Ghetie V, Popov S, Borvak J, et al. Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat Biotech* 1997;15:637–640.
68. Junghans RP, Anderson CL. The protection receptor for IgG catabolism is the b2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5512–5516.
69. Capon DJ, Chamow SM, Mordenti J, Marsters SA. Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature* 1989;337:525–530.
70. Duncan AR, Winter G. The binding site for C1q on IgG. *Nature* 1988;332:738–740.
71. Duncan AR, Woof JM, Partridge LJ, et al. Localization of the binding site for the high affinity Fc receptor on IgG. *Nature* 1988;332:563–564.
72. Jefferis R, Lund J, Pound J. Molecular definition of interaction sites on human IgG for Fc receptors. *Mol Immunol* 1990;27:1237–1240.
73. Lund J, Winter G, Jones PT, et al. Human FcgRI and FcgRII interact with distinct but overlapping sites in human IgG. *J Immunol* 1991;147:2657–2662.
74. Sarmay G, Lund J, Rozsnyay Z, et al. Mapping and comparison of the interaction sites on the Fc region of IgG responsible for triggering antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) through different types of human Fcg receptor. *Mol Immunol* 1992;29:633–639.
75. Bindon CI, Hale G, Bruggemann M, et al. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J Exp Med* 1988;168:127–142.
76. Michaelsen TE, Garred P, Aase A. Human IgG subclass pattern of inducing complement-mediated cytolysis depends on antigen concentration and to a lesser extent on epitope patchiness, antibody affinity and complement concentration. *Eur J Immunol* 1991;21:11–16.
77. Bruggemann M, Willilams GT, Bindon CI, et al. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med* 1987;166:1351–1361.
78. Adair JR. Engineering antibodies for therapy. *Immunol Rev* 1992;130:5–40.
79. Greenwood J, Clark M, Waldmann H. Structural motifs involved in human IgG antibody effector functions. *Eur J Immunol* 1993;5:1098–1104.
80. Tao MH, Morrison SL. Studies of aglycosylated chimeric mouse human IgG: role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *J Immunol* 1989;143:2595–2601.
81. Lund J, Tanaka T, Takahashi N, et al. A protein structural change in aglycosylated IgG3 relates with loss of huFcgRI and huFcgRIII binding and/or activation. *Mol Immunol* 1990;27:1145–1153.
82. Bolt S, Routledge E, Lloyd I, et al. The generation of a humanized, non-mitogenic CD3 monoclonal antibody which retains in vitro immunosuppressive properties. *Eur J Immunol* 1993;23:403–411.
83. Dyer MJS, Hale G, Hayhoe FGJ, Waldmann H. Effects of CAMPATH-1 Antibodies in vivo in patients with lymphoid malignancies: influence of antibody isotype. *Blood* 1989;73:1431–1439.
84. Isaacs JD, Clark MR, Greenwood J, Waldmann H. Therapy with monoclonal antibodies. An in vivo model for the assessment of therapeutic potential. *J Immunol* 1992;148:3062–3071.
85. Maloney DG, Brown S, Czerwinski DK, et al. Monoclonal anti-idiotype antibody therapy of B-cell lymphoma: the addition of a short course of chemotherapy does not interfere with the antitumor effect nor prevent the emergence of idiotype-negative variant cells. *Blood* 1992;80:1502–1510.
86. Stevenson GT, Glennie MJ, Kank S. Chemically engineered chimeric and multi-Fab antibodies. In: Clark M, ed. *Protein engineering of antibody molecules for prophylactic and therapeutic applications in man*. Nottingham, UK: Academic Titles, 1992:127–141.
87. Xia MQ, Tone M, Packman L, et al. Characterization of the CAMPATH-1 (CDw52) antigen: biochemical analysis and cDNA cloning reveal an unusually small peptide backbone. *Eur J Immunol* 1991;21:1677–1684.
88. Clark M, Bindon C, Dyer M, et al. The improved lytic function and in vivo efficacy of monovalent monoclonal CD3 antibodies. *Eur J Immunol* 1989; 19:381–388.
89. Routledge EG, Lloyd I, Gorman S, Clark M, Waldmann H. A humanized monovalent CD3 antibody which can activate homologous complement. *Eur J Immunol* 1991;21:2717–2725.
90. Hughes-Jones NC, Gorrick BD, Howard JC. The mechanism of synergistic complement lysis of rat red cells by monoclonal IgG antibodies. *Eur J Immunol* 1983;13:635–641.
91. Bindon CI, Hale G, Hughes-Jones N, Gorick B, Waldmann H. Synergistic complement lysis by monoclonal antibodies to the human leukocyte common antigen requires both the classical and alternative pathways. *Mol Immunol* 1987;24: 587–594.
92. Ghetie MA, Podar EM, Ilgen A, Gordon BE, Uhr JW, Vitetta ES. Homodimerization of tumor-reactive monoclonal antibodies markedly increases their ability to induce growth arrest or apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7509–7514.
93. Racila E, Hsueh R, Marches R, et al. Tumor dormancy and cell signaling: anti-mu-induced apoptosis in human B-lymphoma cells is not caused by an APO-1-APO-1 ligand interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;3:2165–2168.
94. Davies DR, Padlan EA, Sheriff S. Antibody-antigen complexes. *Annu Rev Biochem* 1990;59:439–448.
95. Wilson IA, Stanfield RL, Rini JM, et al. Structural aspects of antibodies and antibody-antigen complexes. *Ciba Found Symp* 1991;159:13–39.
96. Wu TT, Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 1970;132:211–250.
97. Wilson IA, Stanfield RL. Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Curr Opin Struct Biol* 1994;3:857–867.
98. Rini JM, Schulze-Gahmen U, Wilson IA. Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science* 1992;255:959–965.
99. Wu TT, Johnson G, Kabat EA. Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* 1993;16:1–7.
100. Searle SJ, Pedersen JT, Henry AH, et al. Antibody structure and function. In: Borrebaeck CAK, ed. *Antibody engineering*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1995:3–51.
101. Steipe B, Pluckthun A, Huber R. Refined crystal structure of a recombinant immunoglobulin domain and a complementarity-determining region 1-grafted mutant. *J Mol Biol* 1992;225:739–753.
102. Bajorath J, Novotny J. Model building of antibody combining sites. *Ther Immunol* 1995;2:95–103.
103. Gilliland LK, Norris NA, Marquardt H, et al. Rapid and reliable cloning of antibody V regions and generation of recombinant single chain antibody fragments. *Tissue Antigens* 1996;47:1–20.
104. Hayden MS, Gilliland LK, Ledbetter JA. Antibody engineering. *Curr Opin Immunol* 1997;9:201–212.
105. Orlandi R, Gussow DH, Jones PT, Winter G. Cloning of immunoglobin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3833–3837.
106. Babcook JS, Leslie KB, Olsen OA, et al. A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7843–7848.
107. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;348:552–554.
108. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991;352:624–628.
109. Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, et al. Human antibodies with subnanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotech* 1996;14:309–314.
110. Foote J, Eisen HN. Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1254–1256.
111. Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, et al. Isolation of high-affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J* 1994;13:3245–3260.
112. Barbas CF III, Burton DR. Selection and evolution of high-affinity human antiviral antibodies. *Trends Biotechnol* 1996;14:230–234.
113. Barbas CF III. Synthetic human antibodies. *Nat Med* 1995;1:837–839.
114. Marks JD, Griffiths AD, Malmquist M, et al. By-passing immunization: building high-affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology* 1992;10: 779–783.
115. Yelton DE, Rosok MJ, Cruz G, et al. Affinity maturation of the BR96 anti-carcinoma antibody by codon-based mutagenesis. *J Immunol* 1995;155:1994–2004.
116. Barbas CF III, Hu D, Dunlop N, et al. In vitro evolution ofa neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3809–3813.
117. Yang WP, Green K, Pinz-Sweeney S, et al. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J Mol Biol* 1995;254:392–403.
118. Hawkins RE, Russell SJ, Winter G. Selection of phage antibodies by binding affinity: mimicking affinity maturation. *J Mol Biol* 1992;226:889–896.
119. Gram H, Marconi LA, Barbas CF III, et al. In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3576–3580.
120. Low NM, Holliger PH, Winter G. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator

strain. *J Mol Biol* 1996;260:359–368.

121. Greenwood J, Clark M, Waldmann H. Structural motifs involved in human IgG antibody effector functions. *Eur J Immunol* 1993;5:1098–1104.
122. Shopes B. A genetically engineered human IgG mutantwith enhanced cytolytic activity. *J Immunol* 1992;148:2918–2922.
123. Greenwood J, Gorman SD, Routledge EG, Lloyd IS, Waldmann H. Engineering multiple domain forms of the therapeutic antibody CAMPATH-1H; effects on complement lysis. *Ther Immunol* 1994;1:247–255.
124. Carayannopoulos L, Capra JD. Immunoglobulins: structure and function. In: Paul WE, ed. *Fundamental immunology*. 3rd ed. New York: Raven Press, 1993: 283–314.
125. Jefferis R, Lund J, Goodall M. Recognition sites on human IgG for Fc γ receptors: the role of glycosylation. *Immunol Lett* 1995;44:111–117.
126. Tao MH, Morrison SL. Studies of aglycosylated chimeric mouse human IgG: role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *J Immunol* 1989;143:2595–2601.
127. Hobbs SM, Jackson LE, Hoadley J. Interaction of aglycosyl immunoglobulins with the IgG Fc transport receptor from neonatal gut: comparison of deglycosylation by tunicamycin treatment and genetic engineering. *Mol Immunol* 1992;29:949–956.
128. Brambell FWR, Hemmings WA, Morris IG. A theroretical model of gammaglobulin catabolism. *Nature* 1964;203:1352–1355.
129. Kim JK, Tsen MF, Ghetie V, Ward ES. Localization of the site of the murine IgG1 molecule that is involved in binding to the murine intestinal Fc receptor. *Eur J Immunol* 1994;24:2429–2434.
130. Medesan C, Radu C, Kim JK, et al. Localization of the site of the IgG molecule that regulates maternofetal transmission in mice. *Eur J Immunol* 1996;26: 2533–2536.
131. Medesan C, Matesoi D, Radu C, et al. Delineation of the amino acid residues involved in transcytosis and catabolism of mouse IgG1. *J Immunol* 1997;158: 2211–2217.
132. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, et al. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 1998;242:423–426.
133. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 5879–5883.
134. Winberg G, Grosmaire LS, Klussman K, et al. Surface expression of CD28 single chain Fv for costimulation by tumour cells. *Immunol Rev* 1996;153:6–14.
135. Francisco JA, Gilliland LK, Stebbins MR, et al. Activity of a single-chain immunotoxin that selectively kills lymphoma and other B-lineage cells expressing the CD40 antigen. *Cancer Res* 1995;55:3099–3104.
136. Siegall CB. Targeted therapy of carcinomas using BR96 sFv-PE40, a single chain immunotoxin that binds to the Le^y antigen. *Semin Cancer Biol* 1995; 6:289–295.
137. Demanet C, Brissinck J, De Jonge J, Thielemans K. Bispecific antibody-mediated immunotherapy of the BCL_1 lymphoma: increased efficacy with multiple injections and CD28-induced costimulation. *Blood* 1996;87:4390–4398.
138. Hayden MS, Linsley PS, Gayle MG, et al. Single chain mono- and bispecific antibody derivatives with novel biological properties and anti-tumor activity from a COS cell transient expression system. *Ther Immunol* 1994;1:3–15.
139. Hayden MS, Grosmaire LS, Norris NA, et al. Costimulation by CD28 sFv expressed on the tumor cell surface or as a soluble bispecific molecule targeted to the L6 carcinoma antigen. *Tissue Antigens* 1996;48:242–254.
140. Jost CR, Titus JA, Kurucz I, Segal DM. A single-chain bispecific Fv_2 molecule produced in mammalian cells redirects lysis by activated CTL. *Mol Immunol* 1996;33:211–219.
141. Kurucz I, Titus JA, Jost CR, et al. Retargeting of CTL by an efficiently refolded bispecific single-chain Fv dimer produced in bacteria. *J Immunol* 1995;154: 4576–4582.
142. Mack M, Riethmuller G, Kufer P. A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7021–7025.
143. Weiner LM, Clark JI, Davey M, et al. Phase I trial of 2B1, a bispecific monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and FcgRIII. *Cancer Res* 1995;55: 4586–4593.
144. Zhu Z, Lewis GD, Carter P. Engineering high-affinity humanized anti-$p185^{HER2}$/anti-CD3 bispecific $F(ab')_2$ for efficient lysis of $p185^{HER2}$ overexpressing tumor cells. *Int J Cancer* 1995;62:319–324.
145. Duan L, Bagasra O, Laughlin MA, et al. Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-Rev single chain antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5075–5079.
146. Deshane J, Cabrera G, Grim JE, et al. Targeted eradication of ovarian cancer mediated by intracelluar expression of anti-erb-2 single-chain antibody. *Gynecol Oncol* 1995;59:8–14.
147. Deshane J, Siegal GP, Alvarez RD, et al. Targeted tumor killing via an intracellular antibody against erbB-2. *J Clin Invest* 1995;96:2980–2989.
148. Biocca S, Cattaneo A. Intracellular immunization: antibody targeting to subcellular compartments. *Trends Cell Biol* 1995;5:248–252.
149. Sabzevari H, Gillies SD, Mueller BM, et al. A recombinant antibody-interleukin 2 fusion protein suppresses growth of hepatic human neuroblastoma metastases in severe combined immunodeficiency mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 9626–9630.
150. Staerz UD, Kanagawa O, Bevan MJ. Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature* 1985;314:628–631.
151. Clark MR, Waldmann H. T cell killing of target cells induced by hybrid ntibodies: a comparison of two bispecific monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst* 1987;79:1393–1401.
152. Gilliland LK, Clark MR, Waldmann H. Universal bispecific antibody for targeting tumour cells for destruction by cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7719–7723.
153. Perez P, Hoffman RW, Shaw S, et al. Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody. *Nature* 1985:316:354–356.
154. Waldmann TA. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science* 1991;252:1657–1662.
155. Carter P, Ridgway J, Zhu Z. Toward the production of bispecific antibody fragments for clinical applications. *J Hematother* 1995;4:463–470.
156. Holliger P, Winter G. Engineering bispecific antibodies. *Curr Opin Biotechnol* 1993;4:446–449.
157. Hoogenboom HR. Mix and match: building manifold binding sites. *Nat Biotechnol* 1997;15:125–126.
158. Holliger P, Prospero T, Winter G. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6444–6448.
159. McGuinness BT, Walter G, FitzGerald K, et al. Phage diabody repertoires for selection of large numbers of bispecific antibody fragments. *Nat Biotechnol* 1996;14:1149–1154.
160. Pack P, Pluckthun A. Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in Escherischia coli. *Biochemistry* 1992;31:1579–1584.
161. Ridgway JBB, Presta LG, Carter P. "Knobs-into-holes" engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng* 1996;9: 617–621.
162. Coloma MJ, Morrison SL. Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. *Nat Biotechnol* 1997;15:159–163.
163. Pack P, Muller K, Zahn R, Plunkthun A. Tetravalent miniantibodies with high avidity assembling in Escherichia coli. *J Mol Biol* 1995;246:28–34.
164. Cabilly S, Riggs AD, Pande H, et al. Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3273–3277.
165. Boss MA, Kenton JH, Wood CR, Emtage JS. Assembly of functional antibodies from immunoglobulin heavy and light chains synthesized in E. coli. *Nucleic Acids Res* 1984;12:3791–3806.
166. Guise AD, West SM, Chaudhuri JB. Protein folding in vivo and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies. *Mol Biotechnol* 1996;6:53–64.
167. Huston JS, George AJT, Tai M-S, et al. Single-chain Fv design and production by preparative folding. In: Borrebaeck CAK, ed. *Antibody engineering*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1995:185–209.
168. Ge L, Knappick, Pack P, et al. Expressing antibodiesin E. coli. In: Borrebaeck CAK, ed. *Antibody engineering*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1995:229–243.
169. Isaacs, JD. The antiglobulin response to therapeutic antibodies. *Semin Immunol* 1990;2:449–456.
170. Bertram JH, Gill PS, Levine AM, et al. Monoclonal antibody T101 in T cell malignancies: a clinical, pharmacokinetic and immunologic correlation. *Blood* 1986;68:752–761.
171. Hricik PR, Zarconi J, Schulak JA. Influence of low-dose cyclosporine on the outcome of treatment with OKT3 for acute renal allograft rejection. *Transplantation* 1989;47:272–277.
172. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988;332:323–327.
173. Verhoeyen M, Milstein C, Winter G. Reshaping human antibodies: grafting an anti-lysozyme activity. *Science* 1988;239:1534–1536.
174. Gussow D, Seemann G. Humanization of monoclonal antibodies. *Methods Enzymol* 1991;203:99–121.
175. Queen C, Schneider WP, Selick HE, et al. A humanized antibody that binds to the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:10029–10033.
176. Roguska MA, Pedersen JT, Henry AH, et al. A comparison of two murine monoclonal antibodies humanized by CDR-grafting and variable domain resurfacing. *Protein Eng* 1996;9:895–904.
177. Roguska MA, Pedersen JT, Keddy CA, et al. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:969–973.
178. James K, Bell GT. Human monoclonal antibody production: current status and future prospects. *J Immunol Methods* 1987;100:5–40.
179. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, et al. By passing immunization. Human antibodies from V gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 1991; 222:581–597.
180. Bruggemann M, Caskey HM, Teale C, et al. A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy-chains from transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6709–6713.
181. Jakobovits A. Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol* 1995;6:561–566.

182. Bruggemann MS, Neuberger MS. Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice. *Immunol Today* 1996;17:391–397.
183. Lubin I, Segall H, Marcus H, et al. Engraftment of human peripheral blood lymphocytes in normal strains of mice. *Blood* 1994;83:2368–2381.
184. Isaacs JD, Watts RA, Hazleman BL, et al. Humanized monoclonal antibody therapy for rheumatoid arthritis. *Lancet* 1992;340:748–752.
185. Lockwood CM, Thiru S, Isaacs JD, et al. Long-term remission of intractable systemic vasculitis with monoclonal antibody therapy. *Lancet* 1993;341:1620–1622.
186. Isaacs JD, Waldmann H. Helplessness as a strategy for avoiding antiglobulin responses to therapeutic monoclonal antibodies. *Ther* Immunol 1994;1:303–312.
187. Wawrzynczak EJ. *Antibody therapy.* Oxford, UK: Bios Scientific Publishers, 1995
188. Marasco WA. Intrabodies: turning the humoral immune system outside in for intracellular immunization. *Gene Ther* 1997;4:11–15.
189. Richardson JH, Marasco WA. Intracellular antibodies: development and therapeutic potential. *Trends Biotechnol* 1995;13:306–310.
190. Graus-Porta D, Beerli RR, Hynes NE. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signalling. *Mol Cell Biol* 1995;15:1182–1191.
191. Chester KA, Hawkins RE. Clinical issues in antibody design. *Trends Biotechnol* 1995;13:294–300.
192. Yokata T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumour penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 1992;52:3402–3408.
193. Brinkmann U, Pastan I. Immunotoxins against cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994;1198:27–45.
194. Hwang J, FitzGerald DJ, Adhya S, Pastan I. Functional domains of Pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. coli. Cell* 1987;48:129–136.
195. Pastan I, FitzGerald D. Recombinant toxins for cancer treatment. *Science* 1991; 254:1173–1177.
196. Rybak SM, Hoogenboom HR, Meade HM, et al. Humanization of immunotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3165–3169.
197. Newton DL, Xue Y, Olson KA, et al. Angiogenin single-chain immunofusions: influence of peptide linkers and spacers between fusion protein domains. *Biochemistry* 1996;35:545–553.
198. Bagshawe KD. The first Bagshawe lecture: towards generating cytotoxic agents at cancer sites. *Br J Cancer* 1989;60:275–281.
199. Bagshawe KD, Sharma SK, Springer CJ, Antoniw P. *Tumour Targeting* 1995; 1:17–29.
200. Lockwood CM, Thiru S, Steard S, et al. Treatment of refractory Wegener's granulomatosis with humanized monoclonal antibodies. *Q J Med* 1996;89:903–912.
201. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994;344:1105–1110.
202. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, et al. Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) inpatients with rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994;344:1125–1127.
203. Moreau T, Thorpe J, Miller D, et al. Preliminary evidence from magnetic resonance imaging for reduction in disease activity after lymphocyte depletion in multiple sclerosis. *Lancet* 1994;344:298–301.
204. Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN, et al. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:8789–8794.
205. Routledge E, Waldmann H. The effect of aglycosylation on the immunogenicity of a humanised therapeutic CD3 antibody. *Transplantation* 1995;60:847.
206. Schultz RD, Heuser RR, Hatler C, Frey D. Use of c7E3 Fab in conjunction with primary coronary stenting for acute myocardial infarctions complicated by cardiogenic shock. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1996;39:143–148.
207. Simoons ML, de Boer MJ, van den-Brand MJ, et al. European Cooperative Study Group. Randomized trial of a GPIIb/IIIa platelet receptor blocker in refractoryunstable angina. *Circulation* 1994;89:596–603.
208. Pawson R, Dyer MJ, Barge R, et al. Treatment of T-cell prolymphocytic leukemia with human CD52 antibody. *J Clin Oncol* 1997;15:2667–2672.
209. Dyer MJ, Kelsey SM, Mackay HJ, et al. In vivo 'purging' of residual disease in CLL with Campath-1H. *Br J Haematol* 1997;97:669–672.
210. Osterborg A, Dyer MJ, Bunjes D, et al. Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H treatment in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1997;15:1567–1574.
211. Antoine C, Garnier JL, Dubhoust A, Bariety J, Stevenson G, Glotz D. Successful treatment of posttransplant lymphoproliferative disorder with renal graft preservation by monoclonal antibody therapy. *Transplant Proc* 1996;28:2825–2826.
212. Maloney DG, Grillo Lopez AJ, White CA, et al. C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:2188–2195.
213. Waldmann TA, White JD, Goldman CK, et al. The interleukin-2 receptor: a target for monoclonal antibody treatment of human T-cell lymphotrophic virus I-induced adult T-cell leukemia. *Blood* 1993;82:1701–1712.
214. Riethmuller G, Schneider Gadicke E, Schlimok G, et al. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet* 1994;343:1177–1183.
215. Engert A, Diehl V, Schnell R, et al. A phase-I study of an anti-CD25 ricin A-chain immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in patients with refractory Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;89:403–410.
216. Stone MJ, Sausville EA, Fay JW, et al. A phase I study of bolus versus continuous infusion of the anti-CD19 immunotoxin, IgG-HD37-dgA, in patients with B-cell lymphoma. *Blood* 1996;88:1188–1197.
217. Press OW, Eary JF, Appelbaum FR, et al. Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. *N Engl J Med* 1993;329: 1219–1224.
218. Kaminski MS, Zasadny KR, Francis IR, et al. Radioimmunotherapy of B-cell lymphoma with [131I]anti-B1 (anti-CD20) antibody. *N Engl J Med* 1993;329:459–465.
219. Hird V, Maraveyas A, Snook D, et al. Juvant therapy of ovarian cancer with radioactive monoclonal antibody. *Br J Cancer* 1993;68:403–406.
220. Hayden MS, Linsley PS, Gayle MA, et al. Single-chain mono- and bispecific antibody derivatives with novel biological properties and anti-tumour activity form a COS cell transient expression system. *Ther Immunol* 1994;1,3–15.

汉英对照索引

说明:(1) 为方便读者对照使用,各汉译词条后保留了对应的原英文词条。

(2) 排序:数码在前(先阿拉伯数字,后罗马数字,分别由小至大排列);西文为次(先英文,后希腊文,分别按字母顺序排列);中文在后,按汉语拼音顺序排列。

(3) 各词条后面的数字指英文版原书页码,这些页码已在正文页边的空白处标出,可对应查找。

C

G

H

J

K

L

N

P

Q

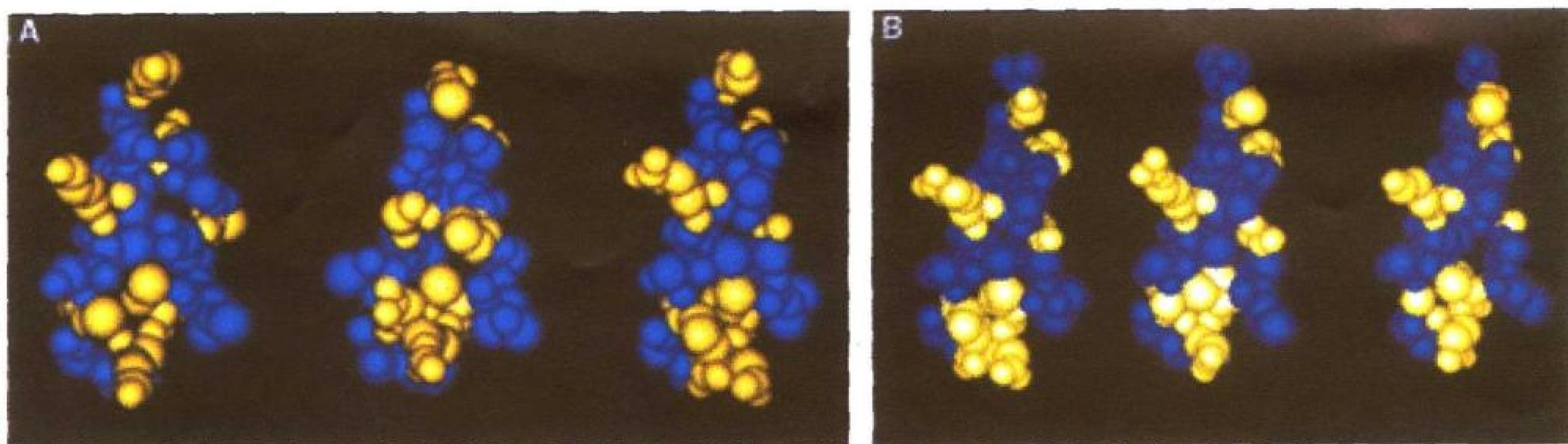
R

S

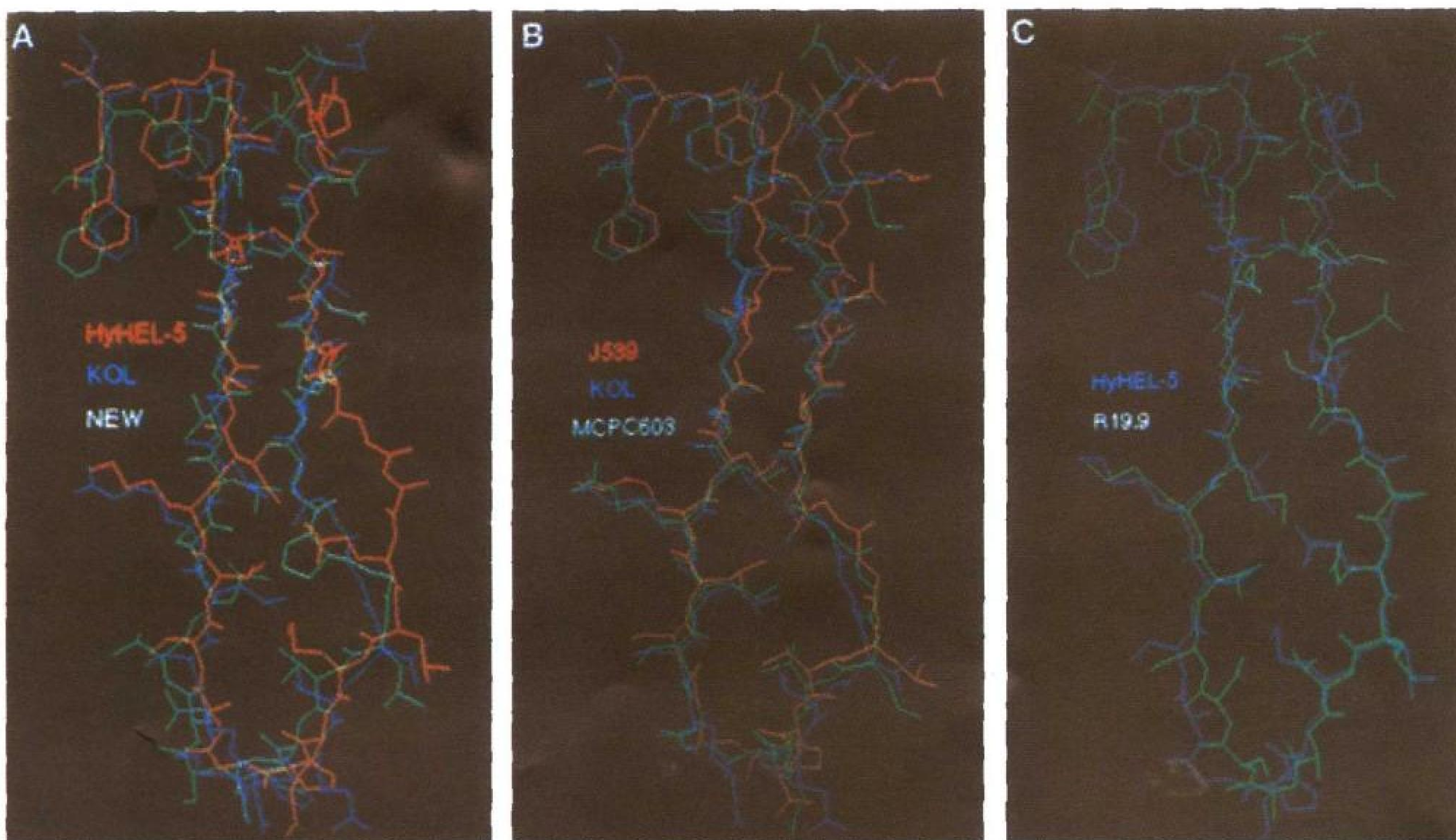
  介导的白细胞外渗 leukocyte extravasation mediation by 1358,1359

Y

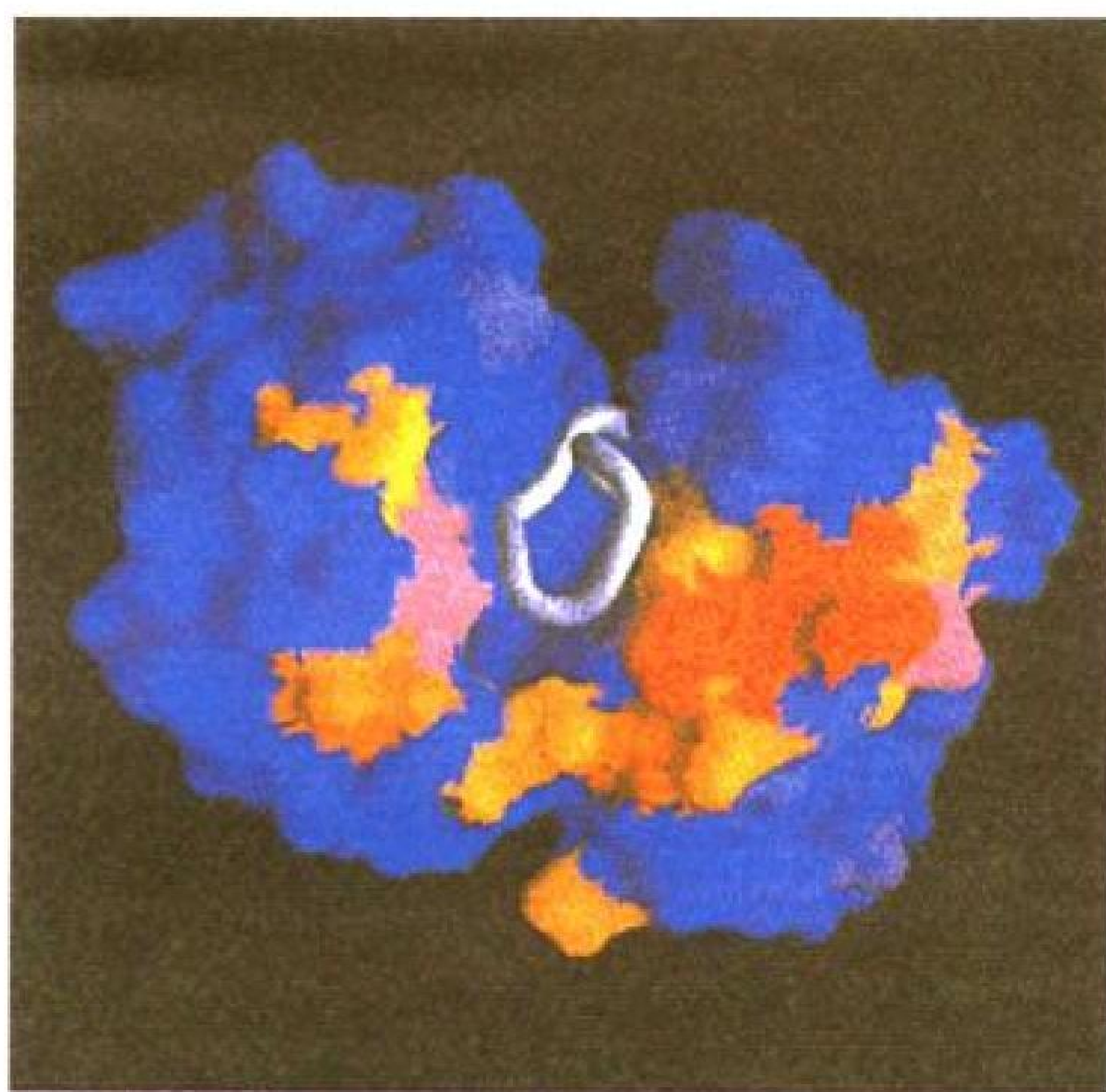
Z



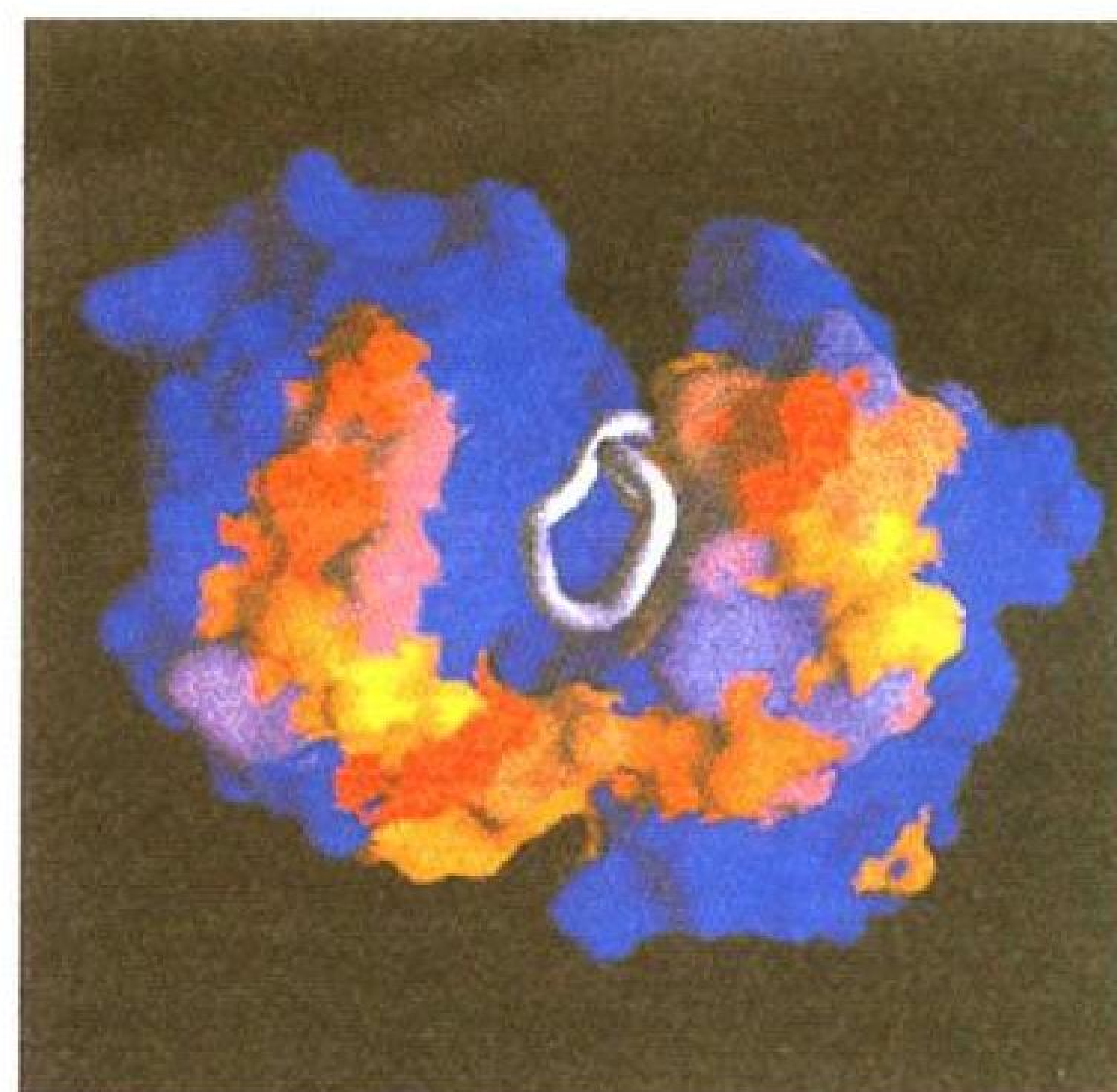
彩图 3.1　免疫球蛋白 FR1 区三维模型。图中方向性地显示了 6 ~ 24 个氨基酸实心模型，例如 CDR 在模型上方，而 C_H1 在下面。为了便于参考，6、9、12、13、16、19 和 23 号氨基酸用黄色标示。图 A 显示了来自 HyHEL-5（左，宗族Ⅰ）、NEW（中，宗族Ⅱ）以及 KOL（右，宗族Ⅲ）三个宗族的抗体模型，显然这些分子的结构不同。图 B 中比较了三个宗族Ⅲ的抗体——人 V_H3 家族 KOL（左）、鼠 V_HT15 家族 MCOC603（中）以及鼠 V_HX24 家族 J539（右），注意 3 个 FR1 环与图 A 中的相关部位有着相似性。(经允许引自参考文献[41]。)



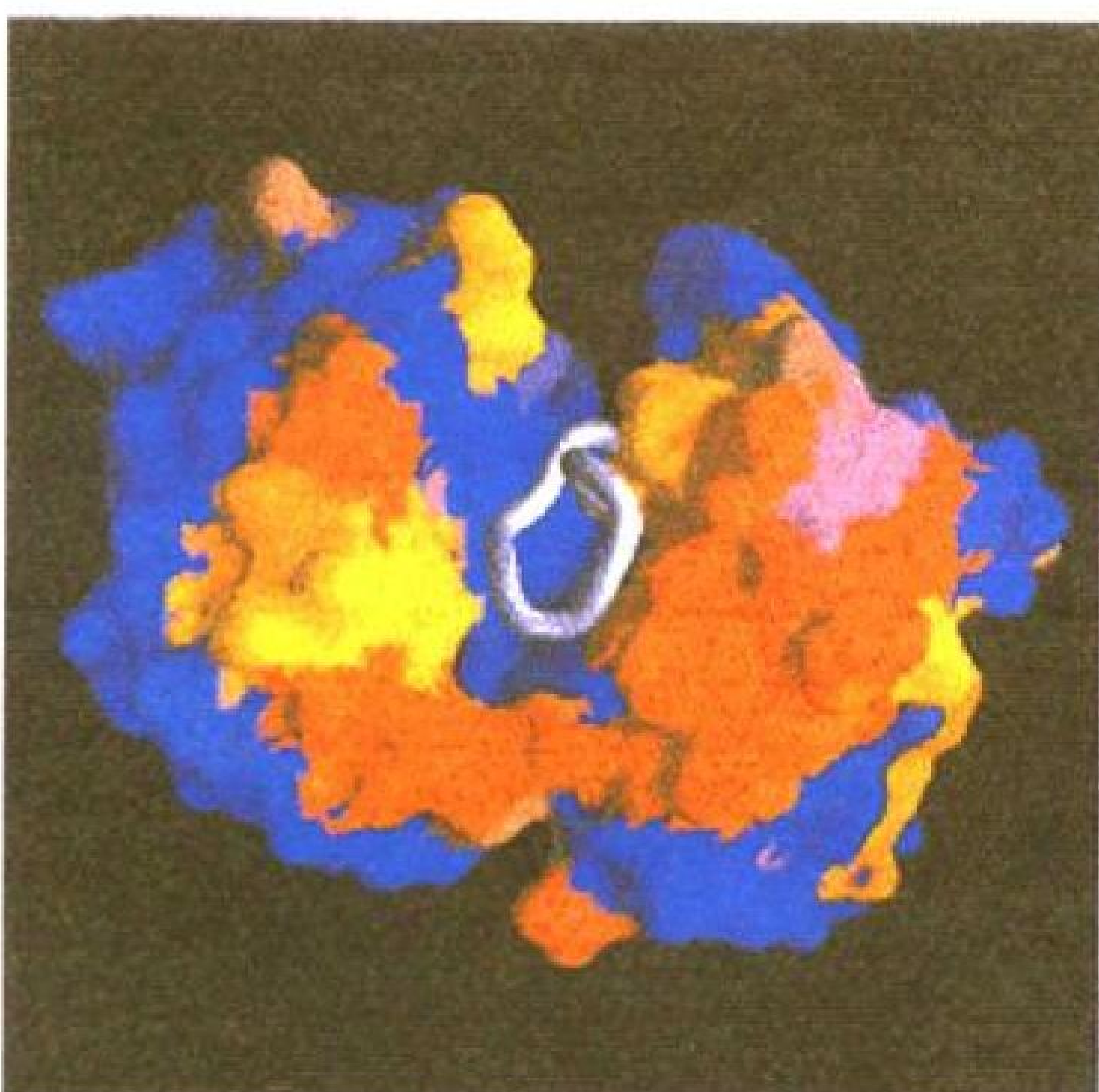
彩图 3.2　抗体 FR1 区的重叠，分别来自不同宗族（A）和相同宗族（B,C）。氨基酸残基的棒状图及其侧链被重叠在一起以利于比较。图 A 中，宗族Ⅰ HyHEL-5 和宗族Ⅱ NEW 重叠于宗族Ⅲ KOL 上，可以看出其差异很大。图 B 中模型显示了宗族Ⅲ 3 种抗体 MCPC603、J539 和 KOL。注意其结构上的侧链大小和方向甚至都相符。图 C 中，宗族Ⅰ R19.9 抗体重叠于宗族Ⅰ的 HyHEL-5 分子上，结果类似。(经允许引自参考文献[41]。)



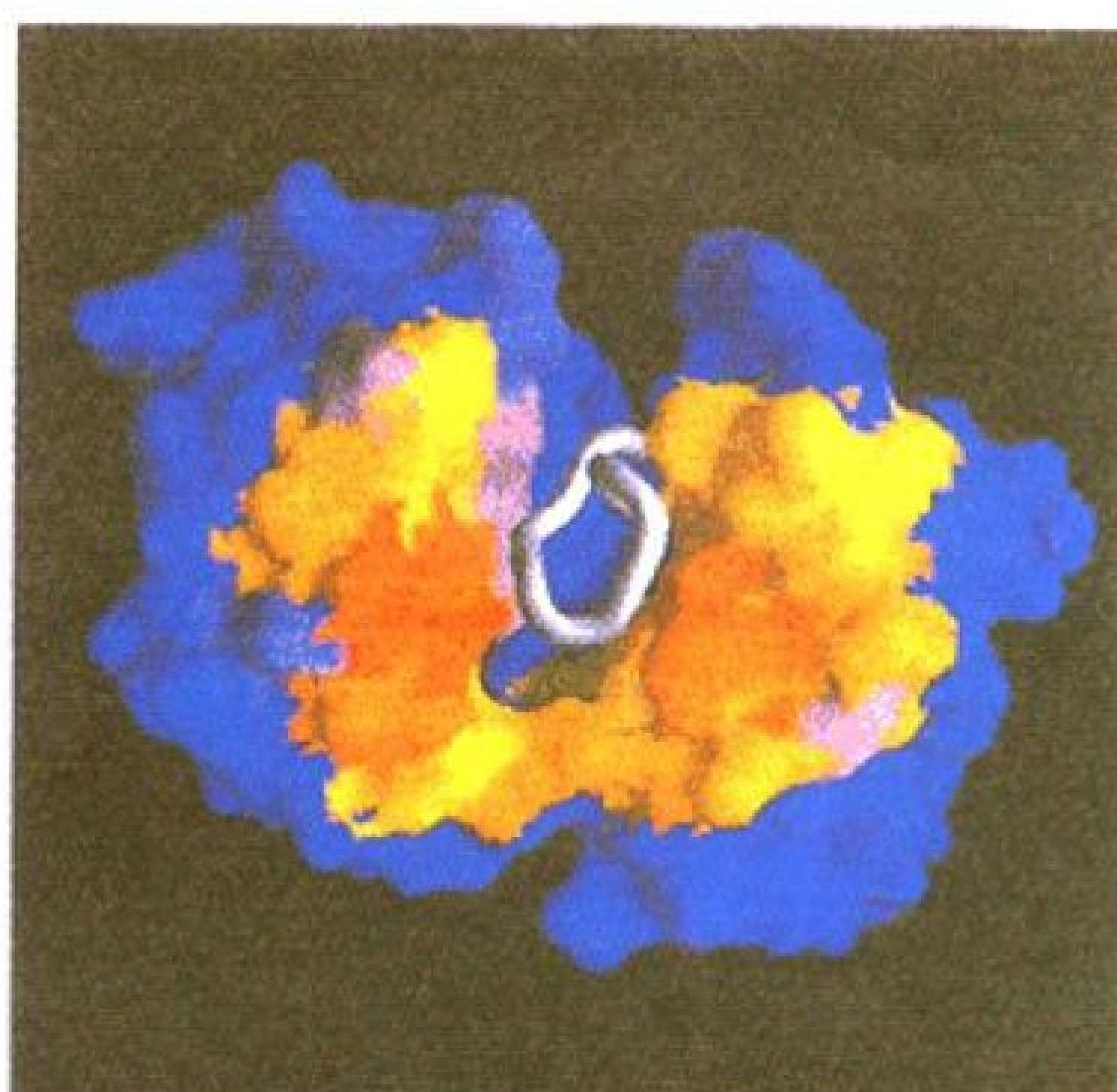
(a)



(b)

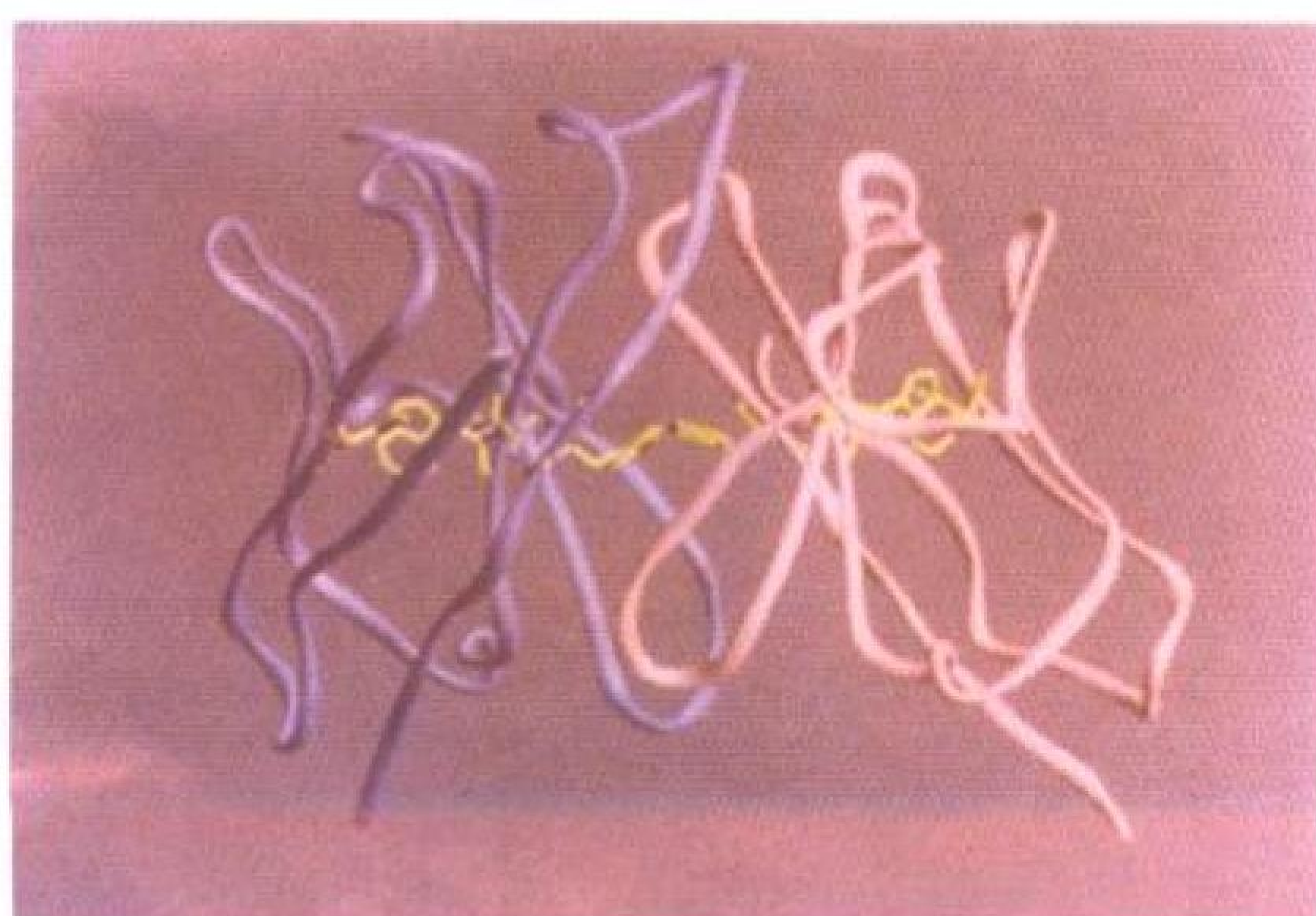


(c)

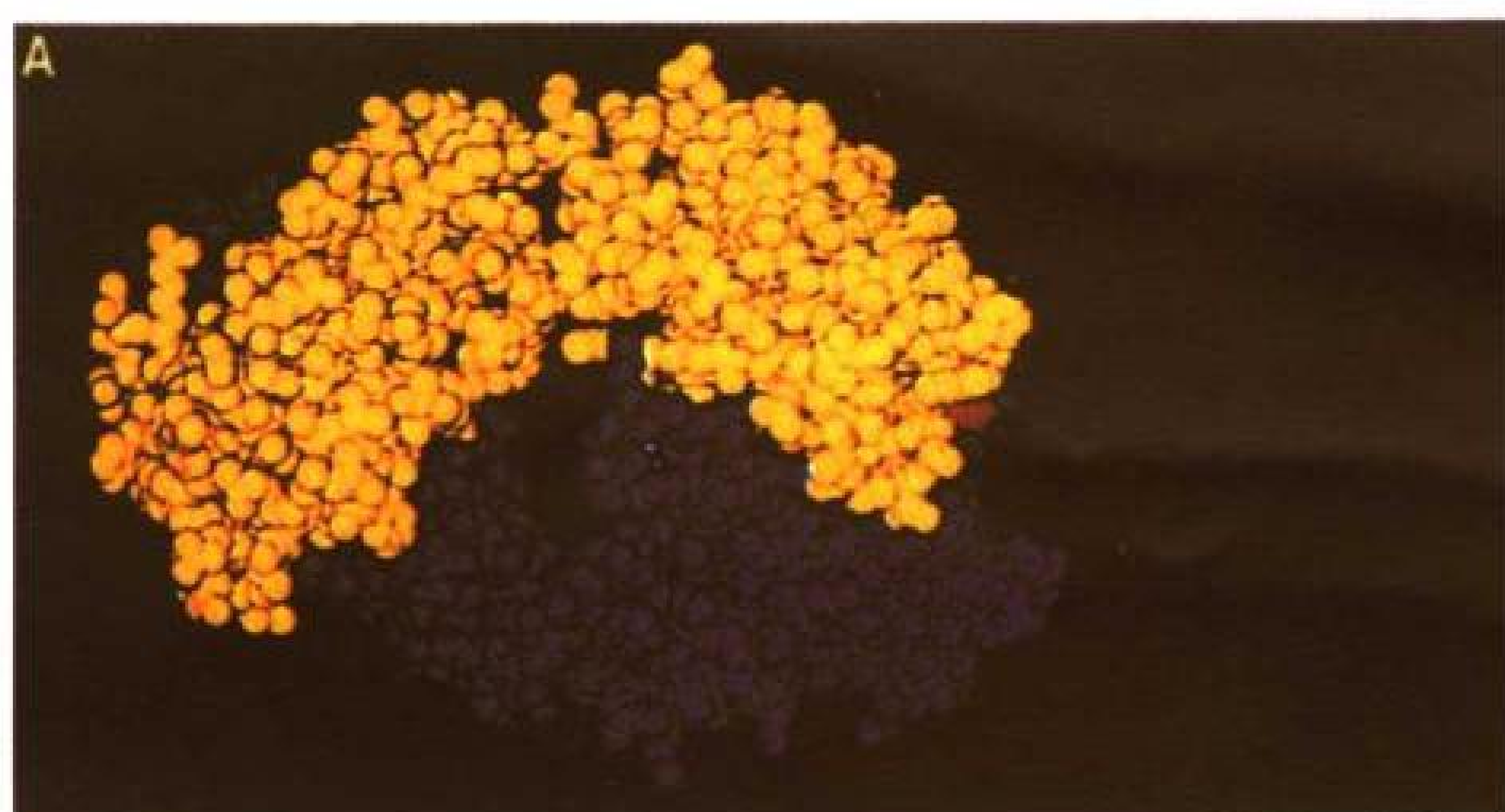


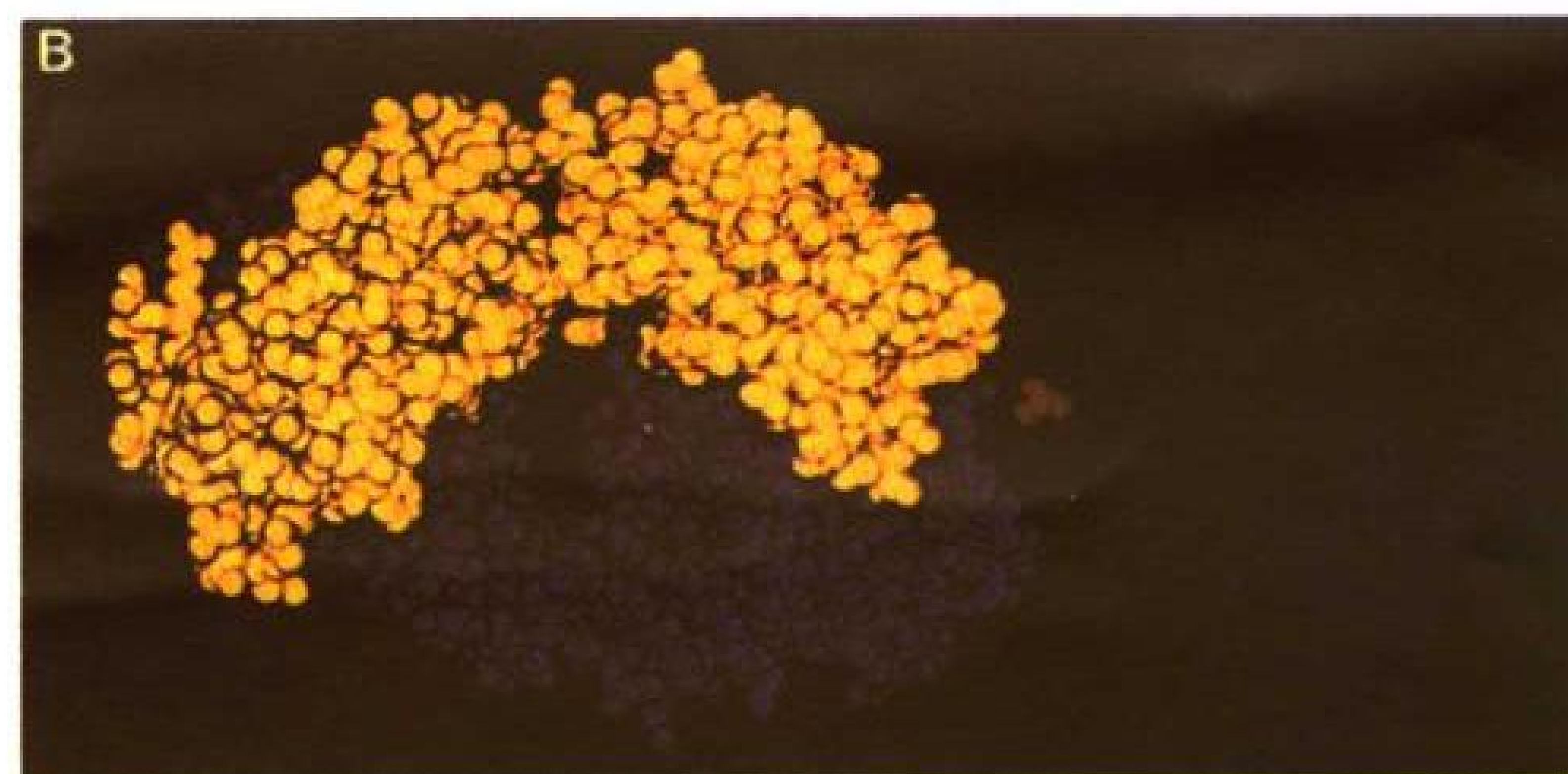
(d)

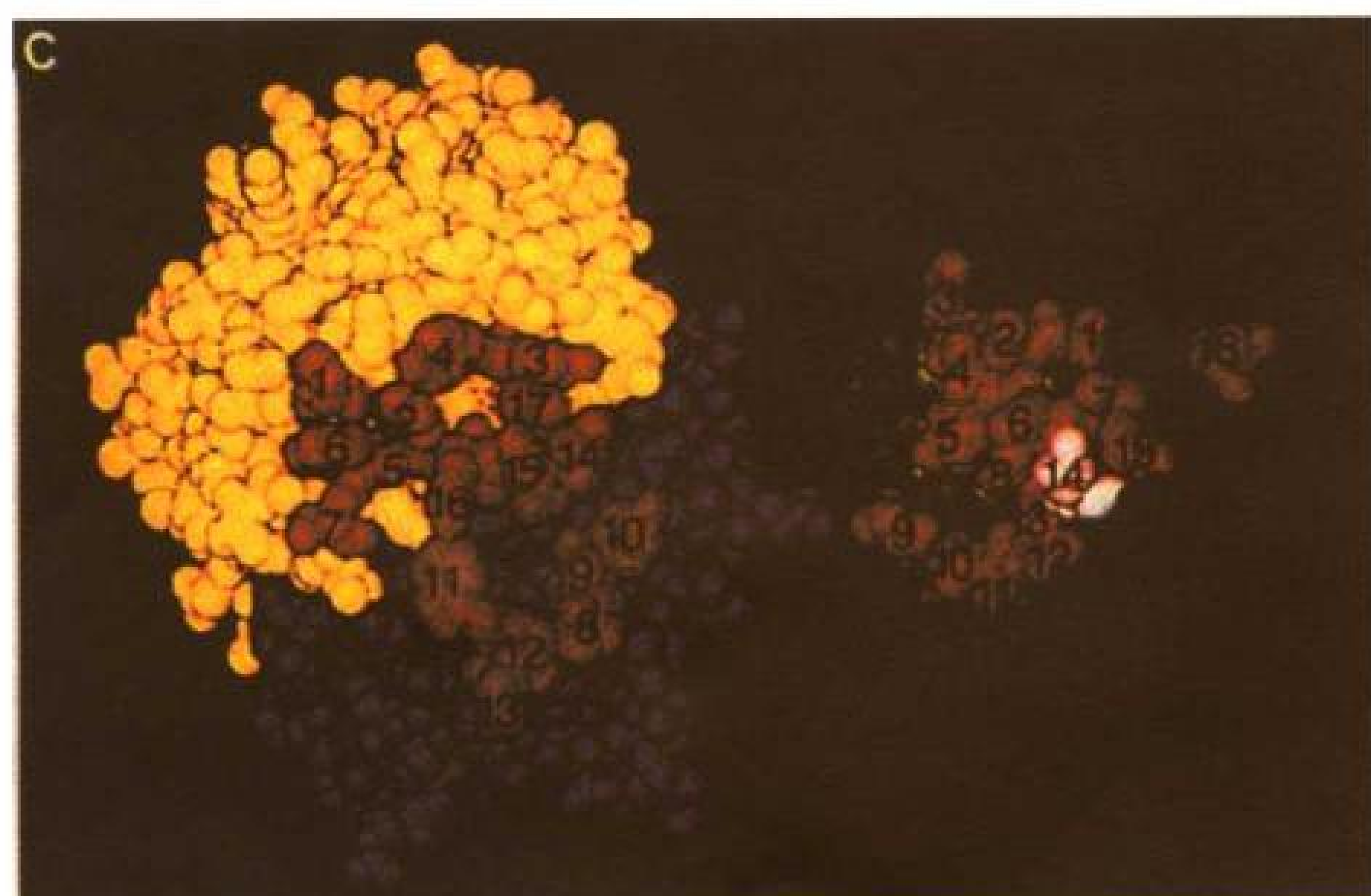
彩图3.3　抗体结合位点是多样性呈坡状的袋状物。抗体序列的变异度是以抗体POT的表面为模板衡量的，其程度从蓝（高度保守）到红（高度变异）。每个模型的左边是V_{κ}区，右边是V_H区。V_H中变异度最高的CDR3环被绘成灰色的长带，而V_{κ}中变异度最高的V_{κ} CDR3未在图中显示。(a)显示胚系多样性；(b)显示体细胞超突变引起的多样性；(c)描绘了两者引起的多样性之和。注意，在每一个例子中，多变性主要限制在抗体结合位点，多样性最高的地方非常靠近V_H CDR3。(d)中能和21种单独的抗原晶体发生直接侧链接触的残基同样的用蓝色（没有接触现象）到红色（16种接触现象）表示。因此，多样性和结合抗体的能力密切相关。（经许可引自参考文献[58a]。）



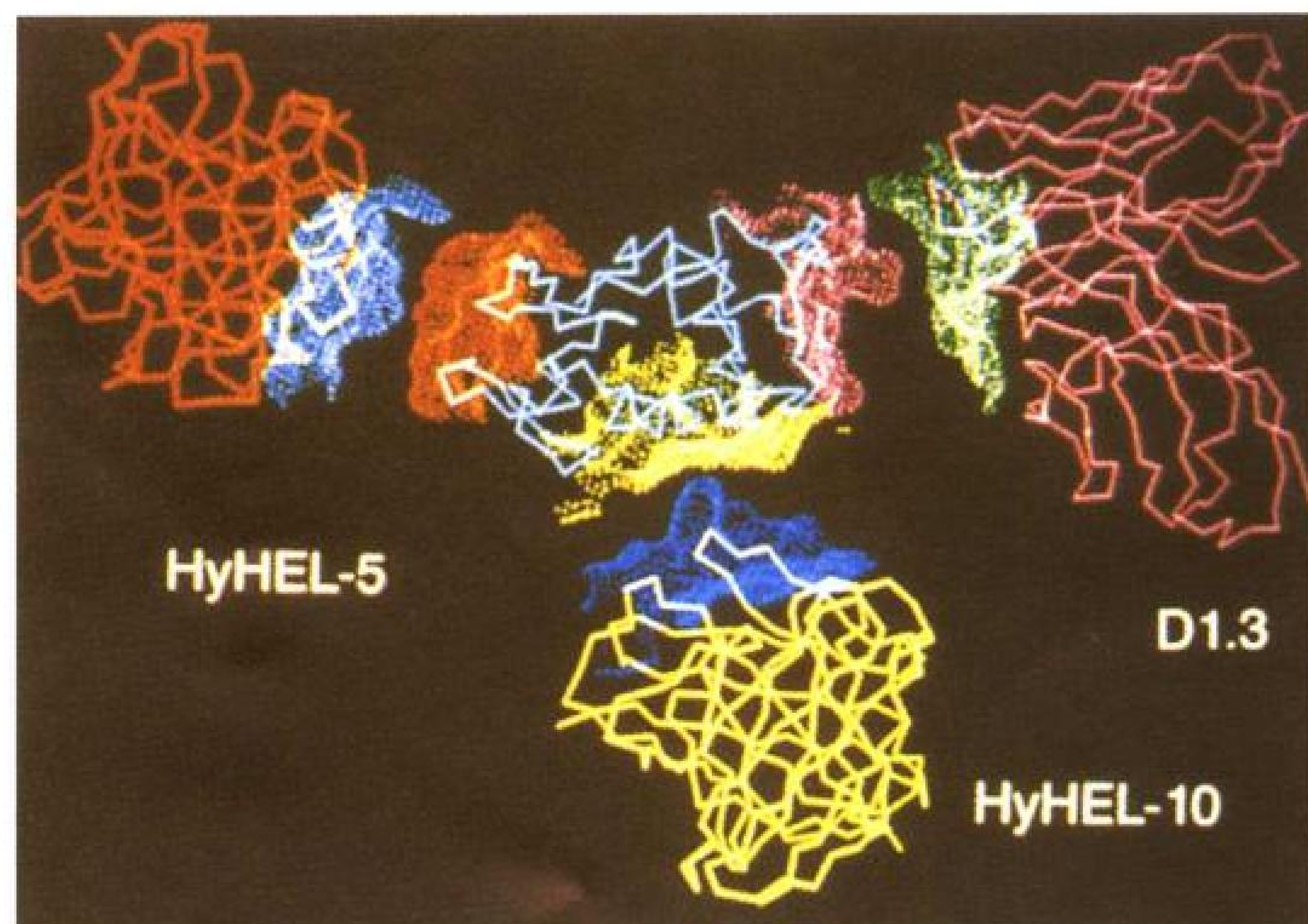
彩图3.4　免疫球蛋Fv片段α碳主链的条图。重链为蓝色，紫色代表轻链。V_H和V_L结构域核心、不变的半胱氨酸、色氨酸和芳香族残基用黄色表示。Fv这种定位使抗原结合位点在顶部，C_H1/C_L应当在底部（经允许摘自参考文献[42]。）



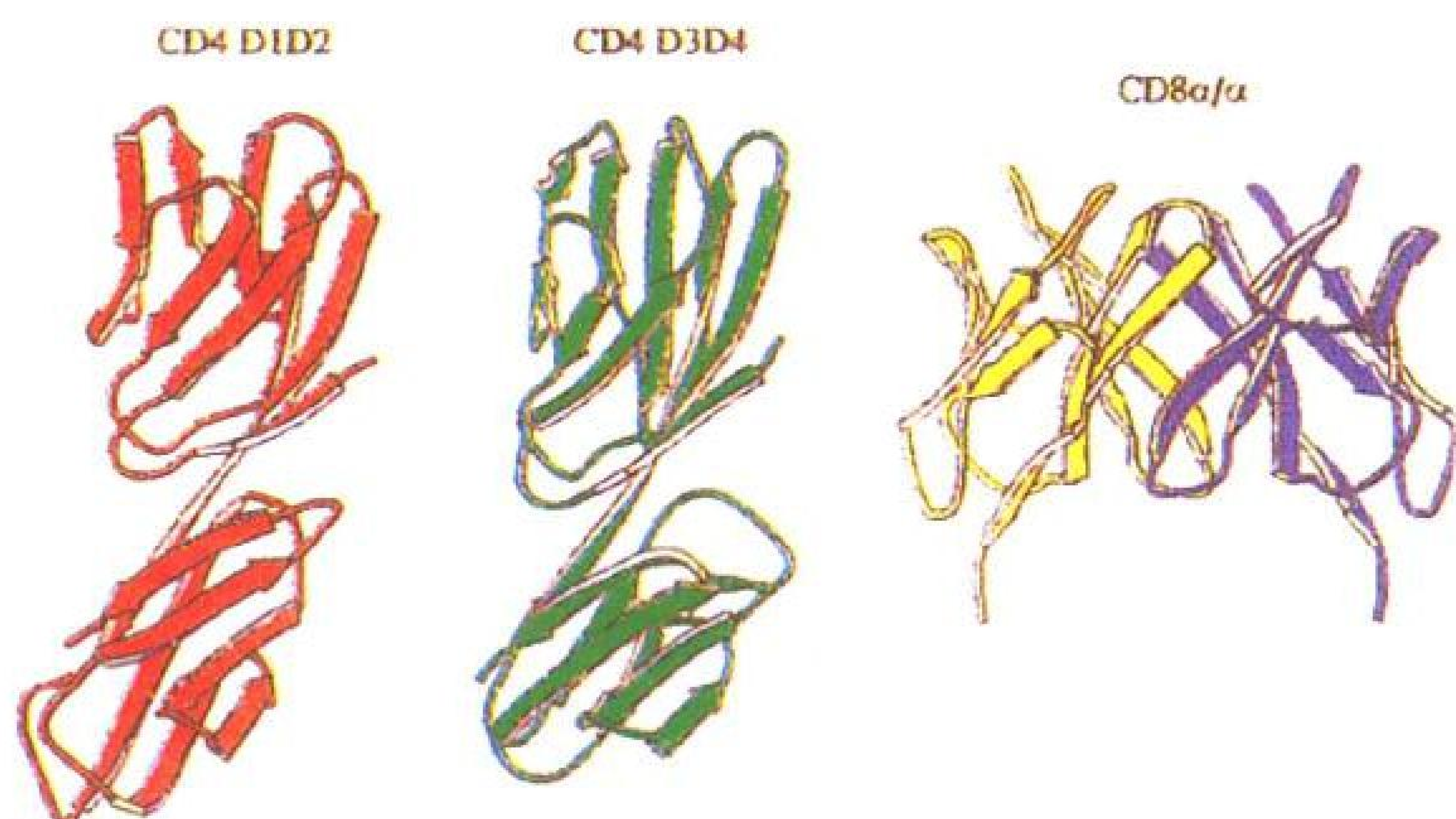




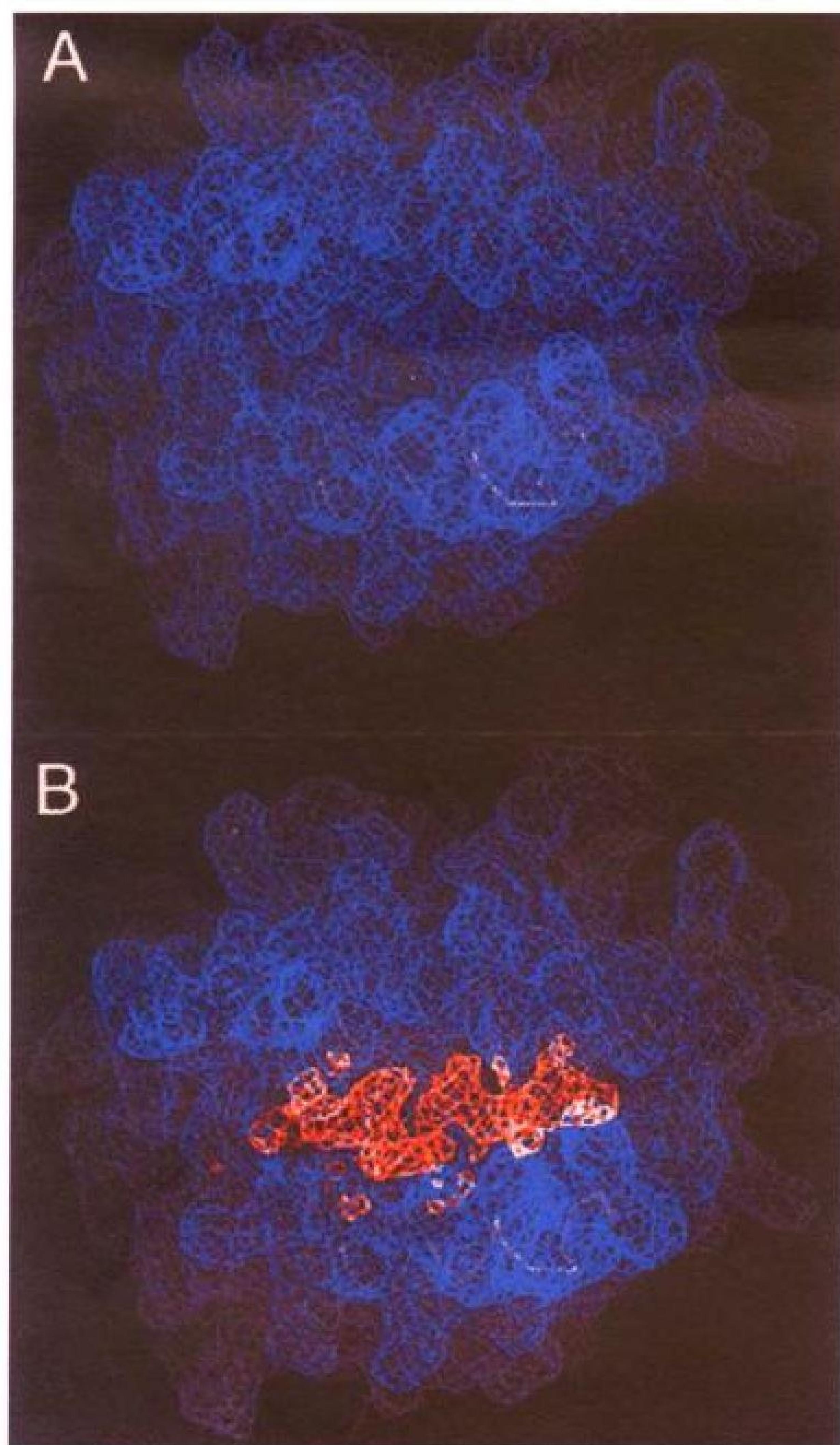
彩图 3.5　溶菌酶－抗溶菌酶抗体(Fab D1.3)复合物模式图。溶菌酶分子以绿色标示，其谷氨酰胺残基 121 用红色表示，D1.3 重链为蓝色，轻链为黄色。A 中显示的是复合物在晶体衍射中的图像，两分子以各自平的尾部相互作用。B 中、两个分子分开显示以展示其结构上的互补性。C 中，分子被转向读者以显示相互接触的重要氨基酸(用红色标示，而 Gln-121 显示为紫色)。（经允许摘自参考文献[109a]。）



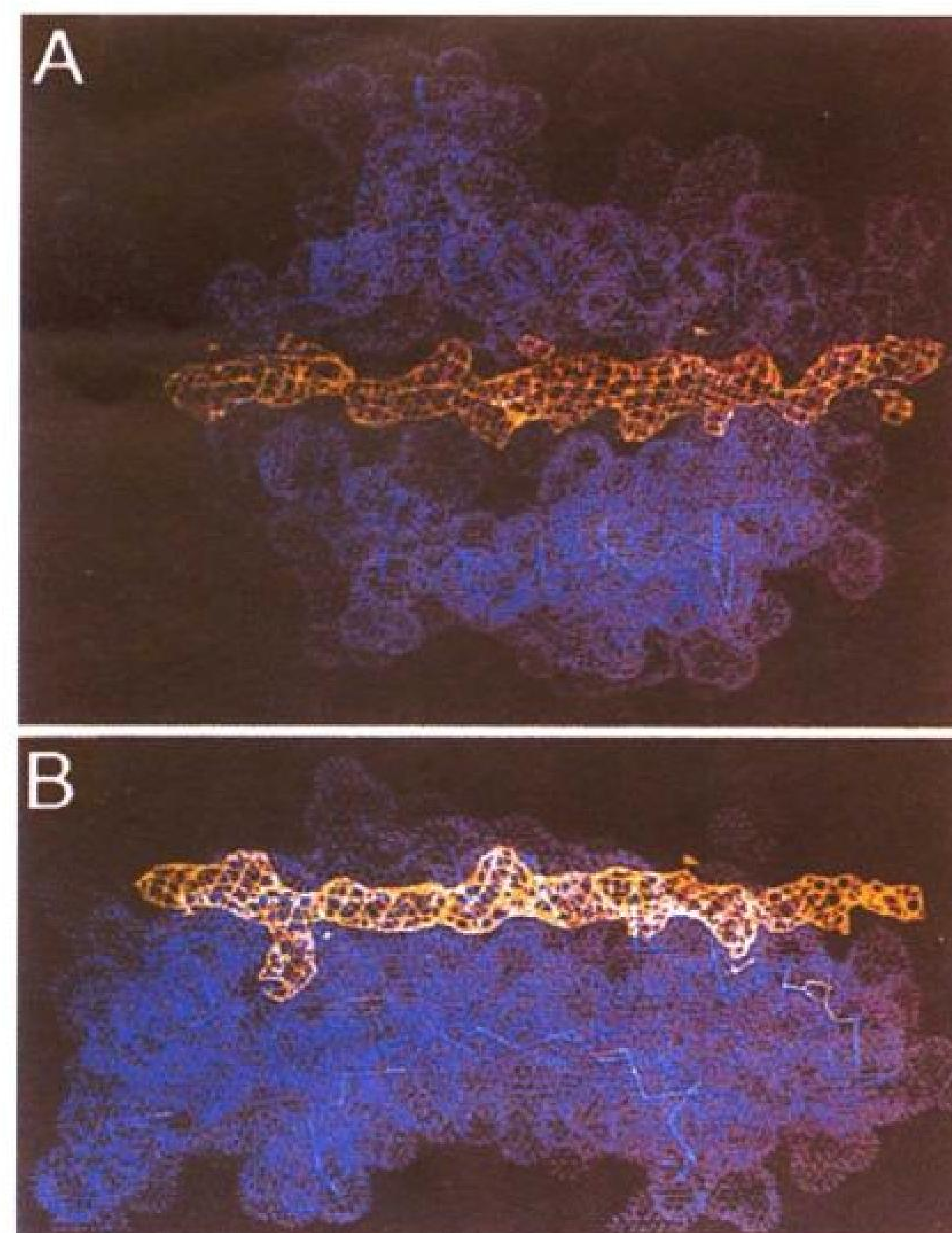
彩图 3.6　溶菌酶和三种抗溶菌酶复合物的模型。Fab D1.3(彩图 3.5)同两种额外的抗体：HyHEL-5(左方)和 HyHEL-10(下方)一起包括进来作为参考。除涉及结合作用的彩色范德华作用表面外，分子也是以 α 碳主链表示。（经允许摘自参考文献[110]。）



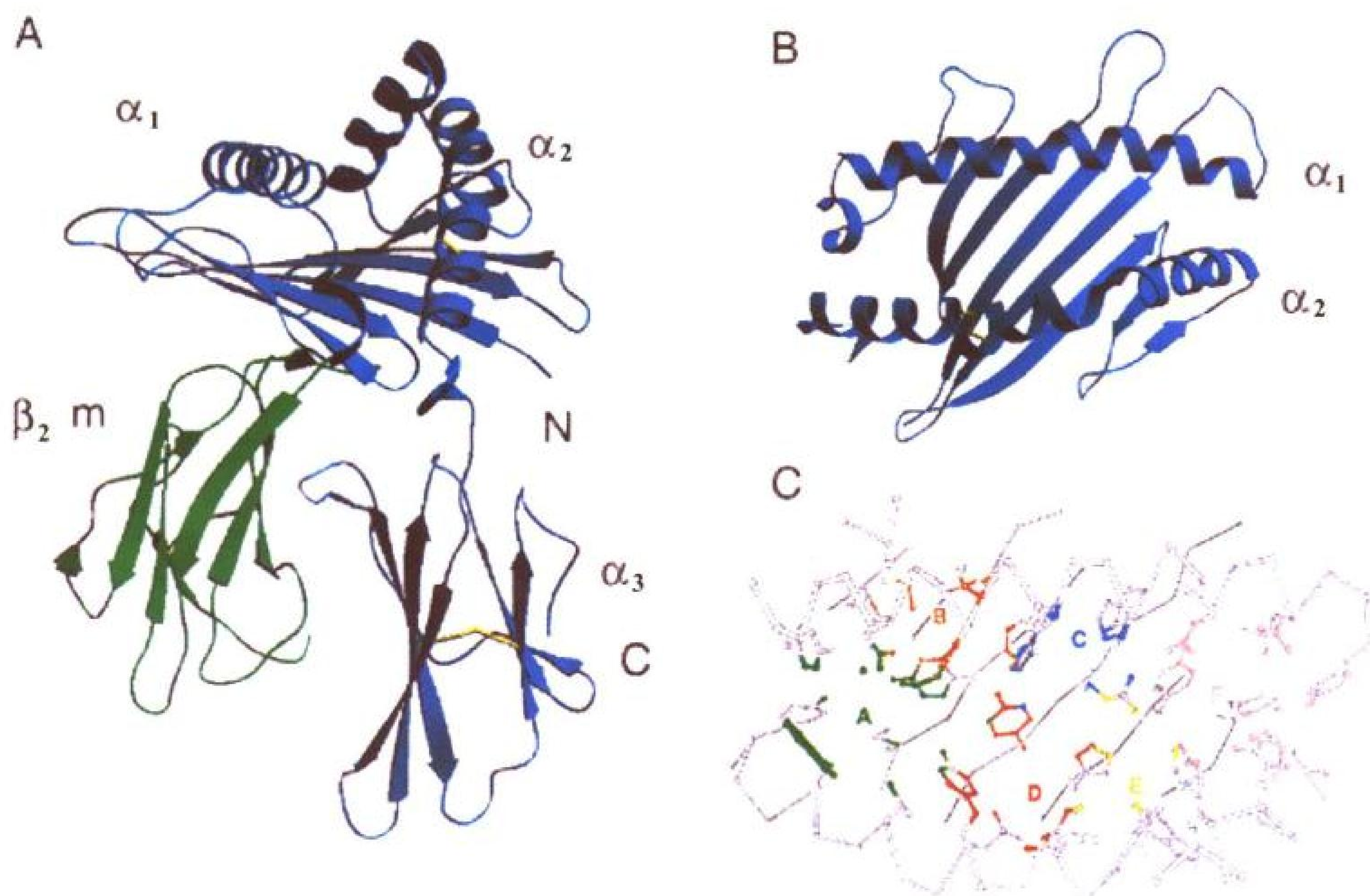
彩图 3.7　CD4 D1D2 (红色)、CD4 D3D4 (绿色)和 CD8 α / α 同型二聚体（一个亚基为黄色，另一个为蓝色）条图。注意连接 D1 至 D2、D3 至 D4 的 β 折叠股的连续性。这导致 D1D2 和 D3D4 区段成为一刚性较大的结构。(经允许引自参考文献[207]。)



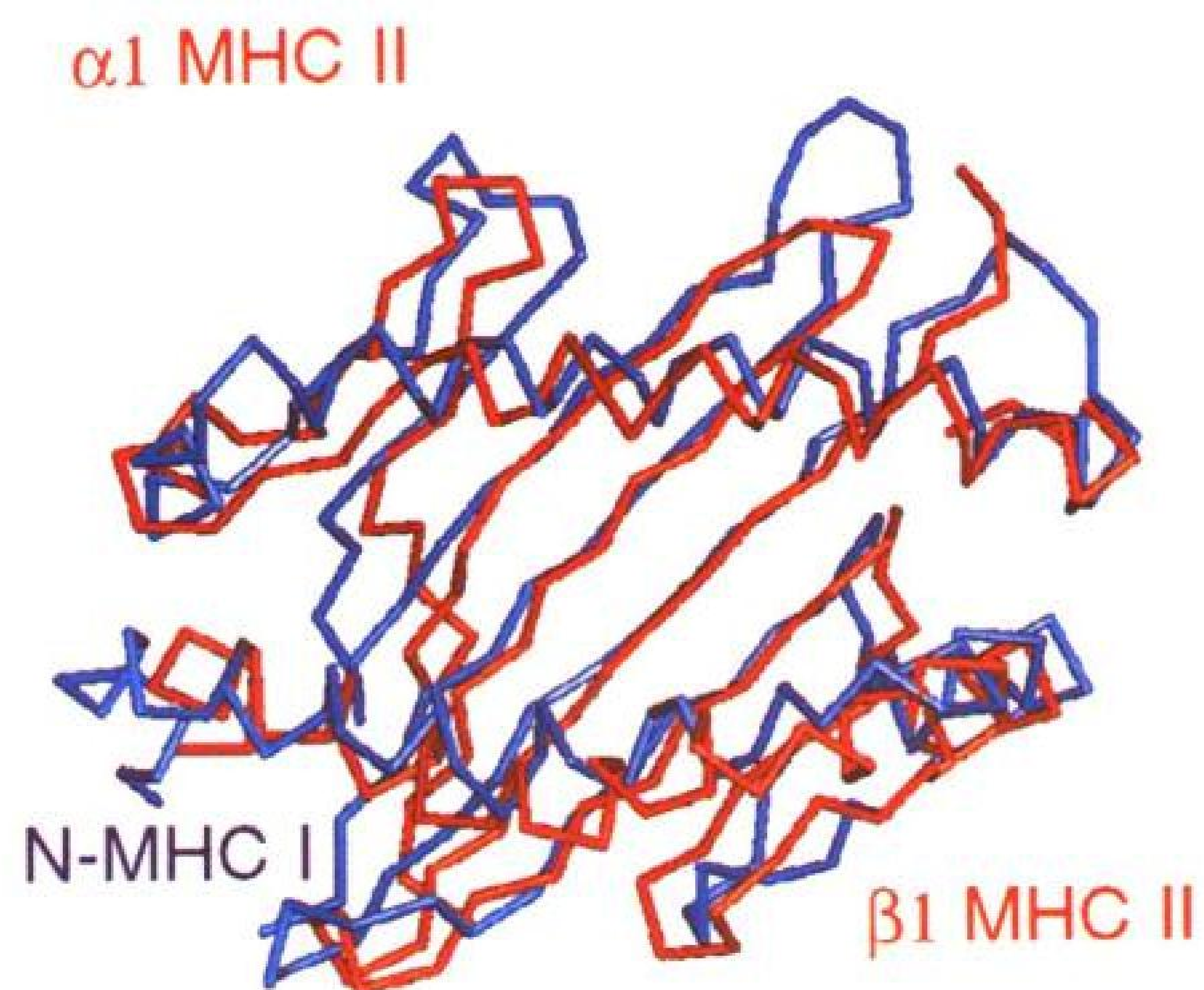
彩图 8.1 HLA-A2 沟槽中的电子密度。A:HLA-A2结构表面观; B:不能用蛋白质的氨基酸序列来解释的电子密度[183]。



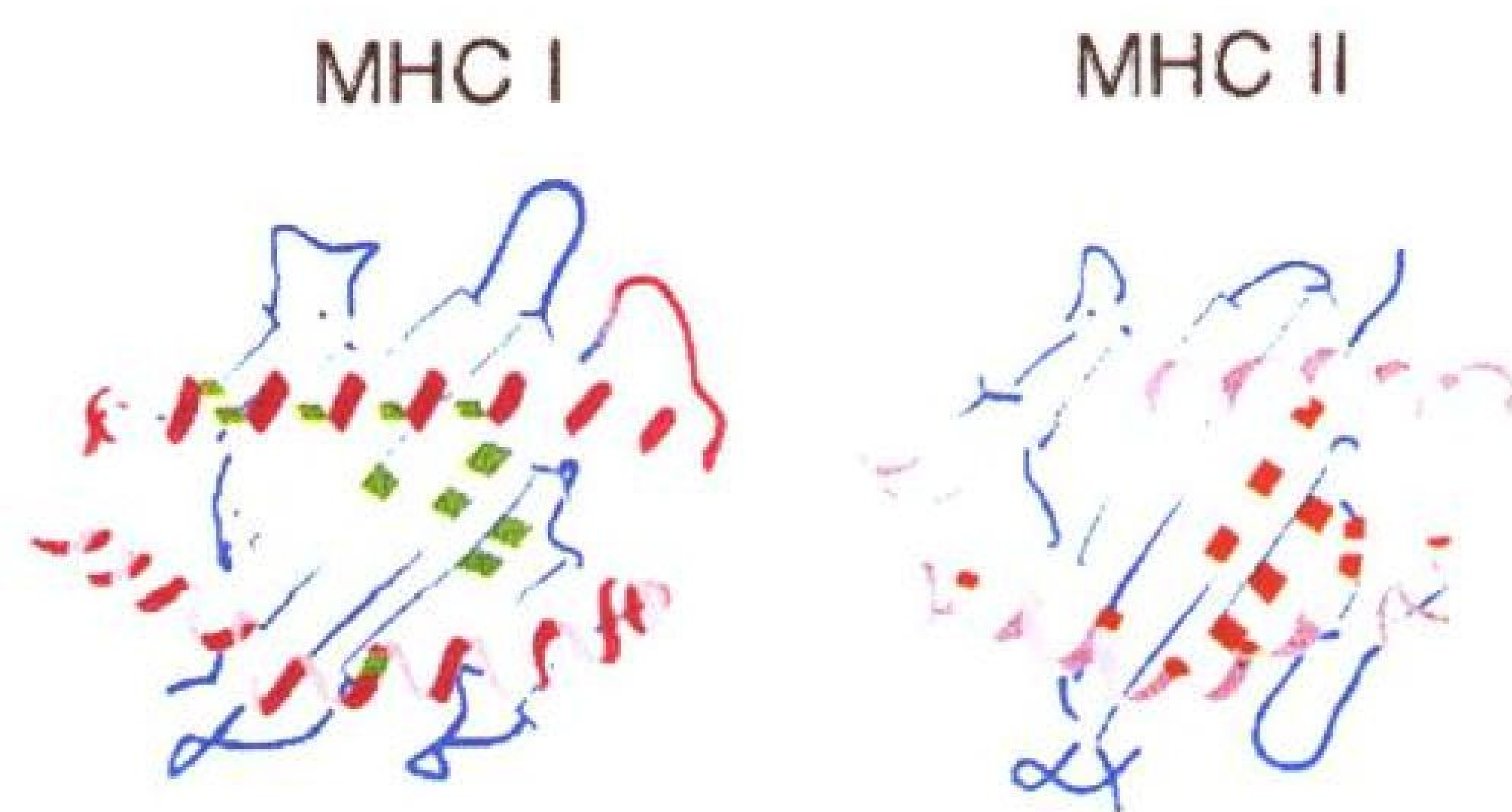
彩图 8.2 HLA-DR1 沟槽中的电子密度定位。A:MHC Ⅱ结合沟槽典型的上面观，有 α 1 螺旋（上）和 β 1 螺旋（下）。B: 正交视图。β 1 螺旋靠近结合的肽。在本图中，MHC Ⅱ 表面用蓝色表示，而结合肽的电子密度用红色表示。（经许可引自参考文献[218]。）



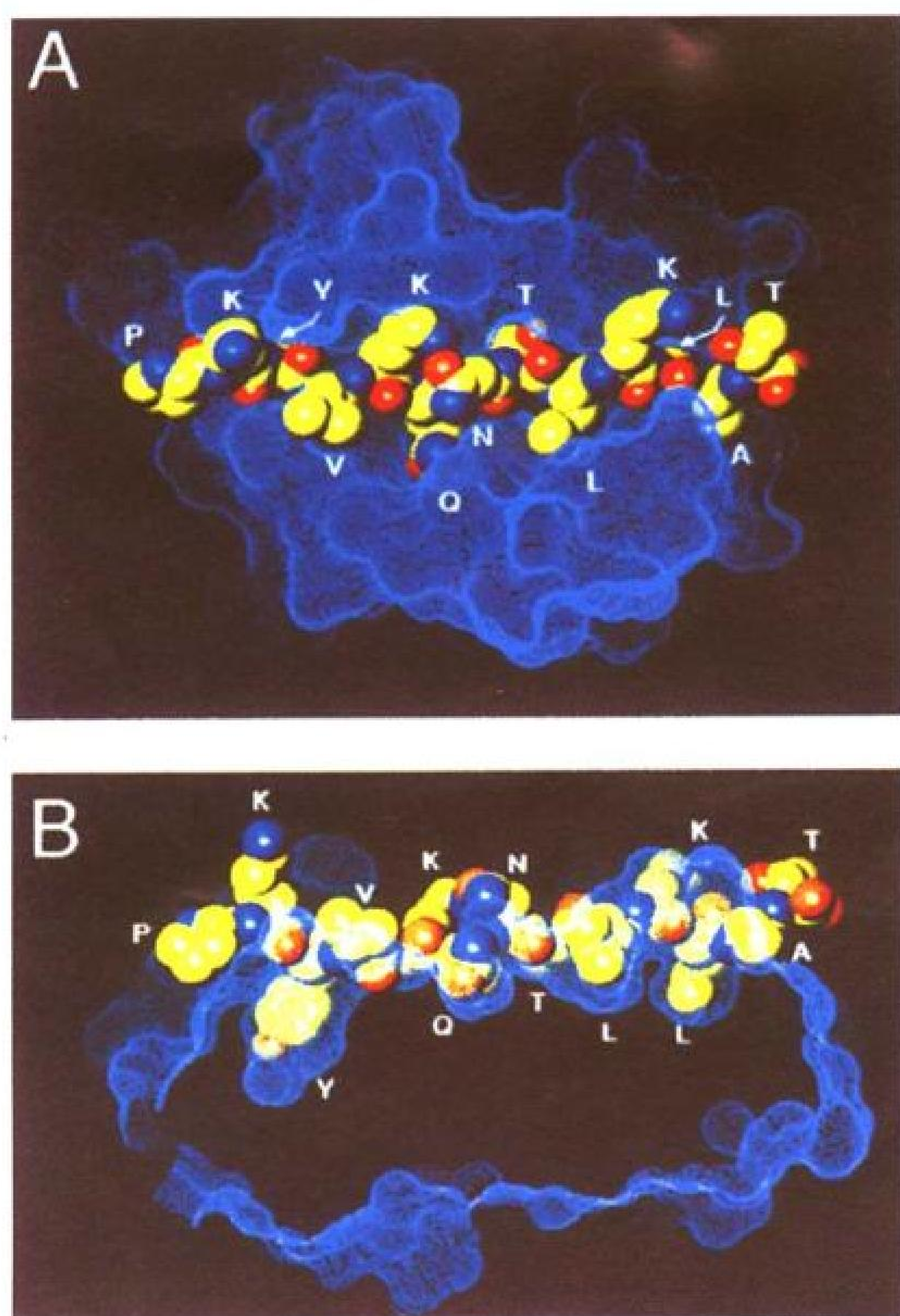
彩图 8.3 HLA-A*0201 彩色条带图。A:侧视图；B:俯瞰图；C:标明口袋 A — F 位置的俯瞰图。本图 A 部分和 B 部分是基于蛋白质数据库中的 3hla，用 SETOR[264] 软件制作的。C 部分直接引自 Saper 等[265]。



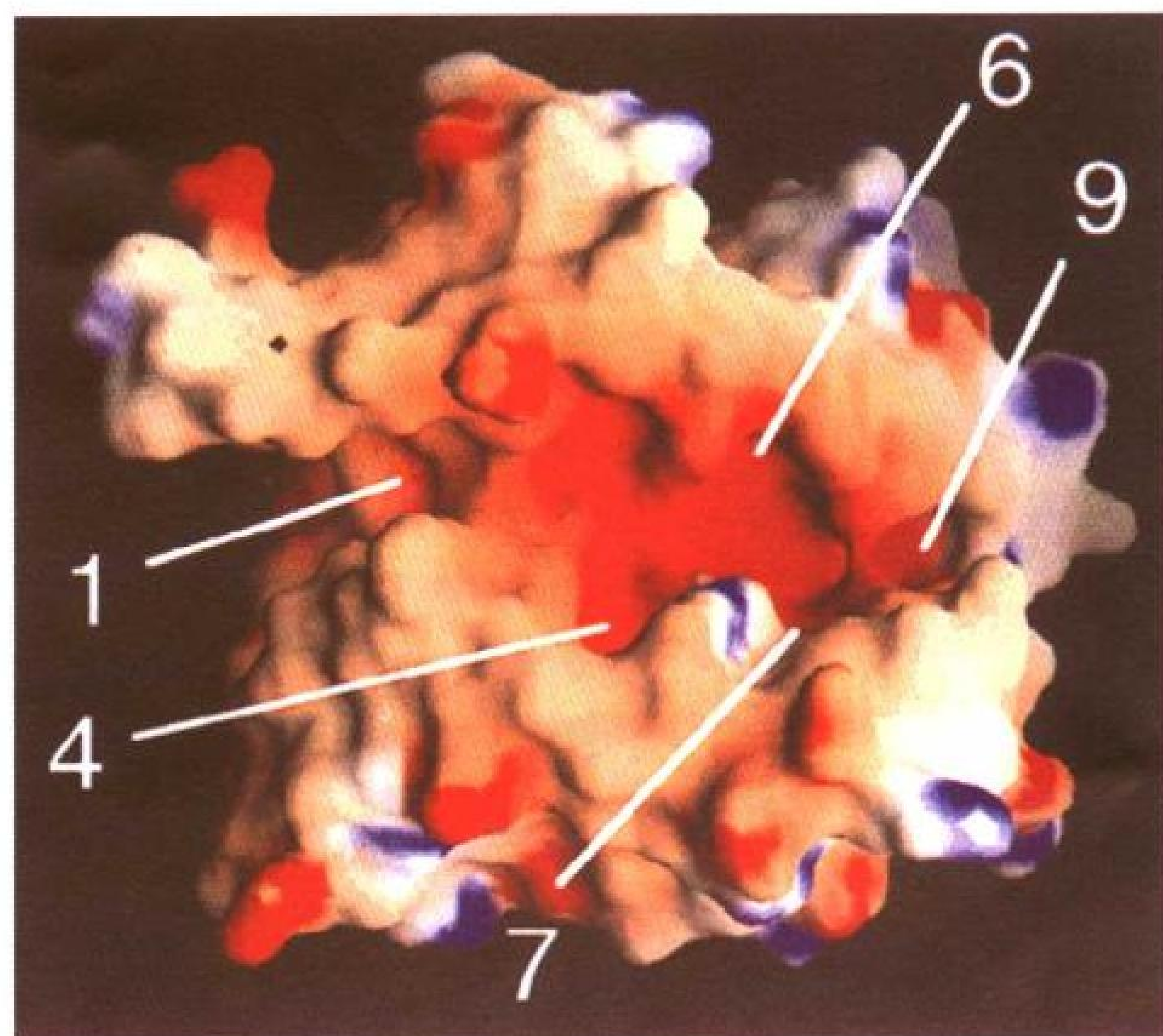
彩图8.4 MHC Ⅰ和MHC Ⅱ分子的α碳骨架叠合。图中显示了MHC Ⅰ分子HLA-A2(PDB 3hla)和MHCII分子HLA-DR1(PDB 1dlh)的α碳骨架。这两种分子用QUANTA 97（Molecular Simmulations, Inc.）展示并叠合。MHC Ⅰ分子的碳骨架显示为蓝色，其氨基端如图所示。相似地，HLA-DR的α1和β1的骨架显示为红色。两条链的N端如图所示。



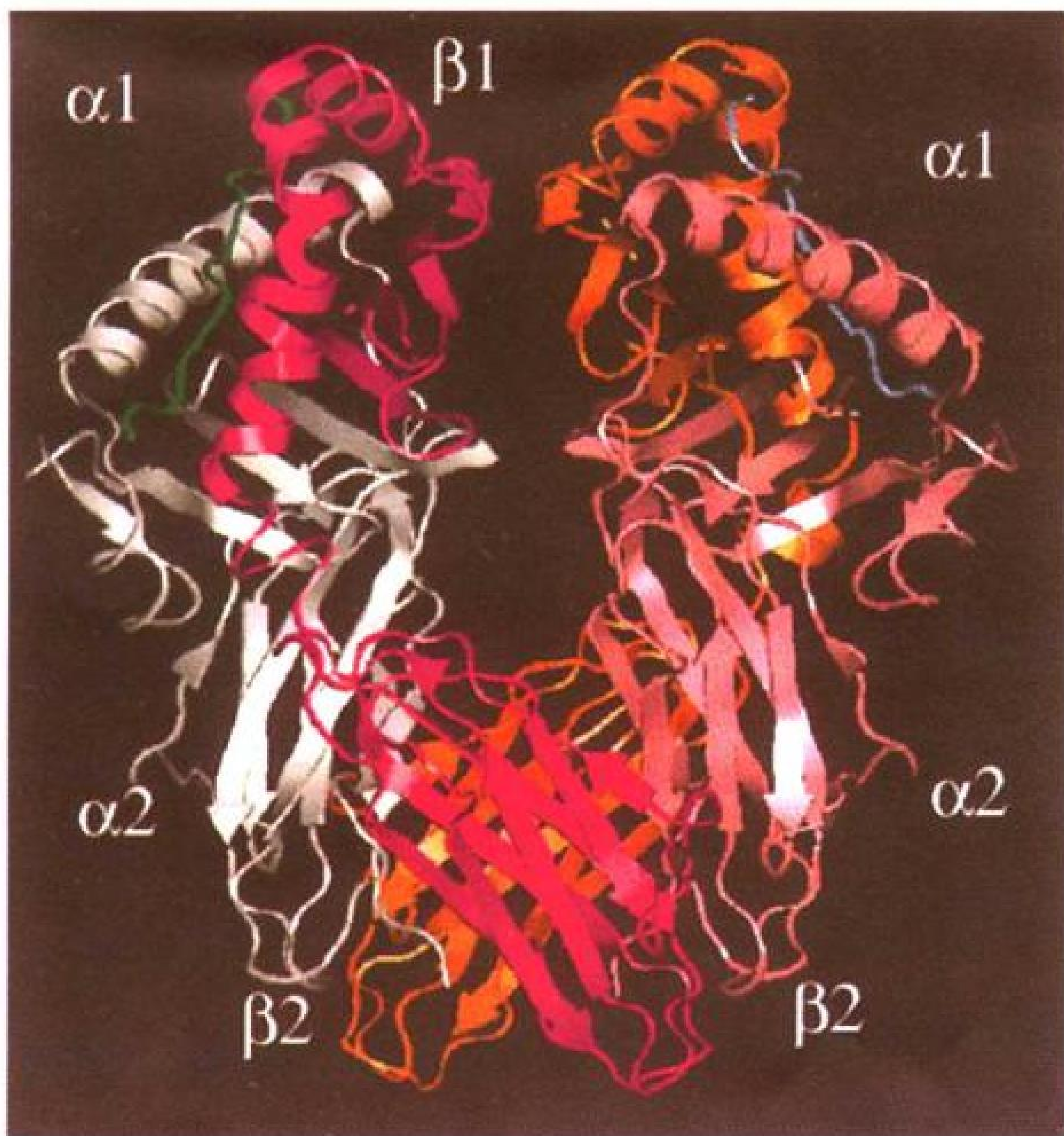
彩图8.5 MHC Ⅰ和MHC Ⅱ分子中的多态性氨基酸残基的位置。A:人MHC Ⅰ分子的多态性残基显示为绿色；B:人MHC Ⅱ分子的多态性残基显示为红色[262]。



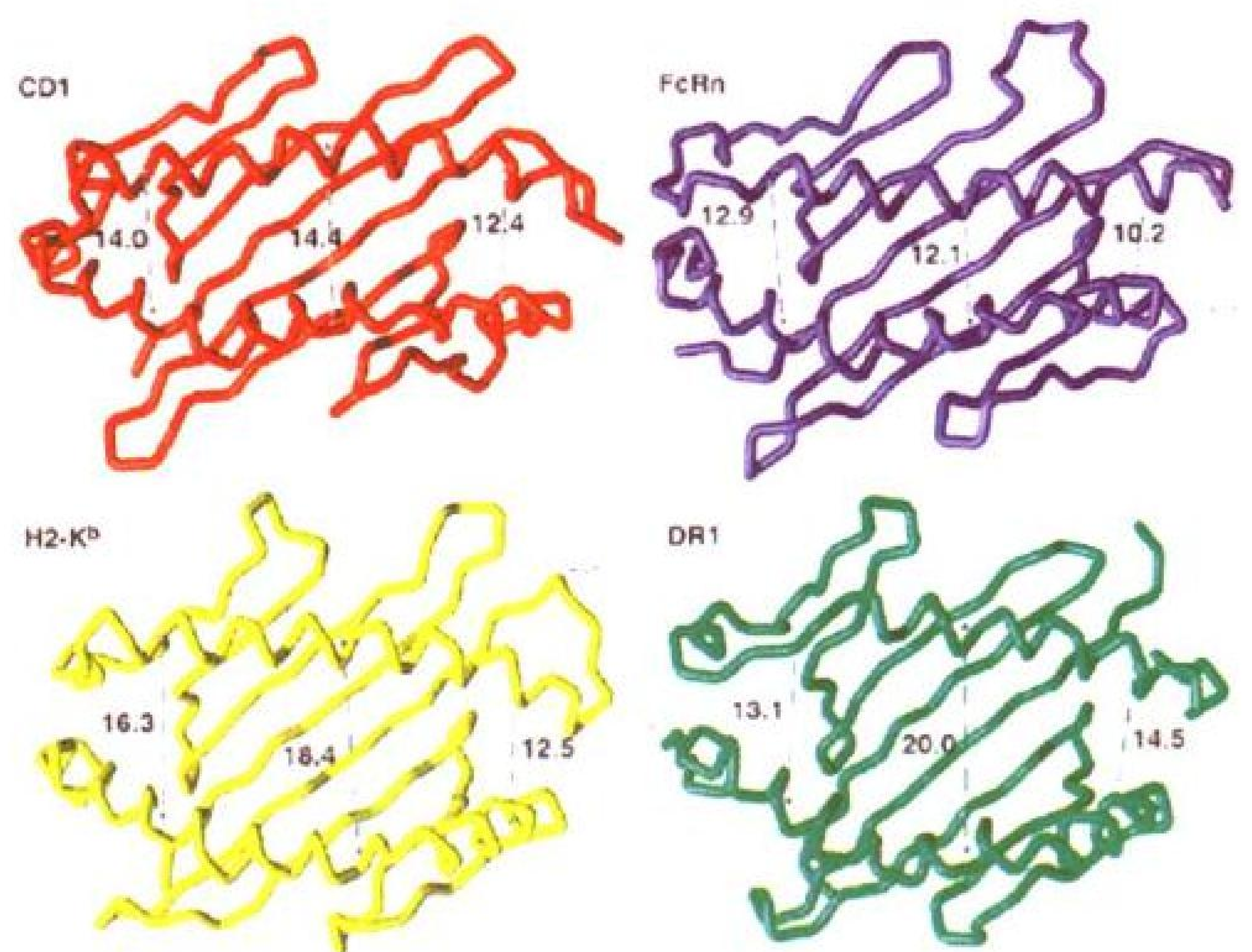
彩图8.6 基于HLA-DR1共结晶的HLA-DR1中口袋的位置，结合有一条来自于流感血凝素的肽。α1和β1结构域的表面图显示为蓝色。本图显示了结合肽PKYVKQNTLKLAT的空间填充模型。A:显示俯瞰图；B:显示侧视图[219]。



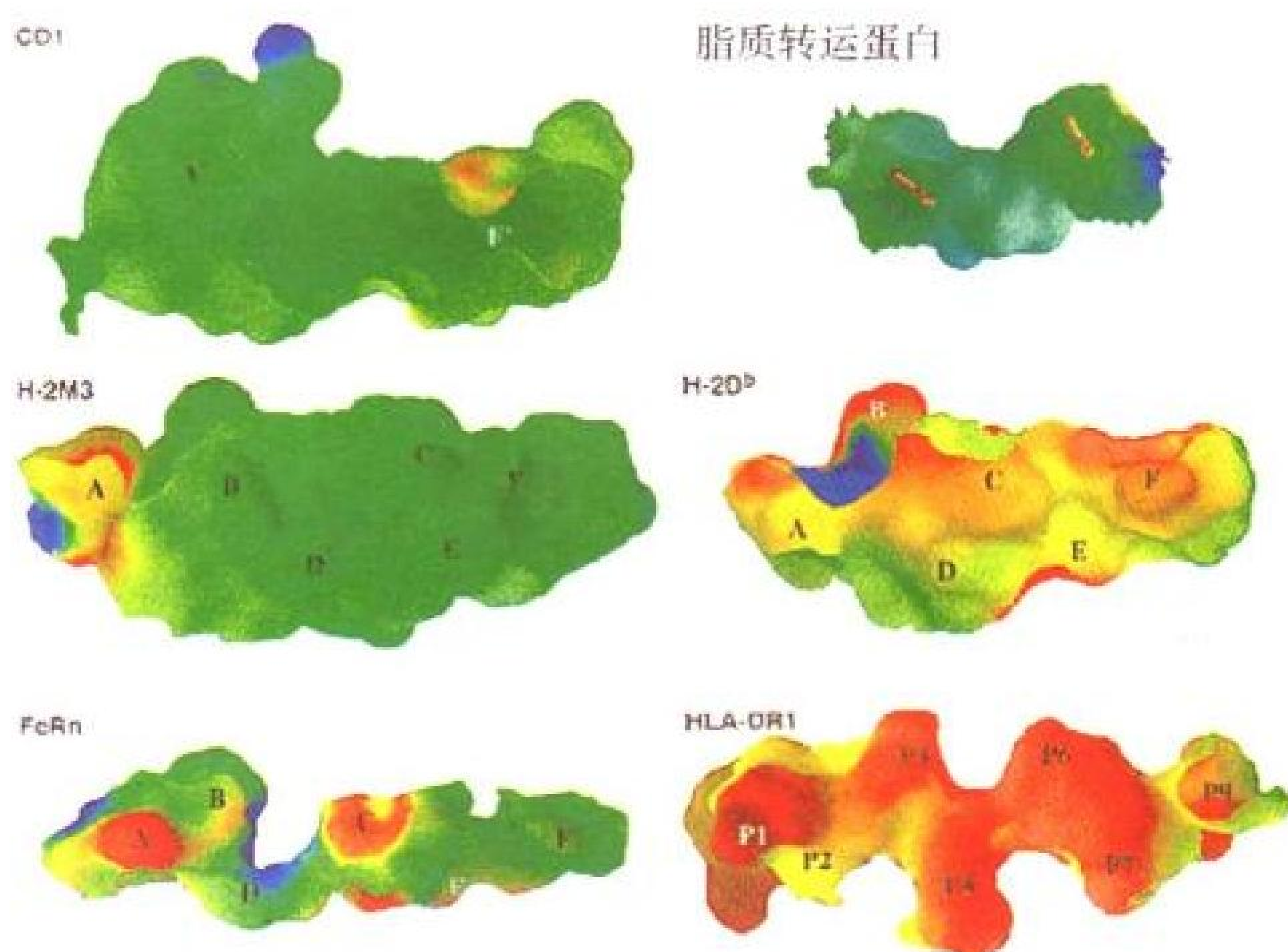
彩图8.7 根据Stern等[219]的HLA-DR1的结合沟槽的主要口袋编号。HLA-DR1(PDB文件1dlh)的结构用GRASP[266]显示。



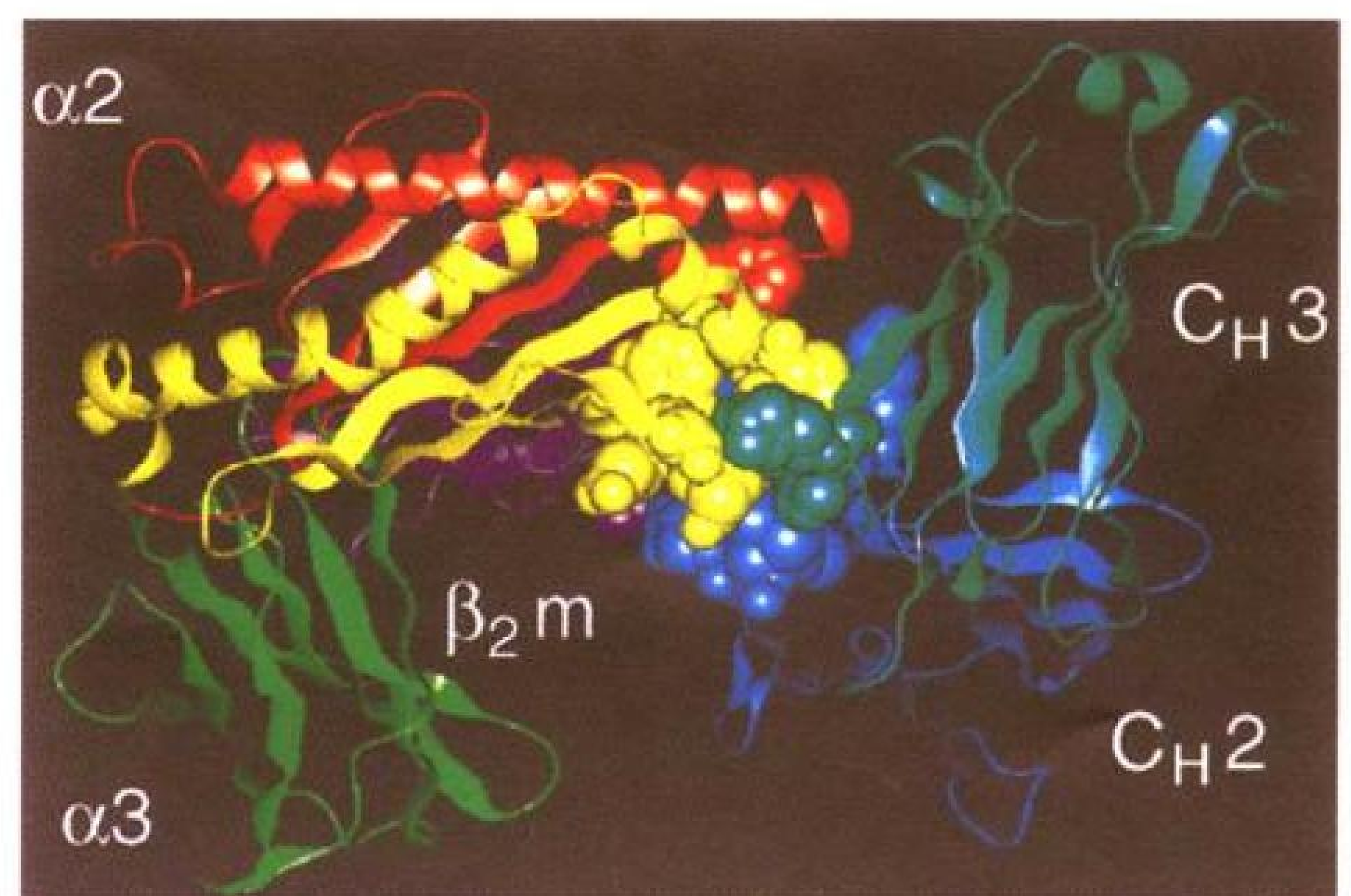
彩图8.8 HLA-DR1(PDB文件1dlh)的带形图，显示了二聚体中的二聚体结晶学的位置，还显示了该蛋白个别结构域的定位。α链显示为灰色和桃红色，β链为洋红色和橙红色，肽为蓝色和绿色。本图用QUANTA 97软件制作。



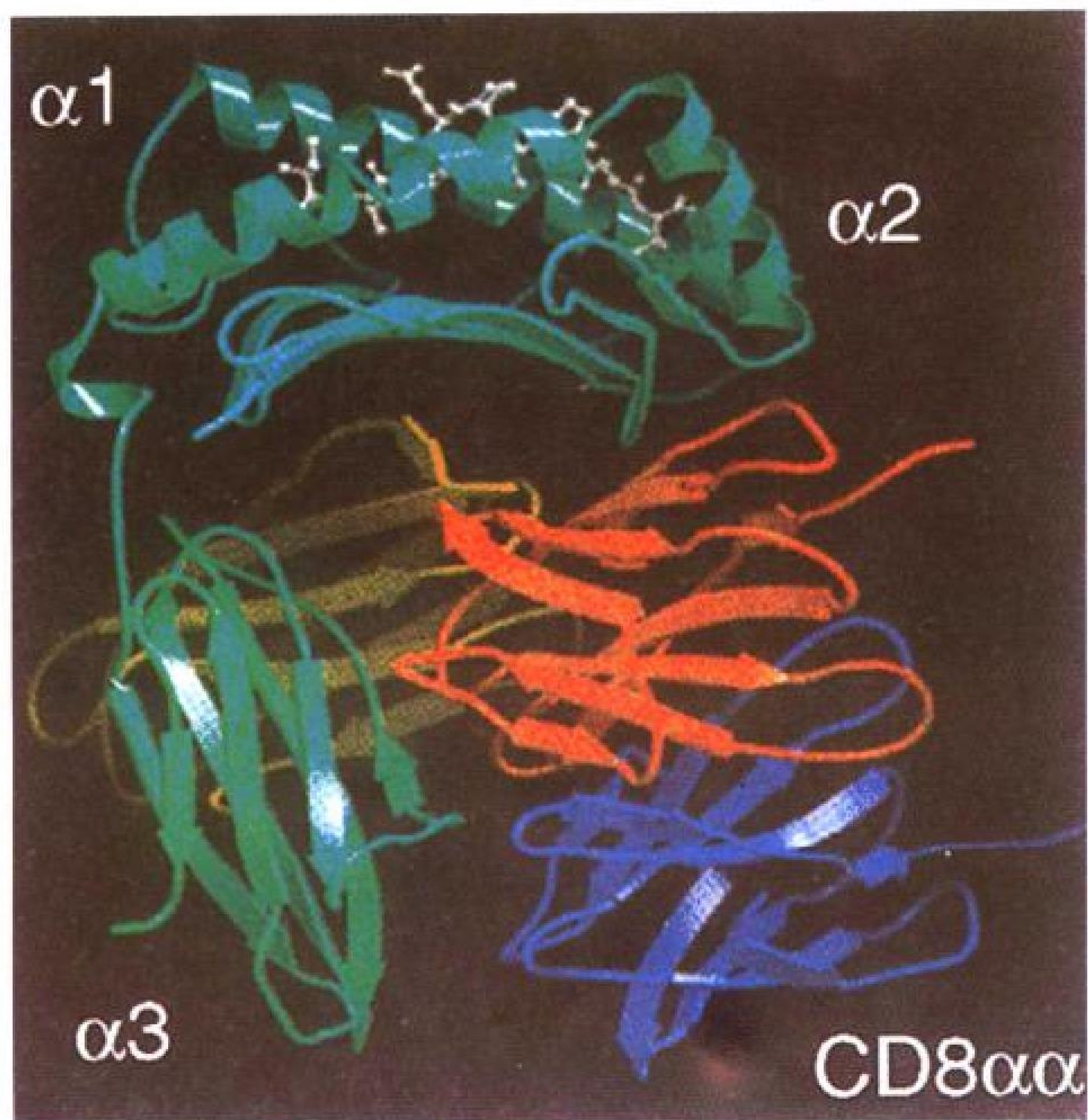
彩图8.9 MHC Ⅰ分子H-2K^b、MHC Ⅱ分子HLA-DR1和MHC Ⅰb分子CD1和FcRn的肽结合沟槽α碳链骨架的走形和大小的比较[235]。



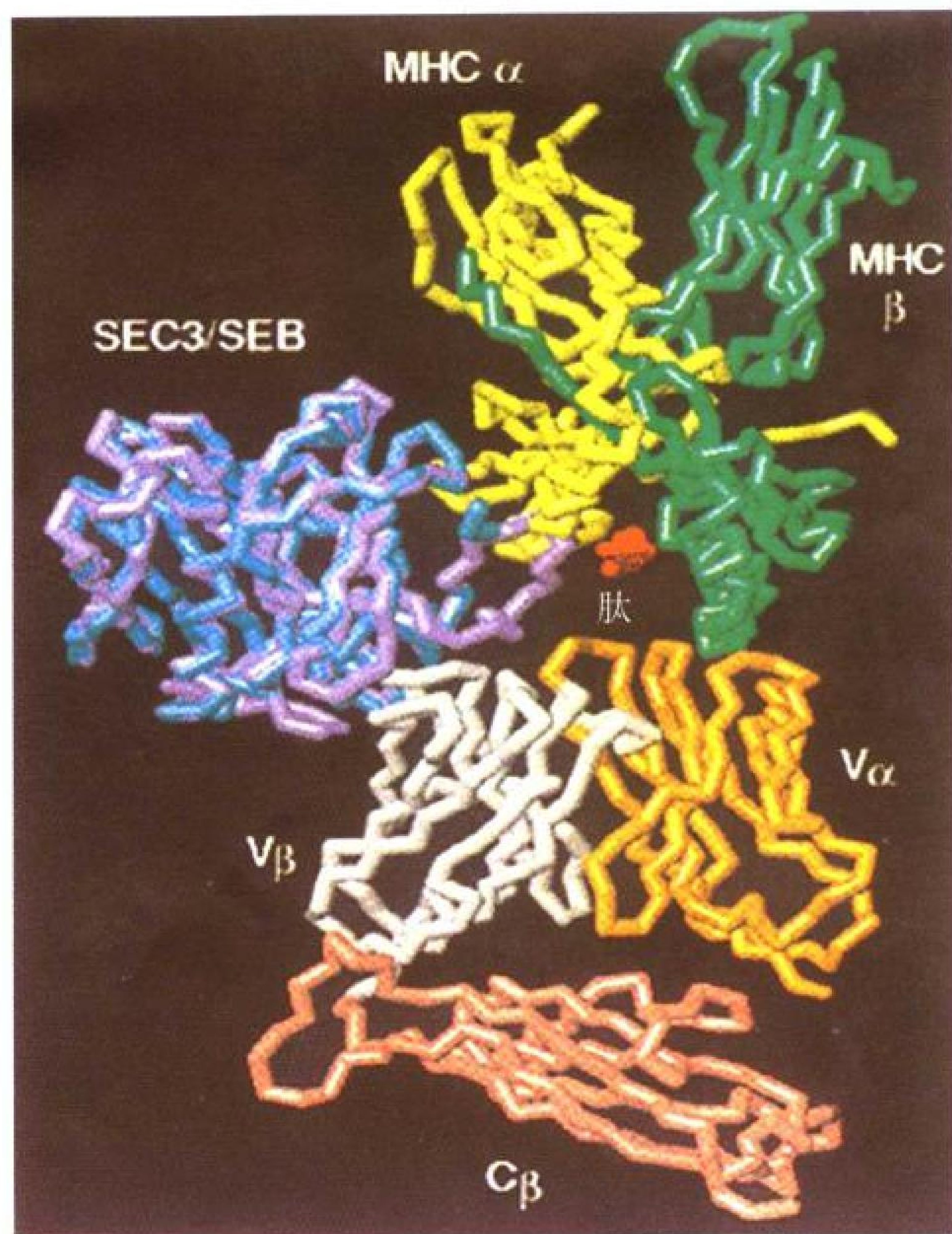
彩图8.10 CD1结合沟槽的形状、大小和电荷，以及同其他多种MHC分子和一个已知脂质转运蛋白的比较。结合沟槽表面图的酸性区用红色表示，碱性区用蓝色表示，中性区用绿色表示[235]。



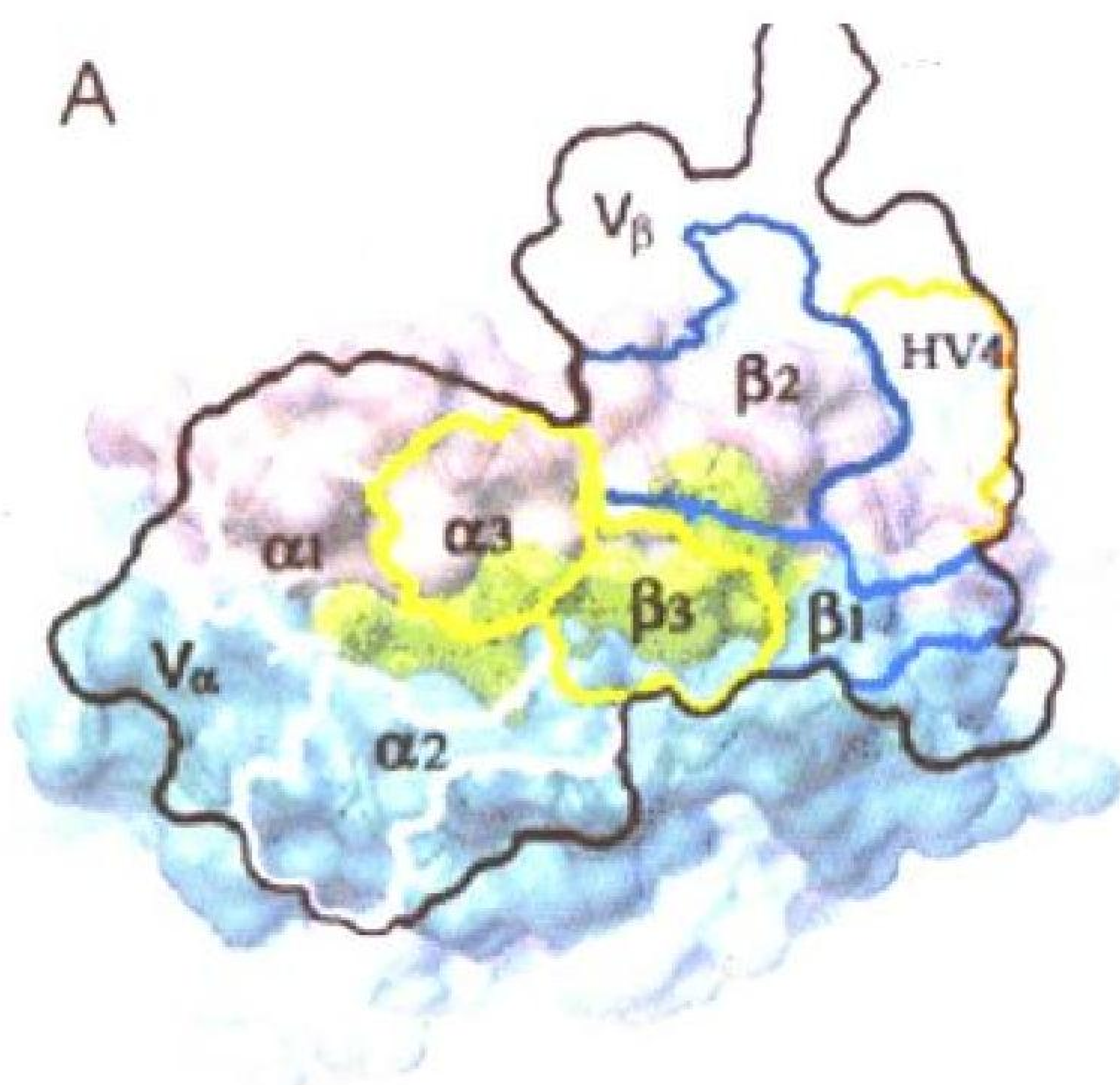
彩图8.11 MHCIb分子FcRn和免疫球蛋白Fc间主要的相互作用。FcRn和Fc的带形图如图显示，α1、α2、α3和$β_2m$分别用红、黄、绿和紫色表示；Fc(C_H2和C_H3结构域)用蓝色和淡绿色表示。主要接触残基用空间填充结构显示(α1结构域，残基90；α2，残基113~119和131~135；$β_2m$，残基1~4和86)。(经许可摘自参考文献[243]、[267]。)

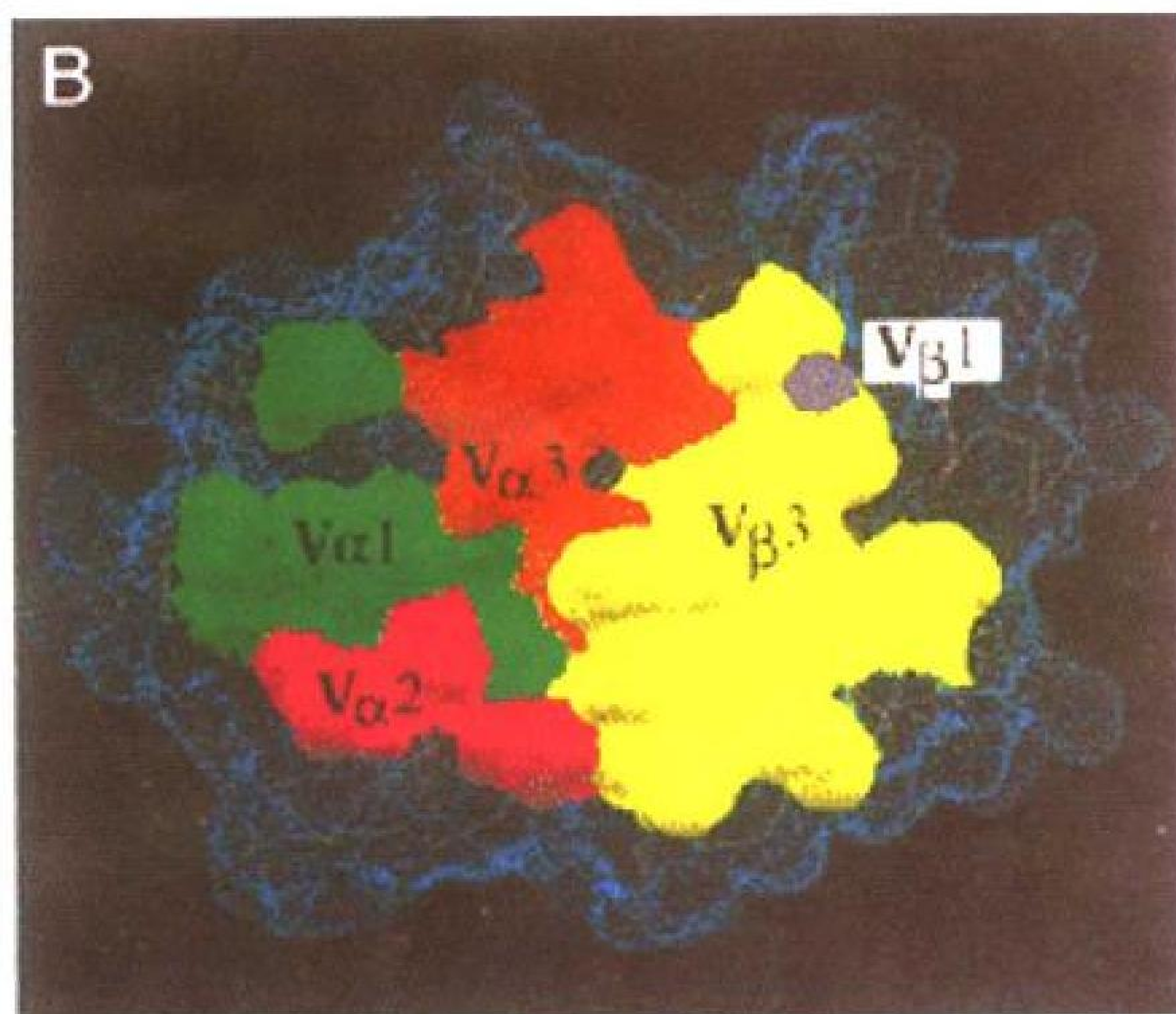


彩图 8.12 共受体 CD8 同 MHC Ⅰ分子 α 3 结构域的相互作用 MHC Ⅰ分子 HLA-A2 展示出其 α 1、α 2 和 α 3 结构域，结合于用红色和蓝色表示的 CD8 α α 同源二聚体。（经允许引自参考文献[246]。）

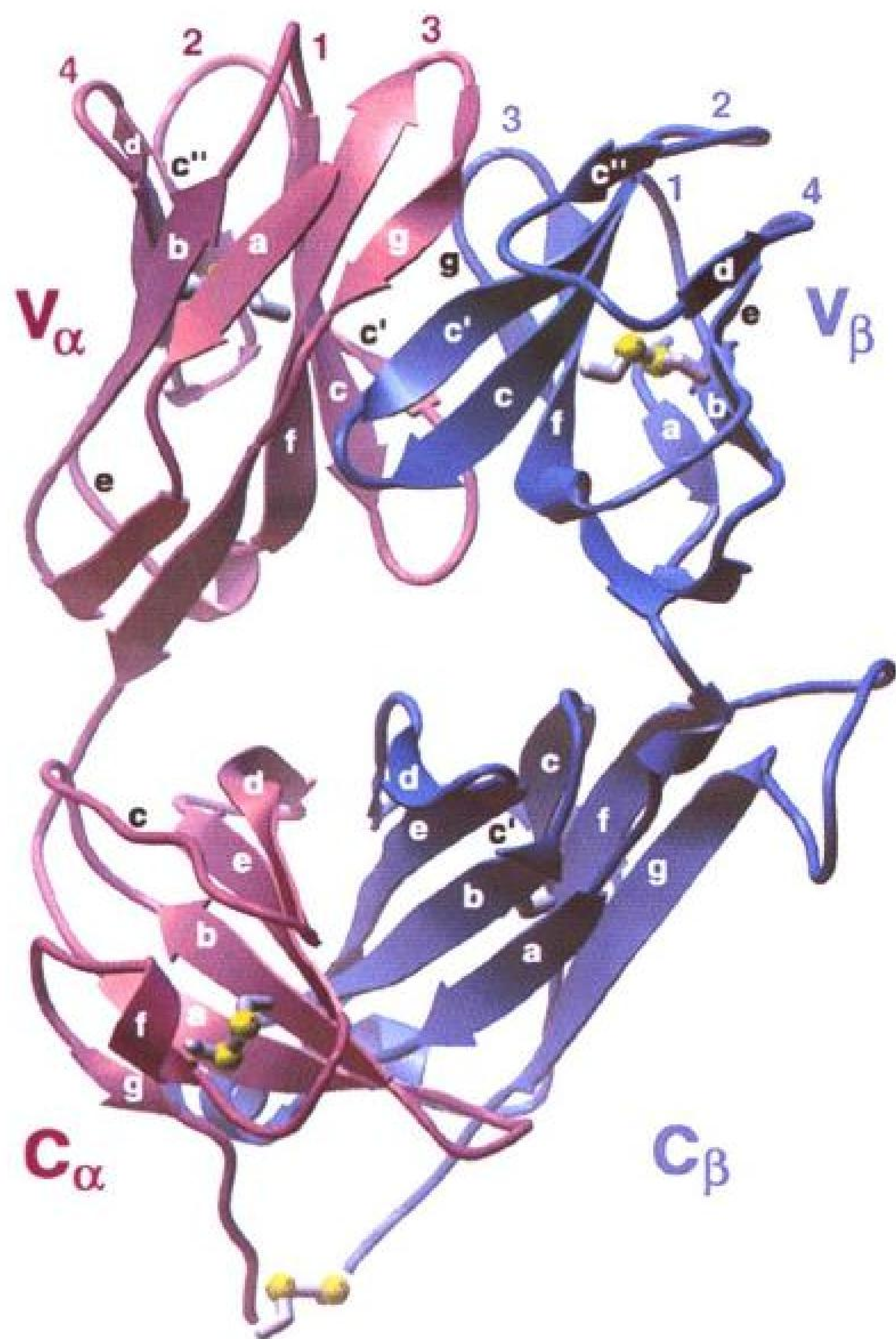


彩图 8.13 超抗原 SEC3 和 SEB 同 HLA-DR1 结构域相互作用的一个模式图，其由 TCR 的 V_{β} 结构域所衬托。（经许可引自参考文献[268]。）



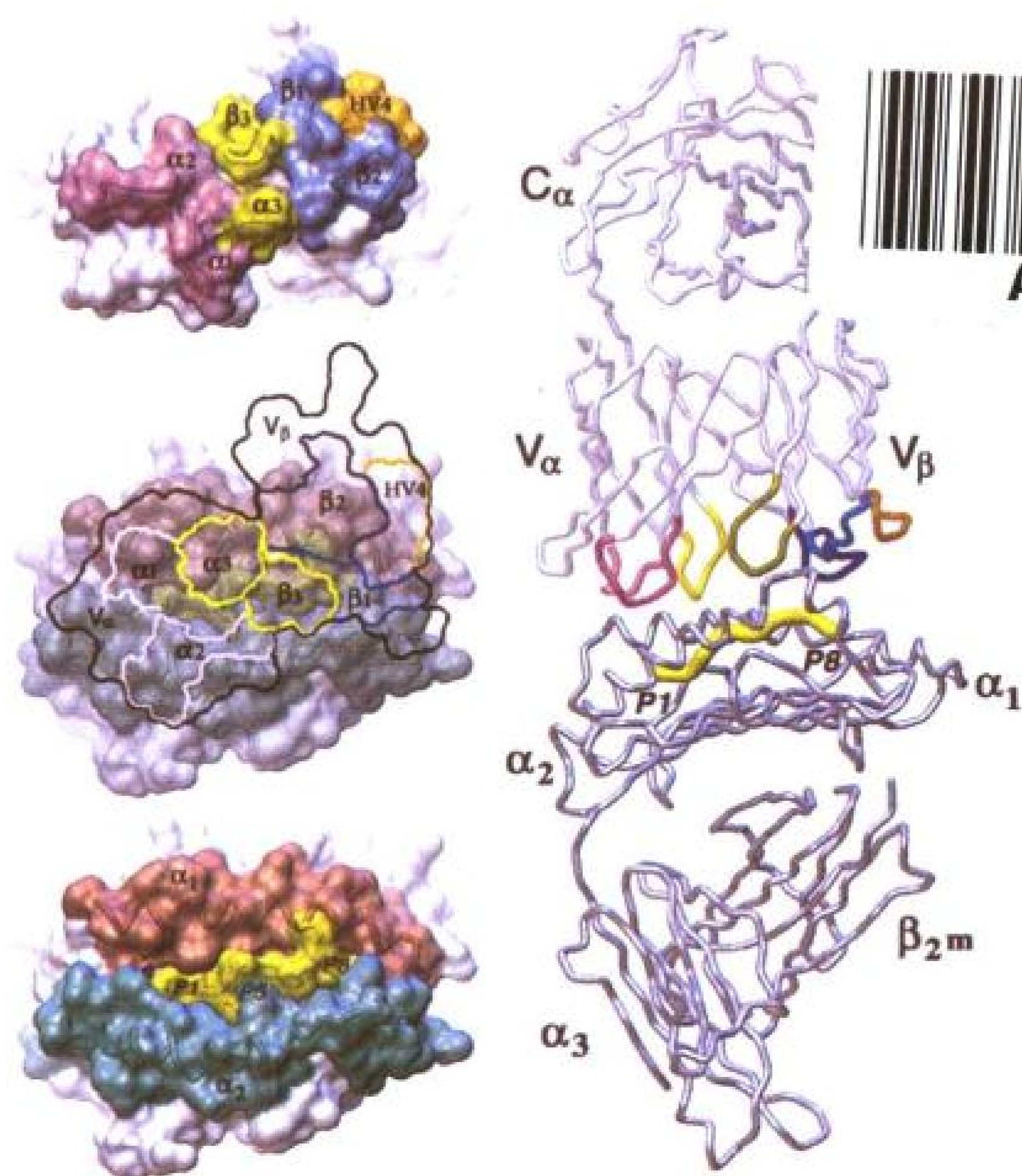


彩图 8.14 TCR 同 MHC Ⅰ-肽复合物关系图。图 A 部分显示 2C TCR 同 H-2K^{b} 及 dEV8 肽形成的复合物。（经许可引自参考文献[228]。）图 B 部分显示 A6 TCR 同 HLA-A2 与 Tax 肽形成复合物的足迹。（经许可引自参考文献[227]。）

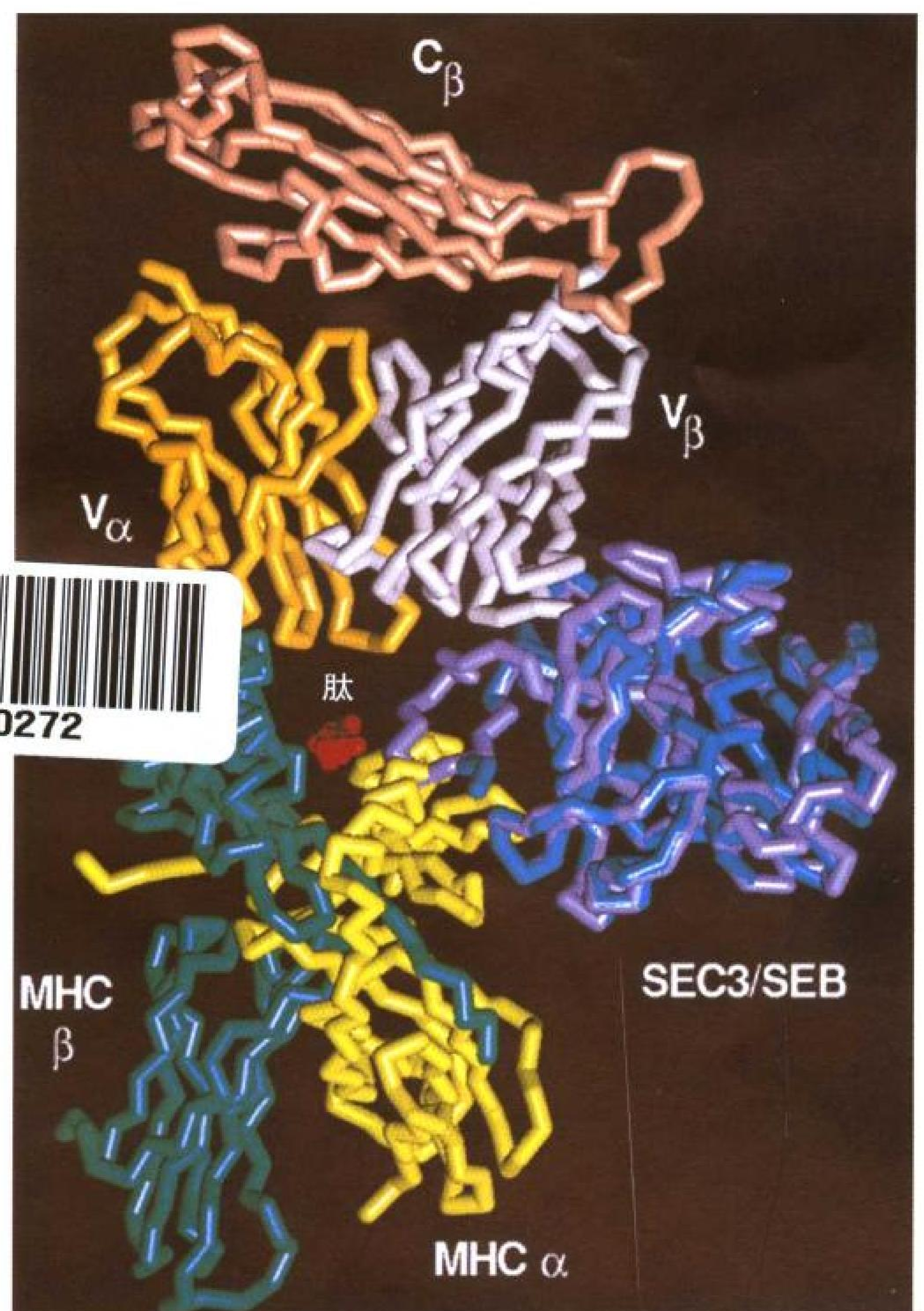


彩图 10.1 完整的TCR α β结构。第一个TCR α β异二聚体结构的带状图来自Garcia等的研究[43]。所有结构内β链均以字母标明，而CDR1、2、3和4环以数字标明。





彩图 10.2 TCR-肽-MHC复合体的晶体结构图。MHC结合的核心肽锚定残基表示为P1、P5和P8，TCR V_{α}和V_{β} CDR区域表示为α 1（对于CDR1 α）、α 2等。MHC α螺旋标记为α 1、α 2。（引自参考文献[43]。）



彩图 10.3 TCR β/超抗原复合体的晶体结构。Fields等[248]晶体化了TCR-SAg复合体，从MHC Ⅱ类分子与相同超抗原的结构，可推断出三个分子的相对空间排列。这一模型提示TCR并不与MHC紧密接触，这与对SAg激活的相对肽不敏感性一致。